

Charakterisierung des Disintegrins
ADAM15

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Stephan

aus Wuppertal

Düsseldorf, November 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Werner Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Nervensystem	1
1.2	Das ZNS und dessen vorherrschende Zelltypen	1
1.3	Das PNS und Schwannzellen	2
1.4	Dorsale Spinalganglien (dorsal root ganglion, DRG)	4
1.5	ADAM15 und die ADAM-Proteinfamilie	5
1.6	Vermutete Funktionen von Mitgliedern der ADAM-Proteinfamilie	10
1.7	Mögliche Interaktionspartner in der Extrazellulärmatrix	12
1.8	Integrine, mögliche ADAM15-Interaktionspartner in der Zellmembran	13
1.9	Arbeitshypothese zur Rolle von ADAM15 während der Nervenregeneration	14
1.10	Ziele	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Abkürzungen	16
2.2	Chemikalien und Antikörper	18
2.3	Puffer und Lösungen	20
2.4	Oligonukleotide	22
2.5	DNA	23
2.5.1	DNA-Isolation	23
2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.5.3	Klonierung von PCR-Produkten	24
2.5.4	Sequenzierung	26
2.6	RNA	27
2.6.1	RNA-Isolierung aus dem Ischiasnerv der Ratte	27
2.6.2	RNA-Isolierung aus Zellen der Zellkultur	27
2.6.3	Reverse Transkription (RT) und RT-PCR	28
2.6.4	Quantitative PCR (Q-PCR)	28
2.7	Proteine	28
2.7.1	Protein-Isolation aus eukaryotischen Zellen	28
2.7.2	GST-Fusionsprotein-Isolation aus proteasedefizienten BL21 Zellen	29

2.7.3	Oberflächenbiotinylierung von Proteinen auf Schwannzellen und HeLa-Zellen	30
2.7.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.7.5	Western-Blot-Analyse	31
2.7.6	Enzymatischer Verdau des basischen Myelin Proteins (MBP) durch ADAM15	31
2.8	Zellkultur	32
2.8.1	Zellkultur von Schwannzellen der Ratte	32
2.8.2	Präparation und Kultivierung von dorsalen Spinalganglien (DRG) als <i>in-vitro</i> -Explantate	33
2.8.3	Immunhistochemische Färbung an dorsalen Spinalganglien als <i>in-vitro</i> -Explantate	34
2.8.4	Transiente Überexpression von ADAM15 in HeLa-Zellen	35
2.8.5	Stabile Expression von ADAM15 in Schwannzellen der Ratte und HeLa-Zellen durch retrovirale Infektion.	36
2.9	Substratadhäsion von MDC15-überexprimierenden Schwannzellen bzw. HeLa-Zellen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Western-Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen verschiedene Domänen des ADAM15-Proteins	38
3.1.1	Nachweis von ADAM15 in Gehirnhomogenat von Ratten	39
3.1.2	Transiente Überexpression von ADAM15 in HeLa-Zellen	40
3.1.3	Herstellung und Detektion von in Bakterien exprimierten Glutathion-S-Transferase-ADAM15-Fusionsproteinen	44
3.2	Immunhistologische Färbungen verschiedener Gewebe der Ratte mit polyklonalen Antikörpern gegen ADAM15	49
3.2.1	Cortex	49
3.2.2	Cerebellum	50
3.2.3	Hippocampus	52
3.2.4	Rückenmark dorsal	53

3.2.5	Rückenmark ventral	54
3.2.6	Ischiasnerv	55
3.3	Inflammatorische Stimulation durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ an Schwannzellen und Astrozyten	56
3.3.1	Vergleich der Expression von ADAM15 und ADAM8 in Schwannzellen, Astrozyten und Neuronen	57
3.3.2	<i>In-vitro</i> $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation von Schwannzellen	58
3.3.3	<i>In-vitro</i> $\text{TGF}\beta$ -Stimulation von Schwannzellen	59
3.3.4	<i>In-vitro</i> Stimulation von Schwannzellen mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit $\text{TGF}\beta$	60
3.3.5	<i>In-vitro</i> $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation von Astrozyten	61
3.3.6	<i>In-vitro</i> $\text{TGF}\beta$ -Stimulation von Astrozyten	62
3.3.7	<i>In-vitro</i> Stimulation von Astrozyten mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit $\text{TGF}\beta$	63
3.4	Untersuchungen an Explantaten von dorsalen Spinalganglien (DRG)	64
3.4.1	Wachstumsverhalten von dorsalen Spinalganglien (DRG) auf verschiedenen Proteinbeschichtungen	64
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbungen von DRG Explantaten	65
3.4.3	Veränderung der Gesamtfläche von DRG-Explantaten in Abhängigkeit von der Fusionsproteinbeschichtung	67
3.4.4	Veränderung des Schwannzellfeldes der DRG-Explantate in Abhängigkeit von der Fusionsproteinbeschichtung	68
3.4.5	Größenvergleich der Ausdehnung von Schwannzellfeld und Neuritenfeld in Abhängigkeit von GST-ADAM15-Fusionsproteinen	70
3.4.6	Zeitlicher Verlauf der Ausdehnung von Neuriten und Schwannzellen auf GST bzw. der Disintegrin-Domäne von ADAM15	71
3.4.7	Einfluss der Disintegrin-Bindedomäne auf das Wachstumsverhalten von DRG-Explantaten	74
3.4.8	Inhibition des Wachstums von dorsalen Spinalganglien durch Antikörper gegen β -Untereinheiten von Integrinen	75

3.5	Einfluss unterschiedlicher Fusionsproteinbeschichtungen auf das Neuritenwachstum dissoziierter DRG-Kulturen	76
3.6	Adhäsion von ADAM15- bzw. Connexin32-überexprimierenden Schwannzellen auf verschiedenen Proteinen der Extrazellulär-Matrix	80
3.6.1	Adhäsion von HeLa-Zellen in verschiedenen Zelldichten auf Mikrotiterplatten	80
3.6.2	Adhäsion von infizierten Schwannzellen auf verschiedenen Extrazellulärmatrixproteinen.	81
3.7	Expressionsveränderung von ADAM15 und ADAM8 nach einer Ischiasnerv-Quetschläsion	82
3.7.1	Zeitliches Expressionsprofil von ADAM15 und PMP22 nach einer Ischiasnerv-Quetschläsion	83
4	Diskussion	86
4.1	Die Proteine der ADAM-Familie und ihre zelluläre Funktion	86
4.2	Generierung polyklonaler ADAM15 Antikörper	88
4.3	Detektion des ADAM15-Proteins	89
4.3.1	Western-Blot-Analysen	89
4.3.2	Immunhistochemie an kryokonservierten Gewebeschnitten	91
4.4	Funktionelle Charakterisierung von ADAM15	92
4.4.1	Adhäsionsversuche an Extrazellulärmatrix-Proteine	92
4.4.2	Wachstumsverhalten von dorsalen Spinalganglien	94
4.4.3	Metalloproteaseaktivität von ADAM15	99
4.4.4	Expression von ADAM15 nach Ischiasnerv-Quetschläsion	99
4.4.5	Einfluss von inflammatorischen Cytokinen auf ADAM15	100
4.5	Modell der ADAM15-Funktion im PNS	102
4.6	Ausblicke	104
5	Zusammenfassung	106
6	Literatur	107

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Unzählige wissenschaftliche Probleme wurden in den letzten Jahrzehnten angegangen und gelöst. Ein seit frühester Zeit ungelöstes medizinisches Problem ist die Regeneration im zentralen Nervensystem. Erste Berichte über regeneratives Verhalten des peripheren Nervensystems (PNS) sowie das wesentlich geringer ausgeprägte Regenerationsvermögen des zentralen Nervensystems (ZNS) gab es schon im alten Ägypten. Von Imhotep, einem Baumeister und gleichzeitig Arzt der Pharaonen, wurde bereits um etwa 2600 Jahre vor Christus der Unterschied zwischen dem Regenerationspotential des PNS und ZNS beobachtet. Er dokumentierte an verletzten Arbeitern die teilweise lebenslangen Defizite in Bewegung und Sensorik. Seitdem wurden zahllose Versuche unternommen, die unterschiedlichen Eigenschaften der Nervensysteme zu analysieren. Dennoch ist dieses Gebiet auch heute noch nicht annähernd erschöpfend untersucht.

Gerade in jüngerer Zeitrechnung konnten aufgrund stetig verbesserter Methoden einige grundlegenden Erkenntnisse zur Entwicklung von PNS und ZNS gewonnen werden. Das Nervensystem von höheren Lebewesen bildet sich aus dem Ektoderm, also dem äußeren Keimblatt des Embryoblasten, durch Einstülpung zu einer Neuralrinne und später einem Neuralrohr. Aus diesem Neuralrohr entsteht letztendlich das Rückenmark, an dessen rostralem Ende sich das Gehirn bildet. Diese beiden Komponenten bilden zusammen das ZNS. Das Neuralrohr beinhaltet sogenannte Vorläuferzellen (Precursor-Zellen), aus denen sich die beiden hauptsächlichen Zelltypen des Nervensystems entwickeln. Hierbei handelt es sich um Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen (Glia).

1.2 Das ZNS und dessen vorherrschende Zelltypen

Die Unterteilung des Nervensystems in das periphere Nervensystem und das zentrale Nervensystem wird unter anderem durch zelluläre Unterschiede bestimmt. So unterscheidet man im ZNS zwei gliale Zelltypen einmal die Oligodendrozyten und zum anderen die Astrozyten (Barres, 1991). Astrozyten sind stark verzweigte, sternförmige Zellen, die mit ihren vielen Endungen zum einen mit Blutgefäßen in Kontakt stehen, jedoch häufig auch

mit dem Zellkörper von Neuronen. Es wird daher vermutet, dass Astrozyten eine essentielle Funktion bei der Versorgung der Neurone spielen. Astrozyten bilden untereinander sogenannte „Gap-junctions“ aus, wodurch die Zellen auf cytoplasmatischer Basis miteinander verbunden sind (Goldstein und Betz, 1986). Die ebenfalls aus den Vorläuferzellen entstandenen Neurone bilden zur starken Verschaltung im Gehirn mehrere Dendriten und ein Axon aus. Axone werden durch die Oligodendrozyten myelinisiert, hierbei myelinisiert etwa ein Oligodendrozyt im Durchschnitt 15 verschiedene Axone. Die Entwicklung von Neuronen verschiedener Subtypen kann einmal durch deren Wanderung und die damit verbundene unterschiedliche Umgebung bestimmt sein, jedoch auch durch den Zeitpunkt der Entstehung der einzelnen Zelle (McConnell, 1989). Ein Beispiel hierfür stellen die Neurone in den verschiedenen Zellschichten des Cortex dar. Neben diesen aus Vorläuferzellen entstandenen Zellen findet man im ZNS eine Vielzahl von kleineren Zellen, die während der frühen Ontogenese in das ZNS eingewandert sind. Man nennt diese unter pathologischen Bedingung, phagozytotischen Zellen Microglia, sie entstammen nicht den Vorläuferzellen des Neuralrohrs, sondern hämatopoetischen Vorläuferzellen.

1.3 Das PNS und Schwannzellen

Im peripheren Nervensystem übernehmen Schwannzellen die myelinisierende Funktion der Oligodendrozyten des ZNS. Diese bilden sich ebenfalls aus Vorläuferzellen und entstammen dem Neuroepithelium, der Neuralleiste am Rand der Neuralplatte, die sich während der Ontogenese zum Neuralrohr einfaltet (Lobsiger *et al.*, 2002). In der Ratte wandern sie am Embryonal-Tag 9-10 (E9-10) vom Neuralrohr lateral und ventral in ihre Zielgebiete, wo sie sich unter anderem zu Melanozyten, glatten Muskelzellen, PNS-Neuronen und eben diesem glialen Zelltyp entwickeln (Anderson, 1997; Henion und Weston, 1997). Im Gegensatz zu den Oligodendrozyten myelinisiert eine Schwannzelle jedoch nur ein einzelnes Axon.

Besonders gut hat sich bei der Betrachtung der Entwicklung des peripheren Nervensystems der Ischiasnerv der Ratte als Modellsystem herausgestellt (Mirsky und Jessen, 1999; Lobsiger *et al.*, 2002). Die ersten Axone projizieren in den Bereich der Hinterbeine der Ratten zwischen E13 und E14. Sie sind mit Vorläuferzellen der Schwannzellen assoziiert,

die die Axone bereits in Gruppen zur späteren Myelinisierung einteilen. Werden diese Zellen von den Axonen getrennt, sterben sie in der Zellkultur ab, so dass ein Überleben dieser frühen Schwannzellstadien von Faktoren abhängen muss, die von den Neuronen sezerniert werden. Umgekehrt scheinen Schwannzellen aber auch für das Überleben der Neurone, nicht aber für die Elongation oder das Auswachsen der Axone essentiell zu sein. Um den Tag E16 differenzieren sich die Neuralleistenzellen zum einen in die nicht-myelinisierenden Schwannzellen, die mit kleineren Axonen in Kontakt treten und nur geringe Mengen an P0 (Protein Zero) und MBP (Basisches Myelin Protein; *myelin basic protein*) aufweisen und zum anderen in die myelinisierenden Schwannzellen, die mit größeren Axonen assoziiert sind und die Myelogene P0 und MBP stark exprimieren (Lobsinger *et al.*, 2002).

Die Differenzierung in myelinisierende Schwannzellen ist reversibel und wird nach Nervenverletzungen wieder rückgängig gemacht, um geeignete Bedingungen für regenerierende Axone zu schaffen (Mirsky und Jessen, 1996). Dabei kommt es zu einer stereotypen Abfolge von histopathologischen Prozessen, der sogenannten Waller'schen Degeneration, das heisst zur Degeneration des Axons im distalen Fragment, zum Abbau des Myelins, zur Einwanderung von Makrophagen und zur Proliferation der dedifferenzierten Schwannzellen (Salzer und Bunge, 1980).

Die Schwannzellen sezernieren daraufhin neurotrophe Faktoren wie NGF, LIF, BDNF und NT4/5 und exprimieren Adhäsionsmoleküle wie L1, N-Cam oder N-Cadherin, die sonst nur in nicht-myelinisierenden Zellen zu finden sind (Jessen und Mirsky, 1992). Die umliegenden Schwannzellen bleiben als sogenannte Büngner'sche Bänder in ihren ursprünglichen Positionen, so dass die proximal erhalten gebliebenen Axonstümpfe wieder nach distal aussprossen und entlang der Schwannzellen in Richtung ihrer früheren Zielgebiete wachsen können. Die Schwannzellen differenzieren nach erneutem Axonkontakt und re-myelinisieren die Axone in einer etwas weniger kompakten Form.

1.4 Dorsale Spinalganglien (dorsal root ganglion, DRG)

Besonderer Betrachtung bedarf das sogenannte dorsale Spinalganglion (Hinterwurzelganglion, engl. dorsal root ganglion), kurz DRG. Hierbei handelt es sich um eine kleine Verdickung im dorsalen Bereich außerhalb des Rückenmarks, in der die Zellkörper von pseudo-unipolaren Neuronen zu finden sind. Bei diesem Ganglion handelt es sich ausschließlich um sensorische Neurone. Dies ist interessant, da hier periphere Neurone mit ihrem Axon bis in das ZNS hinein projizieren und dort direkt durch Synapsen stimulierend auf Motoneurone, aber auch indirekt über Interneurone inhibitorisch auf andere Motoneurone wirken.

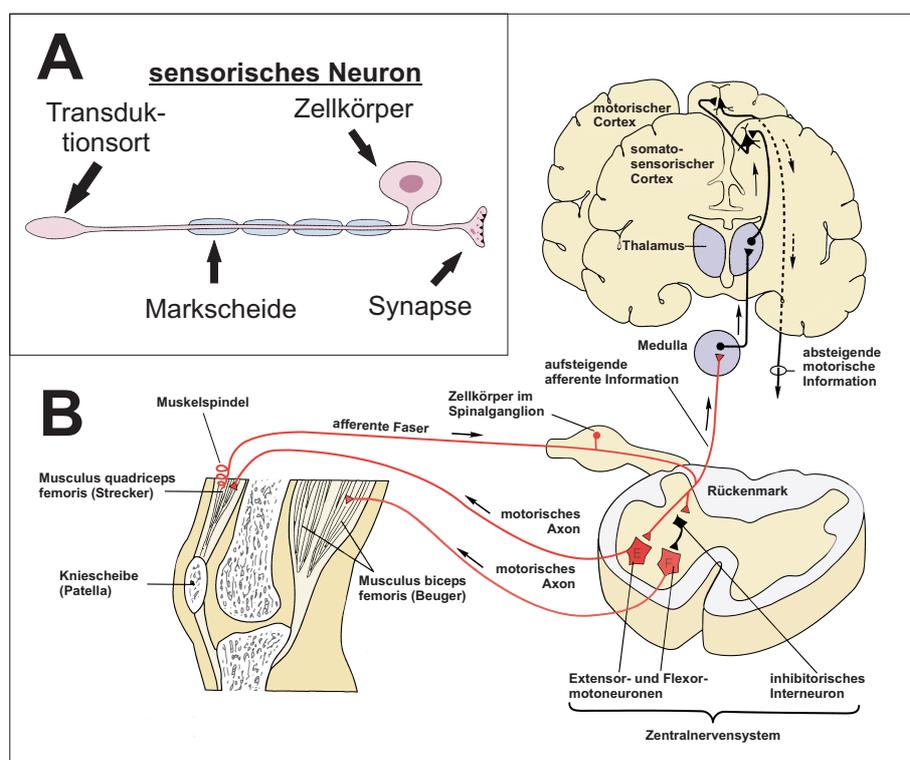


Abbildung 1: **Schematische Darstellung von dorsalen Spinalganglien** Entnommen aus dem Buch Neurowissenschaften, E.R. Kandel, J.H. Schwartz und T.M. Jessel, erschienen im Spektrum Verlag. Die dorsalen Spinalganglien sind (A) aufgrund ihrer speziellen Form (pseudo-unipolare Neurone) und der damit verbunden Myelinisierung an Axon bzw. Neuriten und auch (B) aufgrund ihrer umgekehrt zu anderen Neuronen vorhandene Projektion vom PNS in das ZNS als etwas Besonderes zu betrachten.

Bemerkenswert ist, dass die Regeneration, wie schon zu Beginn angesprochen, im ZNS und im PNS unterschiedlich verläuft und die Neurone der afferenten, sensorischen Fasern

dem PNS entspringen, aber bis in das Rückenmark (also ZNS) auswachsen (Abbildung 1B). Pseudo-unipolare-Neurone sind initial normale, bipolare Neurone mit einem ovalem Soma, aus dem auf der einen Seite die Dendriten entspringen und auf der anderen Seite das Axon. Nach kurzer Zeit jedoch verschmelzen diese beiden Fortsätze und bilden ein einziges Axon, welches aus dem Zellkörper austritt und nach kurzer Distanz sich in zwei Äste aufteilt (siehe Abbildung 1A). Die gegenüber dem PNS veränderte, nicht mögliche Regeneration von ZNS-Neuronen, so nimmt man an, liegt jedoch nicht an einem intrinsischen Unvermögen der Neurone bzw. Axone, sondern an extrinsischen, inhibitorischen Faktoren, die bei einer Verletzung des Rückenmarks das Regenerationsverhalten der ZNS-Neurone negativ beeinflussen. Neben der Untersuchung von solchen inhibitorischen Faktoren, wie z.B. Faktoren des Narbengewebes, oder Nogo (Hermanns *et al.*, 2001; Simonen *et al.*, 2003), gibt es auch Anhaltspunkte, dass die Immunantwort eine entscheidene Rolle spielt (Barouch und Schwartz, 2002; Hauben *et al.*, 2003). Um die Ursachen des unterschiedlichen Regenerationspotentials von PNS und ZNS besser verstehen zu können, wurde neben der Suche nach inhibitorischen Faktoren des ZNS auch untersucht, ob es im PNS möglicherweise regenerativ-stimulierende, intrinsische Faktoren gibt, die im ZNS fehlen. Zu diesem Zweck wurden in unserem Labor differentielle Hybridisierungsexperimente mit cDNA-Banken aus unverletzten und verletzten Ischiasnerven der Ratte durchgeführt (Gillen *et al.*, 1995), um differentiell regulierte Gene der De- und Regeneration des Ischiasnervs zu identifizieren.

1.5 ADAM15 und die ADAM-Proteinfamilie

Im Zuge der Regenerationsexperimente am Ischiasnerv wurde auch ein Gen identifiziert, dass sieben Tage nach einer Crush-Läsion reguliert exprimiert wird (Gillen *et al.*, 1995). Dieses anfänglich als CRII-7 (CR: crush; II: zweite diff. Screeningrunde; 7: siebter Klon) bezeichnete Gen zeigte eine hohe Sequenzhomologie zu der bekannten Gruppe der Disintegrine, genauer gesagt zur Genfamilie der so genannten ADAM-Proteine (A Disintegrin And Metalloprotease). Initial wurden die ADAM als lösliche Proteine in Schlangengiften entdeckt, welche die Blutgerinnung unterbinden (Snake Venom Metalloprotease, SVMP; Gould *et al.*, 1990). Es stellte sich heraus, dass es sich beim CRII-7 um ein Rattenhomolog des entsprechenden Proteins des Menschen (Metargidin) bzw. der Maus handelt,

welches auch als MDC15 (Metalloprotease-Disintegrin-Cysteinreich) bekannt ist. Initiale mRNA-Expressionsuntersuchungen nach peripherer Ischiasnerv-Läsion zeigten, dass dieses Gen eine besonders starke Expressionserhöhung am ersten und zweiten Tag nach der Quetschung sowie der Durchtrennung des Ischiasnervs aufweist (Bosse *et al.*, 2000). Somit rückten erstmalig die Disintegrine mit in den Fokus von Interaktionsuntersuchungen und den Vorgängen der Waller'schen Degeneration (Griffin und Hoffmann, 1993). ADAM-Proteine werden als potentielle Regulatoren von Zell-Zell- (Blobel *et al.*, 1992; Wolfsberg *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1995) bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen (Gaultier *et al.*, 2002; Rapraeger, 2001; Iba *et al.*, 2000), sowie der Migration und Abspaltung von inflammatorischen Molekülen der Zelloberfläche angesehen.

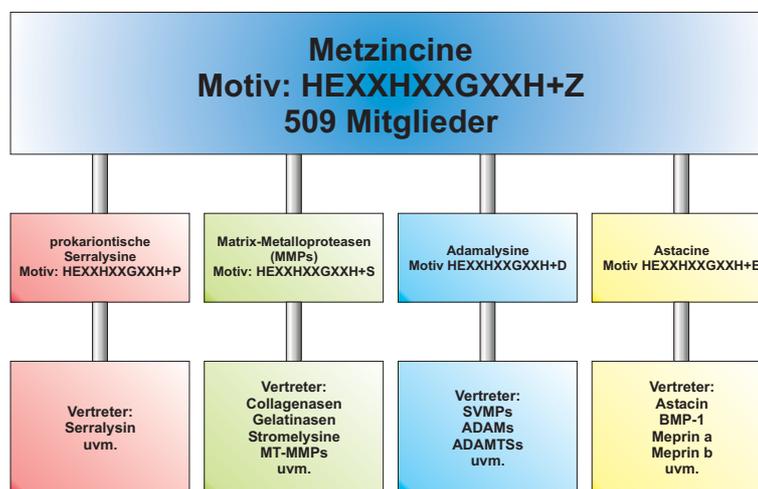


Abbildung 2: ADAMs gehören zu der Gruppe von Proteinen mit dem Namen Metzincine, genauer gesagt den Adamalysinen, zu denen auch die stark verwandten, aber im Gegensatz zu den ADAMs ausschließlich löslich vorkommenden Snake Venome Metalloproteasen (SVMP) gehören.

Die ersten membranständigen ADAM-Proteine wurden bei der Fusion von Eizelle und Spermium näher charakterisiert, hier übernehmen sie eine wichtige Funktion bei der Verschmelzung zu einer Zygote. Heute zählt diese Proteinfamilie (ADAM) 33 Vertreter, ist in zahlreichen Spezies exprimiert und erfüllt die unterschiedlichsten Funktionen (http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html). ADAMs sind Proteine mit einer besonderen Eigenschaft. Ihr besonderes Aminosäuremotiv (HEXXHXXGXXH+D) stuft sie als Mitglied der Gruppe der Adamalysine ein und ordnet sie damit den Metzincinen zu (siehe Abbildung 2), der auch noch andere Vertreter mit einem sehr

ähnlichem Motiv angehören, die sich jedoch in der letzten Aminosäure unterscheiden. Durch die spezielle Anordnung der Histidylreste können alle Proteine dieser Familie ein Zink-Ion komplexieren (Zhang *et al.*, 1998).

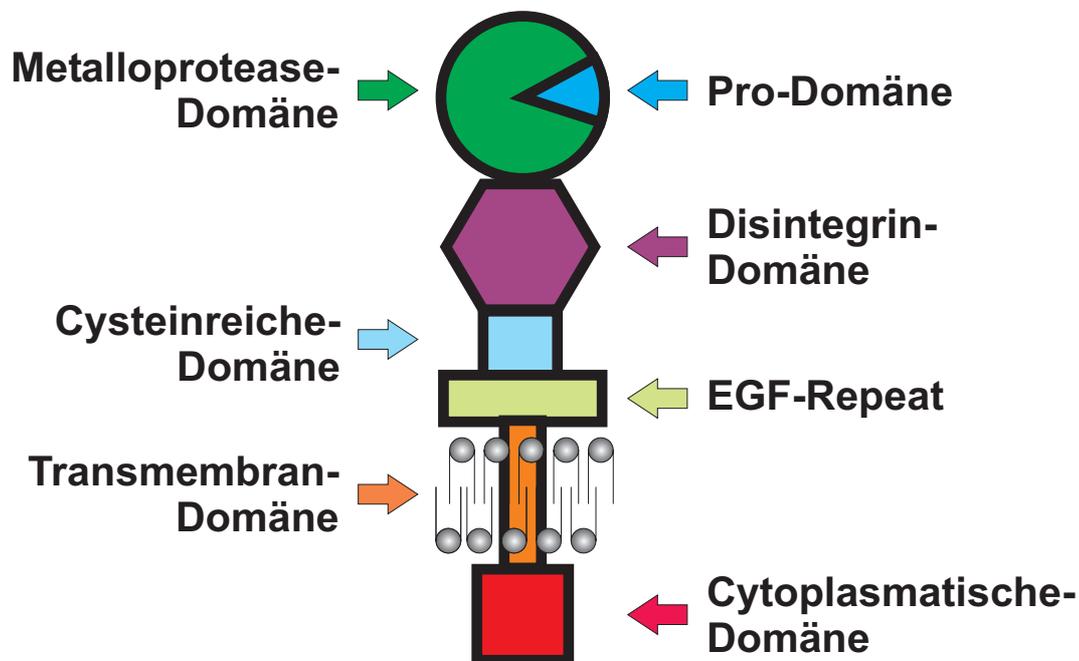


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM-Proteinen.** Sie besitzen neben einer Pro-Domäne eine putativ aktive Metalloprotease-Domäne (nicht alle ADAM-Proteine besitzen eine aktive Metalloprotease-Domäne), eine Disintegrin-Domäne, eine Cysteinreiche-Domäne mit EGF-Repeat und desweiteren, durch eine Transmembran-Domäne getrennt, eine Cytoplasmatische-Domäne.

ADAMs sind Multidomänen Proteine, sie besitzen, wie in Abbildung 3 gezeigt, folgende Domänen:

- **Pro-Domäne:**

Die Pro-Domäne ist eine Untereinheit, die im unreifen Zustand mit der Metalloprotease verbunden ist und so möglicherweise das Protein in einem inaktiven Zustand hält (Grams *et al.*, 1993; Springman *et al.*, 1990; Morgunova *et al.*, 1999). Sie kann intrazellulär bei einigen ADAMs durch eine Pro-Protein-Konvertase, die eine Furin-spaltstelle [RX(K/R)R] im Übergang zur Metalloprotease erkennt, abgespalten werden (Hosaka *et al.*, 1991), oder aber auch durch eine Serin-Protease extrazellulär prozessiert werden (Lum und Blobel, 1997), wodurch das Protein in eine aktive Form überführt werden kann.

- **Metalloprotease-Domäne:**

Diese Domäne ist nicht bei allen ADAM-Proteinen aktiv, denn nur solche ADAMs, die die Sequenz HEXXHXXGXXH beinhalten, verfügen über eine aktive Metalloprotease. Ist diese jedoch aktiv, so können die verschiedenen ADAM-Proteine mit sehr unterschiedlichen Substraten reagieren, zum Beispiel werden häufig in einer Art „Ectodomain-shedding“ Proteine von der Zelloberfläche durch die Metalloprotease abgelöst (White, 2003).

- **Disintegrin-Domäne:**

Alle ADAM-Proteine, mit Ausnahme des humanen ADAM15, besitzen in dieser Domäne nicht eine SVMP-homologe RGD-Sequenz, sondern eine veränderte Sequenz, an deren dritten Aminosäureposition häufig eine saure Aminosäure wie Aspartat oder Glutamat vorkommt. Nach dieser Dreier-Sequenz folgt bei den ADAM-Proteinen hochkonserviert eine Aminosäure mit Cysteyl-Rest. Dieser Cysteyl-Rest geht jedoch durch die ungerade Anzahl dieser Reste in der Disintegrin-Domäne keine Disulfidbindung ein. Es wird jedoch vermutet, dass er möglicherweise mit anderen Proteinen oder mit weiteren Cysteyl-Resten aus der eigenen Cysteinreichen-Domäne interagiert und so zur Aktivierung oder Inaktivierung der Disintegrin-Domäne beiträgt (Smith *et al.*, 2002). In vielen Fällen konnte eine Bindung der Disintegrin-Domäne an Integrine nachgewiesen werden (Blobel und White, 1992; Nath *et al.*, 1999), aber auch Bindungen zu Syndecanen (Iba *et al.*, 2000) oder Extrazellulärmatrix-Proteinen, wie z.B. Fibronectin (Gaultier *et al.*, 2002) wurden beschrieben.

- **Cysteinreiche-Domäne mit EGF-Repeat:**

Wie schon angesprochen, könnte die Cysteinreiche-Domäne entweder durch Interaktion mit der Disintegrin-Domäne, oder aber auch selbstständig an der Interaktion oder Bindung anderer Proteine beteiligt sein. ADAM12 bindet zum Beispiel über diese Domäne das Heparan-Sulfat-Proteoglycan (Iba *et al.*, 2000).

- **Transmembran-Domäne:**

Fast alle ADAM-Proteine besitzen eine Transmembran-Domäne, mit der sie in der Membran verankert sind. Spezielle Splice-Varianten mancher ADAMs ergeben je-

doch auch Proteine, die keine Transmembran- und Cytoplasmatische-Domäne mehr besitzen und somit eher als sekretorische Proteine zu verstehen sind (Katagiri *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997 und Loechel *et al.*, 1998).

• **Intrazelluläre-Domäne:**

Neben der katalytischen und adhäsiven Eigenschaft, durch Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne, könnte die intrazelluläre Domäne eine dritte mögliche Funktion des Proteins darstellen. Durch seine SH3 ähnliche Struktur der Cytoplasmatischen-Domäne ist eine Einbindung in intrazelluläre Signaltransduktionswege denkbar (Weskamp *et al.*, 1996; Krätzschmar *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu den übrigen Mitgliedern dieser Proteinfamilie besitzen die meisten zellulären Disintegrine keine RGD-Sequenz zur Bindung von Integrinen. Die einzige bisher bekannte Ausnahme ist das humane ADAM15-Protein, das auch Metargidin (metalloprotease-RGD-disintegrin) genannt wird (Krätzschmar *et al.*, 1996). Die Maus- und Ratten-Homologe zu Metargidin besitzen an dieser Stelle eine TDD-Sequenz. Das ADAM15-Protein der Ratte ist ein membranständiges Protein mit 85kDa, das alle oben aufgeführten Domänen besitzt, sowie fünf mögliche N-Glykosylierungsstellen. Pro- und Metalloprotease-Domäne sind durch eine potentielle Serin-Protease-Schnittstelle, bestehend aus vier Argininen, getrennt, wobei angenommen wird, dass zur Aktivierung der Metalloproteaseaktivität die Abspaltung der Pro-Domäne notwendig sein könnte (Bosse *et al.*, 2000, Schloemann *et al.*, 2002). Darüber hinaus findet sich ein Zink-Bindungsmotiv in der Metalloprotease-Domäne, sowie Prolin-reiche Sequenzen in der cytoplasmatischen Region, die homolog zu SH3 (Src homology 3) Ligandendomänen sind und auf eine Beteiligung von ADAM15 bei der intrazellulären Signaltransduktion und bei der Bindung an das Zytoskelett hindeutet (Krätzschmar *et al.*, 1996). In der Disintegrin-Domäne des humanen ADAM15 konnte, wie bereits erwähnt, eine RGD-Sequenz nachgewiesen werden, die eine Bindung an $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ Integrine ermöglicht (Krätzschmar *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu Fertilin α und Meltrin α gibt es allerdings keinen hydrophoben Aminosäurestretch, so dass eine Beteiligung von ADAM15 an Membranfusion o.ä. relativ unwahrscheinlich erscheint (Blobel *et al.*, 1992; Emi *et al.*, 1993; Krätzschmar *et al.*, 1996). Bei Untersuchungen an CRII-7/MDC15, dem ADAM15-Homolog der Ratte, konnte gezeigt werden,

dass das ADAM15-Protein in der Lunge und in verschiedenen Zelltypen des ZNS sowie des PNS exprimiert wird, so zum Beispiel in Schwannzellen, endothelialen Zellen und einigen Neuronen-Subtypen (Bosse *et al.*, 2000). Die mRNA-Expression von ADAM15 ist postnatal während der Entwicklung peripherer Nerven reguliert, wobei ADAM15 bereits ab dem embryonalen Tag E7 exprimiert wird und in seiner Expressionsstärke im Verlauf der Myelinisierung bis zum postnatalen Tag P14 stark ansteigt. In Regenerationsexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass die ADAM15-Expression auch während der De- und Remyelinisierung peripherer Nerven einer starken Regulation unterliegt (Bosse *et al.*, 2000). Nach dem Quetschen oder der Transsektion peripherer Nerven wurde in Northern-Blot-Untersuchungen innerhalb der ersten 1-2 Tage ein starker Anstieg der ADAM15 mRNA-Menge beobachtet, die im Laufe der Waller'schen Degeneration während der folgenden vier Wochen wiederum stark abnahm. Diese Regulation deckt sich nicht mit der Expression der klassischen Myelogene PMP22 oder P0, deren mRNA-Menge nach einer Nervenverletzung im Zuge der De- und Remyelinisierung zunächst innerhalb einer Woche bis auf 10% des ursprünglichen Niveaus abnimmt, um nachfolgend wieder auf den ursprünglichen Wert anzusteigen (Bosse *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 1993). Es wurde daher angenommen, dass ADAM15 an der Matrix-Degeneration sowie an der Zellmigration und -proliferation beteiligt sein könnte (Bosse *et al.*, 2000). In Schwannzellen scheint es dabei keine Beeinflussung durch den cAMP-Signal-Transduktionsweg zu geben, wie Versuche mit Zugabe von Forskolin zu subkonfluenten Schwannzellen in Kultur zeigen konnten (Bosse *et al.*, 2000).

1.6 Vermutete Funktionen von Mitgliedern der ADAM-Proteinfamilie

Zell-Zell Interaktion:

Früh wurde entdeckt, dass eine mögliche Funktion der ADAMs die Interaktion mit Integrinen ist. Die nahe Verwandtschaft zu den SVMP legt initial diese Vermutung nahe. Die SVMP besitzen ausschließlich eine Disintegrin-Domäne, welche durch ihre RGD-Sequenz eine Interaktion mit Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ausübt (Rahman *et al.*, 1998). Somit lag auch die funktionelle Verbindung von Fertilin β (auf der Spermiumoberfläche) zu Integrinen (auf der Eioberfläche) sehr nah. Die Interaktion konnte durch die kompetitive Zugabe von

RGD-Peptiden zu Spermium und Eizelle und die damit verhinderte Fertilisation bewiesen werden (Myles *et al.*, 1994). Gleichzeitig konnte die spezifische Interaktion durch die Inhibition mit einem Antikörper gegen Integrin $\alpha_6\beta_1$ nachgewiesen werden (Almeida *et al.*, 1995). Bei dieser spezifischen Interaktion eines ADAM-Proteins mit einem Integrin wird die nicht-katalytische Metalloprotease-Domäne abgespalten, zurück bleibt ausschließlich die Disintegrin-Domäne. Die Prozessierung reifer und/oder aktiver ADAM-Proteine wurde in diesem Beispiel unter anderem auch durch die Beobachtung von verschiedenen Proteinisoformen bestätigt. Es wurde zum einen ein unprozessiertes Molekül (inklusive der Pro-Domäne), sowie eine Isoform ohne Pro-Domäne und eine dritte Isoform ohne Pro- und Metalloprotease-Domäne (Herren *et al.*, 1997, Schlomann *et al.*, 2002) gefunden. Hierbei ist zu vermuten, dass eine Aktivierung der Metalloprotease erst durch Abspaltung der Pro-Domäne vollzogen wird und die Aktivierung der Disintegrin-Domäne erst nach der zusätzlichen Abspaltung der Metalloprotease-Domäne erfolgt. Es wird vermutet, dass die damit verbundene Freisetzung der Metalloprotease (bei ADAM-Proteinen mit aktiver Metalloprotease) dann sogar als Modulator verschiedener Extrazellulärmatrixproteine wirken kann. Darüber hinaus ist eine Interaktion mit Integrinen möglicherweise erst im vollständig prozessiertem Zustand ohne Pro- und Metalloprotease-Domäne möglich.

Protein Ectodomain Shedding:

Es wird davon ausgegangen, dass die ADAMs mit der Sequenz HEXXH eine putativ aktive Metalloprotease besitzen. Zu dieser Gruppe gehören die ADAMs 1, 8-10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30, 33 und 34 wogegen die ADAMs 2-7, 11, 14, 18, 22, 23, 27, 29, 31 und 32 diese Konsensussequenz nicht besitzen, was jedoch nicht ausschließt, dass sie eine Aktivität besitzen (White, 2003). Zwei in Bezug auf ihre Metalloprotease-Aktivität besonders intensiv untersuchte ADAM-Proteine sind ADAM17 (TNF α Converting Enzyme, kurz TACE) und ADAM10, auch Kuzbanian genannt. TACE hat die Eigenschaft, das proinflammatorische TNF α -Cytokin von der Plasmamembran durch die Metalloprotease abzuspalten (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Kuzbanian spaltet dagegen einen Teil der extrazellulären Domäne von Notch ab, was entscheidend in den Signalweg bei der Entwicklung von neuronalen Zellen eingreift (Qi *et al.*, 1999; Sotillos *et al.*, 1997). In neuerer Zeit sind weitere neue Substrate für einzelne ADAM-Proteine gefunden worden, wie z.B.

ADAM19 (Neuregulin, Shirakabe *et al.*, 2001; Kurohara *et al.*, 2000) und ADAM8 (MBP, Schlomann *et al.*, 2002). Andere membranständige Metalloproteasen spalten Cytokine, wie z.B. den Fas-Liganden und $TGF\alpha$ oder aber Cytokinrezeptoren, wie den IL-6 Rezeptor und den NGF-Rezeptor (Übersicht; White, 2003). Für viele ADAM-Proteine ist das Substrat noch völlig unbekannt und stellt somit ein sehr interessantes Aufgabengebiet dar.

Intrazelluläres Signaling:

Interessant erscheint auch die Annahme, dass ein spezieller Faktor die Aktivität aller Metalloproteasen steuert (Arribas *et al.*, 1996). Diese Annahme geht aus den Beobachtungen an einer speziellen CHO-Zelllinie hervor, die möglicherweise eine Mutation in einem solchen zentralen Faktor besitzt, die das Prozessieren von sämtlichen normalerweise abgespaltenen Oberflächenproteinen nicht aufweist. Eine Fusion mit Wildtyp-CHO-Zellen kann diesen Phänotyp wieder legalisieren. Ein solcher Funktionsverlust könnte z.B. durch eine Inaktivierung an einer der PKC-Phosphorylierungsstellen (Hofmann *et al.*, 1999) oder der SH3-Ligand-Domäne (Pawson, 1995) vermittelt werden. Fast alle ADAM-Proteine mit putativ aktiver Metalloprotease besitzen diese Domänen. Es könnte sich hier also um eine sogenannte Inside-Out-Regulation handeln, bei der es einmal durch Kontakt von außen zu einer intrazellulären Phosphorylierung und somit zu einer Aktivierung einer Signalkaskade kommt (Huges *et al.*, 1996; Mehta *et al.*, 1998). Ebenso gut ist eine Phosphorylierung an den oben angesprochenen Domänen denkbar, die erst hierdurch eine Aktivierung der Metalloprotease- oder der Disintegrin-Domäne, verbunden mit der Abspaltung der Metalloprotease, einleitet (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Seals und Courtneidge, 2003; Abram *et al.*, 2003).

1.7 Mögliche Interaktionspartner in der Extrazellulärmatrix

Vitronectin, auch Serum spreading factor oder S-Protein genannt, ist ein Multidomänen-Plasmaprotein, das in der Leber synthetisiert wird und eine Vielzahl von Funktionen aufweist (Horton, 1997). So ist es in die Komplementaktivierung und die Blutagglutination involviert. Zudem integriert es in die Extrazellulärmatrix, wo es modifiziert wird und zum Beispiel Proteoglykane bindet. Rekombinantes humanes ADAM15 interagiert mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen sowie mit $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen (Nath *et al.*, 1999). Da $\alpha_v\beta_3$ -Integrine ei-

ne Interaktion mit Vitronektin eingeht (Horton, 1997), ist denkbar, dass ADAM15 der Ratte mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen interagiert und die eigentliche Interaktion von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen zu Vitronektin damit moduliert.

Laminin ist ebenfalls als ein weiterer Interaktionspartner von Integrinen beschrieben. Laminin ist ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, welches aus drei unterschiedlichen Ketten besteht, einer α -, einer β - und einer γ -Kette und viele putative Bindungsstellen für verschiedenste Proteine besitzt.

Auch Fibronektin ist ein Extrazellulärmatrixprotein mit sehr unterschiedlichen Bindungsstellen, welche über alternatives Splicing in ihrer Zusammensetzung moduliert werden können. Fibronektin, welches unter anderem von Leberzellen sezerniert wird, verfügt insbesondere über eine Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz, die essentiell für die Bindung mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen ist. Alle drei genannten Extrazellulärmatrixproteine stehen in direktem Kontakt mit Integrinen, weisen aber vermutlich auch zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen auf (Buxbaum *et al.*, 1998).

1.8 Integrine, mögliche ADAM15-Interaktionspartner in der Zellmembran

Die Adhäsion von Zellen an die Extrazellulärmatrix wird vor allem über Integrine vermittelt (Plow *et al.*, 2000). Diese Proteinklasse wurde 1986 von Heynes so genannt, um ihre Rolle bei der Integration der Signale aus der Extrazellulärmatrix in das intrazelluläre Zytoskelett zu unterstreichen (Horton, 1997). Integrine sind Transmembran-Heterodimere mit je einer α - und einer β -Untereinheit, von denen bislang 16 α - sowie 9 β -Untereinheiten beschrieben wurden (Meredith *et al.*, 1996). Die unterschiedliche Kombination der Untereinheiten ist ausschlaggebend für die spezifische Bindung des Rezeptors, wobei häufig auch mehrere verschiedene Liganden je Integrin gebunden werden können. Sie zeigen eine hohe Sequenzhomologie innerhalb der sieben, 60 Aminosäure langen Tandemrepeats (Horton, 1997). Die α - und auch die β -Untereinheit scheinen sowohl an der Ligandenbindung beteiligt zu sein, als auch mit dem zellulären Signalsystem und dem Zytoskelett interagieren zu können.

Im Nervensystem sind vor allem folgende Integrine von Interesse (Takeuchi *et al.*, 1994; Hsiao *et al.*, 1991; Roche *et al.*, 1997; Jaakkola *et al.*, 1993):

- $\alpha_2\beta_1$, Laminin-Rezeptor
- $\alpha_5\beta_1$, Fibronektin-Rezeptor
- $\alpha_6\beta_1$, Laminin-Rezeptor, der in einem erhöhten Maß von nicht-myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (Feltri *et al.*, 1992)
- $\alpha_6\beta_4$, Laminin-5-Rezeptor, der nur von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (Feltri *et al.*, 1992, Einheber *et al.*, 1993)
- $\alpha_v\beta_3$, Vitronektin-Rezeptor (Horton, 1997)

1.9 Arbeitshypothese zur Rolle von ADAM15 während der Nervenregeneration

Die erhöhte Expression von ADAM15 nach Verletzung des Ischiasnervs (Bosse *et al.*, 2000) und die schon bei humanem ADAM15 festgestellte Verbindung zu den Integrinen führte zur Formulierung der folgenden Arbeitshypothese (Abbildung 4):

Es wird vermutet, dass ADAM15 nach einer Läsion des Ischiasnervs an den Prozessen der Dedifferenzierung, Migration und Remyelinisierung von Schwannzellen während der Waller'schen Degeneration beteiligt ist. Dies, so die Arbeitshypothese, wird vermittelt durch die Cis-Interaktion von ADAM15 mit Integrinen auf der eigenen Schwannzelloberfläche, um so die Verbindung von Integrinen zur Extrazellulärmatrix zu modulieren.

1.10 Ziele

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion von ADAM15 der Ratte im Nervensystem näher zu untersuchen. Hierzu sollen zunächst die genauen Zelltypen, in denen ADAM15 exprimiert wird, lokalisiert und beschrieben werden. Dies soll durch die Produktion von verschiedenen polyklonalen Antiseren gegen Isoformen von ADAM15 geschehen, um die zelluläre Lokalisation und die vorherrschende Proteinisoform von ADAM15 *in-vivo* zu bestimmen. Die untersuchten Strukturen sollen das zentrale Nervensystem (ZNS), sowie das periphere Nervensystem (PNS) einschließen. Desweiteren soll die Cis-Interaktion von ADAM15, wie in der Arbeitshypothese beschrieben, auf Schwannzellen in Form von überexprimierenden Schwannzellen an Hand eines Adhäsionsassay untersucht werden. Zusätzlich untersucht werden sollen die Einflüsse von unterschiedlichen Fusionsproteinen aus

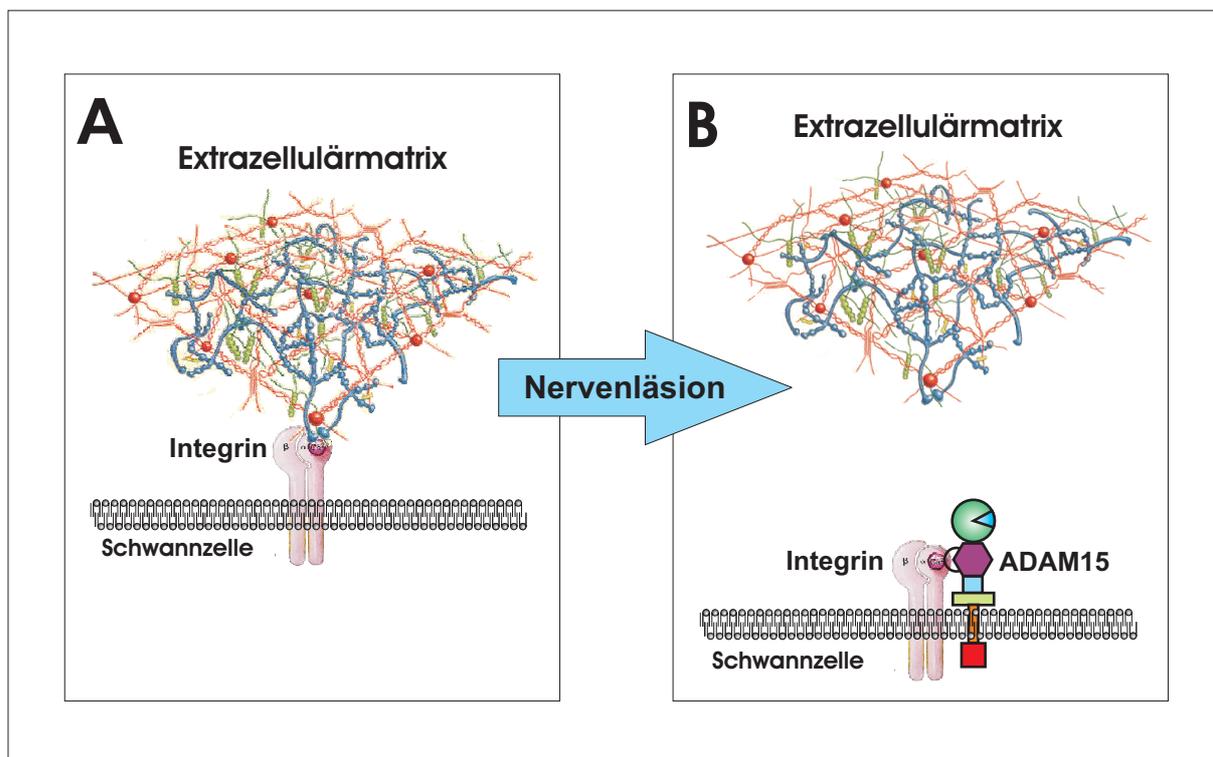


Abbildung 4: Arbeitshypothese zur Cis-Interaktion von ADAM15 der Ratte mit Integrinen auf der selben Zelloberfläche und der damit vermuteten Modulation nach einer peripheren Nervenläsion. ADAM15 würde hierbei die Interaktion von Integrinen zur Extrazellulärmatrix (A) auf der Oberfläche von Schwanzzellen so modulieren, dass durch die Verdrängung der Verbindung zur Extrazellulärmatrix sich die Zellen ablösen können (B).

GST und verschiedenen Domänen von ADAM15 auf dorsale Spinalganglien, sowie dissoziierte Cortexneurone. In diesem Rahmen sind auch Untersuchungen zur vermuteten Interaktion von ADAM15 der Ratte geplant, die einmal den möglichen Integrinpartner und zusätzlich die Bindungsdomäne beschreiben. Weiterhin soll die quantitative Veränderung der ADAM15-Expression auf Entzündungsmediatoren, wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ *in-vitro* bestimmt werden. Vergleichbare *in-vivo* Daten sollen die ebenfalls quantitativen Untersuchungen an Quetsch-Experimenten von Ratten-Ischiasnerven und die dadurch vermutete erhöhte Expression im Vergleich der vorhandenen Literaturdaten liefern. Abschließend ist die Betrachtung der Metalloprotease-Aktivität von ADAM15 und damit verbunden das Auffinden eines Substrates von Interesse.

2 Material und Methoden

Wenn nicht anders angegeben, stammen die nachfolgenden Substanzen, Reagenzien und Geräte aus Deutschland.

2.1 Abkürzungen

AA	Acrylamid
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Cytosine β -D-Arabino-Furanoside
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DIS	Fusionsprotein aus GST und Disintegrin-Domäne
DIS-CYS	Fusionsprotein aus GST, Disintegrin- und Cysteinreicher-Domäne
DIS-MEP	Fusionsprotein aus GST, Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne
DMEM	Dulbeco's Modified Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
E(Zahl X)	embryonaler Tag X
EAN	experimentelle-autoimmune-Neuritis
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
GST	Glutathion-S-Transferase

GAPDH	Glyceraldehyde-Phosphate-Dehydrogenase
HeLa	Tumorzellen von Henrietta Lacks
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lauria-Bertani-Medium
mA	Milliampere
MDC	metalloprotease-disintegrin-cysteine-rich
MBP	basisches Myelin Protein
mRNA	messenger-RNA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithine Decarboxylase
P0	Protein Zero
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMP22	Peripheres Myelin Protein 22
PNS	peripheres Nervensystem
PMS	Phenazinmethosulfat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkali Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SVMP	snake venom metalloproteinase
TBS	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
v	Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

2.2 Chemikalien und Antikörper

Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien und Antikörper

Enzyme und Chemikalien:

- Agar, Hefeextrakt, Trypton: Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
- Bio-Rad Protein Assay: Bio-Rad, California, U.S.A
- Biotin Micro Beads: Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
- Cell Titer 96TM AQueous MTS Reagent Powder: Promega, Mannheim
- CD14 Micro-Beads human: Miltenyi Biotex, Bergisch Gladbach
- Coomassie Brilliant Blue R 250: Serva, Heidelberg
- DMEM Medium: GIBCO BRL, Karlsruhe
- Diethyl-pyrocbonat (DEPC): Fulka, Neu Ulm
- ECLTM Western Botting Detection Reagents: Amersham Bioscience, Braunschweig
- EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-Biotin: Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH
- Fötale Kälberserum (FCS): PAA, Pasching, Österreich
- Glutathion SepharoseTM 4B: Amersham Bioscience, Braunschweig
- HandeeTM Spin Cup Columns: Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH
- NeutravidinTM Biotin Binding Protein4B: Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH

- Pro FoundTM Lysis Puffer: Amersham Bioscience, Braunschweig
 - Qiagen PCR Purifikation Kit und Qiagen-Spin prep-Mini-Plasmid-Isolationskit: Qiagen GmbH, Hilden
 - Streptomycin/Penicillin Lösung: GIBCO BRL, Karlsruhe
 - Trypsin/EDTA: GIBCO BRL, Karlsruhe
 - Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie: BIOZYM Diagnostik, Hessisch Oldendorf; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon Rot; Invitrogen, Leek, Niederlande; Pharmacia, Freiburg; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg.
- Sonstige Laborchemikalien (p.a.): Fluka, Neu Ulm; Merck, Darmstadt; Riedel-de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

Antikörper und Farbstoffreagenzien:

- goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP (Western-Blot/1:10.000): Southern Biotechnology Associates Inc., USA
- rabbit anti-goat IgG (H+L) HRP (Western-Blot/1:20.000): Jackson Immune Research Laboratories Inc., West Grove, USA
- horse anti-mouse IgG (H+L) Biotin (DAB/1:200): Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
- goat anti-mouse IgG-Alexa Green (Immunfluoreszenz/1:500): MoBiTec, Göttingen
- goat anti-rabbit IgG-Cy3 (Immunfluoreszenz/1:1.000): Sigma, Seelze
- rabbit anti-S100 polyklonal (DAB/1:2.000): Sigma, Seelze
- mouse anti-S100 monoklonal (Immunfluoreszenz/1:800): Sigma, Seelze
- mouse anti-NeuN monoklonal (Immunfluoreszenz/1:500): Chemicon, Hampshire, England

- mouse anti-GFAP monoklonal (Immunfluoreszenz/1:300): Chemicon, Hampshire, England
- goat anti-GST monoklonal (Western-Blot/1:1.000): Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- mouse anti-PAN axonal Marker (DAB/1:2.000): Sternberger Monoclonals, Lutherville, USA
- rabbit polyklonal antiserum cocktail to neurofilaments (Immunfluoreszenz/1:2.000): Affiniti Research Products Ltd., Mamhead, UK
- Elite Vectastain ABC: Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
- generierte polyklonale Antikörper

Polyklonale Seren gegen ADAM15 (CRII-7) aus dem Kaninchen		
Domäne	Name	Peptid für die Immunisierung
Pro	7-1-(1-3)	EEQQASPERTQSRLEN
Metalloprotease	7-7-(1-3)	NFLRWRRTDLLPRLP
Disintegrin	7-9-(1-3)	EQCDCGFPDECTPDPC
Cytoplasmatisch	7-15-(1-3)	PERPGPPQRAQQMPGK

Tabelle 1: Es wurden mit jedem Peptid drei Kaninchen immunisiert. Die Namensgebung der resultierenden Antikörper entstand durch die Ziffer sieben aus CRII-7, dann der Nummer des Peptids zur Immunisierung (1, 7, 9, 15) und abschließend durch die Nummer des immunisierten Tieres (1-3). Zum Beispiel entspricht 7-15-3 einem MDC15 Antikörper (7) gegen die cytoplasmatische Domäne (15) aus dem dritten Tier (3).

Membranen:

- HybondTMECLTM, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

2.3 Puffer und Lösungen

Acrylamid Stammlösung (30%)	29,2%	Acrylamid (w/v)
	0,8%	N,N-Methylenbisacrylamid (w/v)
DMEM-Medium		GibcoBRL # 31966-021
	10%	FCS
	2mM	L-Glutamin
	1%	Penicillin/Streptomycin(10 ⁵ U/ml)

Einfriermedium	45%	DMEM
	45%	FCS
	10%	DMSO
Forskolin		Sigma #
Geneticin (G418)		GibcoBRL # 11811-031
HEPES-DMEM		GibcoBRL # 22320-022
LB-Medium	10g	Trypton
	10g	NaCl
	5g	Hefe-Extrakt
	ad 1l bidest. H ₂ O, pH 7.5	
LB-Platte	0.5%	Hefeextrakt
	1%	NaCl
	1%	Pepton
	1.2%	Agar
Lysepuffer (TNES)	50mM	Tris-HCl pH 8.0
	100mM	EDTA
	100mM	NaCl
	1%	SDS
	20mg/ml	Proteinase K
Neutralisierungslösung	1M	Tris-HCl pH 8
	1.5M	NaCl
RIPA-Puffer	1xPBS	
	1%	Nonidet P40
	0,5%	Natrium-Deoxychelate
	0,1%	Natrium-Dodecylsulfat
	10mM	EGTA
		Proteaseinhibitoren
SC-Medium	DMEM-Medium	
SOC	2 μ M	Forskolin
	2%	Trypton
	0.5%	Hefe-Extrakt
	10mM	NaCl
	2.5mM	KCl,
	10mM	MgCl ₂
	10mM	MgSO ₄
	20mM	Glucose
TBS	20mM	Tris pH 7,4
	150mM	NaCl
TE Puffer	100mM	Tris-HCl pH 9.5
	100mM	NaCl

Alle nicht aufgeführten oder gekennzeichneten Chemikalien wurden von den Firmen GibcoBRL, Merck, PAA, Roth und Sigma bezogen, die verwendeten Enzyme von den Firmen Roche und Invitrogen.

2.4 Oligonukleotide

Oligonucleotide zur Klonierung			
Gen	Domäne	Name	Sequenz
ADAM15	komplett	CR27-fullP	TGGCTGCTCCTCCACGCTTAG
		CR27-fullM	TTCCACCACCTACTCCAGCCC
	Disintegrin	Dis-Dom-5'	GATCCCCGGGATGTCCTCTTT GTGTGG
		Dis-Dom-3'-Stop	CGATGCGGCCGCTCAAGGCTC ACCGTCCCCAAGCC
	Metalloprotease bis Disintegrin	GSTohnePro-SE	GCATCCCCGGGATGTAGTAAC AGAG
		Dis-Dom-3'-Stop	CGATGCGGCCGCTCAAGGCTC ACCGTCCCCAAGCC
	Disintegrin bis Cysteinreiche	Dis-Dom-5'	GATCCCCGGGATGTCCTCTTT GTGTGG
		GSTohneTM-AS	CACGATGCGGCCGCGGAGCTG GTTGCTCTGAG
	Metalloprotease bis Cysteinreiche	GSTohnePro-SE	GCATCCCCGGGATGTAGTAAC AGAG
		GSTohneTM-AS	CACGATGCGGCCGCGGAGCTG GTTGCTCTGAG

Tabelle 2: Die aufgelisteten Oligonucleotide wurden alle bei der Firma MWG-Biotech bestellt und sind für die Spezies Ratte entwickelt worden.

Oligonucleotide für die quantitative PCR (Q-PCR)			
Gen	Basenpaare	Name	Sequenz
GAPDH	Start-1515 Ende-1565bp	QrGfwd	GAACGGGAAGCTCACTGGC
		QrGrev	GCATGTCAGATCCACAACGG
ODC	Start-371bp Ende-421bp	QrODCfwd	GGTTCCAGAGGCCAAACATC
		QrODCrev	GTTGCCACATTGACCGTGAC
ADAM15-3	Start-2127bp Ende-2129bp	rQMDC3_fwd	GGCACCTCCTGATTGCATG
		rQMDC3_rev	CTGTGGTCAGGGAGCTGGT
ADAM15-4	Start-432bp Ende-486bp	rQMDC4_fwd	AAACTGCTGCTATCGAGGACG
		rQMDC4_rev	GAGGGAGACCCAAGAGCTGG
ADAM8-2	Start-2261bp Ende-2311bp	rQADAM8_fwd	ACCGCTCCCAGTTCCTGTTT
		rQADAM8_rev	GGTCTAAGCTGGTTTGGTGCC
PMP22	Start-1293bp Ende-1343bp	QrPMPfwd	GCGGAACACTTGACCCTGAA
		QrPMPrev	TCATTTAAACATGTGGCCCCA

Tabelle 3: Die aufgelisteten Oligonucleotide wurden alle bei der Firma MWG-Biotech bestellt und sind für die Spezies Ratte entwickelt worden. GAPDH=Glyceraldehyde-Phosphate-Dehydrogenase, ODC=Ornithine Decarboxylase, PMP22=Periphäres Myelin Protein 22

2.5 DNA

2.5.1 DNA-Isolation

2.5.1.1 Bakterien-Suspensionen

Plasmid-DNA aus Bakterien-Suspensionen wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) isoliert und in einer Endkonzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in LiCrosolv-Wasser (Merck) gelöst.

2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs wurden in Standard-PCR-Reaktionen mit dem HotStar-System (Qiagen) nach folgendem Schema durchgeführt:

5 μl	10fach Puffer
4 μl	dNTP (2.5mM je)
10 μl	Q-Solution
20 μl	ddH ₂ O
5 μl	Primer 1 (20pmol/ μl)
5 μl	Primer 2 (20pmol/ μl)
0.25 μl	Taq (5U/ μl)
20ng	zu amplifizierende DNA oder 1 μl ddH ₂ O

	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1. Schritt	initiale Denaturierung	15min	95°C
2. Schritt	Denaturierung	30sec	95°C
3. Schritt	Primer Annealing	30sec	48-60°C
4. Schritt	Elongation	45-120sec	72°C
5. Schritt	terminale Elongation	10min.	72°C

Die Amplifikationsprodukte wurden in 0.8 bis 1.2%igen TAE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und fotografisch dokumentiert. Falls zur Klonierung weiter nötig, wurden die Produkte aus dem Gel extrahiert. Dies geschah nach dem Ausschneiden aus dem Gel durch Ultrafree-DNA Säulen (Millipore). Bei zu klonierenden Produkten wurde neben der Hotstar-*Taq*-Polymerase eine gleiche Menge *Pfu*-Polymerase (Invitrogen) mit Exonukleaseaktivität verwendet.

2.5.3 Klonierung von PCR-Produkten

2.5.3.1 Dephosphorylierung von Vektoren

Nicht käufliche erworbene Vektoren wurden nach dem Öffnen mit entsprechenden Restriktionsenzymen mittels einer alkalischen Phosphatase (SAP; Shrimp Alkali Phosphatase, Roche) mit 1U SAP je pmol DNA-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurde die Anzahl an pmol Enden durch die Faust-Formel $\frac{\mu\text{g}}{\text{kb}} \text{DNA} * 3.04$ errechnet. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurde die SAP inaktiviert, indem sie durch Erhitzen auf 65°C für 15 Minuten irreversibel denaturiert wurde.

2.5.3.2 Ligation

PCR-Produkte, die durch entsprechende DNA-Polymerasen einen TA Überhang besaßen, wurden mit Hilfe des TOPO-TA Klonierungssystems (Invitrogen) in den pCR-Vektor kloniert. Amplifikationsprodukte, die keine Überhänge, also „blunt“-Enden besaßen, wurden mit Hilfe des Zero-Blunt-Systems (Invitrogen) in den pZero-Vektor kloniert. Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente wurden in entsprechend gleich geschnittene und dephosphorylierte Vektoren über ein T4 Rapid DNA Ligation Kit (Roche) eingefügt. Dabei wurden 400-800ng DNA-Fragment und 20-40ng Vektor verwendet.

2.5.3.3 Transformation mittels Hitzeschock

Nach der Ligation der DNA-Fragmente in die entsprechenden Vektoren für ca. 30 Mi-

nuten bei Raumtemperatur wurde jeweils die Hälfte des Ligationsansatzes auf gefrorene kompetente *E.coli* Zellen (DH5 α TM Competent Cells, TOP 10, Invitrogen) gegeben und für 20 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde ein sogenannter „Heatshock“ durchgeführt. Hierbei wird das Reaktionsgefäß 45s lang in einem 42°C warmen Wasserbad erhitzt und danach für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 200 μ l SOC-Medium wurde das Reaktionsgefäß bei 37°C und 300rpm für 1h inkubiert. Abschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf LB-Platten mit dem Vektor-entsprechenden Antibiotikum verteilt und über Nacht bei 37°C gelagert. Die über Nacht entstandenen Kolonien wurden einzeln mit einem Zahnstocher in 5ml LB-Medium (inklusive Antibiotikum) überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd (200rpm) wachsen gelassen. Aus der entstandenen Bakteriensuspension wurden 500 μ l mit dem gleichen Volumen an 85%igem Glycerin versetzt und bei -80°C zur späteren Wiederverwendung eingefroren. Aus dem restlichen Teil des Ansatzes wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit (Qiagen) isoliert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 50 μ l Elutionspuffer eluiert. Um den Erfolg der Klonierung zu bestätigen, wurden die Plasmide mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wenn nötig, wurden die klonierten DNA-Fragmente sequenziert.

2.5.3.4 Transformation mittels Kälteschock

Im besonderen Fall der Proteinexpression von selbst generierten Fusionsproteinen, durch die Klonierung bestimmter ADAM15-Domänen in den pGex4T-2-Vektor, wurde die Transformation in einen Protease-inhibierten BL21 *E.coli*-Stamm (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Hierzu wurden die untransformierten BL21-Zellen in einer 5ml großen LB-Kultur für 3 Stunden bei 37°C und 200rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 1 ml große Proben aufgeteilt und vorsichtig bei 3.000g abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 100 μ l einer 50mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und mit ca. 10ng Vektor-DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurde jeder Ansatz in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und direkt in einem 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Nun wurde abschließend 200 μ l SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen nach 1h bei 37°C auf Ampizillin beinhaltenden LB-Platten ausplattiert, um sie über Nacht bei 37°C wachsen zu lassen. Die dadurch entstandenen Einzelkolonien wurden separat durch sterile Zahnsto-

cher in 5ml LB-Kulturen überführt und nach erneutem Wachstum über Nacht bei 37°C und 200rpm zur Isolation der Plasmide und der anschließenden Überprüfung der Sequenz verwendet. Enthielt ein Klon keine Sequenzfehler, so wurde er zur Proteinexpression der Fusionsproteine eingesetzt.

2.5.4 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf einer leicht veränderten Variante der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, 1977. Um einen Kettenabbruch herbeizuführen, werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut. An diese Nukleotide kann keine weitere Elongation erfolgen. Somit entsteht nach einer gewissen Zeit ein statistische Verteilung von verschiedenen Fragmentlängen, welche jeweils nach Art des letzten Nukleotids mit einem von vier Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diese Kettenabbruchmethode wurde mit dem BigDye Terminator System (Applied Biosystems) durchgeführt. Üblicherweise wurde eine Sequenzierung mit diesem System nach folgendem Schema durchgeführt:

1.5µl Primer (5pmol/µl)
 7µl ABI-Sequenzier-Mix
 1µg DNA
 ad 20µl ddH₂O

	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1. Schritt	initiale Denaturierung	2min	95°C
2. Schritt	Denaturierung	30sec	92°C
3. Schritt	Primer Anealing	30sec	54°C
4. Schritt	Elongation	4min	60°C

Die Schritte 2-4 der Reaktion wurden 25 mal durchgeführt.

Die entstandenen Fragmente wurden von den überschüssigen Nukleotiden und der Polymerase durch DyeEx-Säulen (Qiagen) befreit. Dieser aufgereinigte Sequenzieransatz (15µl) wurde mit 15µl TSR (template suppression reagent, Applied Biosystems) vermischt und für 2min bei 92°C denaturiert, bevor er in einem ABI 310 (Applied Biosystems) durch POP6-Polymer elektrophoretisch aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten Nukleotide detektiert wurden. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme

Sequencing Analysis 2.1.2 (Applied Biosystems), Sequencher (Gene Codes), sowie den BLASTN Suchdiensten des Internets.

2.6 RNA

Bei der Isolation von RNA aus Geweben oder eukaryotischen Zellen muss besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, dass die RNA nicht durch exogene Ribonukleasen in den verwendeten Medien und Geräten degradiert wird. Hierzu wurden alle benötigten Puffer und Geräte eine Stunde mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Um eine Modifikation an der RNA durch DEPC zu verhindern, wurden nach der einstündigen Behandlung, Puffer und Geräte für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert, um das DEPC zu inaktivieren. Alle entnommenen Zellen bzw. Gewebe wurden direkt auf Trockeneis überführt, sowie jede RNA wie auch cDNA auf Eis pipettiert und weiterhin so lange wie möglich bei -20°C gelagert.

2.6.1 RNA-Isolierung aus dem Ischiasnerv der Ratte

Da der Ischiasnerv der Ratte durch das Myelin sehr lipidhaltig ist, wurde zur besseren Ausbeute an Gesamt-RNA, eine klassische Aufreinigung mit Hilfe von GTC (Guanidine-Thiocyanate) nach folgendem Schema durchgeführt. Die RNA wurde über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt und über Nacht bei -20°C durch Zugabe von 1/10 Volumen Natrium-Acetat und zwei Volumen absolutem Ethanol gefällt. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C in einer Heraeus Tischzentrifuge wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50µl ddH₂O_{DEPC} gelöst.

2.6.2 RNA-Isolierung aus Zellen der Zellkultur

Die RNA aus verschieden transfizierten, infizierten oder auch nativen Zellen der Zellkultur wurde mit Hilfe des RNeasy Prep Systems (Qiagen) isoliert. Dieses System beinhaltet optional einen Zusatzschritt, der die noch teilweise vorhandene DNA durch eine DNase-Inkubation (Qiagen) für 15 Minuten bei Raumtemperatur entfernt.

2.6.3 Reverse Transkription (RT) und RT-PCR

Die RNA muss vor einer PCR in einer Reversen-Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Hierbei wurde die Reverse-Transkriptase-Superscript II (GibcoBRL) wie folgt verwendet:

1 μ g	total RNA	10min	Raumtemperatur
3 μ l	dNTP (2.5mM je dNTP)	1h	42°C
1 μ l	Oligo(dT) (50 μ M)	5min	99°C
2 μ l	DTT	Lagerung	-20°C
10U	RNasin		
1U	Superscript II		
ad 19 μ l	ddH ₂ O-DEPC		

Jeweils 2 μ l der cDNA wurden in oben beschriebenen PCRs eingesetzt.

2.6.4 Quantitative PCR (Q-PCR)

Die zu untersuchenden Zellen wurden einer dem Versuch entsprechenden Zeit unter normalen Kulturbedingungen gehalten, die RNA anschließend mit Hilfe des RNeasy-System (Qiagen) isoliert und in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Standardmäßig wurde der halbe Ansatz in einer wie oben beschriebenen RT in cDNA umgeschrieben und auf 200 μ l mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die quantitative PCR erfolgte mit genspezifischen Primern in einem GeneAmp 7100 mittels des SYBR-Green-Systems (Applied Biosystems), wobei als Referenzen die Gene der Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bzw. der Ornithin-Decarboxylase (ODC) der Ratte dienten.

2.7 Proteine

2.7.1 Protein-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Um Proteine aus Zellen oder Gewebe zu isolieren, wurde das Gewebe zunächst in 6M Harnstoff mit einem Ultraturax homogenisiert. Anschließend wurden zur besseren Zerkleinerung noch 10-15 mal kurze Ultraschallstöße (2s) benutzt. Das erhaltene Homogenat wurde dann für 15 Minuten bei 10.000g in einer Sorvall Zentrifuge zentrifugiert. Der post-nukleäre Überstand wurde dann direkt für eine SDS-PAGE benutzt. Das Pellet wurde mit RIPA-Puffer versehen und anschließend nach kurzer Resuspendierung und Inkubation für

10 Minuten bei Raumtemperatur für die SDS-PAGE verwendet.

Die Proteinkonzentration wurde mit dem detergentenverträglichen DC Protein Assay (Bio-rad, München) bestimmt. Als Referenz wurde Rinder-Serum-Albumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen bestimmt.

2.7.2 GST-Fusionsprotein-Isolation aus proteasedefizienten BL21 Zellen

E. coli-BL21-Zellen, welche mit verschiedenen pGex4T-2-Vektoren (Invitrogen) transformiert wurden, sind zuerst über Nacht aus einem Glycerinstock in einem 50ml LB-Medium gefülltem Ansatz expandiert worden. Am nächsten Morgen wurden 7ml der Übernachtskultur in 300ml LB-Medium überführt und für ca. 3 Stunden bei 37°C und 220rpm wachsen gelassen, bis eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht war. Anschließend wurde diese Kultur für 1,5 Stunden mit einer Endkonzentration von 0,5mM IPTG stimuliert. Am Ende der Stimulation wurden die Zellen vorsichtig bei 6.000g in einer Sorvall Zentrifuge pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 10ml eiskaltem PBS resuspendiert und in Correx-Röhrchen überführt, um dreimal für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt zu werden. Nach den Ultraschallbehandlungen wurde die Proteinsuspension mit der entsprechenden Menge Triton-X-100 auf eine Endkonzentration von 1% gebracht und auf einem horizontalem Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Suspension für 15 Minuten bei 10.000g zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde für spätere Kontrollen aufbewahrt. Der Überstand wurde nun mit 500µl eines 50%igen Gemisches aus Glutathion SepharoseTM 4B (Amersham Bioscience) und PBS versetzt und für 40 Minuten bei 4°C horizontal geschüttelt. Nach 40 Minuten wurde die Lösung bei 1.500g zentrifugiert und das Pellet in 3 ml eiskaltem PBS resuspendiert, um es in eine Säule (HandeeTM Spin Cup Columns) zu überführen. Nach dreimaligem Waschen mit 3ml PBS wurde das an die GST-Sepharose gebundene Protein mit 1ml reduziertem Glutathion eluiert. Dies wurde noch zweimal mit jeweils 1ml wiederholt. Zur Kontrolle wurden neben den drei Eluaten (E1-3) auch jeweils kleine Proben vor der Inkubation (VI) mit IPTG, nach der Inkubation (NI) mit IPTG, dem Überstand (ÜS), dem Pellet (PE) und dem ersten Waschschrift (WA) entnommen, um die Effizienz der Aufreinigung zu überprüfen. Die Proben wurden, wenn nötig, kurz mit Ultraschall behandelt und dann für die SDS-PAGE benutzt.

2.7.3 Oberflächenbiotinylierung von Proteinen auf Schwanzzellen und HeLa-Zellen

Zur Detektion von ADAM15 auf der Oberfläche von überexprimierenden HeLa-Zellen wurden diese in einer im Durchmesser 10cm großen Petrischale unter subkonfluenten Bedingungen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS pH 8.0 wurden zwei Milliliter EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS (0,5mg/ml, Pierce) für 30 Minuten auf die Zellen gegeben und unter leichtem Schütteln bei 100rpm inkubiert. Anschließend wurde die Platte wiederum zweimal mit eiskaltem PBS pH 8.0 gewaschen und die Zellen mit 1,5ml Pro FoundTM Lysis Puffer (Amersham Bioscience), versetzt mit Proteaseinhibitoren, aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation auf einem Überkopfschüttler bei 4°C wurde bei 10.000g zentrifugiert und ausschließlich der Überstand mit 50µl NeutravidinTM Biotin Binding Protein4B (Pierce) versehen und wiederum bei 4°C für 1 Stunde inkubiert. Die anschließende Aufreinigung wurde in Säulen der Firma Pierce (HandeeTM Spin Cup Columns) durchgeführt. Diese hielten die an Sepharosemolekül gebundenen, biotinylierten Oberflächenproteine zurück. Es wurde in den oben zu verschließenden Säulen dreimal mit eiskaltem PBS pH 8.0 gewaschen und abschließend zur Elution mit 2-fachem SDS-Ladungspuffer für 5 Minuten bei 100°C inkubiert und direkt durch die Säule zentrifugiert. Die erhaltenen Eluate wurden durch 10%ige SDS-Gele aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nylonmembran versucht, sie mit entsprechenden Antikörpern (anti-ADAM15) nachzuweisen.

2.7.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Überstände und Pellets der vorhergehenden Proteinisolation wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 2% SDS, 10% Glycerol, 60mM Tris-HCl pH 6.8, 1% Bromphenolblau, 100mM DTT) versehen und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die nicht löslichen Teile der Membranfraktion bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand auf einem 10-15%ige Polyacrylamid-Gel mit gesondertem Sammelgel nach der Methode von Laemmli (1970) in einer SE 250 Mighty Small Gelapparatur (Hofer, 10x8 cm Gelformat) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abschließend wurde das Polyacrylamid-Gel mit Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg) gefärbt.

2.7.5 Western-Blot-Analyse

Sollte nach der SDS-PAGE nicht nur eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg) erfolgen, sondern auch eine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden, so wurde das Polyacrylamid-Gel nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in einer Semi-Dry-Plot-Apparatur (Biorad) mit $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ auf eine Nitrocellulose-Membran (HybondTMECL, Amersham-Pharmacia-Biotech) übertragen. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit PonceauS-Färbung behandelt. War der Transfer erfolgreich, wurde die Nitrocellulosemembran wieder entfärbt und zum Absättigen von freien Bindungsstellen mit 3% Magermilchpulver und 1% BSA in TBS über Nacht bei 4°C behandelt. Am nächsten Morgen wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde mit dem Erstantikörper bei Raumtemperatur in 0.05% Tween/TBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0.05% Tween/TBS wurde ein geeigneter, Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper für eine Stunde zur Blot-Membran gegeben. Abschließend wurde zweimal mit 0.05% Tween/TBS und ein weiteres mal mit TBS gewaschen. Um die durch Bindung des Erstantikörper entstandenen Immunkomplexe zu detektieren, wurde ein ECL-System (Amersham Pharmacia) und ein ECL-Hyperfilm (Amersham Pharmacia) eingesetzt.

2.7.6 Enzymatischer Verdau des basischen Myelin Proteins (MBP) durch ADAM15

Um die Aktivität der Metalloprotease zu überprüfen, wurde die extrazelluläre Domäne von ADAM15 als Fusionsprotein in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 exprimiert und durch das N-terminale GST, wie schon beschrieben, aufgereinigt. $10\mu\text{g}$ MBP wurden in einem Tris-HCl-Puffer mit $100\mu\text{M}$ ZnCl_2 , 5mM CaCl_2 und 200mM NaCl gelöst und mit $2\mu\text{g}$ des Fusionsprotein aus GST und extrazellulärer Domäne von ADAM15 in einem Endvolumen von $100\mu\text{l}$ bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurde einmal die gleiche Menge MBP bei 4°C und bei 37°C ebenfalls für 3 Stunden aufbewahrt und des weiteren zur Beschreibung der proteolytisch möglichen Bedingungen ein Verdau von $10\mu\text{g}$ MBP durch eine Protease des *Staphylococcus aureus* (Firma Sigma), ebenfalls in dem verwendeten Tris-HCl-Puffer, sowie in PBS für 3 Stunden bei 37°C durchgeführt. In weiteren Versuchen wurde auch das Fusionsprotein aus GST, Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne in

gleicher Weise verwendet.

2.8 Zellkultur

Alle Geräte, die in der Zellkultur Verwendung fanden, wurden für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert, oder direkt unter der Sterilbank aus ihrer sterilen Verpackung entnommen.

2.8.1 Zellkultur von Schwanzzellen der Ratte

Schwanzzellen der Ratte wurden regelmäßig als Primärkultur aus Ischiasnerven präpariert und kultiviert. Bei der Präparation wurde nach dem leicht modifiziertem Protokoll von Brockes *et al.*, 1979 vorgegangen. Die Ischiasnerven werden hierbei aus sechs adulten Ratten entnommen und vorsichtig von Fett- und Bindegewebe befreit, um sie mit Trypsin sowie Collagenase für 60min bei 37°C zu inkubieren. Anschließend wurden die Ischiasnerven durch leichtes Zupfen in fadenförmige einzelne Fragmente zerlegt und durch eine 0,7mm sowie 0,4mm starke Kanüle trituiert. Abschließend wurden die Zellkonglomerate durch eine 60 μ m dichte Gaze filtriert und die dadurch erhaltenen Zellen in zwei Gewebekulturflaschen (25cm², Greiner BioOne) mit DMEM-Medium ohne Forskolin kultiviert. Um eine möglichst reine Schwanzzellkultur ohne Fibroblasten zu erhalten, wurde nach 24 Stunden ein Mitoseinhibitor (AraC, Sigma) zum Medium hinzugegeben (10 μ M), wodurch die sich viel schneller teilenden Fibroblasten in der Mitose verharren. Nach weiteren sieben bis acht Tagen wurden die Zellen passagiert und eine erste Komplementlyse mit Komplement (extrahiert aus Kaninchen) gezielt gegen Fibroblasten durchgeführt, wodurch die sich nicht mehr teilenden Fibroblasten lysiert werden. Die so erhaltenen Zellen wurden in Proliferationsmedium mit 2 μ M Forskolin (Sigma) und 100 μ g/ml GGF (Sigma) gehalten, erneut passagiert, um einer weiteren Komplementlyse unterzogen zu werden. Die nun reine Schwanzzellkultur wurde expandiert und zu späteren Versuchen in Aliquots eingefroren. In der Regel kamen keine Schwanzzellen zur Verwendung, die häufiger als zwölfmal passagiert wurden.

2.8.1.1 PDL-Beschichtung der Zellkulturgefäße

Schwanzzellen besitzen eine nicht ausreichend hohe Adhärenz zu Plastikoberflächen, um ohne eine weitere Beschichtung in Plastikzellkulturflaschen zu wachsen. Daher wurden

alle Zellkulturgefäße vorher mit Poly(D)-Lysin (PDL, Sigma, Endkonzentration 0,1mg/ml gelöst in PBS) für 30 Minuten bei 37°C beschichtet. Vor der Benutzung dieser nun mit positiver Ladung beschichteten Gefäße wurde das überschüssige PDL von den Gefäßen entfernt, indem es dreimal mit PBS gewaschen wurde.

2.8.1.2 Passagierung und Kryokonservierung von Zellen der Zellkultur

Erreichten die Zellkulturen eine bestimmte Zelldichte (Konfluenz), wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 2min mit 5ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 5ml FCS-haltigem Medium inaktiviert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50ml großes Reaktionsgefäß überführt und für sieben Minuten bei 1.400rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet zuerst in 1ml entsprechendem Medium resuspendiert, um es dann abschließend in ausreichender Menge Medium zu verdünnen und in bis zu drei neuen Zellkulturgefäßen gleicher Größe erneut zu kultivieren. Sollten die Zellen nicht weiter passagiert, sondern zur späteren Kryokonservierung eingefroren werden, wurden sie wie oben beschrieben trypsiniert und zentrifugiert, um in Einfriermedium resuspendiert zu werden. Die entstandene Zellsuspension wurde zu je 1ml in Kryo-Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden nun langsam eingefroren, hierzu wurden die Zellen zuerst für 1 Stunde bei -20°C gelagert, anschließend über Nacht bei -80°C, um sie letztendlich bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufzubewahren.

2.8.1.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die Zellen aus einem Kryo-Röhrchen wurden schnellstmöglich auf 37°C erwärmt und direkt auf 37°C vorgewärmtes Medium in einer Zellkulturschale gegeben, um weiteren Streß durch Zentrifugation zu vermeiden. Nach acht Stunden Kultivierung wurde das Medium wieder vorsichtig abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Dadurch wurden alle bis dahin adhärenen Zellen von toten und nicht adhärenen Zellen bereinigt.

2.8.2 Präparation und Kultivierung von dorsalen Spinalganglien (DRG) als *in-vitro*-Explantate

Hierzu wurden Embryonen idealerweise 15 Tage nach Befruchtung aus einer schwangeren Ratte entnommen und direkt auf Eis gelagert. Alle Arbeiten wurden an einer horizontal

belüfteten Flow (GelAIRE) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Dekaptierung der Embryonen wurden die Körper einzeln und nacheinander durch Insektenpräparationsnadeln in einem Glasschälchen auf Silikon fixiert. Das sterile Glasschälchen wurde mit sterilem PBS so gefüllt, dass der ganze Körper bedeckt war. Nach dem vorsichtigen Abzupfen der Haut direkt über dem Rückgrat wurde das Rückgrat vom Schwanz her zum Kopf hin herausgezogen. Hierbei werden die DRGs sichtbar und nach dem Freilegen mit einem feinem Spatel vom umliegenden Gewebe entnommen. Die DRGs wurden direkt in eine 0,6% Glukoselösung überführt und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die DRGs in DMEM-Medium überführt und von noch vorhandenen Geweberesten befreit, sowie gleichzeitig halbiert. Die halbierten DRGs wurden nun zu etwa drei Fragmenten pro Well in einem LabTek-Chamber-Slide (Firma: Nalgene Nunc International) so positioniert, dass sie genügend Platz für das Wachstum hatten. Nach drei Stunden bei 37°C, 10% CO₂ wurden 150µl von insgesamt 300µl Mediums entnommen und durch frisches Medium (DMEM mit 10%FCS, 10ng/ml NGF und 10µM FUDR) ersetzt. Für Zeitreihen wurden die DRG circa alle fünf Stunden mit einem Phasenkontrast-Mikroskop der Firma Nikon bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Bei den Vergleichen der Größen wurden die Zellen nach 24 Stunden fixiert und eine DAB-Färbungen mit einem polyklonalem S100-Antikörper auf DAB-Basis durchgeführt.

2.8.3 Immunhistochemische Färbung an dorsalen Spinalganglien als *in-vitro*-Explantate

Hierbei wurden die Explantate für 15 Minuten bei RT in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und wie bei einer DAB-Färbung für 30 Minuten mit 0,3% H₂O₂ in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden alle unspezifischen Bindungen des Zweitantikörpers durch Inkubation in 10% Normal-Goat-Serum (NGS in PBS) mit 0,1% TritonX-100 für 30 Minuten blockiert. Nach Absaugen der Blockierlösung wurde der Erstantikörper (polyklonaler S100 Antikörper der Firma Sigma, 1:2.000 in PBS und 0,1% TritonX-100) über Nacht bei 4°C auf die Explantate gegeben. Nach dem erneutem Waschen mit PBS mit 0,1% TritonX-100 wurde zur Verstärkung der späteren Signale ein adäquater biotinylierter Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-biotinyliert, 1:200 verdünnt in PBS+ 0,1% TritonX-100) verwendet. Dieser wurde für 30 Minuten in jedes Well gegeben.

Zur gleichen Zeit wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex der Firma Vector Laboratories vorbereitet und nach der Zweitantikörperinkubation und dem erneuten Waschen mit PBS + 0,1% TritonX-100 für weitere 30 Minuten auf die Explantate gegeben. Vor der Farbreaktion mit 0,2mg/ml Diaminobenzidin und 0,004% H₂O₂ für zirka 10 Minuten wurde noch einmal mit PBS + 0,1% TritonX-100 gewaschen. Abschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Explantate mit Fluoromount von der Firma Southern Biotechnology Associates eingedeckelt. Zur Bestimmung der Verhältnisse des Neuritenfeldes und des Schwanzzellfeldes wurden die Explantate mit einer CCD-Kamera (Nikon) aufgenommen, immer in der gleichen Größe ausgedruckt, um Kreise um die verschiedenen Ausdehnungen der Neuriten und Schwanzzellen per Hand zu ziehen und durch jeweils dreimaliger Bestimmung des Durchmessers eine Fläche zu berechnen. Für die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung wurde ähnlich verfahren, initial wurde auch hier mit NGS und NHS blockiert. Die Erstantikörper wurden einzeln auf die fixierten Explantate gegeben, da diese miteinander kreuzreagierten. Hier wurde gegen S100 ein monoklonaler Maus-Antikörper der Firma Sigma gewählt und für den Nachweis der Neurone und Axone wurde ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper der Firma Sigma eingesetzt. Beide Antikörper wurden jeweils 1:2.000 in PBS + 0,1% TritonX-100 über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden nach dem Waschen mit PBS + 0,1% TritonX-100 auch die Zweitantikörper jeweils gegen die Erstantikörper separat für jeweils eine Stunde inkubiert. Die Zweitantikörper waren direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nach dem abschließendem Waschen mit PBS + 0,1% TritonX-100 wurden die Explantate mit Fluoromount eingedeckelt.

2.8.4 Transiente Überexpression von ADAM15 in HeLa-Zellen

Die ADAM15-cDNA des entsprechenden Gens der Ratte wurden in einen pIRES2-EGFP-Vektor (BD Bioscience/Clontech) kloniert (pIADAM15). Als Kontrollvektor diente der unveränderte pIRES2-EGFP-Vektor. Zur Transfektion der pIRES-Konstrukte wurden 24 h vor der Transfektion jeweils 700.000 Zellen auf einer unbeschichtete Kulturplatte (10cm Durchmesser) kultiviert. Je Kulturplatte wurden 15µg pIRES2-EGFP- bzw. pIADAM15-Konstrukt in 200µl HEPES-DMEM, sowie in einem weiteren Reaktionsgefäß 54µl Fugene6 (Roche) in 1,8ml HEPES-DMEM gemischt, 10min inkubiert, vereinigt und weitere 10 Mi-

nuten inkubiert, bevor die Suspension zu den Zellen hinzugegeben wurde. Nach 48 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen wurden die Zellen mit 6M Harnstoff lysiert und nach kurzer Ultraschallbehandlung bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der entsprechenden Menge an SDS-Ladungspuffer in 10%igen SDS-Gelen aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran mit Antikörpern gegen ADAM15 überprüft.

2.8.5 Stabile Expression von ADAM15 in Schwanzzellen der Ratte und HeLa-Zellen durch retrovirale Infektion.

Da für Adhäsionsversuche möglichst eine stabile Expression von ADAM15 nötig war, wurden Schwanzzellen der Ratte und auch HeLa-Zellen durch virale Einschleusung von ADAM15 in das Genom hergestellt. Hierzu wurde die cDNA von ADAM15 in den Vektor S11IEG3NEO inkloniert und 15 μ g des überprüften und aufgereinigten Vektors mittels Fugene6 in subkonfluent wachsende, ecotrophe Phönix-Verpackungszellen (Schulze *et al.*, 2002) transfiziert. Nach 16 Stunden wurde das Medium gewechselt und der virushaltige Überstand nach weiteren zwei Tagen durch einen 0,45 μ m großen Filter gegeben. Der nach der Rückgewinnung aus dem Filter zellfreie, infektiöse Überstand wurde an drei aufeinander folgenden Tagen zu je 1,5ml versetzt mit 7,5 μ g Protaminsulfat/ml (Hanenberg *et al.*, 1997) auf die PG13-Verpackungszellen (Miller *et al.*, 1991) gegeben. Die nun stabilen GALV-pseudotypen Viren produzierenden PG13-Verpackungszellen wurden vier Tage lang mit an jedem Tag erneuertem Medium wachsen gelassen und aus dem viermal abgenommene Überstand erneut durch Filtration die Viruspartikel gewonnen. Die subkonfluenten Schwann- oder HeLa-Zellen wurden an zwei verschiedenen Tagen mit den isolierten Viruspartikeln in 7,5 μ g/ml Protaminsulfat enthaltendem Medium infiziert und nach einem Tag unter Einfluß von 0,8mg/ml Geneticin passagiert. Die Zellen wurde mindestens zehn Tage durch die Behandlung von 0,8mg/ml Geneticin auf die infizierten Zellen durch die enthaltene Geneticinresistenz selektioniert.

2.9 Substratadhäsion von MDC15-überexprimierenden Schwannzellen bzw. HeLa-Zellen

Für die Bestimmung der Adhäsion wurde indirekt die Vitalität der Schwannzellen bestimmt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (MaxiSorb, Nunc) mit 100 μ l Laminin, Fibronectin oder Vitronectin (10 μ g/ml in PBS) zu sechs Vertiefungen je Protein versehen. Zusätzlich wurden für jeden Zelltyp sechs Vertiefungen mit Poly-(D)-Lysin (PDL) beschichtet. Diese dienen zur absoluten Nivellierung der Zellzahlen, da die Haftung der Zellen am geladenen PDL nicht abhängig von der Oberflächenmolekül-Zusammensetzung sein sollte. Nach der Inkubation der verschiedenen Oberflächen über Nacht bei 4°C wurden alle Vertiefungen für eine Stunde mit 1% BSA bei 37°C blockiert, um unspezifische Adhäsion an die Kunststoffoberfläche zu vermeiden. Vor der Zugabe der Zellen wurde jede Vertiefung noch zweimal mit PBS gewaschen. Die subkonfluent infizierten Zellen wurden durch Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und nach dem Stoppen mit FCS-haltigem DMEM-Medium abzentrifugiert. Die erhaltenen Zellen wurden dann in einer Konzentration von 100.000 Zellen/ml in Schwannzell-Medium aufgenommen. 100 μ l dieser Zellsuspension wurde dann in die entsprechenden Vertiefungen eingefüllt und für 1,5 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde jede Vertiefung einmal mit PBS gewaschen und mit 120 μ l Medium folgender Zusammensetzung befüllt: 10ml DMEM-Schwannzell-Medium mit 2ml MTS-Stammlösung [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, 2mg/ml in PBS] und 100 μ l PMS-Stammlösung (Phenazinmethosulfat, Elektronenkoppler, 920 μ g/ml in PBS). Nach drei Stunden Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ wurde eine erste Messung in einem ELISA-Plattenlesegerät MRX der Firma Dynex Technologies bei einer Wellenlänge von 490 nm durchgeführt. Die entstandenen Werte wurden dann relativ zu den gemessenen Werten auf PDL normiert.

3 Ergebnisse

3.1 Western-Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen verschiedene Domänen des ADAM15-Proteins

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Kaninchen mit ausgewählten Peptiden aus verschiedenen Domänen von ADAM15 immunisiert. Hierzu wurden vier verschiedene Domänen ausgewählt, die in Tabelle 4 näher beschrieben sind.

Polyklonale Kaninchen-Seren gegen ADAM15 (CRII-7)			
Domäne	Name	Peptid für die Immunisierung	Schema
Pro	7-1-(1-3)	EEQQASPERTQSRLEN	
Metalloprotease	7-7-(1-3)	NFLRWRRTDLLPRLP	
Disintegrin	7-9-(1-3)	EQCDCGFPDECTPDPC	
Cytoplasmatische	7-15-(1-3)	PERPGPPQRAQQMPGTK	

Tabelle 4: **Schema zur Generierung von polyklonalen Antikörper gegen verschiedene Domänen von ADAM15.** Je drei Kaninchen wurden mit den angegebenen Peptiden immunisiert. Die Namensgebung der resultierenden Antikörper entstand durch die Ziffer sieben aus CRII-7, dann der Nummer des Peptids zur Immunisierung (1, 7, 9, 15) und abschließend durch die Nummer des immunisierten Tieres (1-3). Zum Beispiel entspricht 7-15-3 einem polyklonalem ADAM15-Antikörper (7) der gegen die Cytoplasmatische-Domäne (15) gerichtet ist und bei der Immunisierung des dritten Tieres generiert wurde (3).

3.1.1 Nachweis von ADAM15 in Gehirnhomogenat von Ratten

Für ein initiales Screening der erhaltenen polyklonalen Antiseren wurden Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines Proteinhomogenats aus Rattengehirn in 6M Harnstoff durchgeführt. Je 20 μ g Protein wurden in einem 10%igem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, und die Proteine durch Blotten auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend in Streifen geschnitten und mit den zwölf verschiedenen Antikörpern (Tabelle 4) gegen die unterschiedlichen Protein-Domänen von ADAM15 inkubiert (Abbildungen 5). Es lassen sich mit den verschiedenen Antiseren drei Ban-

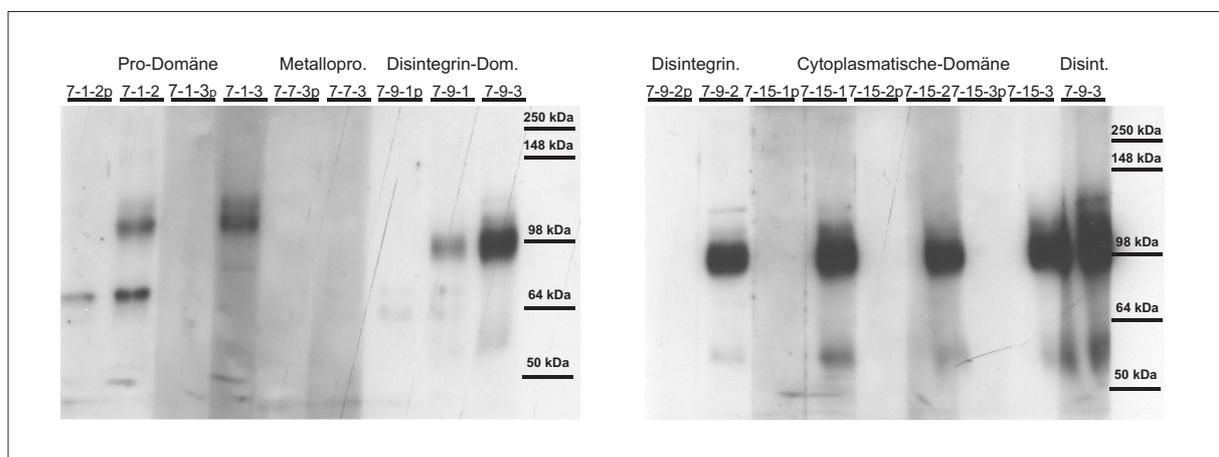


Abbildung 5: **Western-Blot-Detektion von ADAM15 in Gehirnhomogenat von Ratten mit verschiedenen Antikörpern gegen ADAM15.** Je 20 μ g eines Gehirnhomogenates der Ratte wurden durch ein 10%iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblottet und mit den in der Tabelle 4 aufgelisteten Antikörpern inkubiert. Die Antikörper 7-1-2 und 7-1-3 sind gegen die Pro-Domäne gerichtet, der Antikörper 7-7-3 soll die Metalloprotease-Domäne erkennen, die Antikörper 7-9-1, 7-9-2 und 7-9-3 sind gegen die Disintegrin-Domäne gerichtet und die Antikörper 7-15-1, 7-15-2 und 7-15-3 erkennen die Cytoplasmatische-Domäne. Alle Spuren, die mit einem p gekennzeichnet sind, wurden mit dem entsprechenden Präimmunsereum des später immunisierten Tieres inkubiert.

den erkennen, die unterschiedlich prozessierte Proteinzustände entsprechen dürften. Mit den Antikörpern 7-1-2 und 7-1-3 (Pro-Domäne) erkennt man eine Bande oberhalb der 98kDa Markerbande und zusätzlich bei dem Antikörper 7-1-2 noch eine weitere Bande etwas oberhalb der vergleichbaren 65kDa Markerbande. Da diese Bande jedoch auch mit dem entsprechenden Präimmunsereum (7-1-2p) zu detektieren ist, handelt es sich hierbei vermutlich um keine spezifische ADAM15 Bande. Mit allen drei Antikörper gegen die Metalloprotease-Domäne (7-7-1 bis 7-7-3, 7-7-1 und 7-7-2 Ergebnisse hier nicht gezeigt)

sind keine Banden zu detektieren. Mit den Antikörpern gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-1, 7-9-2 und 7-9-3) sind dagegen drei Banden nachweisbar. Der Antikörper 7-9-1 ruft hierbei jedoch nur eine schwache Detektion hervor, so dass die Bande oberhalb von 98kDa und die niedermolekulare Bande bei circa 55kDa fast nicht zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu sind mit allen drei Antikörpern gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-1 bis 7-15-3) drei Banden nachweisbar. Die Präimmunsereen (mit p gekennzeichneten Spuren) belegen eine spezifische Antwort der Antikörper. Alle nicht gezeigten Seren (7-1-1, 7-7-1 und 7-7-2) zeigten keine spezifischen Signale. In Tabelle 5 ist die Reaktivität der verschiedenen polyklonalen Antikörper noch einmal zusammengefasst.

Reaktivität der polyklonalen Kaninchen-Seren gegen ADAM15			
Domäne	Peptid für die Immunisierung	Name	Reaktivität
Pro	EEQQASPERTQSRLEN	7-1-1	-
		7-1-2	+
		7-1-3	+
Metalloprotease	NFLRWRRTDLLPRLP	7-7-1	-
		7-7-2	-
		7-7-3	-
Disintegrin	EQCDCGFPDECTPDPC	7-9-1	+
		7-9-2	++
		7-9-3	+++
Cytoplasmatische	PERPGPPQRAQQMPGTK	7-15-1	++
		7-15-2	++
		7-15-3	++

Tabelle 5: Schema zur Reaktivität der gewonnenen polyklonalen Antikörper gegen ADAM15. Auflistung aller generierter Antiseren gegen ADAM15 mit der Stärke ihrer Reaktivität auf Gehirnhomogenate der Ratte.

3.1.2 Transiente Überexpression von ADAM15 in HeLa-Zellen

Um die drei detektierten Banden im Gehirnlisat von Ratten auch als spezifische ADAM15-Banden nachzuweisen, wurde die cDNA von ADAM15 in einen pIRES2-EGFP-Vektor

(Clontech) kloniert und HeLa-Zellen mit diesem Vektor mittels Fugene6 (Roche) transfiziert. HeLa-Zellen wurden verwendet, da sie *per se* kein rattenspezifisches ADAM15 exprimieren. Das Gesamt-Zelllysat der transfizierten HeLa-Zellen wurde für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt. Dabei wurde getestet, ob das rekombinant exprimierte ADAM15 durch die generierten polyklonalen Antikörper (Tabelle 4) nachzuweisen war. Als Kon-

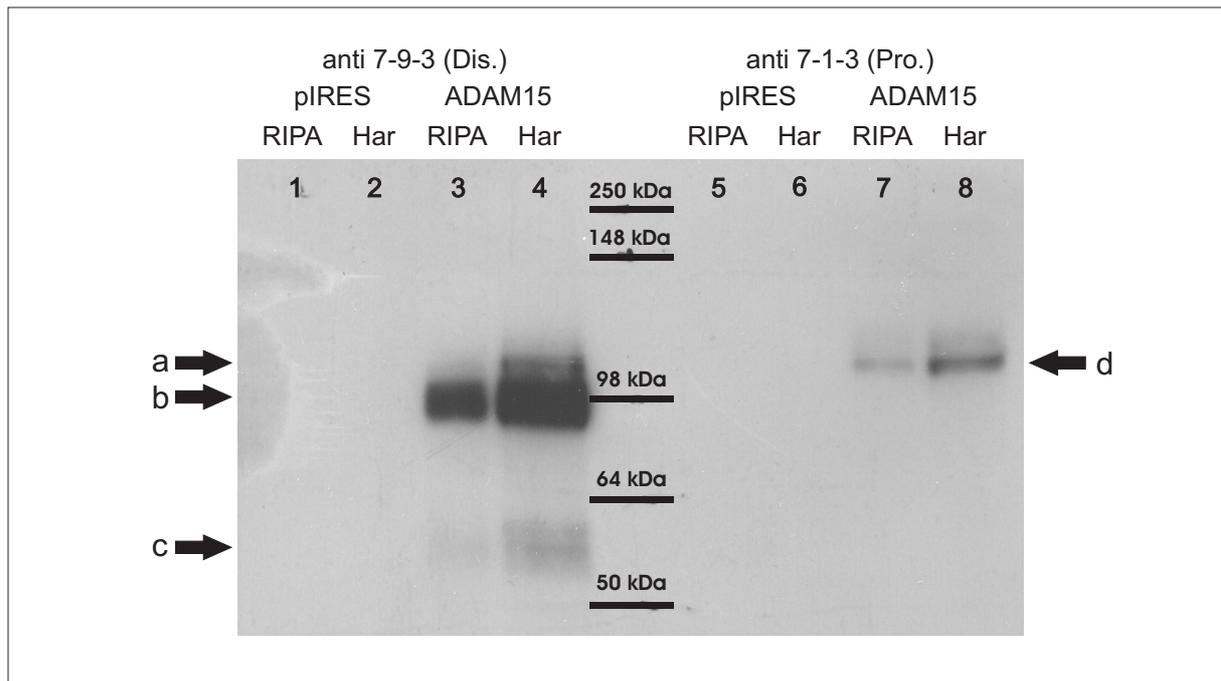


Abbildung 6: Western-Blot-Analyse von Proteinhomogenaten ADAM15-überexprimierender HeLa-Zellen. Das Gesamtprotein von ADAM15-überexprimierenden HeLa-Zellen wurde in einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran gebロットet und mit einem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-3, 1:500 verdünnt in TBS-T) bzw. einem Antikörper gegen die Pro-Domäne (7-1-3, 1:500 verdünnt in TBS-T) inkubiert. Die Visualisierung mit goat-anti-rabbit-HRP (1:10.000) und einem ECL-Detektionssystem zeigt ADAM15-spezifische Banden nur in den ADAM15 überexprimierenden HeLa-Zellen (Spuren 3, 4, 7, 8). Zwei Solubilisierungslösungen wurden auf ihre bestmöglichen Eigenschaften untersucht, in diesem Fall eine RIPA-Lösung (RIPA) und eine 6M Harnstofflösung (Har). (1, 2, 5, 6): Gelspuren von Proteinlysat aus HeLa-Zellen mit „Leer“-Vektor pIRES2-EGFP; (3, 4, 7, 8): Gelspuren von Proteinlysat der ADAM15-überexprimierenden HeLa-Zellen.

trolle diente in diesem Versuch ein Proteinlysat aus kultivierten HeLa-Zellen, die mit dem „Leer“-Vektor pIRES2-EGFP (Clontech) transfiziert worden waren. Es wurden zwei verschiedene Lösungen zur Solubilisierung der präparierten Proteine verwendet, einmal eine RIPA-Lösung und zum anderen 6M Harnstoff.

In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass bei der Western-Blot-Analyse unter Verwendung

der Antikörper 7-9-3 und 7-1-3 spezifische Banden nur in den Spuren der ADAM15-überexprimierenden HeLa-Zellen zu erkennen sind. Eine stärkere Solubilisierung der Proteine wurde mit 6M Harnstoff erzielt (Abbildung 6, Spur 4 und Spur 8). Bei der Detektion mit dem Antikörper 7-9-3, der gegen die Disintegrin-Domäne gerichtet ist, werden drei verschieden große Banden (Pfeile a, b, c) identifiziert, eine schwächere Bande oberhalb der Höhe der 98kDa Markerbande (Pfeil a), eine sehr starke Bande auf etwa der gleichen Höhe wie die 98kDa Markerbande (Pfeil b) und eine weitere schwache Bande bei circa 55kDa (Pfeil c). Bei der Detektion mit dem Antikörper gegen die Pro-Domäne (7-1-3) wird dagegen im Proteinlysate der ADAM15-überexprimierenden HeLa-Zellen (Spuren 7+8) ausschließlich eine Bande oberhalb der 98kDa Markerbande (Pfeil d) erkannt, welche auf derselben Höhe liegt, wie die oberste Bande (Pfeil a), welche mit dem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-3) detektiert wird.

Da sowohl im heterologen Zellsystem, als auch im *in-vivo*-System drei Proteinzustände detektiert werden konnten, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit an ADAM15 infizierten HeLa-Zellen überprüft werden, welche der drei ADAM15-Isoformen auf der Oberfläche dieser Zellen vorkommt. Hierzu wurden die Zellen auf 10 cm im Durchmesser messenden Gewebekulturplatten ausplattiert. Unter subkonfluenten Bedingungen wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem reaktiven, nicht membrangängigen Crosslinker (EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) für 15 Minuten inkubiert. Daher reagiert der Crosslinker ausschließlich mit der freien Amin-Gruppe der Lysinreste von zellulären Oberflächenproteinen. Zur späteren Aufreinigung besitzt er außerdem eine Biotin-Gruppe, hierdurch werden die Oberflächenproteine der Zellen damit biotinyliert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen lysiert und anschließend mit Neutravidin-Sepharose für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Neutravidin geht hierbei eine starke Bindung zu Biotin ein. Durch die sich bildenden großen Sepharosekomplexe ließ sich dann eine einfache Aufreinigung der biotinylierten Oberflächenproteine mit einer entsprechenden Säule (HandeeTM Spin Cup Columns, Pierce) durchführen. Die zurückgehaltenen biotinylierten Proteine wurden zur Elution in zweifachem SDS-Puffer aufgenommen und bei 100°C aufgeköcht, um sie dann direkt durch die Säule zu zentrifugieren. Hierbei löst sich die Biotin-Neutravidin-Verbindung auf. Diese Aufreinigung wurde einmal mit ADAM15 überexprimierenden HeLa-Zellen, sowie als Kontrolle mit HeLa-Wildtypzellen

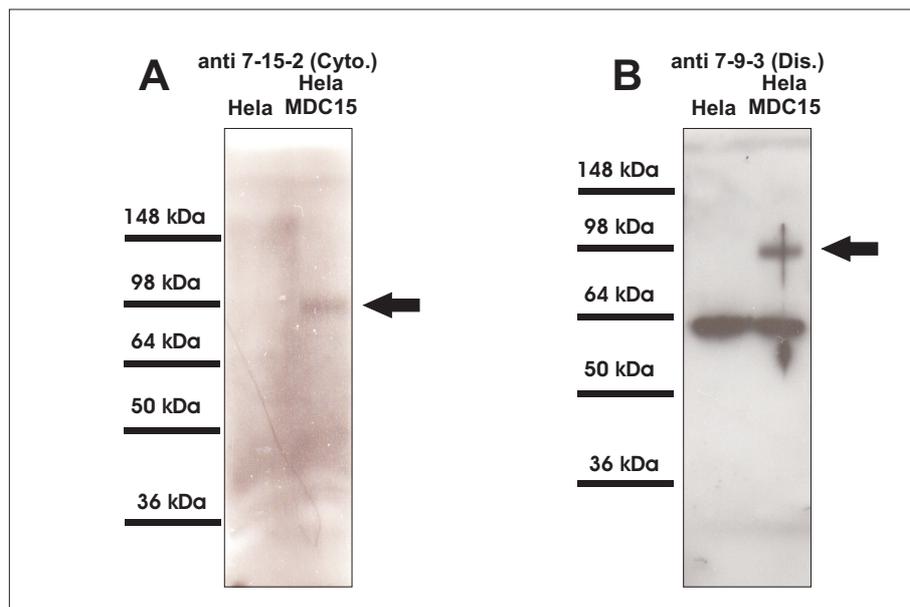


Abbildung 7: **Western-Blot-Analyse von Oberflächenmolekülen bei ADAM15 überexprimierenden HeLa-Zellen, sowie HeLa-Wildtypzellen.** Die Auftrennung erfolgte auf einem 10%-Polyacrylamid-Gel und dem anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran. A: Detektion mit einem Antikörper gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-2, 1:500). B: Detektion mit einem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-3, 1:500). Der Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-HRP) zur Detektion mit einem ECL-System wurde in beiden Fällen 1:10.000 verdünnt.

durchgeführt und die resultierenden Proteinlysate auf ein 10%-SDS-Gel aufgetragen.

Der Nachweis von ADAM15 (Abbildung 7) erfolgte zum einen mit einem Antikörper gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-2) und zum anderen mit einem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-3). Mit beiden Antikörpern ist eine differentielle Bande zu detektieren. Hierbei handelt es sich um die Bande auf Höhe der 98kDa Markerbande. Die Banden auf Höhe der 64kDa Markerbande, die nur mit dem Antikörper 7-9-3 detektiert werden, sind keine spezifischen ADAM15 Banden, da sie nicht mit dem Antikörper gegen die Cytoplasmatische-Domäne zu detektieren sind und auch in den Proteinlysaten der nicht ADAM15 überexprimierenden HeLa-Zellen zu finden sind. Da diese Banden in einem mit dem Crosslinker unbehandeltem HeLa-Zelllysate nicht zu finden sind (siehe Abbildung 6), handelt es sich möglicherweise um eine Reaktion des 7-9-3-Antikörpers mit einer Komponente des verwendeten Aufreinigungssystems. Weitere Banden sind mit keinem der beiden Antikörper zu detektieren.

3.1.3 Herstellung und Detektion von in Bakterien exprimierten Glutathion-S-Transferase-ADAM15-Fusionsproteinen

Für nachfolgende funktionelle Analysen wurden insgesamt vier verschiedene GST-ADAM15-Fusionsproteine hergestellt. Alle Fusionsproteine enthielten zur besseren Aufreinigung

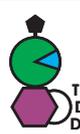
ADAM15-Fusionsproteine			
Domäne	Name	Aminosäuren von ADAM15	Schema
Glutathion-S-Transferase	GST	keine	
Disintegrin	DIS	421-512	
Metalloprotease+Disintegrin	DIS-MEP	206-512	
Disintegrin+Cysteinreiche	DIS-CYS	421-694	
alle extrazellulären Domänen	EXTRA	206-694	

Tabelle 6: **Schema zur Generierung von ADAM15-GST-Fusionsproteinen.** Alle Proteine wurden durch Klonierung der entsprechenden Bereiche in den Vektor pGex4T-2 (Amersham Pharmacia) und der anschließenden Expression in Bakterien des Stammes BL21 hergestellt. Die Aufreinigung wurde durch die Bindung an Glutathion SepharoseTM 4B durchgeführt.

N-terminal, die Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST), an die *in-frame* die Sequenz von verschiedenen Abschnitten des ADAM-Protein fusioniert war (siehe Tabelle 6). Es wurden im einzelnen 1.) die Disintegrin-Domäne, 2.) die Disintegrin- und die Metalloprotease-Domäne sowie 3.) die Disintegrin- zusammen mit der Cysteinreichen-Domäne in den Expressionsvektor pGex4T-2 (Amersham Pharmacia) kloniert und in *E.coli* des Stammes BL21 exprimiert. Als Kontrolle wurde das reine GST aus dem Expressionsvektor pGex4T-2 in *E.coli* des Stammes BL21 exprimiert.

Die in Tabelle 6 beschriebenen GST-ADAM15-Fusionsklone wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft und in einer Übernachtkultur in Gegenwart von Ampicillin herangezogen. Am nächsten Morgen wurden weitere 300ml Medium mit der über Nacht

inkubierten BL21-Kultur angeimpft und für die Proteinisolation nach IPTG Zugabe verwendet. Die während der Aufreinigung gewonnen Proben der Aufreinigungsschritte wurde zusammen mit den drei Eluaten auf ein 10%iges Gel aufgetragen und in einer Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen GST (Abbildung 8A) und gegen die Disintegrin-Domäne von ADAM15 (Abbildung 8B) nachgewiesen.

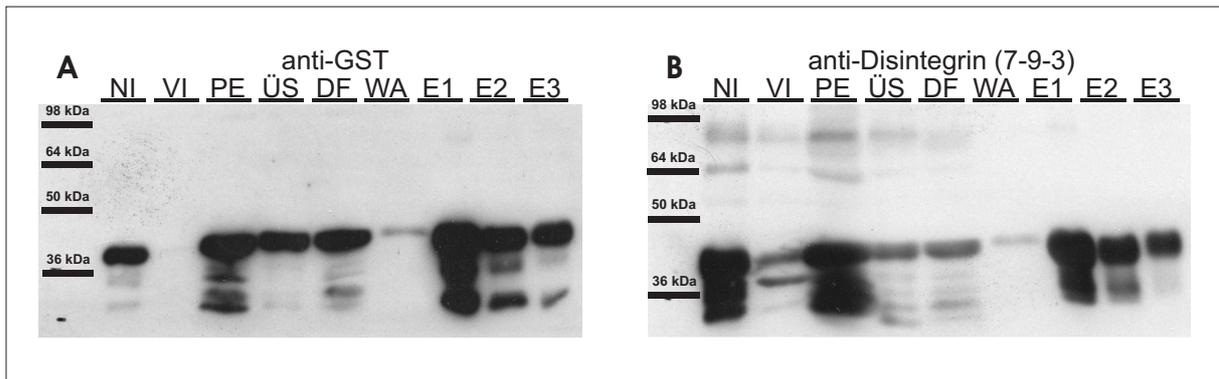


Abbildung 8: **Western-Blot-Analyse des GST-ADAM15-Fusionsproteins DIS.** Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden A) mit einem Antikörper gegen GST (1:1.000) und dem entsprechendem Zweitantikörper rabbit-anti-goat (1:20.000) detektiert. Die gleichen Proteinlysate wurden B) mit einen Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne 7-9-3 (1:500) und dem entsprechendem Zweitantikörper goat-anti-rabbit-HRP (1:10.000) charakterisiert. VI=vor Induktion, NI=nach Induktion, ÜS=Überstand, PE=Pellet, DF=Durchfluß, WA=Waschung, E1-3=Eluat 1-3

Wie in Abbildung 8A+B erkennbar ist, kann das als DIS bezeichnete Fusionsprotein (nur Disintegrin-Domäne) nach der IPTG-Induktion mit beiden getesteten Antikörpern oberhalb der 36kDa Markerbande nachgewiesen werden (Spur NI). Obwohl ein großer Anteil im Überstand lokalisiert ist (Spur ÜS), verbleibt bei der Aufreinigung ein nicht unerheblicher Teil im Pellet (Spur PE), sowie im Durchfluss (Spur DF). Dies bedeutet, dass nicht die ganze Menge des produzierten Fusionsprotein aufgereinigt werden kann, jedoch konnten nach drei Elutionsschritten immer ausreichende Mengen des DIS-Fusionsproteins isoliert werden. Neben dem eigentlichen Produkt bei ca. 38kDa werden mit dem GST-Antikörper noch weitere Banden detektiert. Hierbei könnte es sich um Degradationsprodukte des Fusionsproteins handeln. Durch die drei Elutionsschritte ließ sich mit dieser Aufreinigung Protein im Milligrammbereich isolieren. Die Übereinstimmung der detektierten Banden mit dem Antikörper gegen GST (Abbildung 8A) und dem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (Abbildung 8B) zeigt, dass es sich tatsächlich um das erwartete Fusionsprotein

aus GST und der Disintegrin-Domäne handelt. Trotz der vorhandenen Spaltprodukte besteht der Hauptanteil des isolierten Proteins aus dem vollständigen Fusionsprotein. Eine abschließende Analyse mit weiteren ADAM15-Antikörpern belegt eine ausschließliche Expression der Disintegrin-Domäne im Fusionsprotein DIS (Abbildung 9). Nur mit den

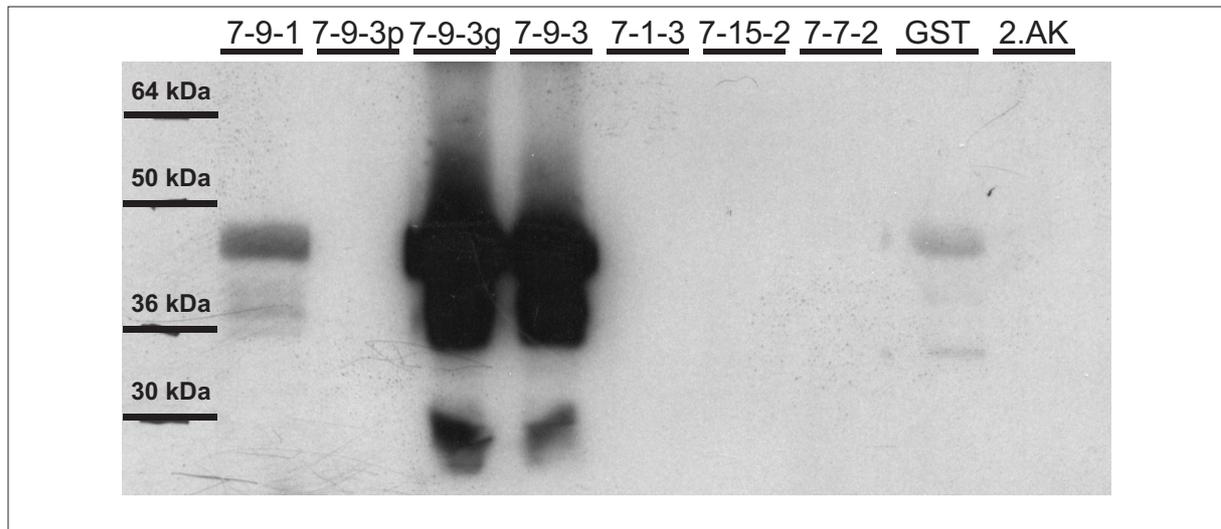


Abbildung 9: **Western-Blot-Analyse des Fusionsproteins DIS.** Alle Antikörper gegen ADAM15 wurden 1:500 verdünnt, der Antikörper gegen GST 1:1.000. Im Falle des 7-9-3g betitelten Antikörpers handelt es sich um den gegen das zur Generierung hergestellte Peptid aufgereinigte 7-9-3 Antikörper. Detektiert wurde im Falle des GST-Antikörpers mit einem rabbit-anti-goat-HRP (1:20.000) und bei den ADAM15-Antikörpern mit einem goat-anti-rabbit-HRP Zweitantikörper (1:10.000). Die mit 7-9-3p bezeichnete Spur beinhaltet ein Präimmunserum des später immunisierten Tieres.

Antikörpern gegen die Disintegrin-Domäne und gegen GST lassen sich Banden und somit Protein nachweisen. Auch das Präimmunserum des 7-9-3-Antikörpers (Spur 7-9-3p) zeigt keine Banden, genauso wie die Zweitantikörperkontrolle (Spur 2.AK).

Nach Aufreinigung des GST-ADAM15-Fusionsproteins DIS-MEP lässt sich das exprimierte Fusionsprotein aus Metalloprotease- mit Disintegrin-Domäne bei etwa 64kDa Größe nach IPTG-Induktion (NI) nachweisen (Abbildung 10). Auch bei dieser Aufreinigung verbleibt ein großer Anteil des Proteins im Pellet (PE). Dennoch lässt sich eine ausreichende Menge DIS-MEP detektieren. Ebenso wie bei dem Fusionsprotein DIS gibt es hier verschiedene Degradationsprodukte (Spur E1 und E2 in Abbildung 10A). Die Zweitantikörperkontrolle (Spur 2.AK) zeigt keine unspezifischen Bandenfärbungen. Die Färbung mit dem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (Abbildung 10B) zeigt ein ähnliches Muster wie die Detektion mit dem Antikörper gegen GST (Abbildung 10A), jedoch sind

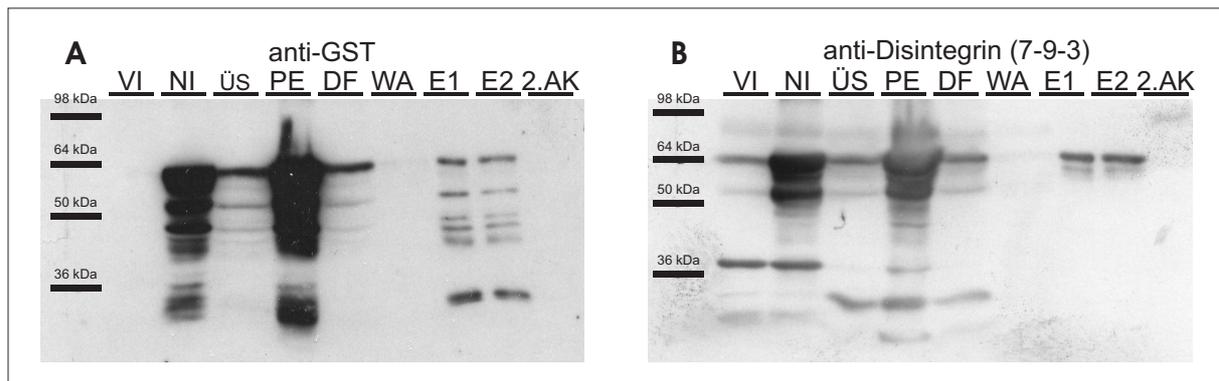


Abbildung 10: **Western-Blot-Analyse GST-ADAM15-Fusionsproteins DIS-MEP.** Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden A) mit einem Antikörper gegen GST (1:1.000) und dem entsprechendem Zweitantikörper rabbit-anti-goat (1:20.000) detektiert. Die gleichen Proteinlysate wurden B) mit einen Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne 7-9-3 (1:500) und dem entsprechendem Zweitantikörper goat-anti-rabbit-HRP (1:10.000) charakterisiert. VI=vor Induktion, NI=nach Induktion, ÜS=Überstand, PE=Pellet, DF=Durchfluß, WA=Waschung, E1-3=Eluat 1-3

mit dem Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne nicht so viele Degradationsprodukte detektierbar. Wie schon für das DIS-Fusionsprotein beschrieben wurde DIS-MEP mit Hilfe von verschiedenen ADAM15-Antikörpern charakterisiert. Wie aus Abbildung 11 ersichtlich ist, reagieren nur Antikörper, welche gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-1+7-9-3g+7-9-3) gerichtet waren, mit dem GST-Fusionsprotein DIS-MEP. Leider war mit den Antikörpern gegen die Metalloprotease-Domäne eine Detektion nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Dies überrascht jedoch nicht, da diese auch mit Proteinlysaten aus dem Gehirn der Ratte nicht reagiert hatten. Die Antikörper gegen die Pro-Domäne (7-1-3) und gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-2) zeigen, dass diese Domänen in DIS-MEP nicht enthalten sind. Die Zweitantikörperkontrolle (Spur 2.AK) bestätigt, dass es sich ausschließlich um Banden handelt, welche durch die Erstantikörperbehandlung entstanden sind. Die Aufreinigung des DIS-CYS-Fusionsproteins, des EXTRA-Fusionsproteins und der GST-Kontrolle wurden auf gleiche Art und Weise durchgeführt und zeigten ebenfalls aufgereinigte, spezifische Produkte.

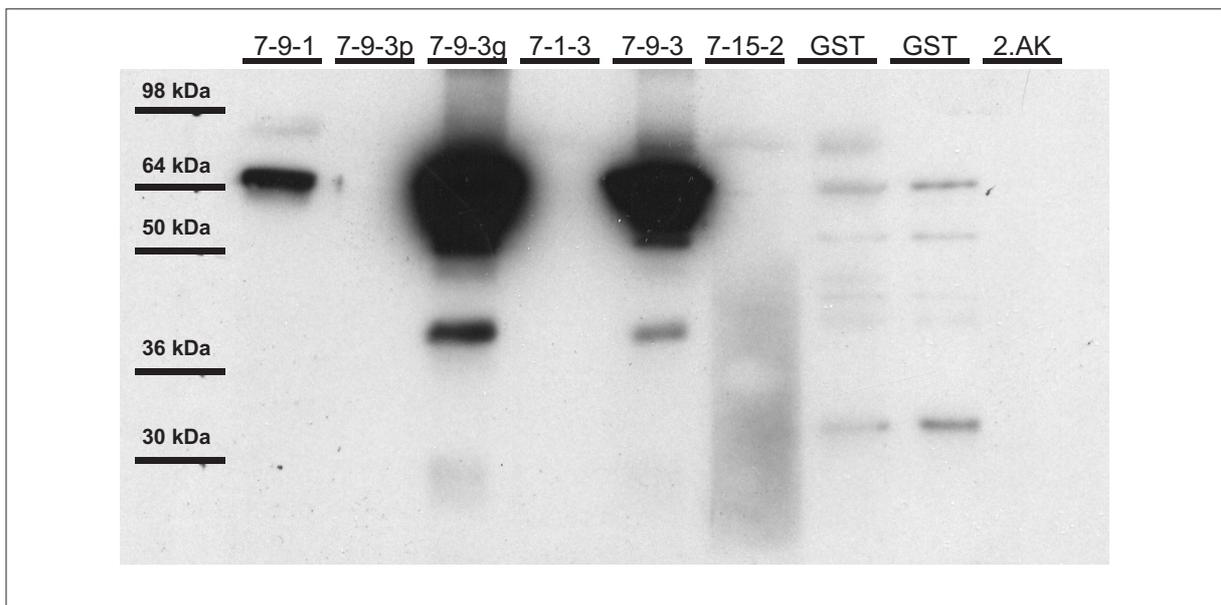


Abbildung 11: **Western-Blot-Analyse des Fusionsproteins DIS-MEP.** Alle Antikörper gegen ADAM15 wurden 1:500 verdünnt, der Antikörper gegen GST 1:1.000. Im Falle des 7-9-3g betitelten Antikörpers handelt es sich um den gegen das zur Generierung hergestellte Peptid aufgereinigte 7-9-3 Antikörper. Detektiert wurde im Falle des GST-Antikörpers mit einem rabbit-anti-goat-HRP (1:20.000) und bei den ADAM15-Antikörpern mit einem goat-anti-rabbit-HRP Zweitantikörper (1:10.000). Die mit 7-9-3p bezeichnete Spur beinhaltet ein Präimmunsrum des später immunisierten Tieres.

3.2 Immunhistologische Färbungen verschiedener Gewebe der Ratte mit polyklonalen Antikörpern gegen ADAM15

Nach dem Nachweis der Spezifität der produzierten Antikörper gegen ADAM15, sollte die zelluläre Lokalisation von ADAM15 im Nervensystem der Ratte untersucht werden. Die Western-Blot-Analysen zeigten, dass ADAM15 im Gehirn vorhanden ist, lassen aber keine Rückschlüsse zu, von welchen speziellen Regionen bzw. Zelltypen es exprimiert wird (Abbildung 5). Die immunhistochemische Charakterisierung wurde sowohl für das zentrale Nervensystem (Gehirn und Rückenmark), als auch für das periphere Nervensystem (Ischiasnerv) durchgeführt. Um alle drei in Western-Blot-Analysen detektierte ADAM15-Proteinformen nachweisen zu können, wurde für die immunhistologischen Färbungen ein Antikörper (7-15-2) gegen die Cytoplasmatische-Domäne gewählt. Dieser funktioniert, im Gegensatz zu den Antikörpern gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-1 bis 7-9-3), gut mit den für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten kryokonservierten Gewebeschnitten.

Für Kolokalisierungsexperimente im zentralen Nervensystem wurden zum einen ein NeuN-spezifischer Antikörper (Neurone) und desweiteren ein GFAP-spezifischer Antikörper (Astrozyten) eingesetzt. Im peripheren Nervensystem wurde die erwartete Lokalisation von ADAM15 in Schwannzellen durch eine Kolokalisierung mit dem spezifischen Schwannzellmarker S100 gezeigt.

3.2.1 Cortex

Im Cortex der Ratte wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (grün) und dem ADAM15-spezifischen Antikörper gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-2, rot) durchgeführt. Abbildung 12 zeigt die hauptsächliche Übereinstimmung der beiden Färbungen. Es lassen sich hierbei kaum qualitative Unterschiede der Expression von ADAM15 in den Neuronen der verschiedenen Schichten des Cortex beobachten. Ausnahme ist hier die äußerste Cortexschicht, sie ist mit beiden Antikörpern ungefärbt (weißer Pfeil). Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Antikörper-Färbungen besteht jedoch im Bereich der Dura. Hier sind Unterschiede in der Färbung mit anti-NeuN und 7-15-2 zu erkennen. Lässt sich die äußere Schicht noch mit beiden Antikörpern

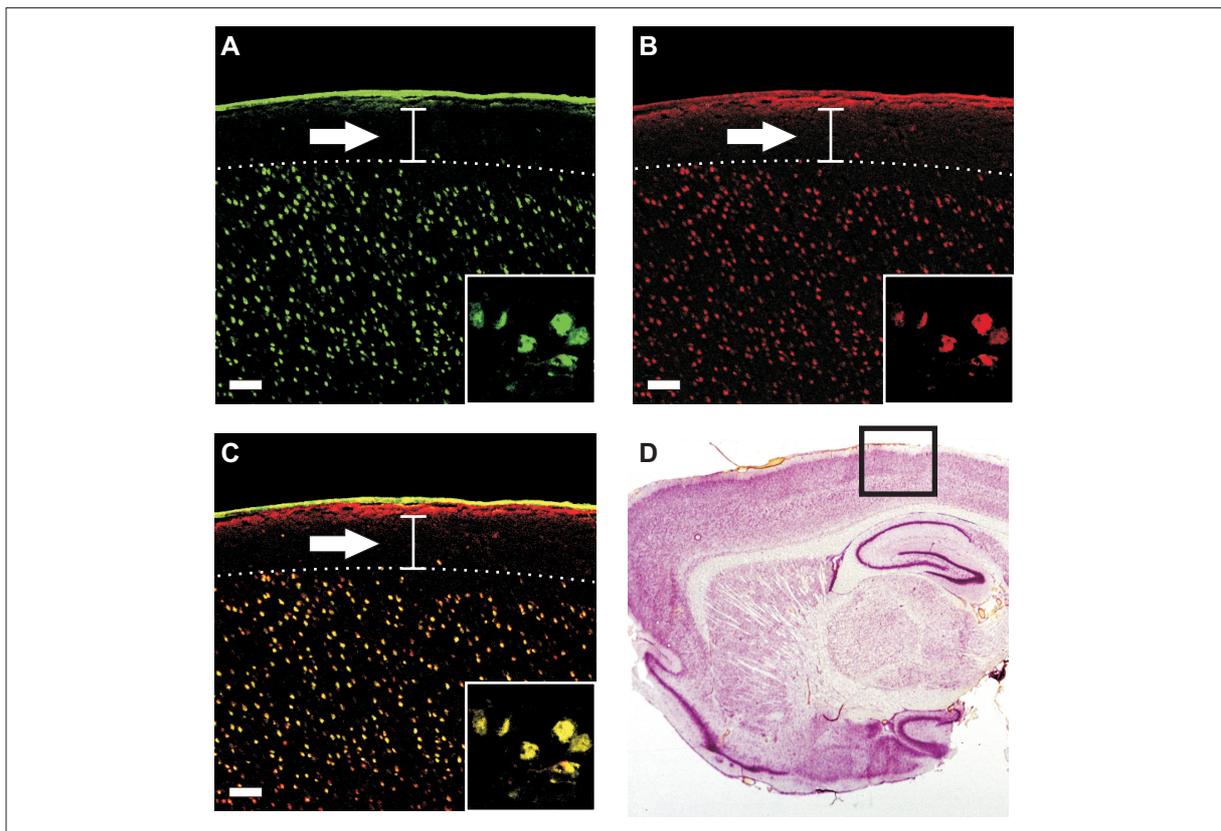


Abbildung 12: **Gehirnschnitt einer adulten Ratte (lateral)**. Gefärbt wurde im Bereich des gestreiften Cortex mit anti-NeuN (A) und anti-Disintegrin 7-15-2 (B). Die Abbildung 12C zeigt die beiden überlappenden Färbungen gelb. Der weiße Pfeil weist auf den ungefärbten Bereich unterhalb der Dura, bei dem es sich um den Cortexlayer I handelt. Die Detailvergrößerungen in den jeweiligen Abbildungen unten rechts zeigen die einzeln angefärbten Neurone. Alle eingezeichneten Maßbalken entsprechen $100\mu\text{m}$. Die Übersichtsfärbung (D) mit Crysolrot dient nur der Orientierung und ist dem Buch „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, Academic Press, Georg Paxinos & Charles Watson entnommen. Die Übersicht zeigt keine Färbung gegen spezifische Marker.

färben, so ist die mit 7-15-2 gefärbte tiefere Schicht mit dem anti-NeuN nicht gefärbt. Die im Cortex beobachtete neuronale Kolo-kalisierung steht stellvertretend für die durchgeführten NeuN-Färbungen im ZNS der Ratte. Überall dort, wo Neurone gefärbt wurden, findet man auch eine Färbung mit dem Antikörper (7-15-2) gegen ADAM15.

3.2.2 Cerebellum

Somit findet man z.B. auch im Cerebellum (Abbildung 13) ADAM15-Färbungen (7-15-2) der Körnerschicht (ks), die durch Einstülpung eine sternförmige Struktur hat (Abbildung 13B). Die Färbungen mit anti-NeuN (Abbildung 13A) kolo-kalisieren dabei mit der

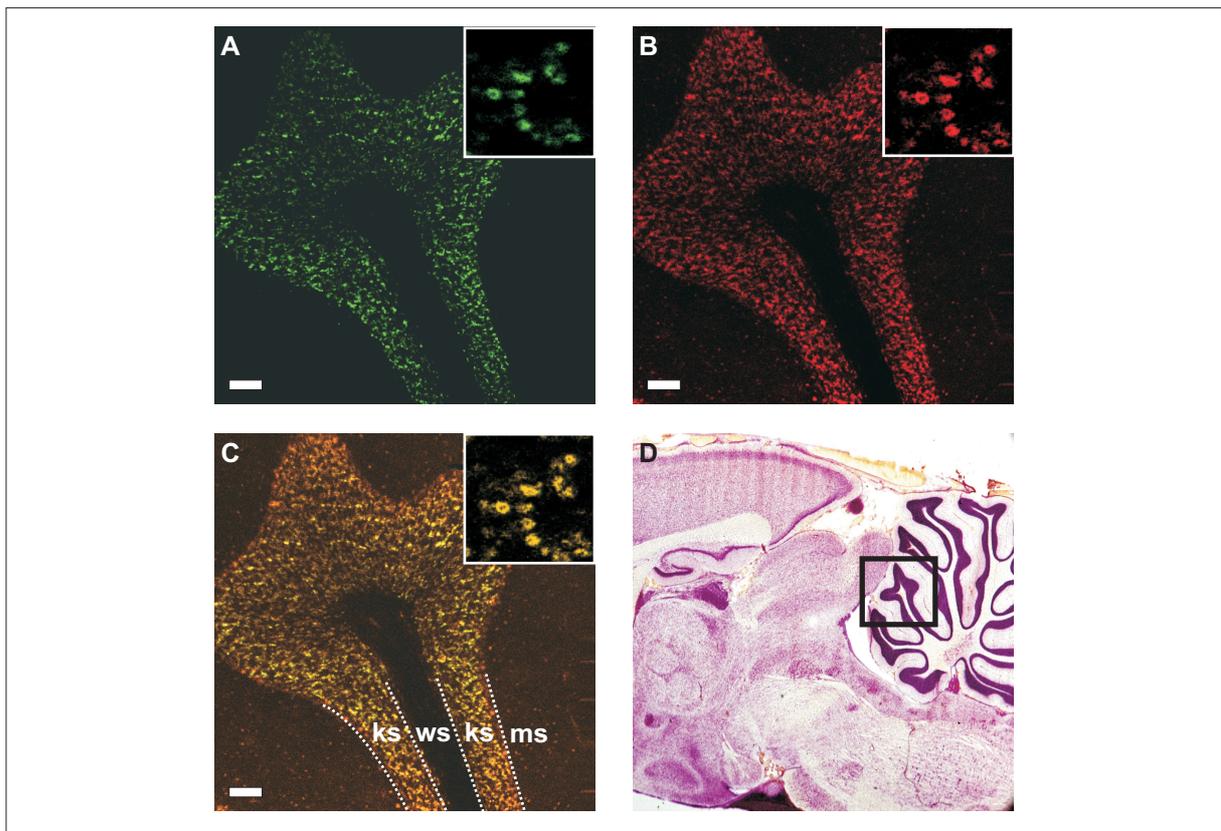


Abbildung 13: **Lateraler Gehirnschnitt einer adulten Ratte gefärbt mit NeuN (A) und anti-Disintegrin 7-15-2 (B).** Die 40-fache konfokale Aufnahme des Cerebellums zeigt charakteristische, kolokalisierte Färbungen (C) in der Körnerschicht (KS). In der Molekularschicht (ms), sowie in der weißen Substanz (ws, myelinisierte Bereiche) sind kaum Färbungen zu beobachten. Die Detailvergrößerungen in den jeweiligen Abbildungen oben rechts zeigen die einzeln angefärbten Neurone. Die Übersichtsfärbung (D) mit Crysolrot dient nur der Orientierung und ist dem Buch „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, Academic Press, Georg Paxinos & Charles Watson entnommen. Die Übersicht zeigt keine Färbung gegen spezifische Marker. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen $100\mu\text{m}$.

Färbung gegen ADAM15 (Abbildung 13C). Keine Färbungen sind mit beiden Antikörper in der Molekularschicht (ms) des Cerebellums zu beobachten. Die Molekularschicht (ms) wird von der Körnerschicht (ks) durch eine dünne Purkinje-Zellschicht getrennt, auch diese Zellen sind ADAM15 positiv (Abbildung 13B, weiße Pfeile). Interessanterweise ist ADAM15 jedoch nicht in den myelinisierenden Bereichen der weißen Substanz (ws) des Cerebellums zu detektieren.

3.2.3 Hippocampus

Auch im Hippocampus (Abbildung 14) der Ratte ist mit dem cytoplasmatischem Antikörper (7-15-2) gegen ADAM15 (Abbildung 14B) und mit anti-NeuN (Abbildung 14A) eine Kolokalisierung (Abbildung 14C) und damit eine neuronale ADAM15-Expression (wie schon im Cortex und Cerebellum) zu beobachten. Abbildung 14C zeigt eine Färbung

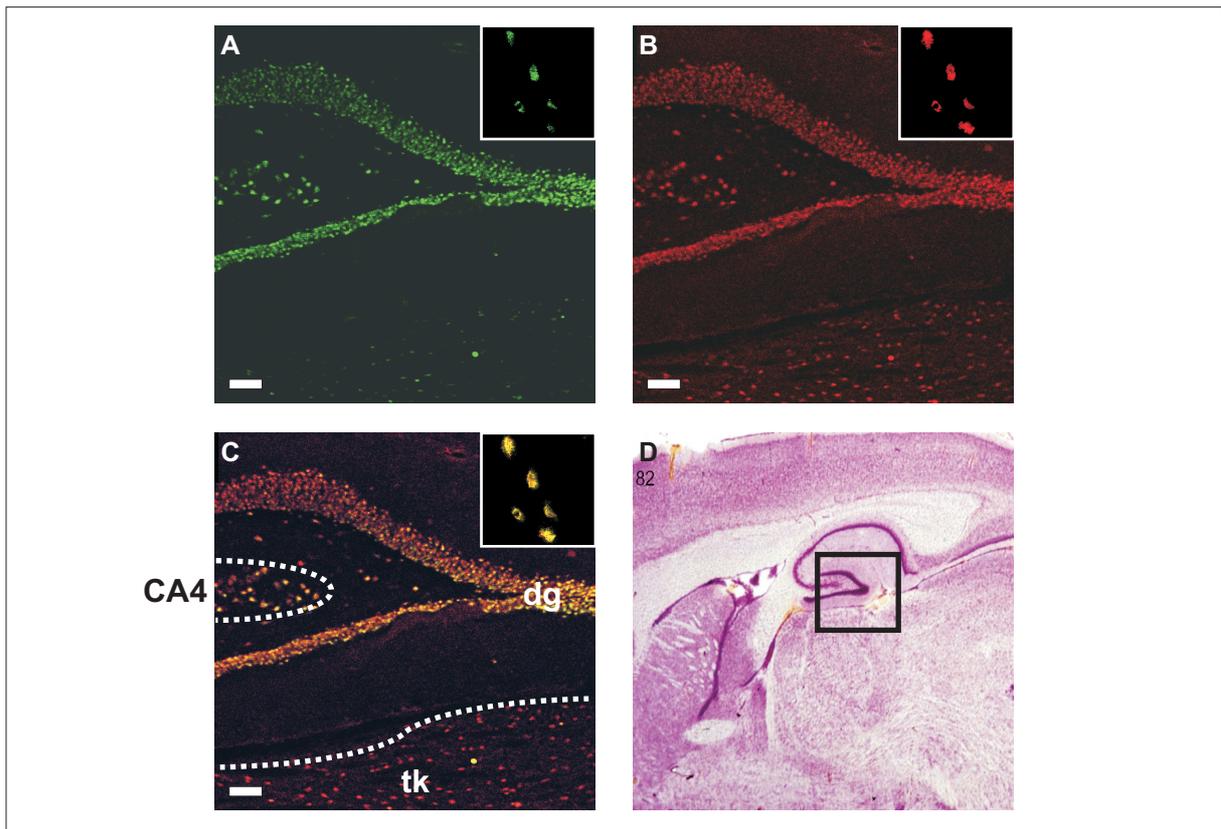


Abbildung 14: **Lateraler Gehirnschnitt einer adulten Ratte im Bereich des Hippocampus.** Die Färbungen mit anti-NeuN (A) und anti-Disintegrin 7-15-2 (B) sind in dem Bereich CA4 des Hippocampus, sowie im dentate gyrus (dg) zu beobachten. Vereinzelt Färbungen sind auch im thalamischen Kern (tk) zu detektieren. Die Detailvergrößerungen in den jeweiligen Abbildungen oben rechts zeigen die einzeln angefärbten Neurone. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen $100\mu\text{m}$. Die Übersichtsfärbung (D) mit Crysolrot dient nur der Orientierung und ist dem Buch „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, Academic Press, Georg Paxinos & Charles Watson entnommen. Die Übersicht zeigt keine Färbung gegen spezifische Marker.

mit beiden Antikörpern auf den von links nach rechts sich vereinigenden Armen des Dentate gyrus (dg) sowie vereinzelt Färbungen im als CA4 (weiße Halbellipse) bezeichnetem Hippocampusbereich. Weitere positive Zellen sind im sogenannten thalamischen Kern (tk) zu sehen, wobei die auftretende anti-ADAM15-Färbung (rot) stärker und zahlreicher

ist als die anti-NeuN-Färbung (grün).

3.2.4 Rückenmark dorsal

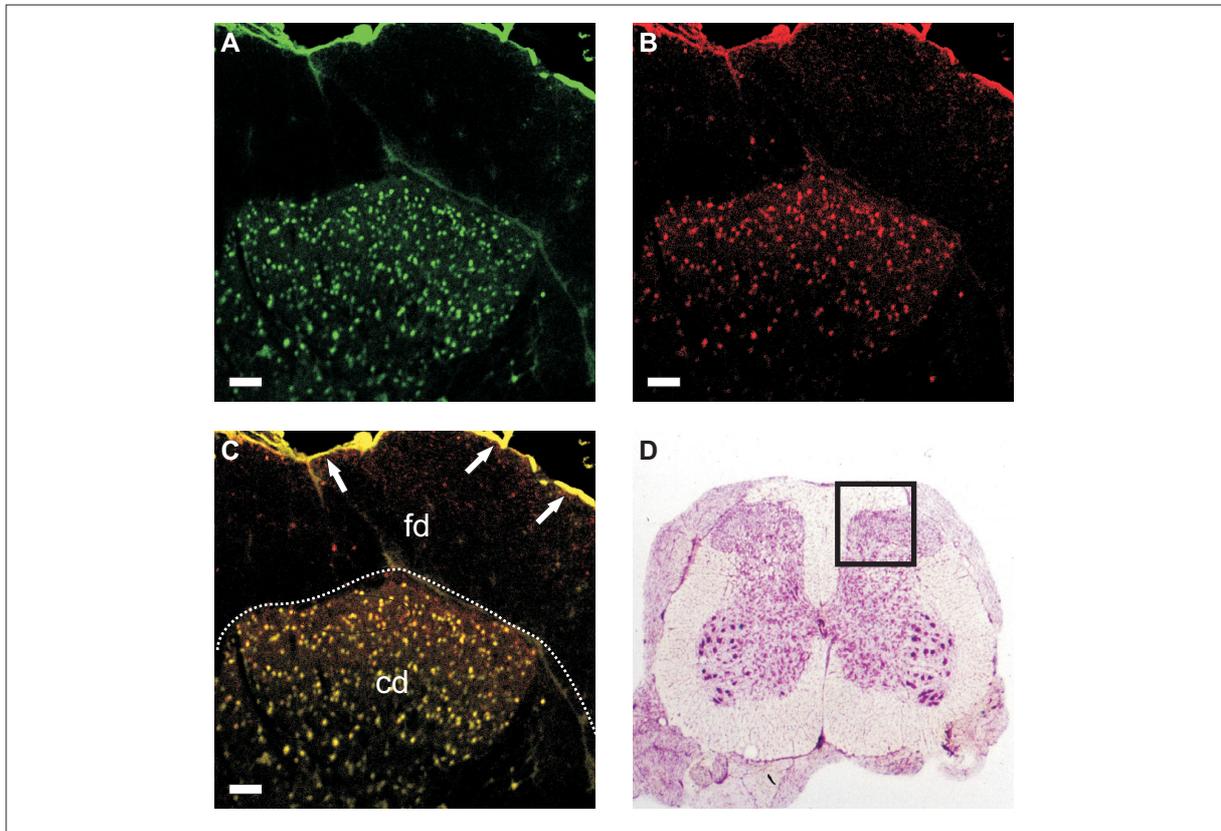


Abbildung 15: **Anti-Disintegrin-7-15-2 Färbungen (B) und anti-NeuN-Färbungen (A) im Rückenmarkquerschnitt (Thoraxbereich) einer adulten Ratte.** Die Kolokalisierungen beschränken sich auf die Dura (weiße Pfeile) und Bereiche im Hinterhorn (cornu dorsalis, cd). Der Bereich der weißen Substanz (funiculus dorsalis, fd) ist frei von Färbungen. Die Übersichtsfärbung (D) mit Crysolrot dient nur der Orientierung und ist dem Buch „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, Academic Press, Georg Paxinos & Charles Watson entnommen. Die Übersicht zeigt keine Färbung gegen spezifische Marker. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen $100\mu\text{m}$.

Das schon im Cerebellum (Abbildung 13) festgestellte Fehlen einer ADAM15-Reaktivität myelinisierter Bereiche ist auch in der weißen Substanz des Rückenmarks (Abbildung 16), z.B. im funiculus dorsalis (fd) zu beobachten. Es sind nur Färbungen in der schwächer myelinisierten grauen Substanz des Rückenmarks zu finden. Die im Hinterhorn (cornu dorsalis, cd) beobachtete anti-ADAM15-Färbung (Abbildung 13B) kolokalisiert mit der anti-NeuN-Färbung (Abbildung 13A). ADAM15 Reaktivität ist in allen nach dem REXED-Schema eingeteilten Laminaeschichten (I-X) zu detektieren. Desweiteren findet man, wie zuvor im

Cortex beschrieben, eine Färbung der Dura (weiße Pfeile).

3.2.5 Rückenmark ventral

Auch im ventralen Bereich des Rückenmarks sind neuronale Färbung mit anti-NeuN (Abbildung 16A) sowie Färbungen mit dem Antikörper gegen ADAM15 (Abbildung 16B) zu detektieren. Die Abbildung 16 zeigt die großen Motoneurone in der grauen Substanz der Vorderhörner des Rückenmarks, im REXED-Schema als Laminae-IX bezeichneter Bereich. In diesem Bereich kolokalisiert (Abbildung 16C) die neuronale Färbung (grün) mit der Färbung gegen ADAM15 (rot). Jedoch wird ADAM15 auch von Astrozyten expri-

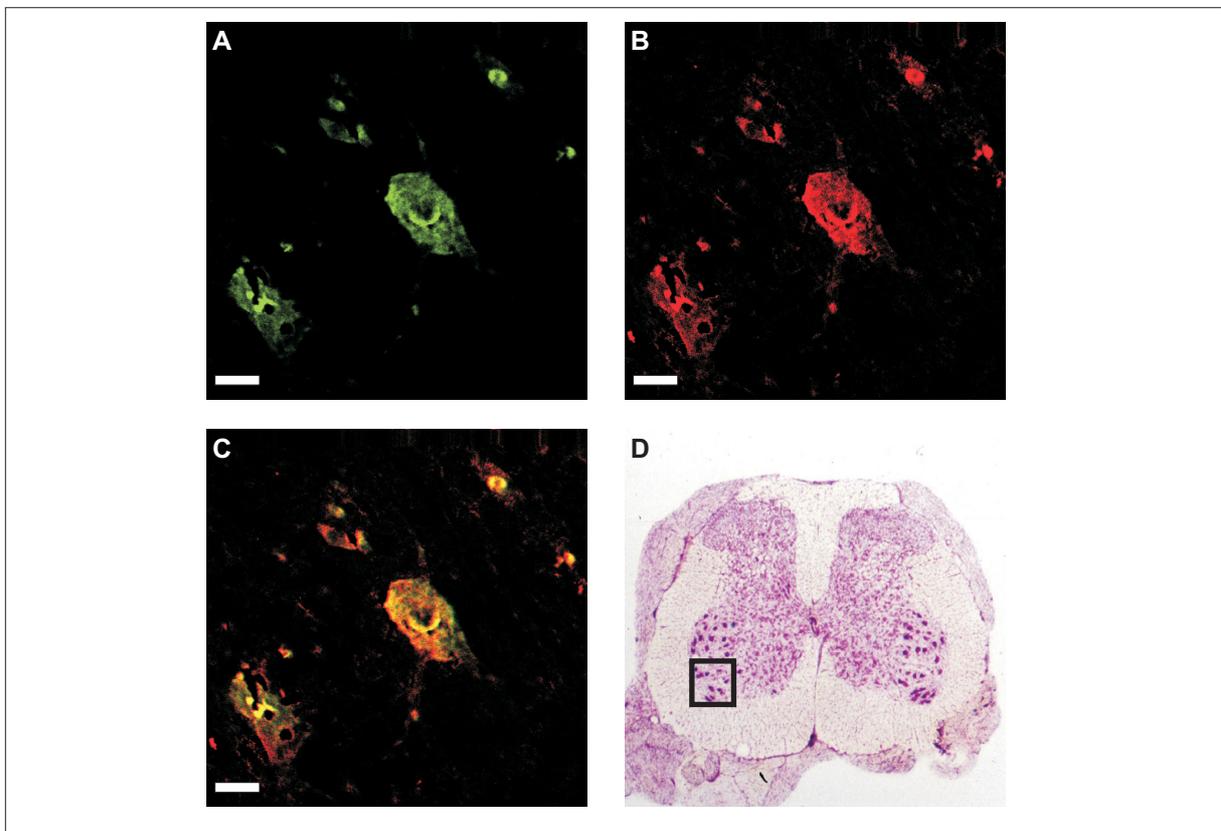


Abbildung 16: **Rückenmarksquerschnitt einer adulten Ratte** Detailaufnahme eines Rückenmarksquerschnittes im REDEX-Schema als Laminae-IX bezeichneter Bereich. Hier ist die Färbung der Motoneurone mit NeuN (A) und anti-Disintegrin 7-15-2 (B) kolokalisiert (C). Die Übersichtsfärbung (D) mit Crysolrot dient nur der Orientierung und ist dem Buch „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, Academic Press, Georg Paxinos & Charles Watson entnommen. Die Übersicht zeigt keine Färbung gegen spezifische Marker. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen $50\mu\text{m}$.

miert. In Abbildung 17 ist eine entsprechende Expression in Astrozyten nachweisbar. Die hier gezeigte Färbung mit anti-GFAP (Abbildung 17A) und anti-ADAM15 (Abbildung

17B) im Bereich der Cortexschicht IV zeigt eine Kolokalisierung (Abbildung 17C) beider Proteine in den Ausläufern der Astrozyten (weiße Pfeile).

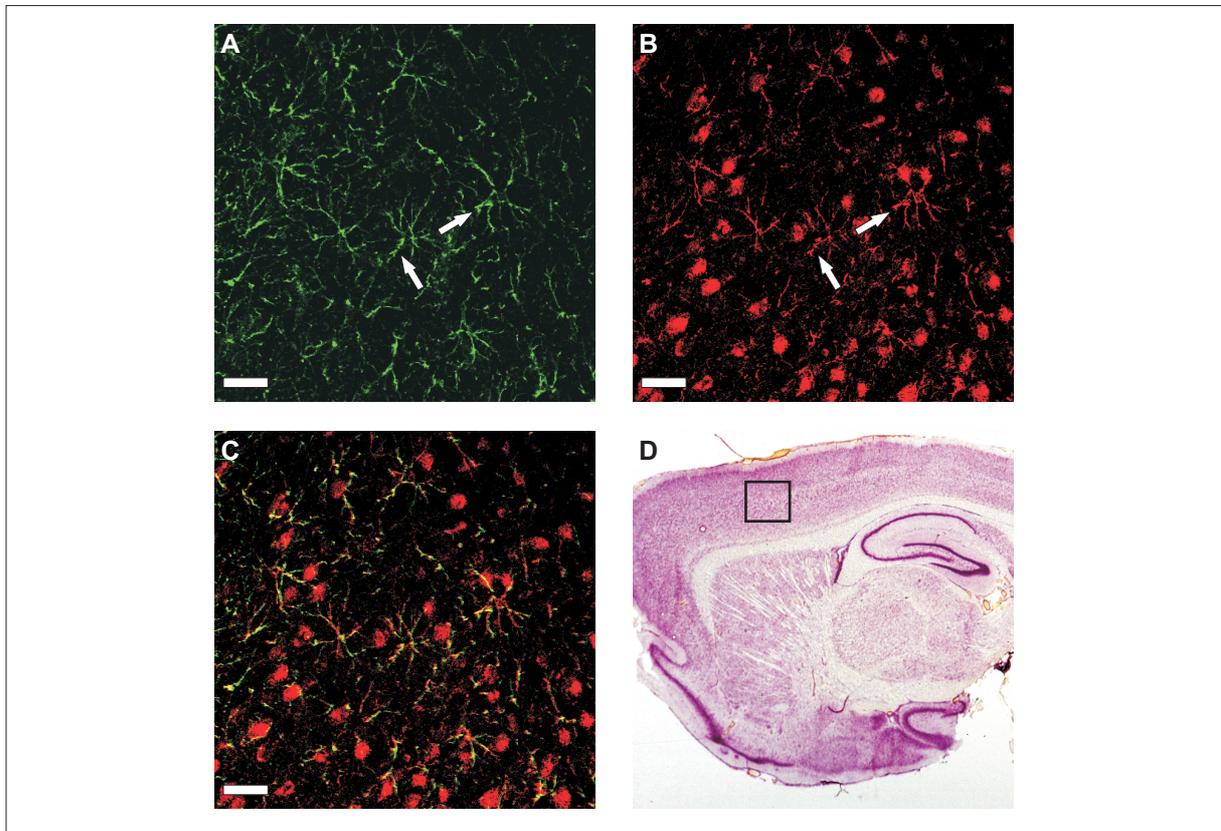


Abbildung 17: **Lateraler Gehirnschnitt einer adulten Ratte gefärbt im frontoparitalen Bereich des Cortex mit GFAP (A) und anti-Disintegrin 7-15-2 (B).** Die Kolokalisierung in gelb (C) zeigt die partielle Übereinstimmung der beiden Proteine (weiße Pfeile). Alle eingezeichneten Maßbalken entsprechen $50\mu\text{m}$. Die Übersichtsfärbung (D) mit Crysolrot dient nur der Orientierung und ist dem Buch „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, Academic Press, Georg Paxinos & Charles Watson entnommen. Die Übersicht zeigt keine Färbung gegen spezifische Marker.

Zusätzlich sind auch in Abbildung 17 mit dem Antikörper gegen ADAM15 kreisförmig aussehende Neurone angefärbt, welche nicht mit der Färbung des Astrozytenmarkerproteins GFAP kolokalisieren. Die neuronale ADAM15-Expression scheint im gesamten ZNS vertreten zu sein.

3.2.6 Ischiasnerv

Im peripheren Nervensystem (Abbildung 18) wurde die zelluläre ADAM15-Lokalisierung am Beispiel des Ischiasnervs untersucht. Es lässt sich eine Kolokalisierung (C) von ADAM15 (B) mit dem Antikörper S100 (A) zeigen. Hierbei sind mit dem S100 Antikörper die

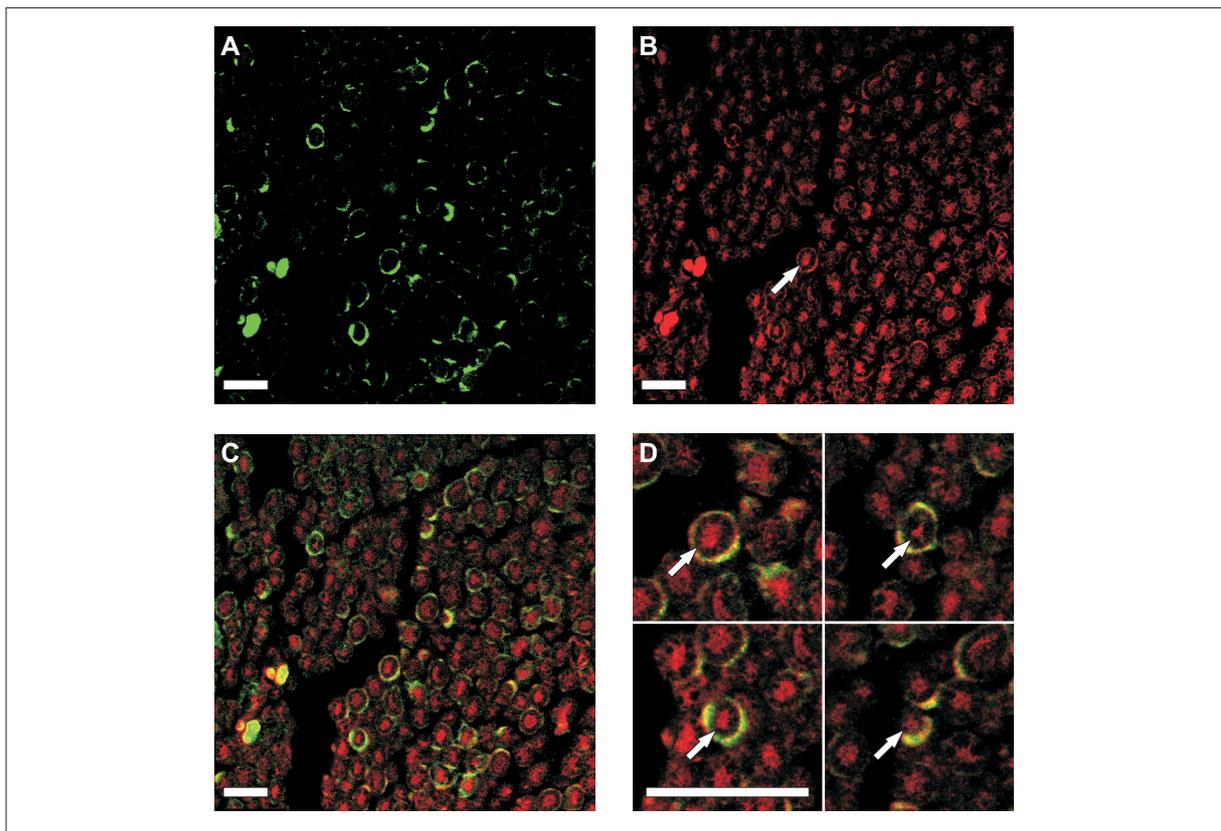


Abbildung 18: Ischiasnerv-Querschnitt einer adulten Ratte, gefärbt mit anti-S100 (A) und anti-Disintegrin 7-15-2 (B). Die Kolokalisierungen (C) zeigt eine cytoplasmatische Färbung im verbliebenen Zellkörper der Schwannzelle. Dies ist an vier Beispielen (D) in einer stärkeren Vergrößerung genauer gezeigt. Hier kann man dann auch die zusätzliche Färbung in der Mitte eines Faserbündels erkennen (weiße Pfeile). Alle eingezeichneten Maßbalken entsprechen $50\mu\text{m}$.

äußeren Bereiche eines Faserbündels angefärbt, welches die Zellkörper der myelinisierenden Schwannzellen umfasst. Genau diese cytoplasmatischen Bereiche der Schwannzelle umfasst die Kolokalisierung. Darüberhinaus ist eine weitere schwache Färbung mit dem Antikörper gegen ADAM15 zu beobachten, die eventuell einer axonalen Expression des ADAM15-Proteins entspricht (weiße Pfeile).

3.3 Inflammatorische Stimulation durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ an Schwannzellen und Astrozyten

Finden im PNS oder ZNS Verletzungen statt, so werden Entzündungsmediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ (Skoff *et al.*, 1998) freigesetzt. In einer Versuchsreihe sollte daher die Auswirkung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ (einzeln, sowie in Kombination) auf die Expression

von ADAM15 und ADAM8 in Schwannzellen und Astrozyten *in-vitro* untersucht werden. Hierzu wurden in einer Mikrotiterplatte pro Konzentration jeweils 2×10^5 Zellen kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und/oder $\text{TGF}\beta$ behandelt und für zusätzliche 24 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels eines Qiagen RNeasy-Aufreinigungskits isoliert und durch Reverse Transkription in cDNA überführt. Die Bestimmung der Expressionsstärken erfolgte durch eine quantitative Echtzeit-PCR mit der SYBR-Green-Methode. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Zur Normierung der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge wurde die Expression von GAPDH und ODC bestimmt und die so korrigierte Expression von ADAM15 bzw. ADAM8 in der unbehandelten Kontrollen (unbehandelte Zellen) auf 100% gesetzt. Bei der Interpretation der Daten ist deshalb zu beachten, dass die Kontrollzellen keineswegs gleiche Menge an ADAM15 und ADAM8 exprimieren müssen.

3.3.1 Vergleich der Expression von ADAM15 und ADAM8 in Schwannzellen, Astrozyten und Neuronen

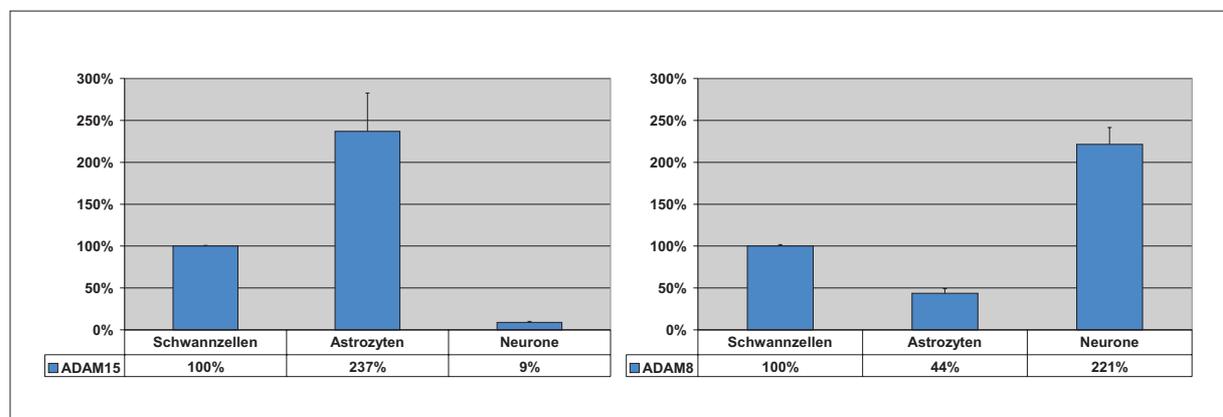


Abbildung 19: **Quantitativer Vergleich der RNA Menge von ADAM15 und ADAM8 in Schwannzellen, Astrozyten und Neuronen.** Die Expression von ADAM15 und ADAM8 wurde durch die Expression der „house-keeping-genes“ GAPDH und ODC normiert und auf die Werte in Schwannzellen bezogen. Die Ergebnisse beinhalten drei unabhängige Versuche, die pro Zelltyp in einem Balken zusammengefasst und mit einem Standardfehler versehen sind.

Vergleicht man die relative Menge an ADAM15 oder ADAM8 in unbehandelten Schwannzellen, Astrozyten und Neuronen, so fällt auf, dass die zellspezifische Expression von ADAM15 und ADAM8 in Astrozyten und Neuronen unterschiedlich (Abbildung 19) re-

guliert ist. So ist ADAM15 in Astrozyten (ca. 240%) weit aus stärker exprimiert als in Neuronen (ca. 10%). Bei ADAM8 verhält es sich genau umgekehrt. ADAM8-Transkripte kommen in Neuronen (ca. 220%) häufiger und in Astrozyten (ca. 45%) seltener vor, als in Schwannzellen (100%).

3.3.2 *In-vitro* TNF α -Stimulation von Schwannzellen

Bei der Stimulation mit TNF α (Abbildung 20) verhalten sich die Expressionsänderungen von ADAM15 und ADAM8 ähnlich. Bei niedrigen Dosierungen (20pg/ml und 200pg/ml) beobachtet man eine schwache Erhöhung der Expression. Für ADAM15 beträgt diese 15% bzw. 17%. Deutlicher ist der Einfluss von TNF α auf die Expression von ADAM8.

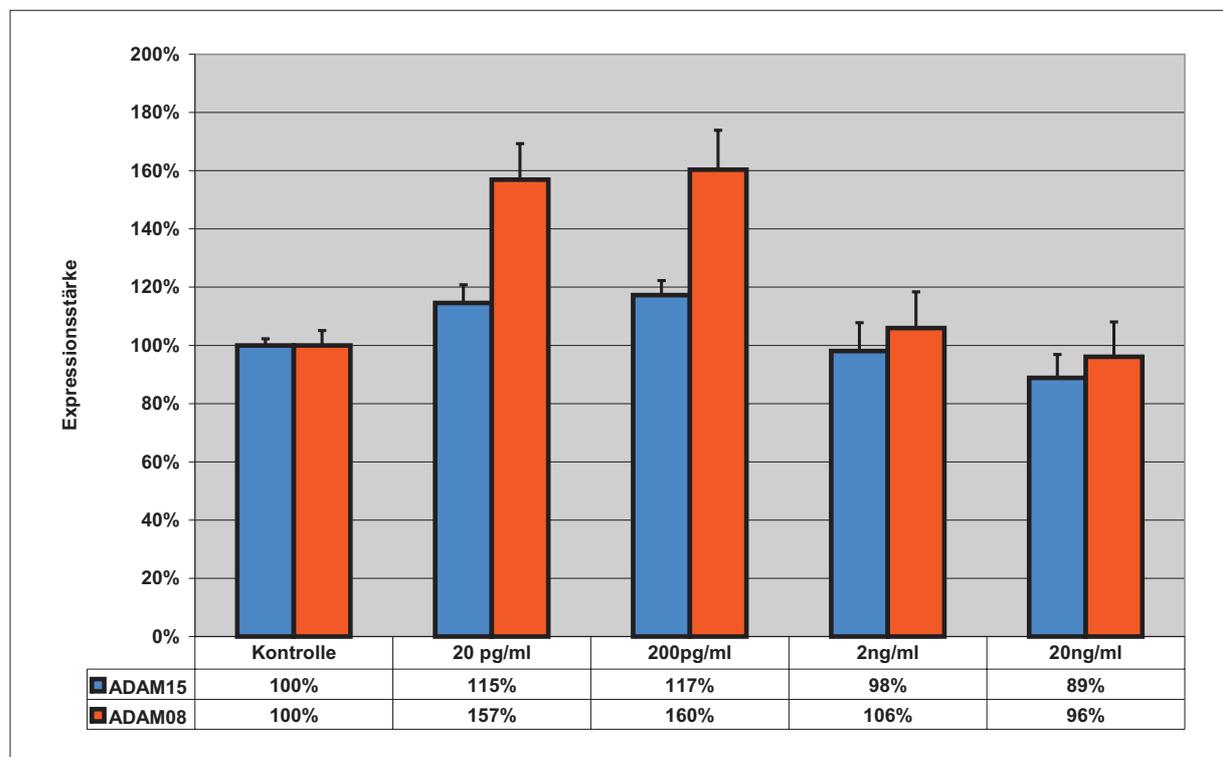


Abbildung 20: **Dosiskurve einer Stimulation von Schwannzellen mit TNF α .** Es wurden jeweils 200.000 Zellen mit der angegebenen Konzentrationen von TNF α für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen behandelt. Anschließend wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (die Ergebnisse wurden durch GAPDH und ODC normalisiert). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Die TNF α -Stimulation führt zu einer Erhöhung der mRNA-Menge um 57% bzw. 60%. Höhere Dosen (2ng/ml und 200ng/ml) führen dagegen bei ADAM15 und ADAM8 nicht zu signifikanten Expressionsveränderungen.

3.3.3 *In-vitro* TGF β -Stimulation von Schwanzzellen

Neben TNF α wurde auch die Wirkung von TGF β auf die Expression von ADAM15 und ADAM8 untersucht. Im Gegensatz zu TNF α führt eine Inkubation der Schwanzzellen mit geringen Konzentrationen an TGF β (bis zu 200pg/ml) für 24 Stunden nicht zu einer signifikanten Veränderung der Expression von ADAM8 und ADAM15 (Abbildung 21). Bei höheren Konzentration (2ng/ml und mehr) sinkt dagegen die Expression beider Gene, wobei diese Regulation bei ADAM15 weniger ausgeprägt ist als bei ADAM8. Die Verminderung der Transkriptionsmenge ist bei einer Zugabe von 20ng/ml TGF β am stärksten. Bei dieser Konzentration sinkt die Expression von ADAM15 auf fast die Hälfte (ca. 55%) des Kontrollniveaus. Die ADAM8-Expression sinkt sogar auf ein Drittel (ca. 33%).

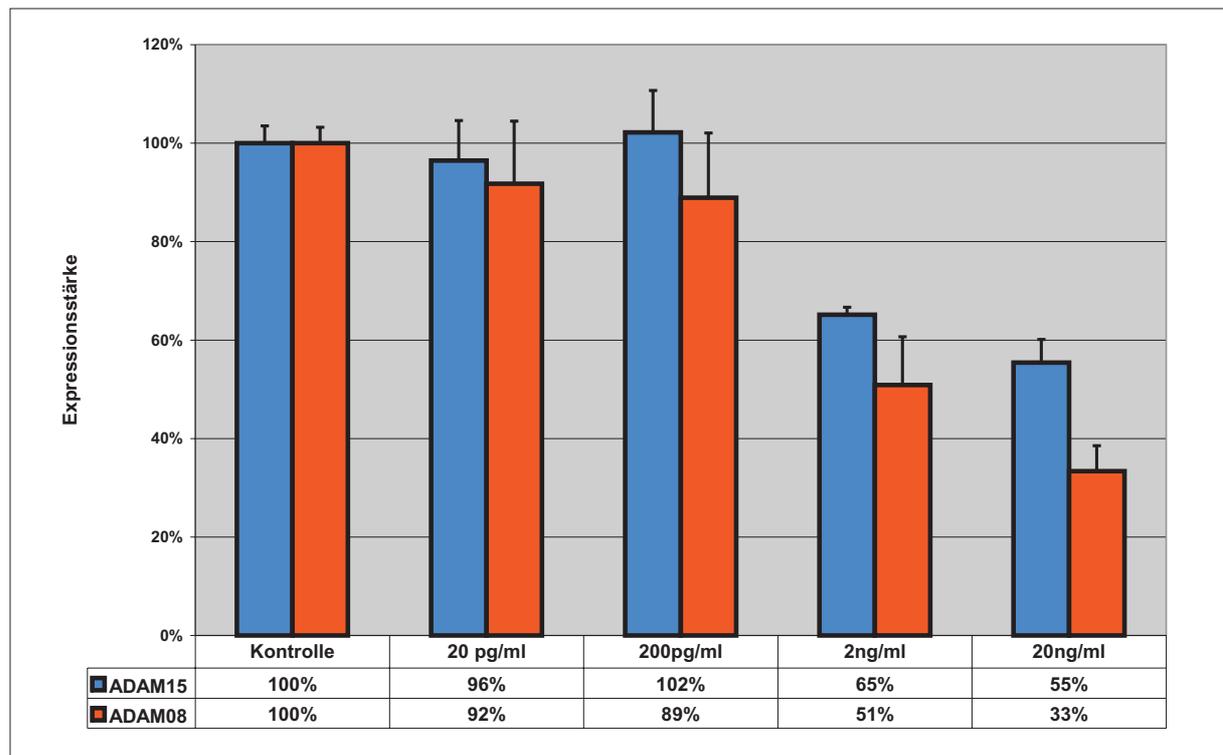


Abbildung 21: **Dosiskurve einer Stimulation von Schwanzzellen mit TGF β .** Es wurden jeweils 200.000 Zellen mit der angegebenen Konzentrationen von TGF β für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen behandelt. Anschließend wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (die Ergebnisse wurden durch GAPDH und ODC normalisiert). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

3.3.4 *In-vitro* Stimulation von Schwanzzellen mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit $\text{TGF}\beta$

Neben der separaten Stimulation von Schwanzzellen mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ wurde auch die Wirkung einer Kombination beider Substanzen auf die ADAM-Expression untersucht. Kombiniert man beide Mediatoren, so ergibt sich interessanterweise ein anderes Bild (Abbildung 22), als bei der alleinigen Stimulation. Eine Dosis von jeweils 20pg/ml $\text{TNF}\alpha$

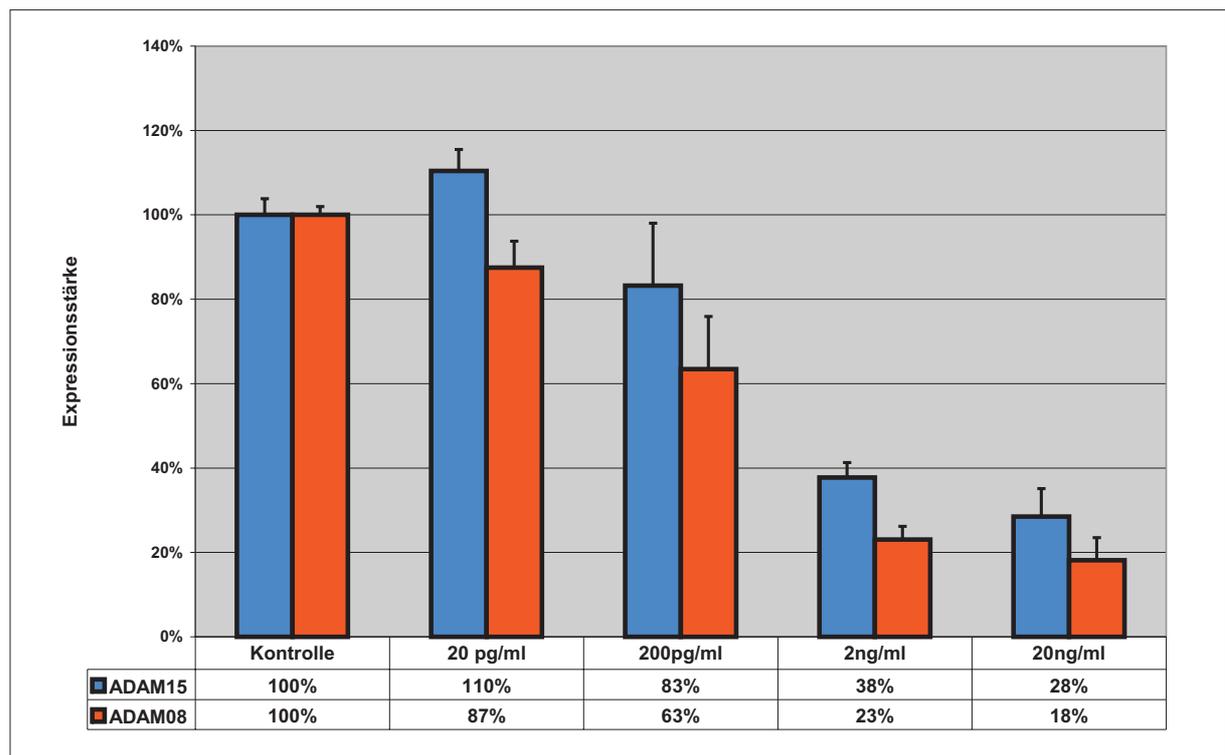


Abbildung 22: **Dosiskurve einer Stimulation von Schwanzzellen mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit $\text{TGF}\beta$.** Es wurden jeweils 200.000 Zellen mit der angegebenen Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen behandelt. Anschließend wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (die Ergebnisse wurden durch GAPDH und ODC normalisiert). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

und $\text{TGF}\beta$ führt bei ADAM15 nur noch zu einer sehr schwachen Erhöhung der Expression (ca. 110%). Die ADAM15-Expression fällt mit zunehmender Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ kontinuierlich ab und erfährt bei einer Zugabe von 20ng/ml die stärkste Erniedrigung auf circa ein Viertel (ca. 28%) der Kontrollexpression. ADAM8 ist ähnlich reguliert, jedoch nimmt hier die Expression schon bei der geringsten untersuchten Konzentration (je 20pg/ml) geringfügig ab (87%) und sinkt mit steigender Konzentration an

TNF α und TGF β auf circa ein Fünftel (ca 20%) der Kontrolleexpression (100%). Die Reduktion der untersuchten ADAM-mRNA-Expression bei einer Kombination der Cytokine ist stärker, als bei der Behandlung der Schwannzellen mit den einzelnen Cytokinen.

3.3.5 *In-vitro* TNF α -Stimulation von Astrozyten

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 in kultivierten Astrozyten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF α untersucht. Im Vergleich zu den zuvor untersuchten Schwannzellen verläuft die Express-

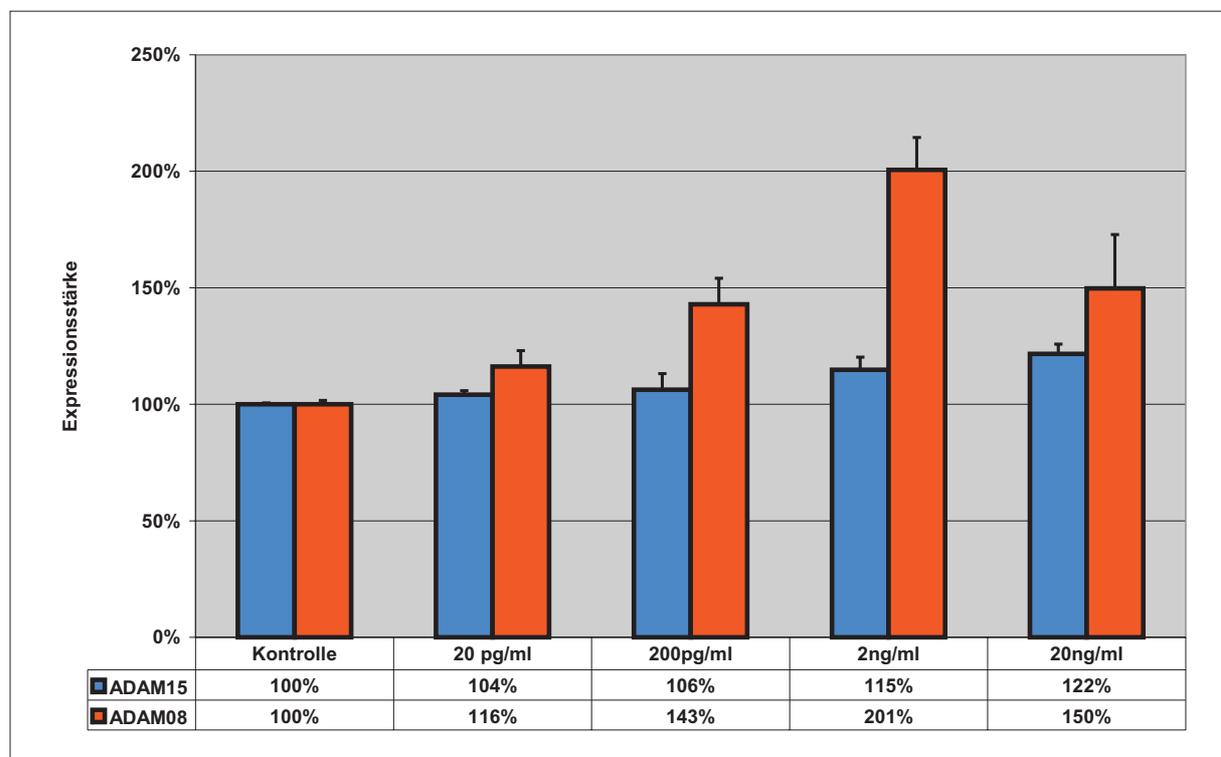


Abbildung 23: **Dosiskurve einer Stimulation von Astrozyten mit TNF α .** Es wurden jeweils 200.000 Zellen mit der angegebenen Konzentrationen von TNF α für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen behandelt. Anschließend wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (die Ergebnisse wurden durch GAPDH und ODC normalisiert). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an

ionsveränderung von ADAM15 und ADAM8 in Astrozyten nach TNF α -Gabe etwas anders (Abbildung 23). ADAM15 zeigt einen leichten Anstieg der Expression schon bei geringeren Konzentrationen (20pg/ml und 200pg/ml), anschließend verläuft dieser schwache Anstieg kontinuierlich bis zur höchsten getesteten Konzentration von 20ng/ml TNF α . Die maximale Induktion beträgt circa 120%. Einen ähnlichen Verlauf, jedoch deutlich stärker

ausgeprägt, zeigt die ADAM8-mRNA-Expression. Diese erfährt ein Maximum bei 2ng/ml TNF α auf das Zweifache der Kontrollexpression (100%) und fällt dann bei der noch höheren Konzentration wieder auf circa das 1,5-fache (ca. 150%) der Kontrollexpression ab.

3.3.6 *In-vitro* TGF β -Stimulation von Astrozyten

TGF β bewirkt in Astrozyten schon bei geringen Dosen eine Reduktion der ADAM15- und ADAM8-Expression (Abbildung 24). Die Expression fällt bei beiden Genen mit stei-

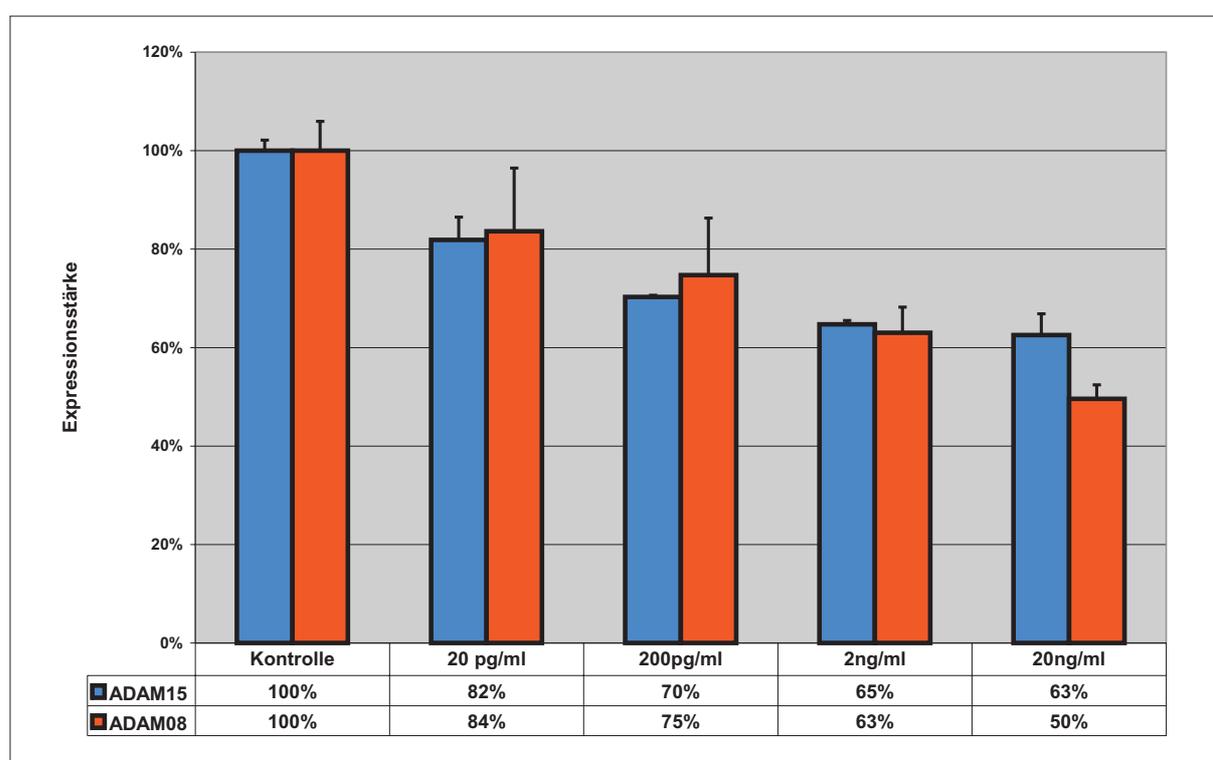


Abbildung 24: **Dosiskurve einer Stimulation von Astrozyten mit TGF β** . Es wurden jeweils 200.000 Zellen mit der angegebenen Konzentrationen von TGF β für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen behandelt. Anschließend wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (die Ergebnisse wurden durch GAPDH und ODC normalisiert). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an

gender Konzentration weiter ab. Bei ADAM15 auf bis zu 63% der Kontrollexpression, bei ADAM8 auf circa die Hälfte (ca. 50%). Es ist somit eine kontinuierliche Verringerung der Expression mit steigender Konzentration von TGF β zu beobachten.

3.3.7 *In-vitro* Stimulation von Astrozyten mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit $\text{TGF}\beta$

Abschließend wurden auch die Astrozyten mit der Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ behandelt. Die kombinierte Inkubation von Astrozyten mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ führt zu ei-

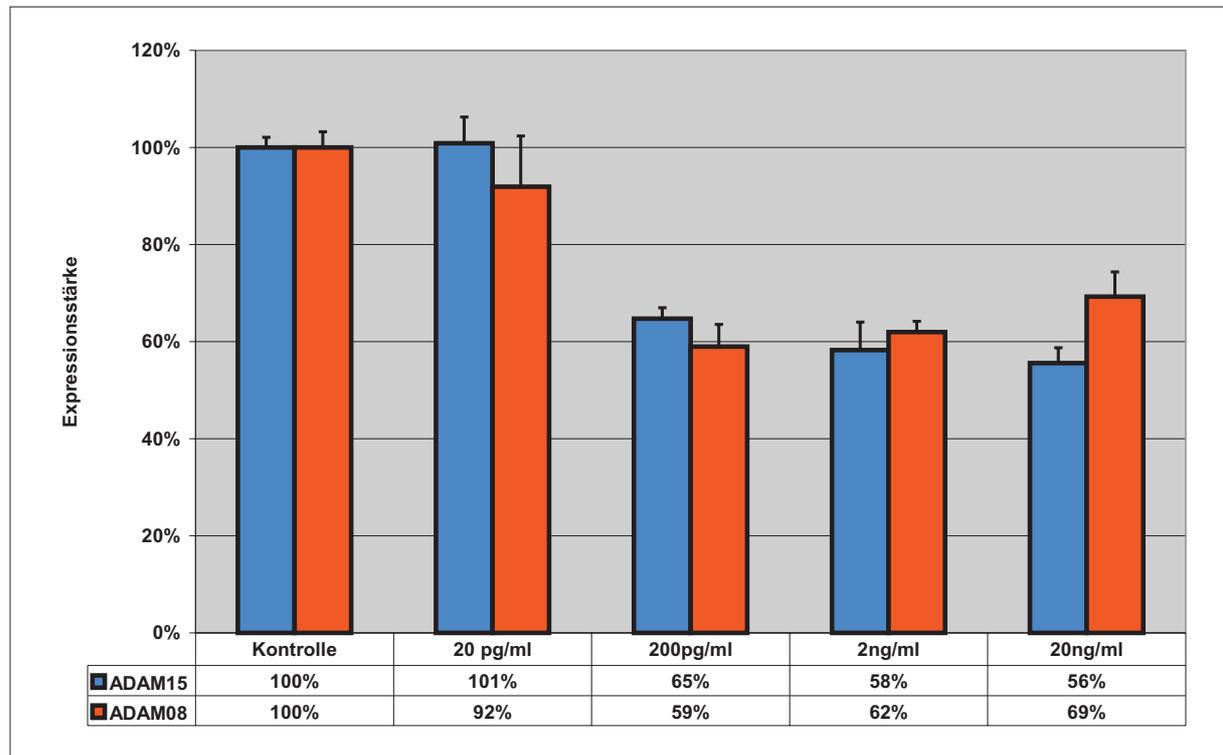


Abbildung 25: **Dosiskurve einer Stimulation von Astrozyten mit $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit $\text{TGF}\beta$.** Es wurden jeweils 200.000 Zellen mit der angegebenen Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen behandelt. Anschließend wurde die Expression von ADAM15 und ADAM8 mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (die Ergebnisse wurden durch GAPDH und ODC normalisiert). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

nem veränderten Bild im Vergleich zu der Behandlung mit nur einem Cytokin. Bei beiden Genen führt eine Konzentration von jeweils 20pg/ml $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ zu keiner signifikanten Veränderung. Erst bei einer Dosis von je 200pg/ml und mehr sinkt die Expression von ADAM15 und ADAM8 auf etwa 60% des Kontrollniveaus. Diese Verminderung lässt sich mit noch höheren Konzentrationen nicht weiter steigern. Die reduzierte Expression schwankt nur noch im Rahmen des Standardfehlers.

3.4 Untersuchungen an Explantaten von dorsalen Spinalgangli- en (DRG)

Um den Einfluss von ADAM15 auf das Migrationsverhalten und Wachstum von Schwannzellen bzw. Neuronen zu untersuchen, wurden dorsale Spinalganglien (DRG) von 15-17 Tage alten Rattenembryonen auf mit Laminin und verschiedenen ADAM15-Domänen beschichteten Multiwellplatten kultiviert.

Um den Einfluss der ADAM-Domänen auf das Wachstum der DRG zu untersuchen, wurden die DRG-Explantate auf verschiedenen Untergründen kultiviert. Hierzu wurden die verwendeten Zellkulturgefäße (LabTek, Nunc) mit $4\mu\text{g/ml}$ Laminin und zusätzlich mit $20\mu\text{g/ml}$ der in Tabelle 6 beschriebenen GST-ADAM15-Fusionsproteine, oder zu Kontrollzwecken mit GST beschichtet. Diese Kontrolle diente der Detektion von möglichen unspezifischen Effekten auf das Wachstum der DRG durch GST. Die aus den Embryonen gewonnen DRG wurden zu etwa drei Stück pro LabTek-Kammer in Gegenwart von FUDR ($10\mu\text{M}$ als Mitoseinhibitor) und NGF (10ng/ml als Neuronenstimulans) für 24 Stunden kultiviert. FUDR hemmt hauptsächlich die Proliferation der Schwannzellen.

3.4.1 Wachstumsverhalten von dorsalen Spinalganglien (DRG) auf verschiedenen Proteinbeschichtungen

Auf Laminin wandern Schwannzellen und Neurone innerhalb von 24 Stunden kreisförmig aus den DRG-Explantaten. Die Zellen sind vor allem in der Mitte der Explantate zu finden, aus denen die Axone und Dendriten faserförmig auswachsen (siehe kreisförmige Markierungen in Abbildung 26). Die Verwendung der Fusionsproteine zur Beschichtung der Kulturplatten führt im Vergleich der auf Laminin kultivierten DRG, zu einer Verkleinerung der von Zellen und Neuritenausläufer bedeckten Gesamtfläche (Teilbilder DIS-CYS, GST, DIS-MEP in Abbildung 26). DRG-Explantate, die auf GST als Kontrolle, oder auf den Fusionsproteinen DIS-CYS bzw. DIS-MEP wachsen, zeigen darüber hinaus kein verändertes Wachstumsverhalten. Die bewachsenen Regionen sind zwar kleiner als die der auf Laminin kultivierten DRG. Dennoch zeigen sie ein Wachstum der Neuriten (blaugestrichelter Kreis in Abbildung 26), das sich über die Ausdehnung der Schwannzellmigration (rotgestrichelter Kreis in Abbildung 26) hinaus erstreckt. Anders verhält sich die Situation im Falle des Fusionsproteins DIS (GST-Disintegrin-Domänen).

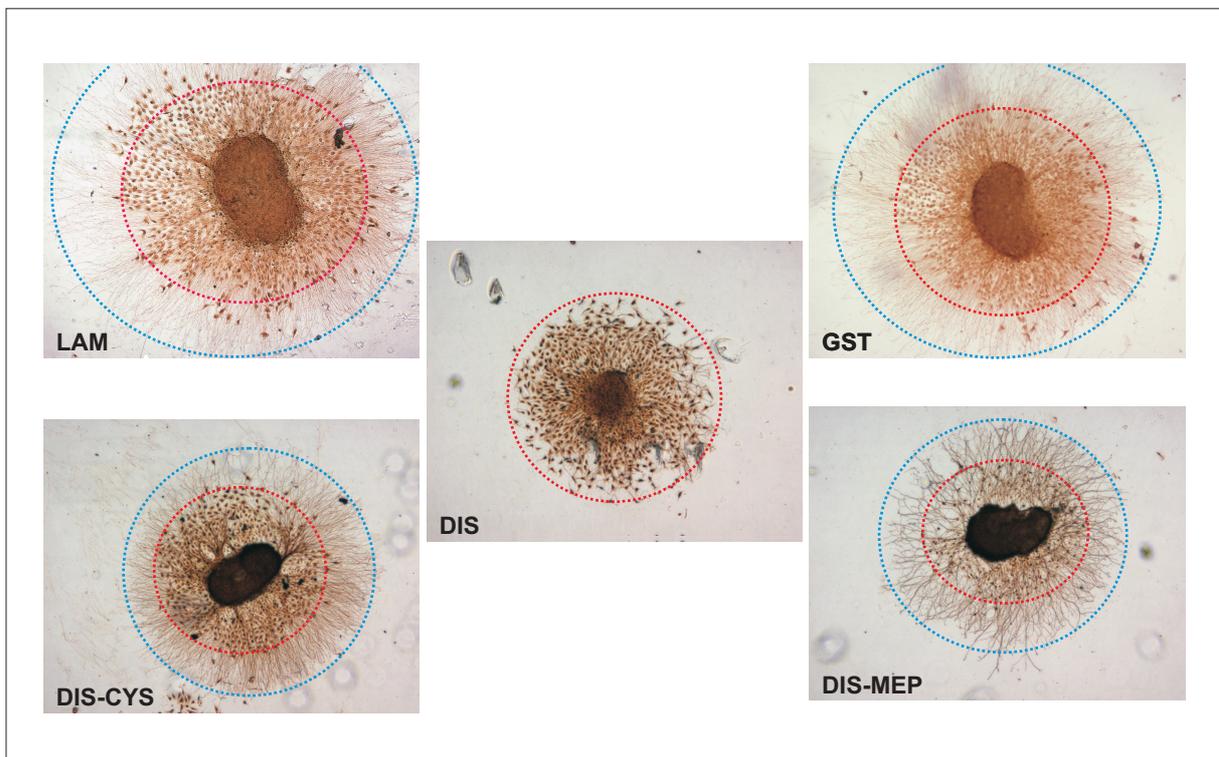


Abbildung 26: **Wachstum der Explantate von dorsalen Spinalganglien (DRG)**. Die Explantate wurden in Kulturgefäßen kultiviert, die mit $4 \mu\text{g}$ Laminin/ml sowie zusätzlich mit einem der oben genannten Fusionsproteine von ADAM15 beschichtet wurden. Es wurde mit jeweils $20 \mu\text{g/ml}$ der entsprechenden GST-Fusionsproteinen bzw. GST beschichtet. Neben der Disintegrin-Domäne (DIS) wurde auch die Kombination von Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne (DIS-MEP) bzw. die Disintegrin- und Cysteinreiche-Domäne (DIS-CYS) eingesetzt. Die DRG wurden 24 Stunden unter Standardzellkultur-Bedingungen gehalten und anschließend mit einem polyklonalem S100-Antikörper (rabbit 1:2.000) gefärbt, der auf DAB-Basis mit einem biotinyliertem Zweitantikörper (goat anti-rabbit, 1:200) detektiert. Die blaugestrichelten Kreise beschreiben das Neuritenwachstum, die rotgestrichelten Kreise dagegen die Schwanzzellmigration.

Eine Beschichtung mit dem DIS-Protein führt dazu, dass Neuriten kaum noch über die Schwanzzellen hinaus auswachsen (Teilbild DIS in Abbildung 26).

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen von DRG Explantaten

Um zu untersuchen, ob die beobachtete reduzierte Ausdehnung der Neuriten auf dem DIS-Protein mit der Fläche der migrierenden Schwanzzelle korreliert, wurde an einigen DRG eine fluoreszente Doppelfärbung durchgeführt. Hierzu wurde zum einen ein Antikörper gegen Schwanzzellen (anti-S100, Sigma) und zum anderen ein Antikörper gegen den panaxonalen Marker (PAN-Marker, Sternberger Monoclonals) eingesetzt. Wie in Abbildung 27 erkennbar ist, können zwei Bereiche unterschieden werden:

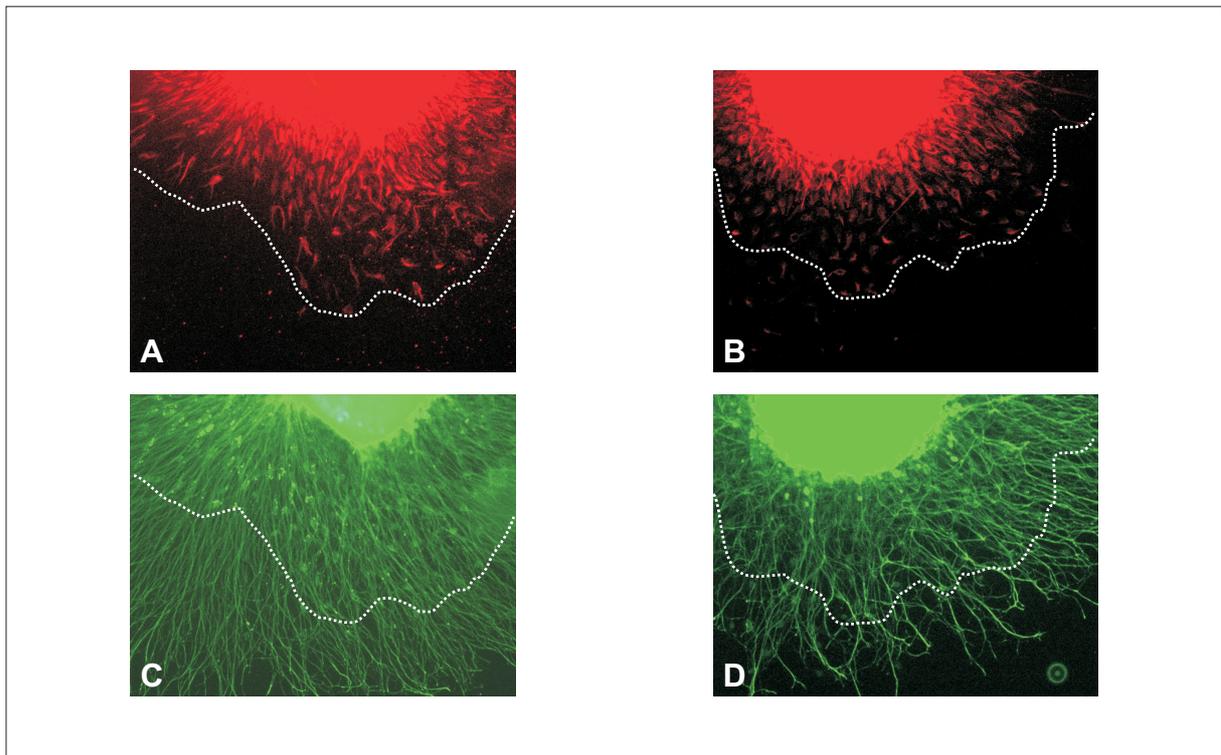


Abbildung 27: **Immunfluoreszenzfärbung an DRG Explantaten.** Die DRG-Explantate wurden auf $4\mu\text{g/ml}$ Laminin und $20\mu\text{g/ml}$ GST kultiviert. A+B: Färbungen mit einem monoklonalem mouse anti-S100 Antikörper (1:2.000) detektiert mit horse anti-mouse-Cy3 (1:500), C+D: Färbungen mit einem polyklonalem Erstantikörper gegen Axone (rabbit anti-PAN axonal Marker, 1:2.000) detektiert mit dem Zweitantikörper goat anti rabbit-Alexagreen (1:500). Die weiß gestrichelte Linie beschreibt auf allen Abbildungen die Schwanzzellausdehnung.

1.) der Bereich mit angefärbten Schwanzzellen (Abbildung 27 A+B) und 2.) ein Bereich ausschließlich aus Neuriten (Abbildung 27 C+D). Die Neuriten wachsen über das Schwanzzellfeld hinaus, dies bedeutet, dass die Ausdehnung der Neuriten größer ist als die Ausdehnung der Schwanzzellen. Somit ist klar, dass die Schwanzzellen als direkter Untergrund für das Wachstum der Neuriten nicht notwendig sind. Die Neuriten wachsen sowohl auf dem mit Laminin beschichteten Untergrund als auch auf Laminin und GST. Ein anderes Bild ergibt sich bei der Verwendung einer Beschichtung aus Laminin und DIS (Abbildung 28). Hier beobachtet man eine Veränderung des Neuriten-Wachstums (C+D). Die Neuritenfasern stoppen am Ende der Schwanzzellausdehnung (A+B) und wachsen nicht auf der mit Laminin und DIS beschichteten Oberfläche weiter. Das Neuritenfeld entspricht also der Ausdehnung der Schwanzzellen.

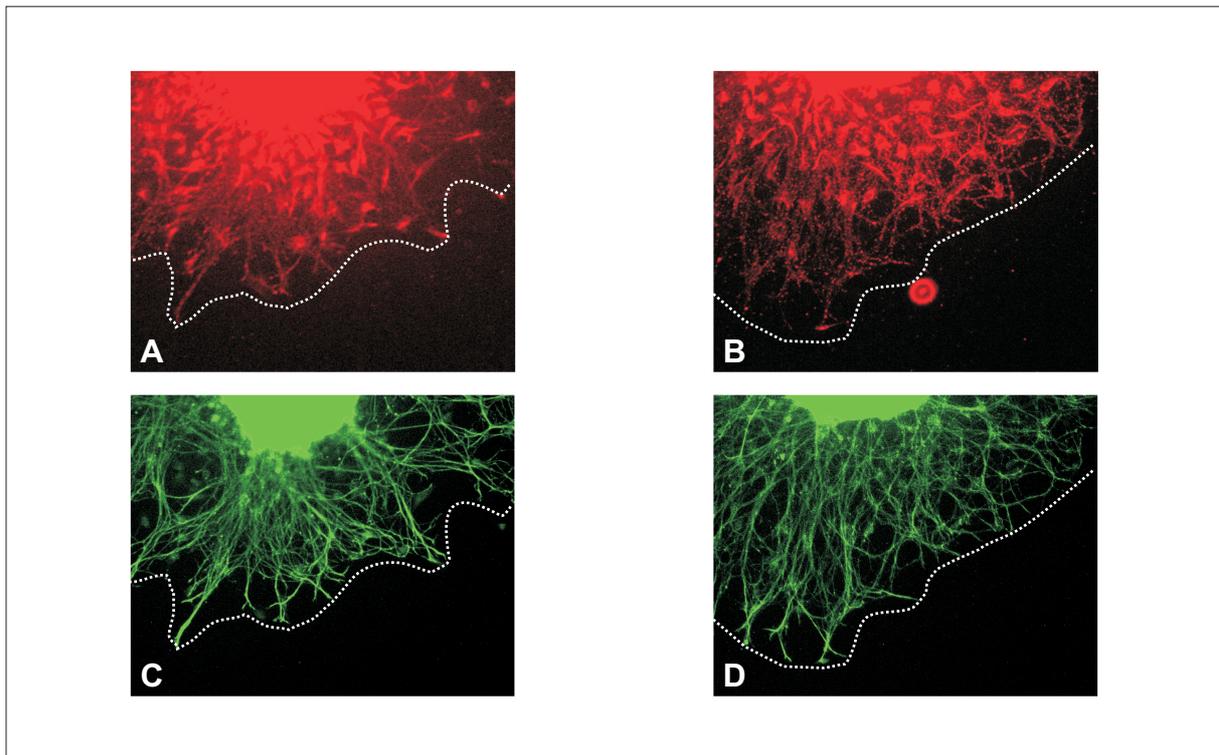


Abbildung 28: **Immunfluoreszenzfärbung an DRG Explantaten.** Die DRG-Explantate wurden auf $4\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin und $20\mu\text{g}/\text{ml}$ DIS kultiviert. A+B: Färbungen mit einem monoklonalem mouse anti-S100 Antikörper (1:2.000) detektiert mit horse anti-mouse-Cy3 (1:500), C+D: Färbungen mit einem polyklonalem Erstantikörper gegen Axone (rabbit anti-Pan axonal Marker, 1:2.000) detektiert mit dem Zweitantikörper goat anti rabbit-Alexagreen (1:500). Die weiß gestrichelte Linie beschreibt auf allen Abbildungen die Schwanzzellausdehnung.

3.4.3 Veränderung der Gesamtfläche von DRG-Explantaten in Abhängigkeit von der Fusionsproteinbeschichtung

Die maximale Ausdehnung der DRG-Explantate wurde wie folgt ermittelt:

Der Durchmesser der Neuritenausdehnung (in Abbildung 26 blau gestrichelt) wurde an drei zufällig ausgewählten Stellen bestimmt und hierdurch die Gesamtfläche berechnet. Da die GST-Beschichtung als Kontrolle diente, wurde das Wachstum der Explantate auf den weiteren Beschichtungen auf diesen Wert bezogen. Betrachtet man die Gesamtfläche der verschiedenen DRG-Explantate (Abbildung 29), so fällt auf, dass sich die Gesamtfläche bei Beschichtung mit DIS-MEP, DIS-CYS oder GST verringert. Dieser Effekt beruht möglicherweise auf der stöchiometrischen Veränderung der Lamininmoleküle durch Zugabe der Fusionsproteine. Eine signifikante Veränderung der Gesamtfläche tritt jedoch nur bei einer zusätzlichen Beschichtung mit der Disintegrin-Domäne (DIS) auf. Die maximale Ausdeh-

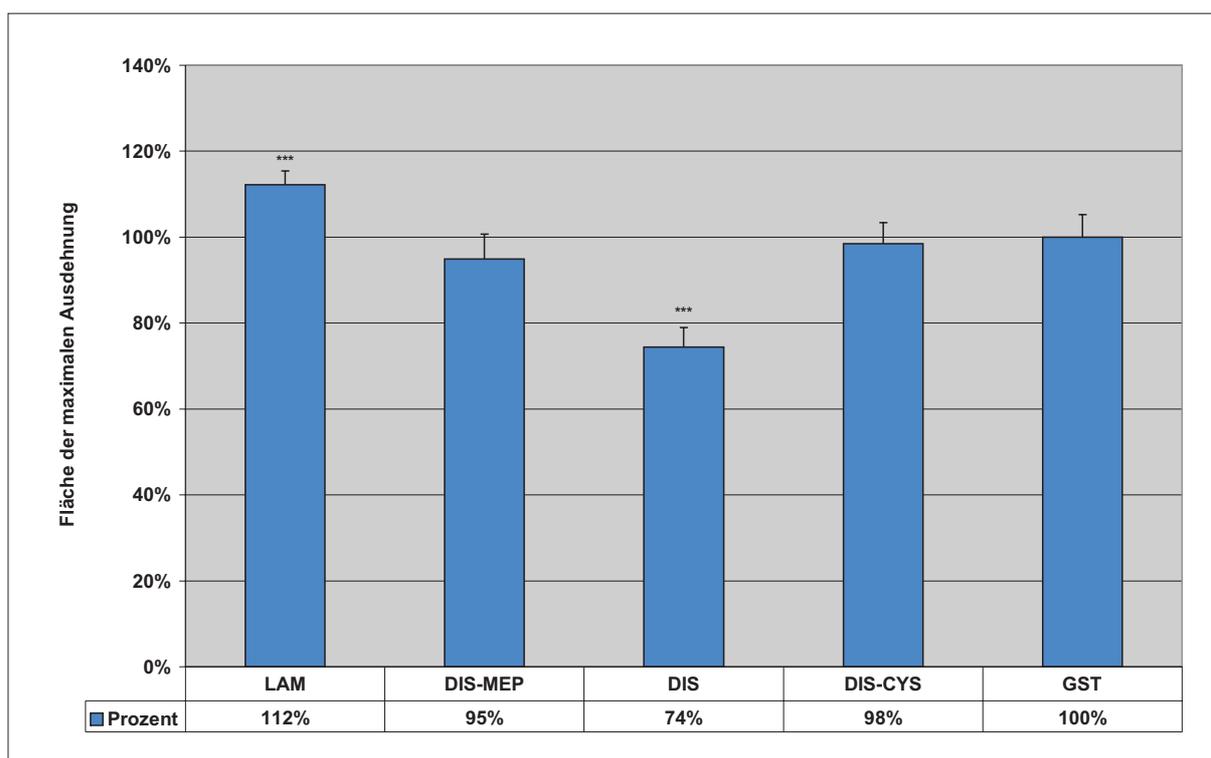


Abbildung 29: **Größenvergleich von DRG-Explantaten auf verschieden beschichteten Oberflächen.** Die DRG auf allen fünf beschichteten Untergründen (Laminin+ Fusionsproteine) wurden nach dem Ausdrucken auf Papier in ihrer kreisförmigen Maximalausdehnung umrandet (blaugestrichelter Kreis in Abbildung 26) und der Durchmesser an drei willkürlichen Stellen bestimmt. Der daraus resultierende Mittelwert des Durchmessers wurde für die Flächenberechnung eingesetzt. Als Kontrolle dient hier die Beschichtung aus Laminin+GST und wurde daher gleich 100% gesetzt. Die anderen berechneten Flächen wurden auf diesen Wert bezogen.

nung reduziert sich um ca 25%. Die beobachteten Veränderungen durch die Disintegrin mit Metalloprotease-Domäne bzw. die Disintegrin- mit Cysteinreicher-Domäne liegen bei etwas mehr als 5% und damit im Rahmen des Standardfehlers.

3.4.4 Veränderung des Schwanzzellfeldes der DRG-Explantate in Abhängigkeit von der Fusionsproteinbeschichtung

Nachdem man eine signifikante Abnahme in der maximalen Flächenausdehnung der DRG-Explantate durch das Fusionsprotein DIS (Abbildung 29) festgestellt hatte, sollte nachfolgend untersucht werden, ob auch die Größe des Schwanzzellfeldes reduziert ist. Hierzu wurde die jeweilige Schwanzzellausdehnung (Abbildung 26 rot gestrichelt) der DRG auf verschiedenen Beschichtungen bestimmt, ihre Fläche berechnet und auf die gewachsene Schwanzzellfläche bei einer GST-Beschichtung bezogen. Betrachtet man die daraus

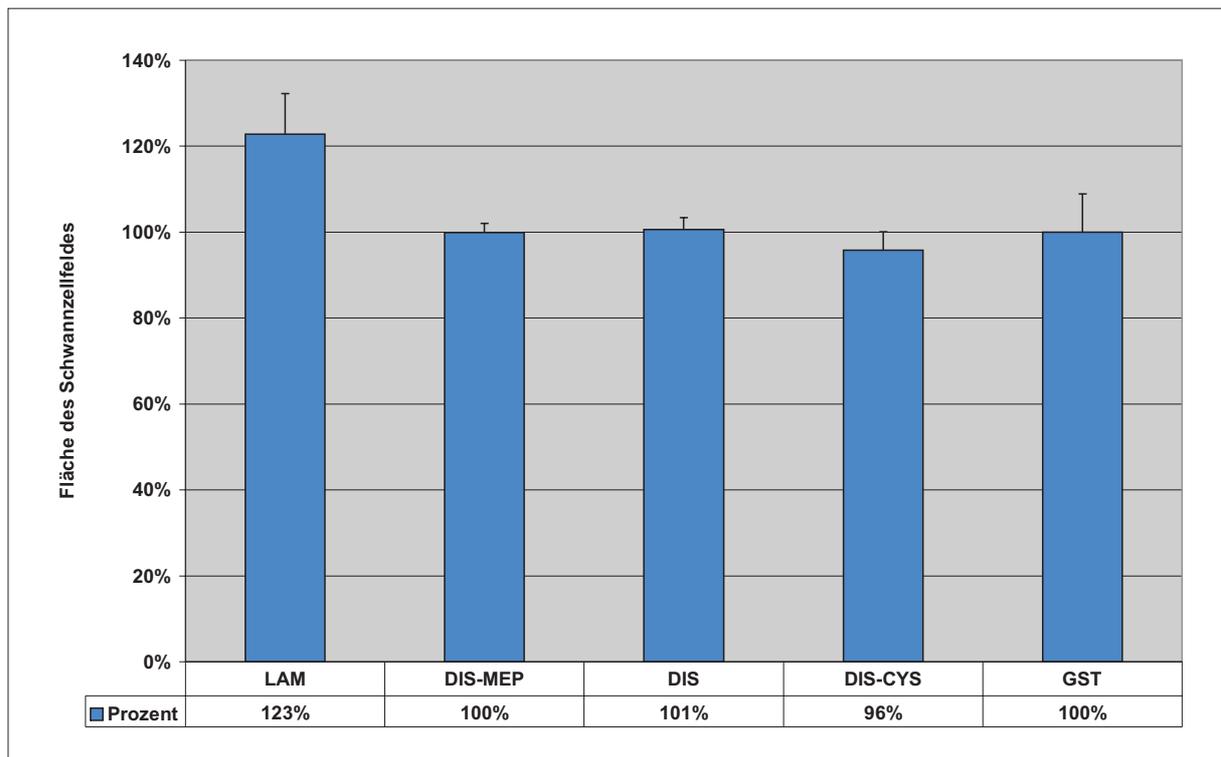


Abbildung 30: **Vergleich von Flächen der Schwannzellausdehnungen auf verschiedenen beschichteten Oberflächen.** Alle Oberflächen, auf denen die DRG-Explantate wachsen, wurden mit Laminin beschichtet und teilweise zusätzlich mit den entsprechenden Fusionsproteinen. Nach 24 Stunden wurde die Schwannzellfläche nach dem gleich großen Ausdrucken umrandet und durch dreimaliges Messen des Durchmessers in ihrer Fläche bestimmt. Die Werte wurden in Bezug zur Kontrolle auf Laminin-GST gesetzt.

resultierende Schwannzellausdehnung (Abbildung 30), so ist die bewachsene Schwannzellfläche nur auf Laminin verändert. Auf purem Laminin ist sie um circa ein Fünftel erhöht (auf 125%). Der Grund für diese Beobachtung liegt wie bereits beschrieben, vermutlich an der veränderten Stöchiometrie von zugänglichen Lamininmolekülen pro Quadratmeter durch die zugesetzten Fusionsproteine. Alle DRG-Explantate auf den beschichteten Oberflächen aus Laminin und einem Fusionsprotein zeigen alle in etwa eine gleiche Schwannzellausdehnung. Durch den Einsatz des DIS-Fusionsproteins wird die Schwannzellausdehnung somit nicht verändert. Nur das Neuritenwachstum erscheint durch die Beschichtung mit dem DIS-Fusionsprotein negativ beeinflusst zu werden (Abbildung 29).

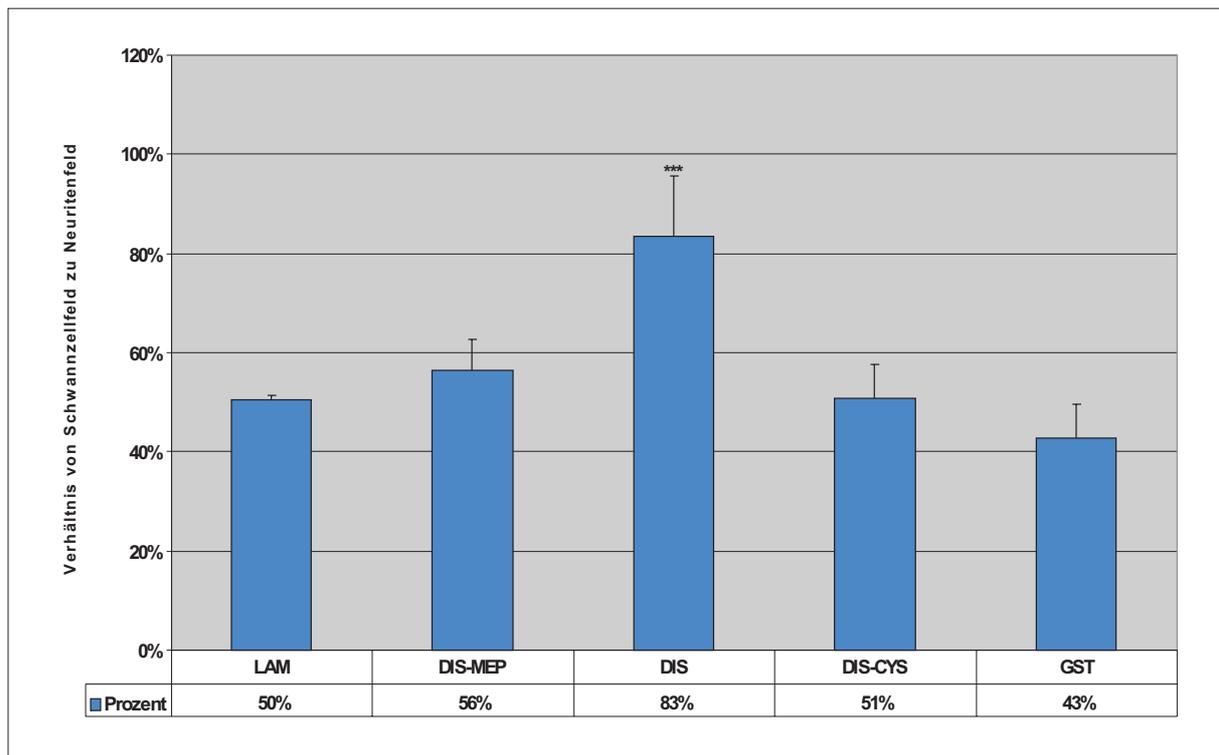


Abbildung 31: **Vergleich der Fläche von Schwannzellfeld zu Neuritenfeld.** Das Verhältnis von Schwannzellfeld (rote Kreise Abbildung 26) zu Neuritenfeld (blauer Kreis Abbildung 29) wurde durch die Division der beiden Flächen berechnet. Beschichtungen: Lam=Laminin, GST=Laminin+Glutathion-S-Transferase, DIS-MEP=Laminin+Fusionsprotein aus GST mit Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne, DIS=Laminin+Fusionsprotein aus GST mit Disintegrin-Domäne, DIS-CYS=Laminin+Fusionsprotein aus GST mit Disintegrin- und Cysteinreicher-Domäne

3.4.5 Größenvergleich der Ausdehnung von Schwannzellfeld und Neuritenfeld in Abhängigkeit von GST-ADAM15-Fusionsproteinen

Die beobachtete Verminderung des Neuriten-Wachstums lässt sich durch den Vergleich der Fläche des Schwannzellfeldes mit der Fläche des Neuritenfeldes abbilden (Abbildung 31). Hierbei wird die maximale Flächenausdehnung der Neuriten und die Fläche des Schwannzellfeldes durch Messen des Durchmessers an je drei Positionen bestimmt (blau und rote Umrandungen in Abbildung 26). Die Fläche des Schwannzellfeldes wurde dann durch die Fläche des Neuritenfeldes geteilt. Dieses Verhältnis beider Flächen liegt bei der Kontrollbeschichtung mit GST, als auch bei der Beschichtung mit Laminin, DIS-MEP und DIS-CYS etwa im Bereich von 43-57%, was dem Schwankungsbereich des Standardfehlers entspricht. Einen deutlichen Unterschied im Ausdehnungsverhältnis erkennt man dagegen bei dem Wachstum der DRG-Explantate auf DIS. Hier liegt das Verhältnis im Mittel bei

ca. 83%, so dass die Neuriten-Ausdehnung ungefähr der Ausdehnung der Schwanzzellen entspricht.

3.4.6 Zeitlicher Verlauf der Ausdehnung von Neuriten und Schwanzzellen auf GST bzw. der Disintegrin-Domäne von ADAM15

Um nach der zuvor beschriebenen Endpunktbestimmung (nach 24h) der DRG-Explantate auch den zeitlichen Verlauf des Auswachsens von Schwanzzellen und Neuriten aus DRG-Explantatkulturen zu charakterisieren, wurde in einer Zeitreihe das Migrations- und Wachstumsverhalten durch Phasenkontrastaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert. Die DRG-Explantate wurden entweder auf DIS- sowie auf GST-Fusionsproteinen kultiviert und jeweils nach 5, 9, 18 und 24 Stunden fotografiert (Abbildung 32+33).

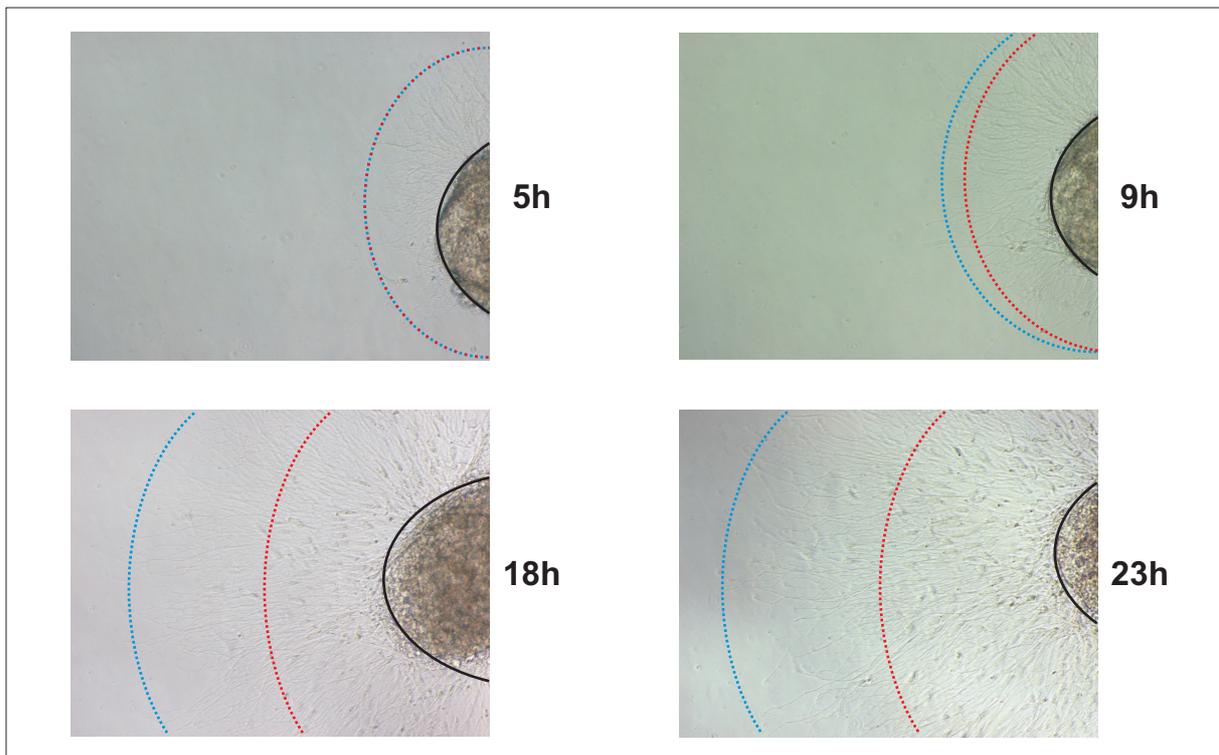


Abbildung 32: **Zeitlicher Verlauf des Wachstums von DRG-Explantaten auf GST.** Die auf einer Mischung von $4\mu\text{g/ml}$ Laminin und $20\mu\text{g/ml}$ GST wachsenden DRG-Explantate wurden durch Phasenkontrast-Aufnahmen mit einer zehnfachen Vergrößerung nach 5, 9, 18 und 24 Stunden dokumentiert. Die blau gestrichelten Halbkreise beschreiben das Neuritenwachstum, die rot gestrichelten Halbkreise beschreiben die Schwanzzellausdehnung.

Nach 5 und 9 Stunden sind die Regionen der Schwanzzellmigration (rot gestrichelt in Abbildung 32) und das Neuriten-Wachstum (blau gestrichelt) auf GST-behandelten Kul-

turgefäßen fast deckungsgleich. Nach 18 Stunden kann man jedoch eine schnellere Ausdehnung der Neuriten (blau gestrichelt) gegenüber den Schwanzzellen (rot gestrichelt) erkennen. Betrachtet man das Wachstum der DRG-Explantate auf DIS (Abbildung 33),

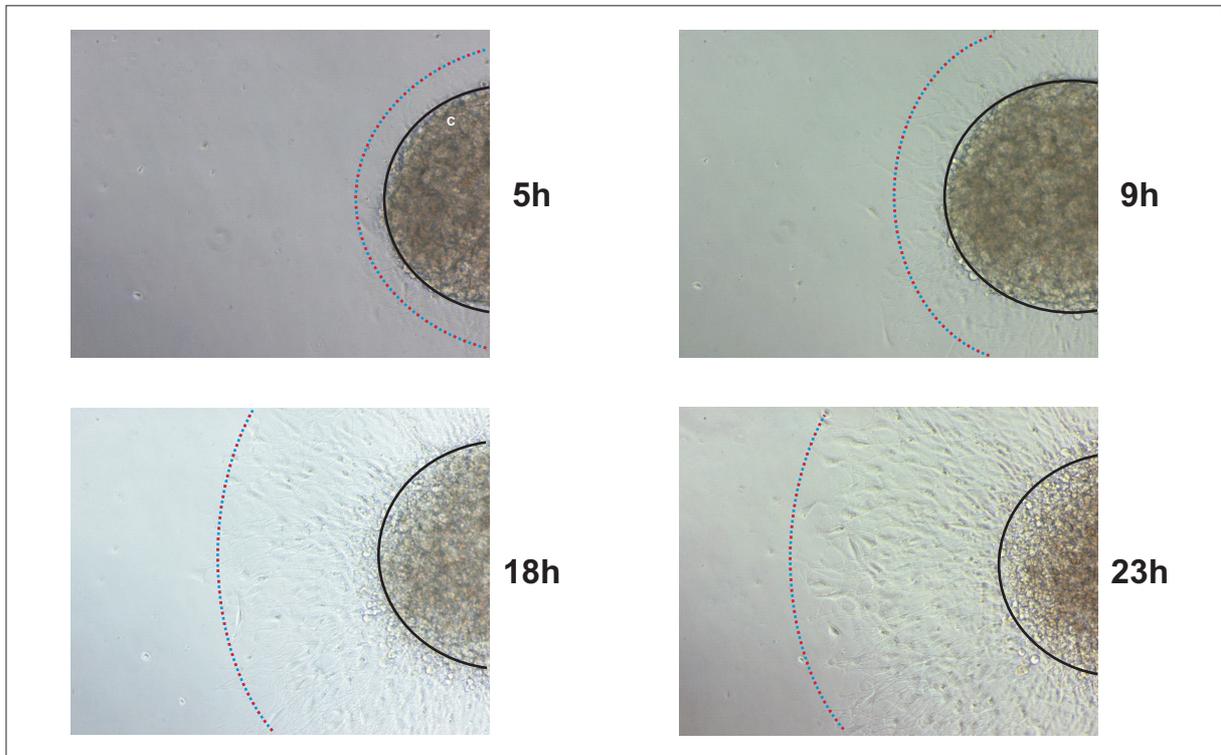


Abbildung 33: **Zeitlicher Verlauf des Wachstums von DRG-Explantate auf dem DIS-Fusionsprotein.** Die auf einer Mischung von $4\mu\text{g/ml}$ Laminin und $20\mu\text{g/ml}$ GST wachsenden DRG-Explantate wurden durch Phasenkontrast-Aufnahmen mit einer zehnfachen Vergrößerung nach 5, 9, 18 und 24 Stunden dokumentiert. Die blau gestrichelten Halbkreise beschreiben das Neuritenwachstum, die rot gestrichelten Halbkreise beschreiben die Schwanzzellausdehnung.

so kann man zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Unterschied in der Schwanzzellmigration und des Neuriten-Wachstums (Abbildung 32) feststellen.

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die in Abbildung 32 und 33 eingezeichneten Ausdehnungen von Schwanzzellen (rot gestrichelt) und Neuriten (blau gestrichelt) im Radius bis zum präparierten DRG-Explantat (schwarzer Halbkreis) an drei Stellen gemessen. Die dunkelblaue Gerade (Dreiecke) in Abbildung 34 beschreibt das Wachstum der Neuriten auf GST (ca. 2,6 Millimeter pro Stunde). Die Migrationsgeschwindigkeit der Schwanzzellen auf GST ist mit einer Geschwindigkeit von etwa 1,1 Millimeter pro Stunde langsamer (Abbildung 34, dunkelrote Gerade aus Dreiecken). Dies

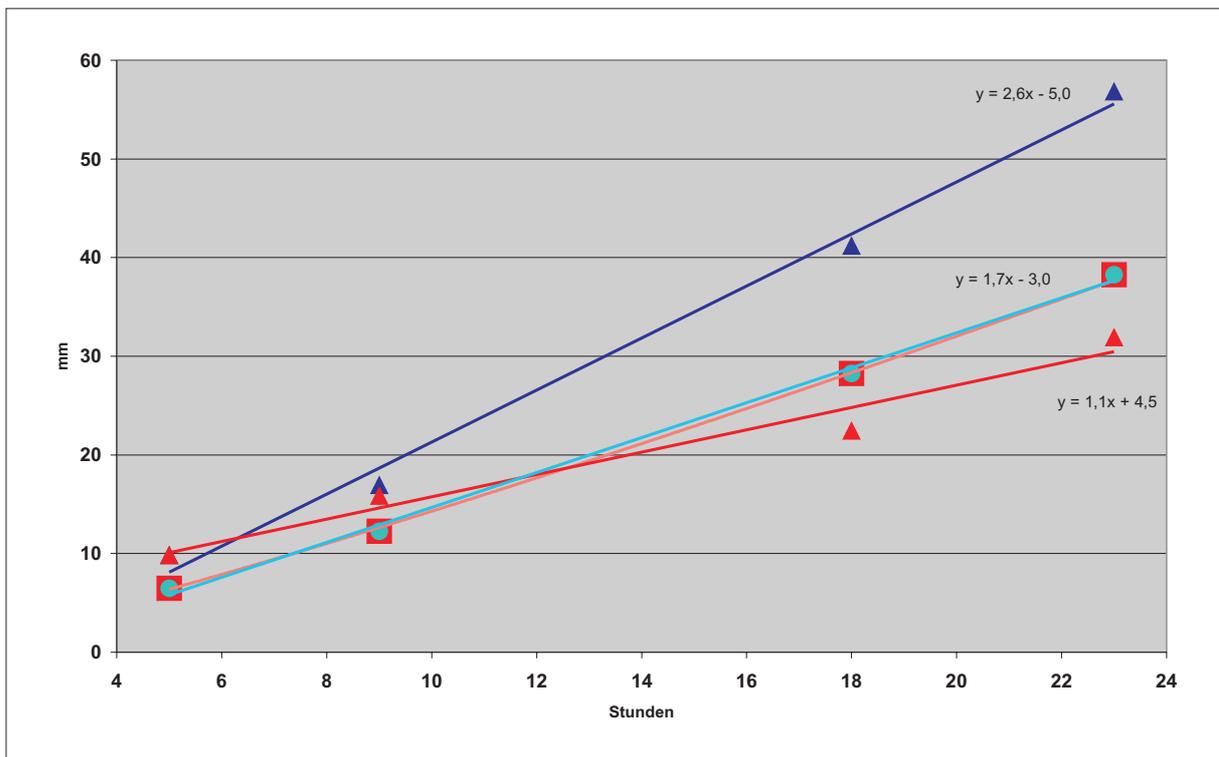


Abbildung 34: **Zeitlicher Verlauf des Wachstums von DRG-Explantaten.** Die Schwannzellausdehnung und die Neuritenausdehnung der DRG auf DIS und GST in den Abbildungen 32+33 wurde im Abstand zum präparierten DRG-Explantat an drei Stellen bestimmt. Dies geschah an mehreren Explantaten und wurde im Mittel über die Zeit aufgetragen. Die dunkelblaue Gerade (Dreiecke) beschreibt das Wachstum der Neuriten auf Laminin+GST, die dunkelrote Gerade (Dreiecke) dagegen das Wachstum der Schwannzellen auf Laminin+GST. Die hellblaue (Kreise) und hellrote (Vierecke) Gerade beschreiben dagegen das Wachstum von Neuriten und Schwannzellen auf Laminin+DIS-Fusionsprotein. Dies wurde an mehreren verschiedenen DRG durchgeführt und im Mittel in Abbildung 34 über die Zeit aufgetragen.

zeigt, dass die Neuriten-Ausdehnung circa 2,4 mal schneller als die Schwannzellmigration erfolgt und somit von dieser unabhängig zu sein scheint. Ganz anders verhält es sich bei dem Wachstum der DRG-Explantate auf dem DIS-Fusionsprotein. Hier kann man keinen Unterschied in dem Neuritenwachstum (hellblaue Gerade, Kreise) und der Schwannzellmigration (hellrote Gerade, Quadrate) erkennen. Sie wachsen beide mit einer Geschwindigkeit von 1,7 Millimeter pro Stunde, was ungefähr dem Wachstum der Schwannzellregion auf GST entspricht. Im Gegensatz zu den Beobachtungen dieser Arbeit auf dem GST-Untergrund scheint das Neuritenwachstum auf der DIS-Beschichtung von den migrierenden Schwannzellen abhängig zu sein.

3.4.7 Einfluss der Disintegrin-Bindedomäne auf das Wachstumsverhalten von DRG-Explantaten

Eine frühere Publikation von Nath und Mitarbeitern (1999) beschreibt die Interaktion von humanem ADAM15 mit Integrinen (Nath *et al.*, 1999). Für diese Bindung wurden vor allem die drei Aminosäuren Arg-Gly-Asp (RGD) in der Bindedomäne von ADAM15 verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die

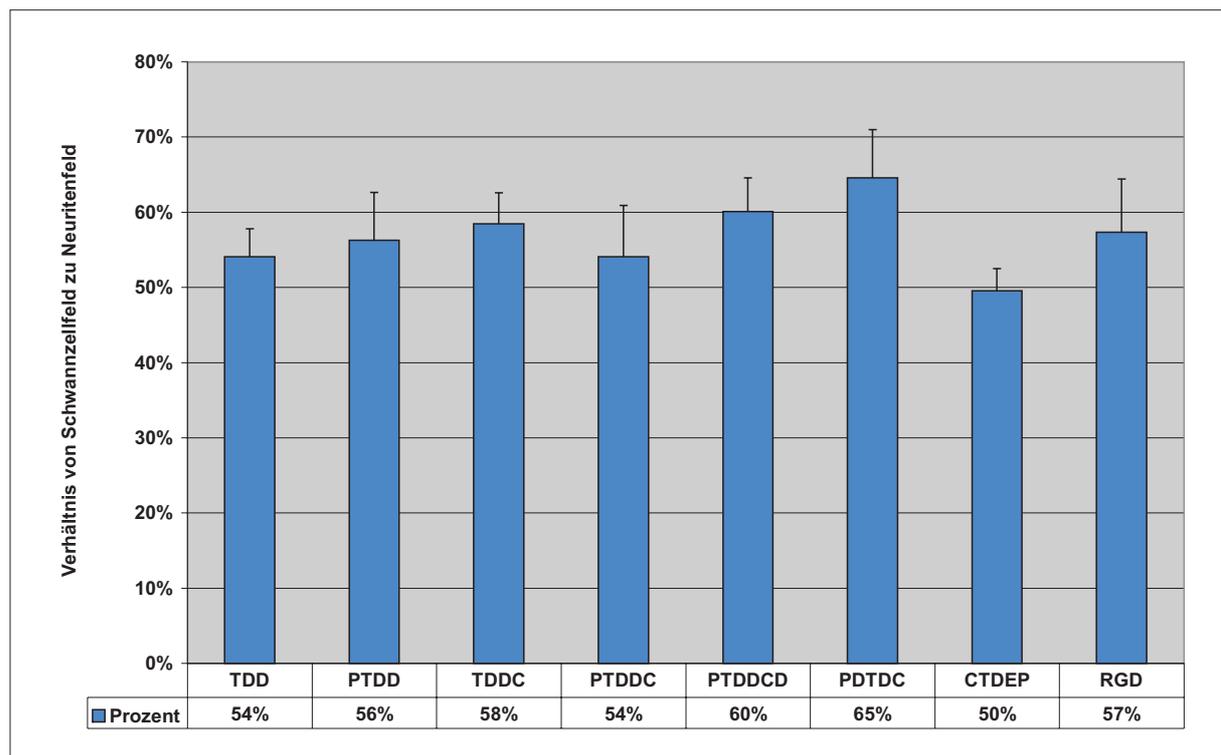


Abbildung 35: **Einfluss von Peptidderivate der putativen Bindedomäne von ADAM15 auf das Wachstum der DRG-Explantate.** Anstelle der Fusionsproteine wurden in diesem Fall Peptidderivate der putativen Bindedomäne TDD, die homolog zur Bindedomäne RGD bei humanem ADAM15 ist, für die Beschichtung der Oberflächen zu Laminin in einer Konzentration von $20\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzu gegeben. Die Peptide PDTDC, CTDEP und RGD dienen hier als Kontrolle.

in Ratte homologe Aminosäuresequenz TDD darauf untersucht werden, ob die mit dem DIS-Fusionsprotein erzielten Effekte auf das Wachstum der Explantatkulturen von diesen Peptiden vermittelt werden (Abbildung 35). Daher sollte das DIS-Fusionsprotein als Beschichtung nun durch mögliche funktionelle Peptide ersetzt werden. Hierzu kamen verschiedene Peptide zum Einsatz: Das Peptid TDD analog zu RGD im humanen ADAM15, ein Peptid mit einer zusätzlichen Aminosäure vor diesem Motiv (PTDD) bzw. einer Aminosäure danach (TDDC), sowie die Peptide PTDDC und PTDDCD. Die Peptide PDTDC

(vertauschen von D und T) sowie CTDEP (Substitution von D zu E) dienten ebenso wie ein RGD-Peptid als Kontrolle, welche keine Veränderungen hervorrufen dürfen. Die Peptide wurden neben $4\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin in einer Konzentration von $20\mu\text{g}/\text{ml}$ zur Beschichtung der einzelnen Kammern des Lab-Tek (Nunc) benutzt und anschließend nach dreimaligem Waschen mit den DRG kultiviert. Auch hier wurde der Vergleich der Schwannzellfläche mit der Fläche der Neuriten-Ausdehnung durch die Bestimmung der Durchmesser berechnet. Die DRG-Explantate wachsen auf allen Peptiden annähernd gleich aus (Abbildung 35). Es ist in allen Fällen ein Wachstum der Axone über die Schwannzellfläche hinaus festzustellen, die einen Anteil von 50-65 % an der Gesamtfläche erreichen. Dies trifft auch für die verwendeten Kontrollen zu (PDTDC, CTDEP und RGD)). Ein Verhältnis von 80% oder höher, wie es bei der Verwendung von DIS-Fusionsproteinen beobachtet wurde (Abbildung 31), konnte nicht festgestellt werden. Mit den Peptiden kann somit kein inhibitorischer Effekt auf das Neuritenwachstum ausgelöst werden.

3.4.8 Inhibition des Wachstums von dorsalen Spinalganglien durch Antikörper gegen β -Untereinheiten von Integrinen

Da eine Interaktion zwischen Disintegrinen und Integrinen schon für verschiedene Proteine der ADAM-Familie bekannt ist (Nath *et al.*, 1999; Eto *et al.*, 2000), lag die Vermutung nahe, dass das verringerte Neuritenwachstum auf DIS-Fusionsproteinen durch eine Interaktion mit Integrinen vermittelt wird. Daher wurde versucht, den Effekt, den das DIS-Fusionsprotein hervorruft, durch Antikörper gegen die $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - und $\beta 4$ -Untereinheit von Integrinen nachzuahmen. Hierzu wurden entweder dem Kulturmedium Antikörper (jeweils in einer Verdünnung von 1:300) zugesetzt, oder die Antikörper wurden über Nacht (1:300) zusammen mit Laminin auf der Oberfläche der Kulturschalen gebunden. Anschließend wurden die DRG-Explantate für 24 Stunden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen inkubiert. Der schon beschriebene Effekt des DIS-Fusionsproteins auf das Verhältnis von Schwannzellfeld und Neuritenfeld (ca. 88%) liegt, wie schon zuvor in Abbildung 36, weit über dem Wert der Kontrollen mit nur Laminin (LAM) und dem GST-Protein (ca. 50%). Diese Inhibition des Neuritenwachstums ist nicht durch Zugabe der Antikörper gegen die $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Untereinheit nachzuahmen (ebenfalls ca. 50%). Erst durch den Antikörper gegen die $\beta 3$ -Untereinheit kann ein leichter Anstieg des Verhältnisses (ca. 71%) erzielt

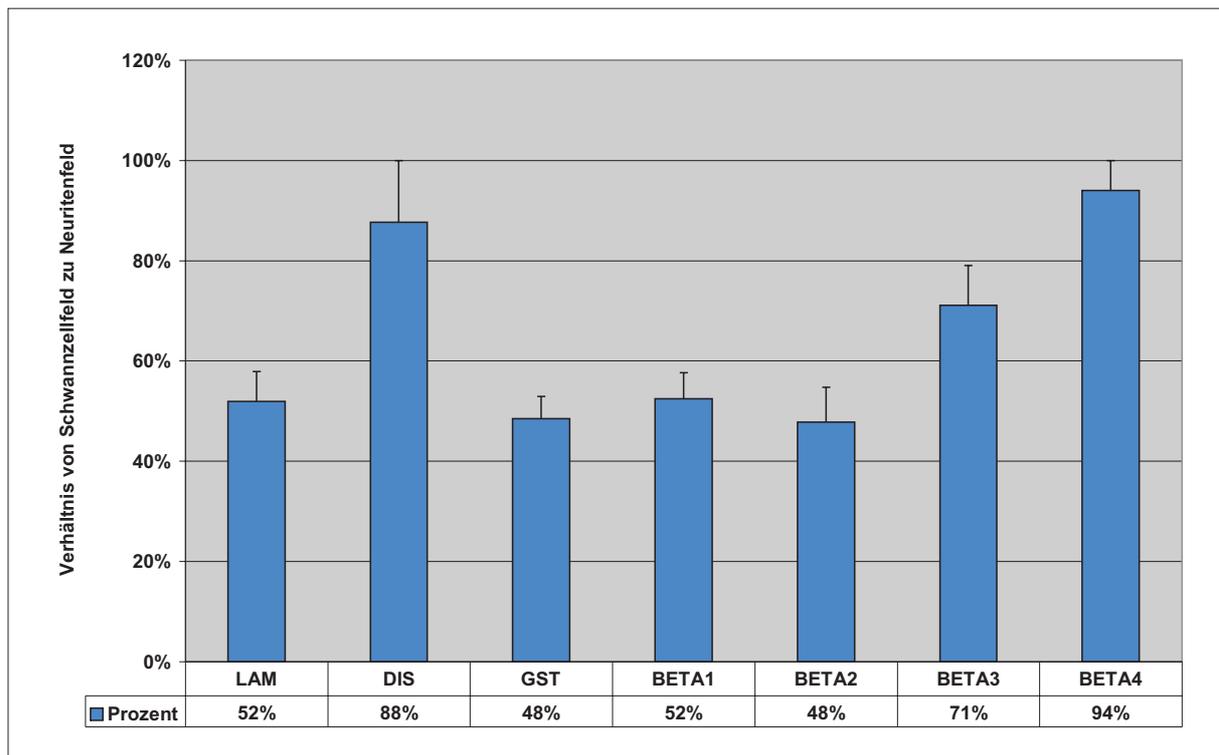


Abbildung 36: **Einfluss von Antiseren gegen β -Untereinheiten von Integrinen auf das Wachstum von DRG-Explantaten.** Antikörper gegen β -Untereinheiten von Integrinen wurden entweder 1:300 verdünnt und über Nacht zusammen mit $4\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin auf der LabTek-Oberfläche gebunden, oder 1:300 verdünnt dem Medium auf nur Laminin beschichteten LabTek-Kammern zugegeben. Nach 24 Stunden wurde wie in Abbildung 26 das Schwannzellfeld und das Neuritenfeld bestimmt und durcheinander dividiert.

werden und damit verbunden eine leichte Hemmung des Neuriten-Wachstums. Eine wirklich starke Hemmung des Neuriten-Wachstums ist mit dem Antikörper gegen die $\beta 4$ -Untereinheit zu erzielen, er liegt bei ca. 94%.

3.5 Einfluss unterschiedlicher Fusionsproteinbeschichtungen auf das Neuritenwachstum dissoziierter DRG-Kulturen

Um die Auswirkungen der Disintegrin-Domäne (DIS) auf das Wachstumsverhalten von Zellen genauer charakterisieren zu können, wurden aus den DRG-Explantaten eine dissoziierte Zellkultur angelegt. Hierfür wurden etwa 150 dorsale Spinalganglien aus 15-17 Tage alten Embryonen präpariert und durch eine Inkubation mit Trypsin/EDTA und Triturieren durch unterschiedlich stark verengte Pasteurpipetten eine Zellsuspension hergestellt. Die so erhaltene Zellsuspension beinhaltet immer noch Schwannzellen und Neurone, jedoch nicht mehr als Gewebeverband, sondern als einzelne Zellen. Diese dissoziierte Zellsuspen-

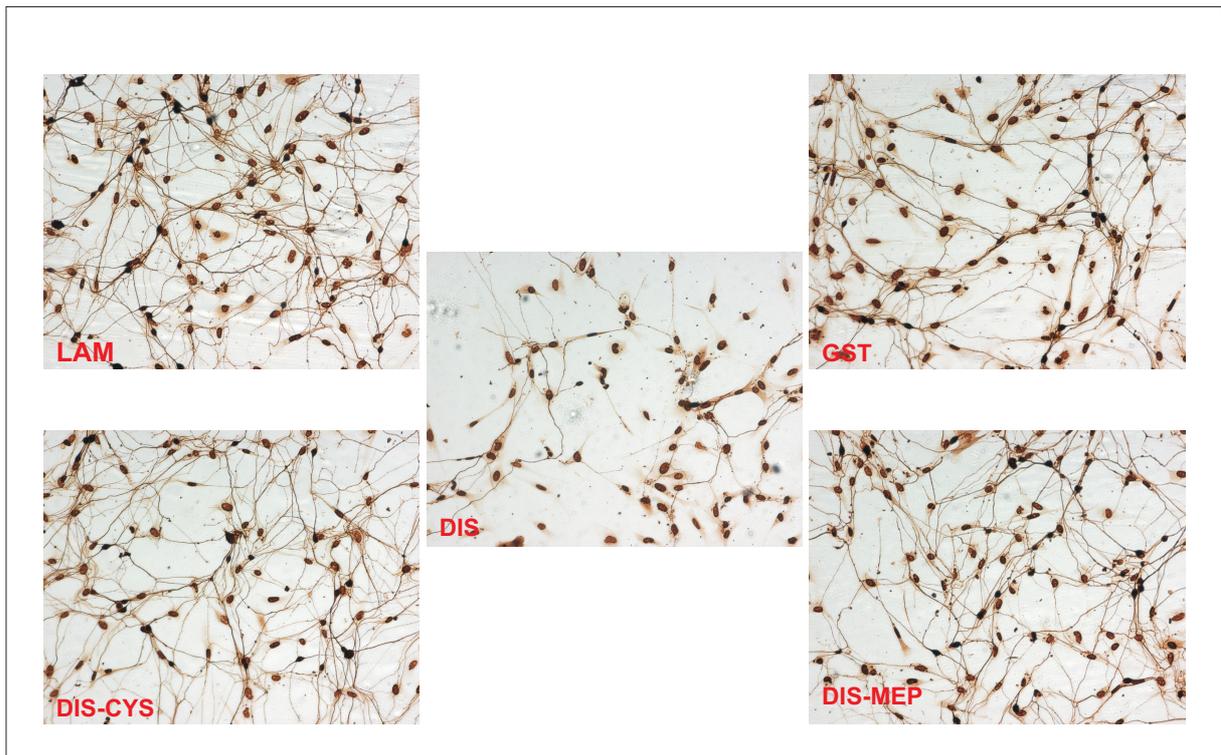


Abbildung 37: **Dissoziierte DRG-Kulturen auf verschiedenen beschichteten Oberflächen.** Die DRG wurden dissoziiert und 24 Stunde auf $4\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin kombiniert mit verschiedenen Fusionsproteinen aus GST und ADAM15-Domänen ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem PAN-axonalen Marker (1:2.000) durch eine DAB-Methode zur besseren Visualisierung gefärbt.

sion wurden in einer Dichte von etwa 100.000 Zellen pro Quadratzentimeter auf die mit Laminin und den entsprechenden Fusionsproteinen vorbereiteten Glasplättchen gegeben. Gefärbt wurden die Zellen 24 Stunden später mit einem Antikörper gegen den panaxonalen Marker (anti-PAN, Sternberger Monoclonals). Dieser färbt jedoch nicht nur die neuronalen Ausläufer an, sondern auch die Kerne von Schwannzellen werden unspezifisch mit angefärbt.

Der zuvor bei den DRG-Explantaten beobachtete, negative Effekt des DIS-Fusionsproteins auf das Neuritenwachstum ist auch in der dissoziierten Kultur rein optisch zu erkennen (Abbildung 37). Die mit einem Antikörper gegen den panaxonalen Marker gefärbten Zellen zeigen deutlich weniger Ausläufer als auf GST, DIS-MEP, DIS-CYS oder Laminin. Zusätzlich wurden zur Auswertung verschiedene repräsentative Bereiche der jeweiligen Zellkulturen fotografisch dokumentiert und die Gesamtzellzahl der Gesichtsfelder bestimmt (Abbildung 38). Da auch hier das GST-Protein als Kontrolle diente, wurde die Zellzahl auf

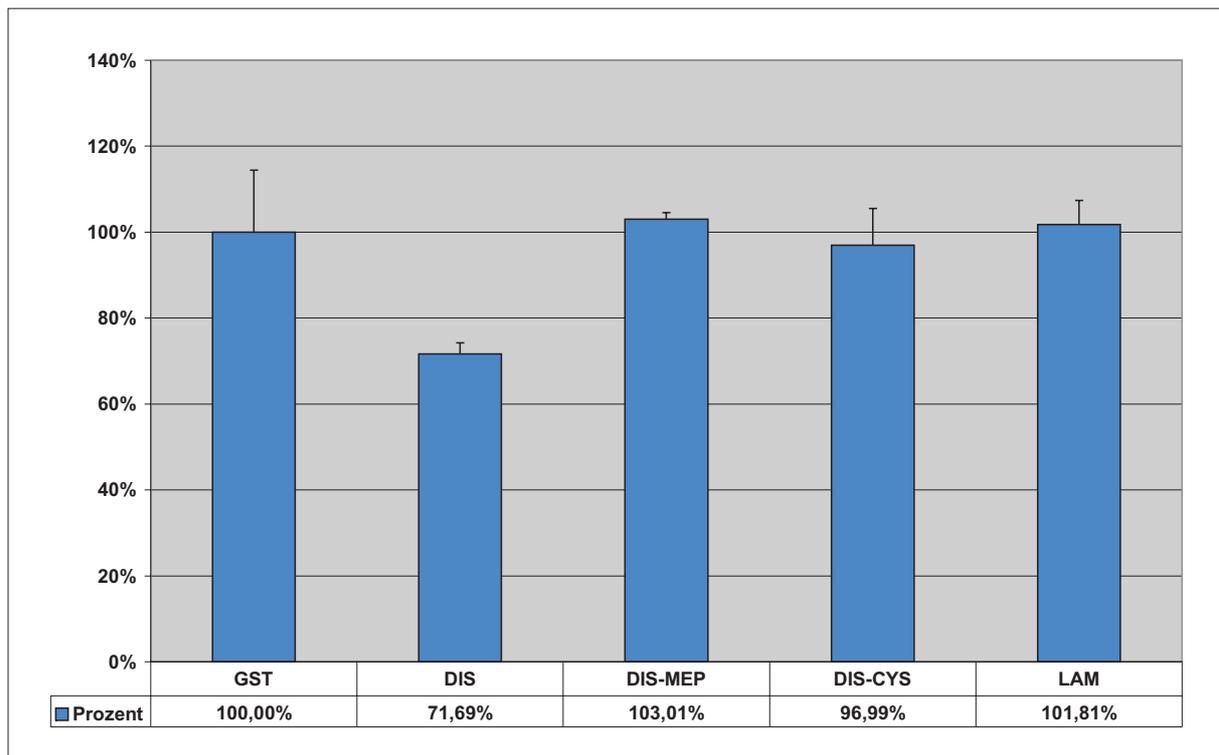


Abbildung 38: **Veränderte Zellzahl der dissoziierten DRG-Kulturen auf verschiedenen beschichteten Oberflächen.** Die in Abbildung 37 gefärbten Zellen wurden in mehreren Gesichtsfeldern ausgezählt und im Mittel in Bezug auf die Kontrolle von Laminin und GST berechnet. Dies betrifft alle enthaltenen Zellen, nicht nur Neurone.

100% gesetzt und die ermittelte Zellzahl auf den anderen GST-ADAM15-Fusionsproteinen relativ zur Zellzahl auf GST-beschichteten Glasplättchen berechnet. Bezüglich der Zellzahl sind kaum Unterschiede in den Kulturen auf GST, DIS-MEP, DIS-CYS und Laminin zu erkennen. Einen signifikanten Unterschied gibt es nur auf DIS. Somit ist der optische Eindruck in Abbildung 37 nicht nur auf die geringe Dichte der neuronalen Ausläufer beschränkt, sondern auch auf die Adhäsion der dissoziierten DRG-Zellkultur auf DIS. Um diesen Effekt auf die Zelladhäsion mit einer anderen neuronalen Zellpopulation näher zu charakterisieren, wurden dissoziierte Cortexneurone ebenfalls auf die verschiedenen GST-ADAM15-Fusionsproteine für 24 Stunden ausgesät. Den Effekt der verminderten neuronalen Ausläufer auf dem Fusionsprotein DIS (Abbildung 37) ist mit dissoziierten Cortexneuronen (Abbildung 39) nicht wiederholbar. Hier verhalten sich die Neurone, obwohl sie langsamer als embryonale DRG-Neurone zu wachsen scheinen, auf allen Untergründen gleich. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in Zellzahl und Neuritenwachstum auf den verschiedenen Beschichtungen nach 24 Stunden.

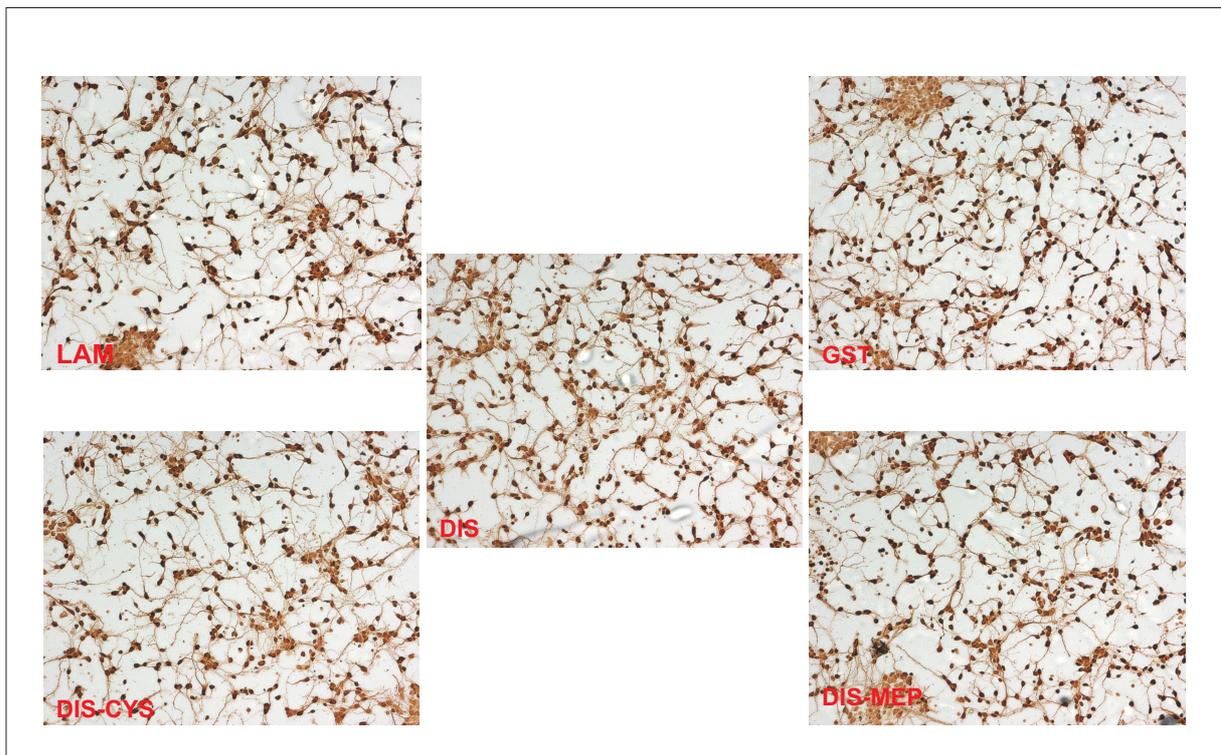


Abbildung 39: **Dissoziierte Cortexneuronenkulturen auf verschieden beschichteten Oberflächen.** Die dissoziierten Cortexneurone wurden in gleicher Anzahl für 24 Stunden auf $4\mu\text{g/ml}$ Laminin kombiniert mit Fusionsproteinen aus GST und verschiedenen ADAM15-Domänen ($20\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem PAN-axonalem Marker (1:2.000) durch eine DAB-Methode zur besseren Visualisierung gefärbt.

3.6 Adhäsion von ADAM15- bzw. Connexin32-überexprimierenden Schwanzzellen auf verschiedenen Proteinen der Extrazellulär-Matrix

Um zu bestätigen, dass die Disintegrin-Domäne keinen inhibitorischen Effekt auf die Schwanzzellen hat, wurden ADAM15- und Connexin32-überexprimierende Schwanzzellen durch virale Infektion hergestellt und auf verschiedenen Extrazellulärmatrixproteinen kultiviert. Neben Laminin kamen noch Fibronectin und Vitronectin zum Einsatz. Um die Zelldichte zu bestimmen, kam ein sogenannter MTS-Test zur Anwendung. Hierbei wird indirekt die Zelladhäsion gemessen, denn die adhärenzten Zellen setzen durch mitochondriale Dehydrogenasen ein Farbreagenz (MTS) in ein unlösliches Formazansalz um, welches bei 490 nm gemessen werden kann. Da die Zellzahl durch Auszählen beider Zellkulturen in einer Zählkammer nicht ausreichend genau ist, wurde die Adhäsion an PDL als Normalisierungsgrundlage mit durchgeführt. Die Adhäsion der zwei rekombinanten Zellsuspensionen an die PDL-beschichtete Oberfläche des Zellkulturgefäßes sollte annähernd gleich sein.

3.6.1 Adhäsion von HeLa-Zellen in verschiedenen Zelldichten auf Mikrotiterplatten

Zum Beweis der Linearität des benutzen MTS-Tests, in Bezug auf die zu bestimmende Zellzahl und zur Bestimmung der optimalen Zelldichte, wurden verschiedene Verdünnungen einer Zellsuspension angelegt und auf eine unbeschichtete Kunststoff-Mikrotiterplatte gegeben. Nach zwei Stunden Adhäsion bei 37°C wurde jedes Well einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 μ l einer Mischung aus Kulturmedium und MTS-Reagenz befüllt. Nach drei Stunden Farbreaktion bei 37°C wurde die optische Dichte (OD) bei 490 nm gemessen. Die gemessene OD ist in Abbildung 40 proportional zur Zellzahl aufgetragen. Der MTS-Test ist, so angewendet, über einen weiten Bereich linear. Von 2.000 bis 20.000 Zellen verhält sich die Farbreaktion absolut linear. Die ermittelte Regressionsgerade hat eine Genauigkeit von 99,63%, was für nur sehr geringe Schwankungen im Experiment spricht. Somit kann der MTS-Test nicht nur als Proliferations- oder Vitalitätstest, sondern auch als Adhäsionstest benutzt werden. Durch den MTS-Test ist es möglich, einen Unterschied von 500-1.000 Zellen klar festzustellen, was bei einer routinemäßig eingesetzten

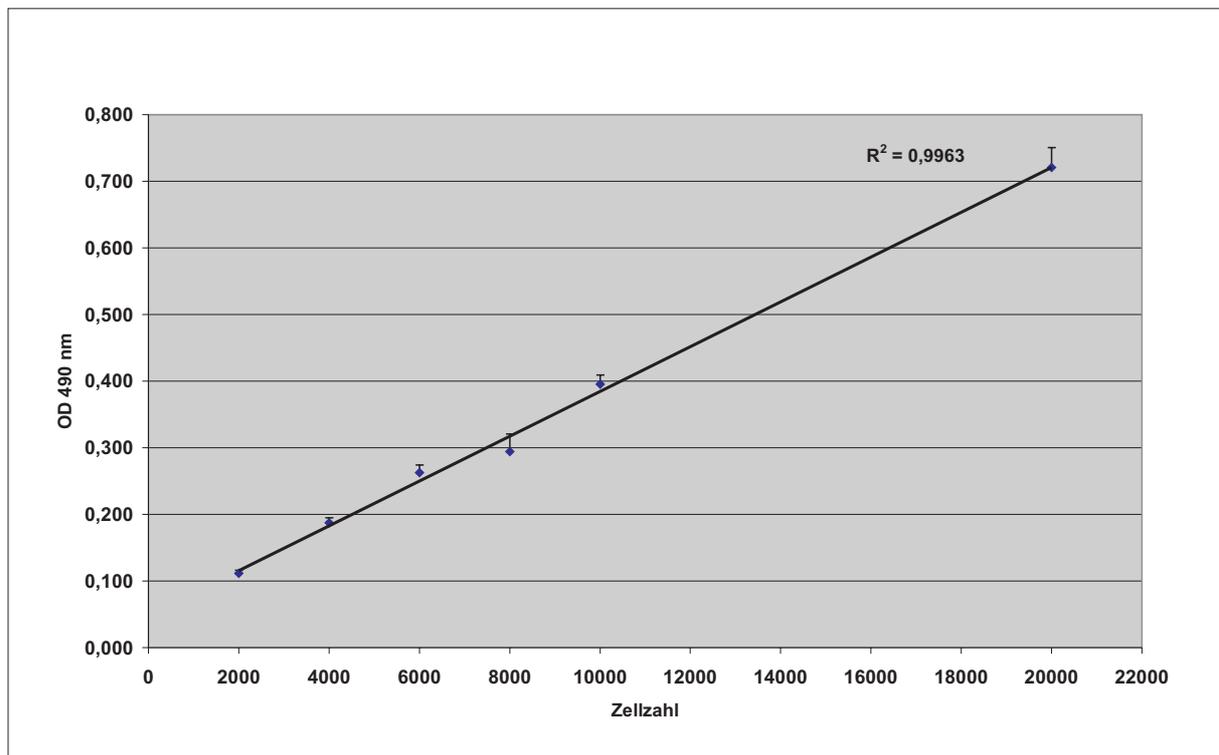


Abbildung 40: **Bestimmung der Linearität des verwendeten MTS-Test zur Adhäsionsbestimmung von HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden auf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte in verschiedenen Zelldichten für zwei Stunden kultiviert. Nach dem Waschen und der Zugabe von MTS-versetztem Medium wurde nach drei Stunden die OD bei 490 nm gemessen. Die gemessene OD wurde proportional zur Zelldichte aufgetragen.

Gesamtzellzahl von 10.000 einer Differenz von 5-10% entspricht.

3.6.2 Adhäsion von infizierten Schwanzzellen auf verschiedenen Extrazellulärmatrixproteinen.

Nachdem die Linearität des MTS-Tests im Bereich von 2.000-20.000 Zellen nachgewiesen werden konnte, war es möglich, die Normierung der unterschiedlich infizierten Zellen über das Wachstum auf PDL durchzuführen. Daher wurden pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte jeweils 10.000 der ADAM15- und Connexin32-überexprimierenden Schwanzzellen kultiviert. Die Kulturgefäße waren wahlweise mit 100 μ l Laminin (10 μ g/ml), Fibronectin (10 μ g/ml) oder Vitronectin (10 μ g/ml) beschichtet, um eine mögliche Wirkung von ADAM15 oder Connexin32 auf die Adhäsion an diese Extrazellulärmatrixproteine zu untersuchen. Wie durch die Experimente mit dorsalen Spinalganglien bereits vermutet, hat ADAM15 keinen Einfluss auf die Adhäsion von Schwanzzellen an die untersuchten Extrazellulärmatrixproteine (Abbildung 41). Es ist weder eine Veränderung der Adhäsion auf

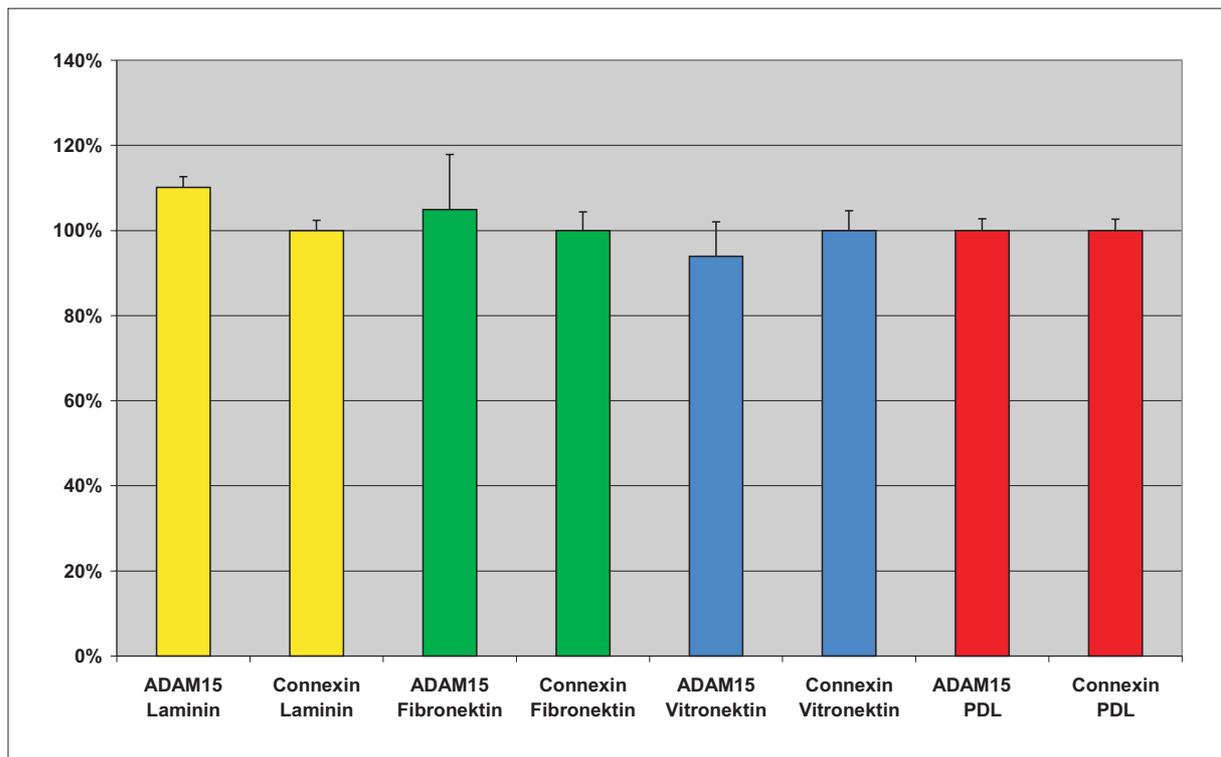


Abbildung 41: **Adhäsionsassay mit infizierten Schwannzellen, einmal infiziert mit ADAM15 und einmal infiziert mit Connexin32 als Kontrolle.** Zur exakten Normierung der Zellzahlen wurden das Adhäsionsverhalten auf PDL als Normierung benutzt. Beide Zelltypen wurden in einer annähernd gleichen Zelldichte von 10.000 Zellen pro 100 μ l in ein Well gegeben und für zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Die Zelldichte wurde nach dem einmaligem Waschen mit PBS auf den verschiedenen Extrazellulärmatrixproteinen durch ein MTS-Farbreagenz bestimmt, wobei nur die lebenden Zellen eine Farbreaktion hervorrufen.

Laminin, noch auf Fibronectin oder Vitronectin zu erkennen. Die kleinen Schwankungen zwischen den unterschiedlich infizierten Schwannzellen liegt im Rahmen der Standardabweichung.

3.7 Expressionsveränderung von ADAM15 und ADAM8 nach einer Ischiasnerv-Quetschläsion

Da ADAM15 und ADAM8 ein sehr ähnliches Expressionsprofil bei der Stimulation mit Entzündungsmediatoren zeigen, sollte der Expressionsverlauf von ADAM15 und ADAM8 nach einer sogenannten Ischiasnerv-Quetschläsion ermittelt werden. Als Kontrolle wurde auch die Expression des Peripheren-Myelin-Proteins (PMP22) mit Hilfe einer quantitativen PCR (Q-PCR) bestimmt. Hierzu wurden die Zeitpunkte 1, 2, 4, 7, 14 und 28 Tage nach der Läsion ausgewählt. Für jeden dieser Zeitpunkte wurden drei adulte Ratten von

etwa 180g Gewicht operiert und auf beiden Seiten wurde der Ischiasnerv mit einer Pinzette für ca. drei Sekunden gequetscht. Zu den oben genannten Zeitpunkten nach dem operativen Eingriff wurden die Ischiasnerven entnommen und die Gesamt-RNA extrahiert. Die Kontroll-RNA stammte von sham-operierten Tieren. Die mRNA wurde in cDNA mittels einer Reversen-Transkription umgeschrieben und mit jeweils einem Primerpaar pro Gen vermessen.

3.7.1 Zeitliches Expressionsprofil von ADAM15 und PMP22 nach einer Ischiasnerv-Quetschläsion

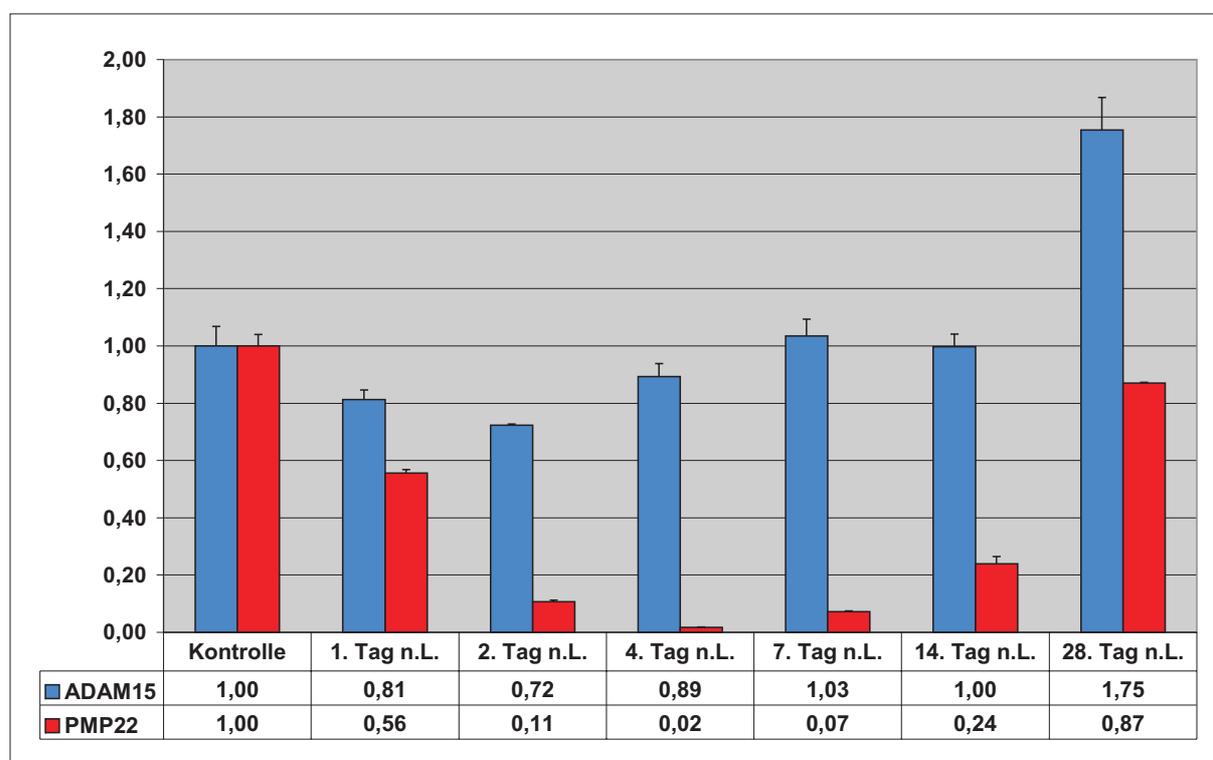


Abbildung 42: **Expressionsveränderung von ADAM15 und PMP22 nach einer Ischiasnerv-Quetschläsion.** Relativer Vergleich der Expressionsstärken des Peripheren-Myelin-Protein 22 (PMP22) und ADAM15 durch eine quantitative PCR (Q-PCR) auf mRNA-Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Quetsch-Läsion (n.L.) des Ischiasnervs. Normiert wurden die Expressionssignale der einzelnen Zeitpunkte durch die Expressionsstärke der „house-keeping-genes“ GAPDH und ODC.

Die auf einen unlädierten Nerv bezogene zeitliche Expressionsveränderung von PMP22 (Abbildung 42) zeigt kurz nach der Quetschung des Ischiasnervs eine starke und schnelle Abnahme der mRNA-Expression bis zum fast vollständigem Expressionsstop am vierten Tag. Nach dem vierten Tag steigt die mRNA-Menge dann langsam aber stetig an und

erreicht am 28. Tag nach der Läsion fast das unlädierte Kontrollniveau (87%). ADAM15 verhält sich anders, es zeigt zwar auch zu Beginn einen leichten Abfall der Expression am ersten und zweiten Tag (ca. 70% der Kontrollexpression), steigt dann am vierten Tag wieder an (ca. 90%), um an den Tagen 7 und 14 nach der Läsion im Vergleich zur Kontrolle fast unverändert exprimiert zu werden (103% bzw 100%). Eine Induktion der Expression erfährt ADAM15 dann erst zum Ende der untersuchten Regenerationsperiode (28. Tag: 175%). ADAM15 zeigt in der vorliegenden Q-PCR überraschenderweise nicht den in einer früheren Veröffentlichung (Bosse *et al.*, 2000) beschriebenen Expressionsverlauf mit einer Induktion nach ein bis zwei Tagen.

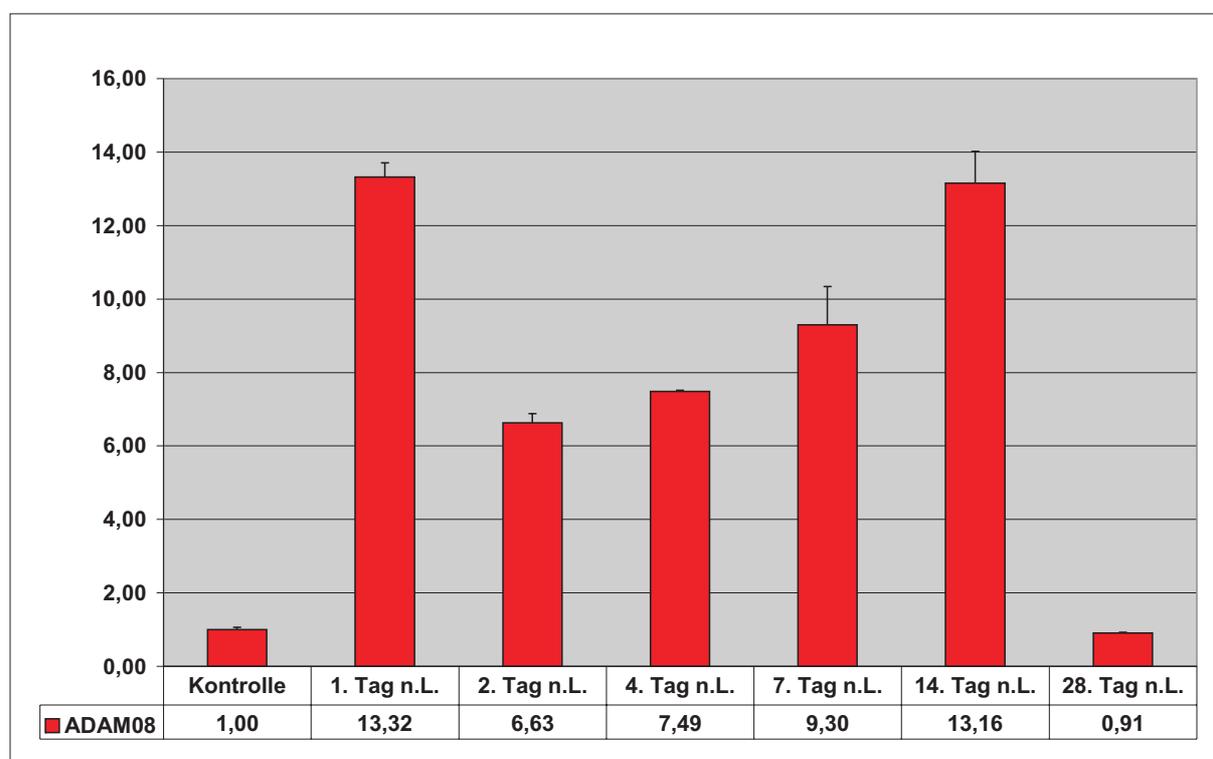


Abbildung 43: **Expressionsveränderung von ADAM8 nach einer Ischiasnerv-Quetschläsion.** Relativer Vergleich der Expressionsstärken von ADAM8 durch eine quantitative PCR (Q-PCR) auf mRNA-Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Quetsch-Läsion (n.L.) des Ischiasnervs. Normiert wurden die Expressionssignale der einzelnen Zeitpunkte durch die Expressionsstärke der „house-keeping-genes“ GAPDH und ODC.

Einen völlig anderen Verlauf der mRNA-Expression zeigt ADAM8 nach einer Läsion des Ischiasnervs (Abbildung 43). Hier steigt die Expression am ersten Tag nach der Läsion dramatisch auf über das Dreizehnfache an, um dann am zweiten Tag wieder um die Hälfte zu fallen. Von dort steigt die Expression von ADAM8 in den nächsten 14 Tagen

kontinuierlich an (14. Tag: dreizehnfach). Bis zum 28. Tag geht die Expression dann fast wieder auf das Niveau des unlädierten Kontroll-Nerves zurück. ADAM8 zeigt somit einen sehr kurzen und starken Anstieg zu Beginn der Läsion am ersten Tag, wird dann zwar etwas niedriger, aber weiterhin auf deutlich erhöhtem Niveau exprimiert, um dann zum Ende der Regenerationsphase auf das Kontrollniveau zurück zu sinken.

4 Diskussion

4.1 Die Proteine der ADAM-Familie und ihre zelluläre Funktion

Bei der Sichtung der Literatur zur Bedeutung der Disintegrine wurde schon nach kurzer Zeit klar, dass Disintegrine in sehr vielen Bereichen der zellulären Signalvermittlung eine wichtige Rolle spielen. Ursprünglich entdeckt als lösliche Proteine in Schlangengiften (Huang *et al.*, 1987; Gould *et al.*, 1990; Dennis *et al.*, 1990) konnten kurz darauf auch membranständige Disintegrine nachgewiesen werden, die z.B. bei der Fusion von Spermium und Ei einen entscheidenden Einfluss für die Entwicklung der Zygote besitzen (Blobel *et al.*, 1992; Wolfsberg *et al.*, 1993; Wolfsberg und White, 1996). Das Interessante an den Disintegrinproteinen der ADAM-Familie ist die hohe Anzahl an funktionell unterschiedlichen Domänen. Neben der im Rahmen dieser Arbeit überwiegend untersuchten Disintegrin-Domäne verfügen viele ADAM-Proteine über aktive Metalloprotease-Domänen, sowie über Cysteinreiche-Domänen mit putativen Bindungsstellen für Liganden und/oder Modulatoren (Übersicht: White, 2003). Des Weiteren wird auch eine Signaltransduktionsfunktion der intrazellulären Domäne diskutiert (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2003). Eine aktive Metalloprotease wurde zum Beispiel bei einem als TACE bezeichneten ADAM-Protein gefunden (TNF-Alpha-Converting-Enzyme; Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Das TACE Protein (ADAM17) spaltet das proinflammatorisch, membranständige Cytokin Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), welches nach der Spaltung aktiviert und freigesetzt wird. Zu der ständig steigenden Anzahl bekannter ADAM-Proteine gehört darüber hinaus auch das ADAM10 (Kuzbanian in Drosophila), das bei der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt (Rooke *et al.*, 1996; Fambrough *et al.*, 1996). Kuzbanian greift durch die Metalloprotease in den Notch-Signalweg ein und entscheidet somit über das Schicksal von neuronalen Zellen (Pan und Rubin, 1997; Fambrough *et al.*, 1996).

In einer differentiellen Expressionsanalyse nach einer Quetsch- sowie einer Transsektions-Läsion des Ischiasnervs der Ratte wurde das ADAM15-Gen als reguliert exprimiert nachgewiesen (Bosse *et al.*, 2000). Hierbei wurde die ADAM15-Expression mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen am ersten und zweiten Tag nach der Läsion als deutlich induziert gefunden. Aufgrund dieser Northern-Blot-Analysen, bei der der mRNA-steady-state-level

innerhalb des ersten Tages auf mehr als das Zweifache erhöht war, wurde zu Beginn dieser Arbeit folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

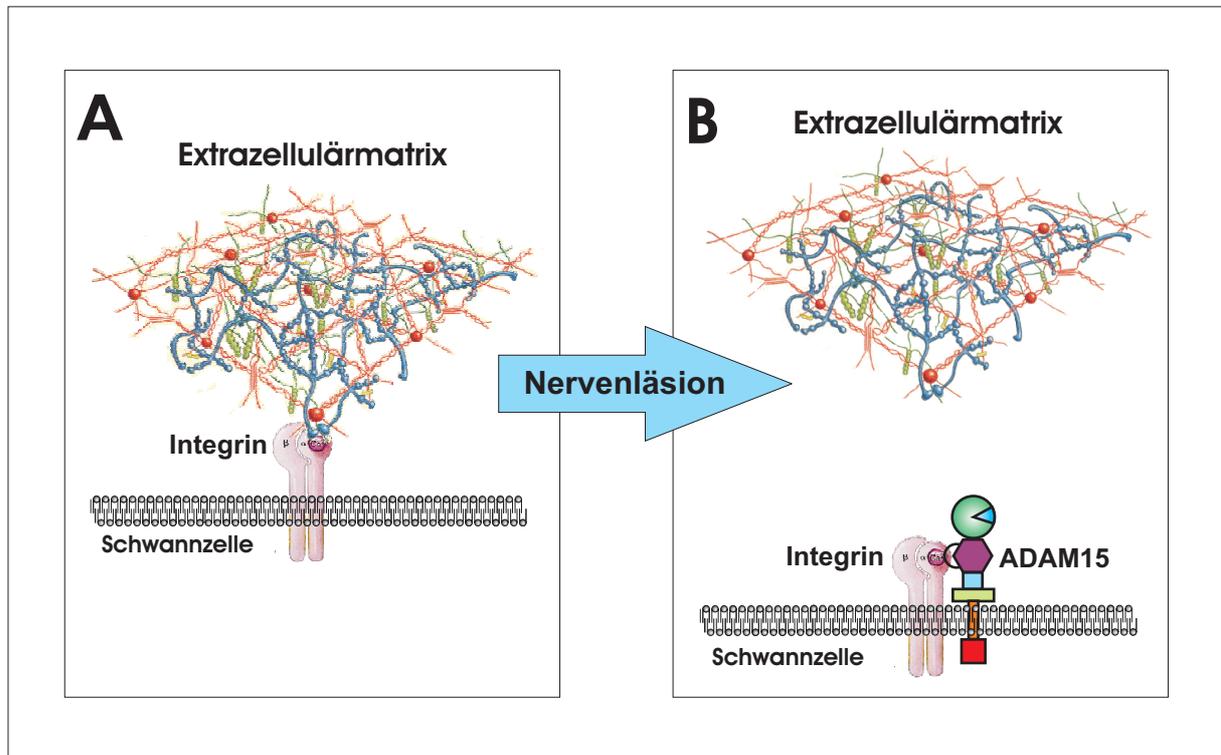


Abbildung 44: **Arbeitshypothese zur erhöhten Expression von ADAM15 bei Ischiasnerv-Läsion der Ratte.** A: Zustand des nicht lädierten Nerven. Integrine der Schwanzzelle stehen in Verbindung mit Proteinen der Extrazellulärmatrix. B: Nach einer Nervenläsion findet man eine erhöhte Menge an ADAM15 auf der Oberfläche, was die Verbindung zur Extrazellulärmatrix moduliert und somit der Schwanzzelle ermöglicht, sich aus dem Zellverband zu lösen, um anschließend zu dedifferenzieren, migrieren und proliferieren.

Die erhöhte ADAM15-Expression in den Schwanzzellen des verletzten Nervenstumpfes kann als modulatorische Komponente verstanden werden, die zur Dedifferenzierung, Proliferation und Migration der myelinisierenden Schwanzzelle beiträgt (Abbildung 44). Unter dieser Annahme wäre ADAM15 als Modulator von Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Verbindungen zu verstehen, der z.B. über eine Cis-Interaktion mit Integrienen interagieren und so eine für die Dedifferenzierung, Proliferation oder Migration notwendige Loslösung von der Extrazellulärmatrix (Fawcett und Keynes, 1990) bewirken könnte. Um diese Arbeitshypothese zu bestätigen, sollten funktionelle Untersuchungen des ADAM15-Proteins der Ratte durchgeführt werden. Da zu Beginn dieser Arbeit spezifische Antikörper ge-

gen ADAM15 der Ratte fehlten, bestand der erste Schritt in der Generierung geeigneter polyklonaler Antikörper.

4.2 Generierung polyklonaler ADAM15 Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, durch mehrfache Immunisierung verschiedener Kaninchen, spezifische polyklonale Antikörper gegen fast alle funktionelle Domänen des ADAM15-Proteins zu generieren. Bei der Charakterisierung der generierten Antikörper zeigte sich, dass für Western-Blot-Analysen besonders die Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-1 bis 7-9-3) geeignet sind, wobei der 7-9-1-Antikörper jedoch schwächer reagiert als die anderen beiden (7-9-2 und 7-9-3). Auch die Antikörper gegen die Cytoplasmatische-Domäne von ADAM15 sind geeignet, um sie in Western-Blot-Analysen zu benutzen (7-15-1 bis 7-15-3). Schwächer, jedoch auch verwendbar, sind zwei der drei Antikörper gegen die Pro-Domäne (7-1-2 und 7-1-3). Der Antikörper 7-1-1 gegen die Pro-Domäne, sowie alle polyklonalen Antiseren, die nach der Immunisierung mit einem Peptid der Metalloprotease-Domäne gewonnen wurden, reagieren leider nicht (Abbildung 5). Dies kann neben systemischen Fehlern bei der Generierung dieser Antikörper auch an einer veränderten Sekundärstruktur des reifen Proteins im natürlichen System liegen. Den Einfluss der Sekundärstruktur auf die Reaktivität dieser Antikörper belegt die zwar schwache, aber dennoch spezifische, immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten. Hier wird die erhaltene native Sekundärstruktur der Proteindomäne vom Antikörper erkannt, während im Gegensatz dazu der Antikörper bei der Erkennung des völlig denaturierten Proteins im SDS-PAGE versagt. Die Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne zeigten im Gegensatz dazu bei der immunhistochemischen Verwendung auf Gewebeschnitten keine spezifischen Signale, obwohl sie im SDS-PAGE die reaktivsten Antikörper waren. Ideal waren für die Verwendung zur immunhistochemischen Charakterisierung von Gewebe die Antikörper gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-1 und 7-15-2), sie wiesen spezifisch Signale im Vergleich zu den ebenfalls getesteten Präimmunsereen auf.

Somit stehen durch die generierten Antikörper hilfreiche Werkzeuge zur Charakterisierung des ADAM15 Proteins zur Verfügung. Acht der zwölf generierten Antikörper lassen sich für den Nachweis von ADAM15 verwenden. Diese acht Antikörper zeigten spezifische Signale gegenüber den Präimmunsereen der entsprechenden Kaninchen.

4.3 Detektion des ADAM15-Proteins

4.3.1 Western-Blot-Analysen

Mit den generierten polyklonalen Kaninchen-Seren lassen sich sowohl im heterologen System (Überexpression in HeLa-Zellen, Abbildung 6), als auch im homologen System (Rattengehirn, Abbildung 5) drei verschiedene Protein-Formen von ADAM15 nachweisen. Diese Formen sind vermutlich keine Degradationsprodukte, die bei der Präparation der Proteinlysate entstanden, da die Bearbeitung der Lysate immer unter Verwendung von geeigneten Proteaseinhibitoren und EDTA bei 4°C durchgeführt wurde.

Die größte Isoform stellt das unprozessierte ADAM15 dar (größer als 98kDa), welches mit allen drei getesteten Antikörpern, also auch gegen die Pro-Domäne, nachgewiesen werden kann. Das molekulare Gewicht des Proteins ist größer als es rein rechnerisch aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden kann (85kDa). Eine Erklärung könnten posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung des Proteins sein. Insgesamt handelt es sich bei dieser Isoform vermutlich um ein Protein, das alle aus der cDNA abgeleiteten Proteindomänen besitzt und aufgrund der vorhandenen Pro-Domäne noch inaktiv ist (Lum *et al.*, 1998). Da die zugehörige Bande oberhalb der 98kDa Markerbande in den Western-Blot-Analysen relativ schwach erscheint, ist diese komplette ADAM15-Proteinisoform (inklusive der Pro-Domäne) nicht die dominierende Proteinisoform in den untersuchten Zellen. Diese stellt das prozessierte Protein ohne Pro-Domäne dar (ca. 98kDa), welches daher mit dem Antikörper gegen die Pro-Domäne nicht nachgewiesen werden kann, wohl aber mit den Antikörpern gegen die Cytoplasmatische-Domäne (7-15-1 bis 7-15-3) und gegen die Disintegrin-Domäne (7-9-1 bis 7-9-3). Bei dieser Proteinisoform handelt es sich demnach nicht um eine C-terminale Verkürzung, sondern um eine N-terminale des Proteins, also dort, wo sich die Pro-Domäne befindet.

Als eine dritte ADAM15-Proteinisoform kann ein circa 55kDa großes Protein nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine zusätzliche Abspaltung der Metalloprotease, da diese Isoform zwar nicht durch den Antikörper gegen die Pro-Domäne detektiert werden kann, jedoch weiterhin mit den Antikörpern gegen die Disintegrin- bzw. die Cytoplasmatische-Domäne. Leider konnte der Verlust der Metalloprotease-Domäne nicht

explizit durch einen Antikörper belegt werden, da keiner der generierten Antikörper (7-7-1 bis 7-7-3) gegen diese Domäne spezifische Banden zeigt (siehe Tabelle 5).

Die drei detektierten Proteinisoformen von ADAM15 decken sich in Vorkommen und Größe gut mit der Beobachtung von ebenfalls drei lokalisierten Formen von Maus-ADAM15 bzw. Maus-ADAM8 (Lum *et al.*, 1998; Schlomann *et al.*, 2002). Wie die Oberflächenbiotinylierung an ADAM15-überexprimierenden HeLa-Zellen zeigt (Abbildung 7), sind wohl nicht alle drei Formen auf der Oberfläche lokalisiert. Hierbei konnte nur die 98kDa-Isoform ohne Pro-Domäne nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen mit der insgesamt geringeren Proteinmenge zusammenhängen, die nach dem Aufreinigen der biotinylierten Proteine bleibt. Dadurch könnten die ohnehin schwächer exprimierten beiden anderen Proteinisoformen für eine Western-Blot-Detektion in zu geringer Menge vorhanden sein. Jedoch könnten diese Beobachtungen ebenso gut für eine andere Lokalisierung dieser beiden Formen in der Zelle sprechen. Es ist denkbar, dass die Prozessierung der kompletten Proteinisoform mit Pro-Domäne zur Form ohne Pro-Domäne auf dem Transport über den Golgi-Apparat nach der Translation und der Bewegung in Vesikeln zur Zelloberfläche an der vorhandenen Furinspaltstelle entfernt wird. Auch die Isoform ohne Pro- und Metalloprotease-Domäne scheint für einen Nachweis auf der Zelloberfläche zu gering konzentriert. Schlomann und Mitarbeiter (2002) vermuten, dass ADAM8 auf der Zelloberfläche erst dann mit Integrinen interagieren kann, wenn die Abspaltung der Metalloprotease-Domäne erfolgt ist. Da im Rahmen der biochemischen Charakterisierung des ADAM15-Proteins der Maus (Lum *et al.*, 1998) bereits gezeigt wurde, dass der weitaus größte Anteil an ADAM15 intrazellulär im „trans-Golgi-Netzwerk“ und im sekretorischen Signalweg lokalisiert ist, ist ein ähnlicher Prozess der Modulation der ADAM15-Integrin-Wechselwirkung über die Abspaltung der Metalloprotease denkbar. Das Abspalten der Metalloprotease innerhalb sekretorischer Vesikel und deren anschließende Freisetzung durch Exozytose könnte darüber hinaus zu einer Veränderung der Extrazellulärmatrix und/oder die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Extrazellulärmatrix herbeiführen. Dies würde die in dieser Arbeit gefundene eher intrazelluläre Lokalisation der Proteinisoform ohne Pro- und Metalloprotease-Domäne erklären. Beobachtungen von Fourie und Mitarbeitern (2003) an Insektenzellen, die ADAM15 überexprimieren, sowie Beobachtungen von Lum und Mitarbeitern (1998) deuten darauf hin, dass die Abspal-

tung der Pro-Domäne sowohl autokatalytisch, als auch durch Protein-Konvertasen, wie zum Beispiel Furin, erfolgen kann. Die Abspaltung der Pro-Domäne bewirkt in vielen Fällen eine Aktivierung der Metalloprotease-Domäne (ADAM9, Roghani *et al.*, 1999; ADAM10, Anders *et al.*, 2001; ADAM12, Loechel *et al.*, 1998; ADAM15, Lum *et al.*, 1998 und ADAM17, Clarke *et al.*, 1998). Diese Aktivierung könnte durch einen, der Abspaltung der Pro-Domäne-nachfolgenden, Cystein-Switch-Aktivierungsmechanismus (Van Wart und Brikedal-Hansen, 1990; Grams *et al.*, 1993; Springman *et al.*, 1990; Morgunova *et al.*, 1999) zurückzuführen sein. Die auf der Zelloberfläche ausschließlich detektierte 98kDa große Proteinisoform, ohne Pro-Domäne, steht im Gegensatz zu Beobachtungen von Schlomann und Mitarbeitern (2002) an Proteinisoformen von ADAM8. Er postuliert die ca. 55kDa große, ohne Pro- und Metalloprotease-Domäne vorkommende Form, als die auf der Oberfläche vorherrschende Form von ADAM8. Diese Beobachtung könnte unter anderem an der Verwendung eines nicht geeigneten Biotinylierungsreagenz liegen, das im Gegensatz zu dem von mir verwendeten Crosslinker membrangängig ist (siehe Produktbeschreibung der Firma Pierce). Lum und Mitarbeiter (1998) entdeckten ebenfalls bei Biotinylierungsexperimenten hauptsächlich das Maus-ADAM15-Protein ohne Pro-Domäne auf der Zelloberfläche, jedoch zusätzlich, wenn auch viel schwächer exprimiert, das Protein ohne Pro- und Metalloprotease. Die Funktion eines ADAM15-Proteins ohne Pro- und Metalloprotease-Domäne könnte einmal in einer verbesserten Adhäsionseigenschaft der Disintegrin-Domäne liegen, oder aber auch in der Freisetzung von löslichen Metalloproteasekomplexen.

4.3.2 Immunhistochemie an kryokonservierten Gewebeschnitten

Das ADAM15-Protein ist, so zeigen es die vorliegenden immunhistochemischen Färbungen, sowohl intrazellulär als auch in der Plasmamembran lokalisiert. Diese Verteilung konnte mit verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Domänen gezeigt werden. Diese Beobachtung wird besonders anschaulich am Beispiel der großen Motoneurone im Rückenmark, wo sich ADAM15-Protein verstärkt kernnah detektieren lässt (Abbildung 16), aber auch starke plasmamembranständige Färbungen zu sehen sind. Im ZNS kann man ADAM15 durch die beobachtete Kolokalisierung mit dem Antikörper gegen NeuN in Neuronen nachweisen (z.B. Abbildung 13). ADAM15 wird aber auch von glialen Astrozyten

exprimiert, was durch die Kolo­kalisierung von GFAP und ADAM15 belegt wird (Abbildung 17). Markante neuronale, aber auch astrozytäre Expression wurde im Cortex, im Hippocampus, dem Cerebellum sowie im Rückenmark gefunden. ADAM15-Protein ist weder im Myelin des ZNS noch des PNS lokalisiert, wie es aufgrund der in-situ-Hybridisierungen von Bosse und Mitarbeitern (2000) zu erwarten war. Im peripheren Nerv wird ADAM15 nicht im kompakten Myelin von Schwannzellen detektiert, sondern im verbliebenen cytoplasmatischen Bereich der Schwannzelle, was sich durch Kolo­kalisierungen mit dem Schwannzellmarkerprotein S100 nachweisen lässt. Dieser findet sich hauptsächlich im Cytoplasma sowie auf der äußeren Membran der myelinisierenden Schwannzelle. Zusätzlich findet man ADAM15-Reaktivität auch in der Mitte eines quer geschnittenen Schwannzell-Axon-Komplexes, was auf eine axonale Expression von ADAM15 in peripheren Nerven hindeutet (Abbildung 18). ADAM15 kommt somit sowohl in glialen als auch in neuronalen Zellen des ZNS und PNS vor.

Die Färbungen im Cortex sowie im Rückenmark zeigen im Allgemeinen immer eine Färbung der Dura, was auf eine Expression in meningealen Fibroblasten hinweist. Häufig ist diese Anfärbung jedoch eine artifizielle, unspezifische Anfärbung, die auch mit anderen für diesen Bereich unspezifischen Antikörpern beobachtet wird und auf degradierende Prozesse während der Gewebeaufarbeitung zurückzuführen ist, die am Rande des Gewebeschnittes passieren. Im Fall der NeuN- und ADAM15-Färbungen ist jedoch ein klarer Unterschied in dieser Region zu erkennen. Der dorsale Bereich der Dura ist im Cortex mit beiden Antikörpern gegen NeuN und ADAM15 gefärbt. Mit dem ADAM15-Antikörper ist jedoch noch eine zweite Schicht etwas unterhalb der weiter dorsal liegenden ersten Schicht ange­färbt, die nicht durch NeuN ange­färbt wird und somit spezifisch zu sein scheint (Abbildung 12). Dies würde die oben angesprochene Expression in meningealen Zellen belegen.

4.4 Funktionelle Charakterisierung von ADAM15

4.4.1 Adhäsionsversuche an Extrazellulärmatrix-Proteine

Wie schon weiter oben angedeutet, wurde zu Beginn dieser Arbeit aufgrund der Vorarbeiten am lädierten Ischiasnerv und der Lokalisation der mRNA von ADAM15 in Schwannzellen (Bosse *et al.*, 2000) angenommen, dass die vermutete Funktion von ADAM15 die

Modulation der Verbindung von Schwanzzelle zu Extrazellulärmatrix betrifft. In der daraus resultierenden Arbeitshypothese (Abbildung 44) wurde daher angenommen, dass ADAM15 die Wechselwirkung von Integrinen der Schwanzzelle mit Proteinen der Extrazellulärmatrix durch eine direkte Cis-Interaktion mit Integrinen moduliert. Dies könnte durch ein einfaches Verdrängen der bestehenden Verbindung zur Extrazellulärmatrix durch die ADAM15-Disintegrin-Domäne zustande kommen. Aber auch eine nach der Bindung der Disintegrin-Domäne folgende Prozessierung der Integrine durch die Metalloprotease ist vorstellbar. Untermuert wurde die Arbeitshypothese durch Interaktionsuntersuchungen des humanen ADAM15-Proteins und verschiedenen Integrinen (Blobel und White, 1992). Das humane ADAM15 (Metargidin) besitzt eine RGD-Sequenz in der putativen Bindestelle der Disintegrin-Domäne (Krätzschar *et al.*, 1996). Dies konnte zum Beispiel durch Experimente mit Fusionsproteinen und durch Expression von Integrinen auf CHO-Zellen gezeigt werden. Metargidin bindet spezifisch an die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ (Zhang *et al.*, 1998; Nath *et al.*, 1999). Um die Gültigkeit der aufgestellten Hypothese zu einer Cis-Interaktion von ADAM15 der Ratte und Integrinen zu untersuchen, wurden durch retroviralen Gentransfer Schwanzzellpopulationen hergestellt, die stabil ADAM15 oder Connexin32 (als Kontrolle) exprimieren. Connexin32 ist wie ADAM15 auch ein integrales Membranprotein, das sogenannte Gap-Junctions zum Zell-Zell-Kontakt ausbildet. Die durchgeführten Adhäsionsuntersuchungen, welche in Abbildung 41 gezeigt sind, fanden auf Laminin, Fibronectin und Vitronectin statt. Es zeigte sich jedoch, dass die Überexpression von ADAM15 nicht in einer verminderten Adhäsion zu einer der drei Extrazellulärmatrix-Proteinen resultiert. Obwohl die Expression von ADAM15 durch quantitative PCR auf das 600-700 fache der endogenen Konzentration bestimmt wurde, konnte die angenommene Cis-Interaktion mit den Integrinen auf der selben Zelloberfläche nicht nachgewiesen werden.

Dies kann mehrere Gründe haben:

Zuerst ist eine nicht funktionelle Prozessierung oder Faltung des Proteins denkbar, so dass die eigentlich nachzuweisende Cis-Interaktion zu entsprechenden Integrinen auf der Schwanzzellplasmamembran nicht zustande kommt. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, denn selbst die transiente Überexpression von ADAM15 der Ratte in humanen HeLa-Zellen führt zu den drei Proteinformen von ADAM15 (Abbildung 6) wie sie auch *in-vivo*

detektiert werden können (Abbildung 5 und folgende).

Es ist weiterhin denkbar, dass ADAM15 *in-vivo* ein Integrin moduliert, welches an der Bindungen *in-vitro* mit Laminin, Fibronektin oder Vitronektin nicht beteiligt ist. Wahrscheinlich wird die Interaktion der Schwannzellen mit Extrazellulärmatrix *in-vitro* über zahlreiche Wechselwirkungen realisiert, so dass die Modulation einer Interaktion durch ADAM15 in unserem Testsystem nicht detektiert werden kann. Ist dies der Fall, so sind möglicherweise weitere ADAM-Proteine oder andere Integrinmodulatoren involviert, so dass die alleinige Betrachtung von ADAM15 den Effekt in diesem *in-vitro*-System nicht nachstellen kann.

Zusätzlich könnten Schwannzellen dieses *in-vitro*-Systems endogen erhöhte ADAM15-Mengen besitzen, so dass eine weitere Überexpression von ADAM15 keinen zusätzlichen Effekt erzielt. Es ist letztendlich aber auch vorstellbar, dass ADAM15 in Schwannzellen nach einer Nervenläsion in erhöhtem Maße exprimiert wird, die Schwannzelle jedoch nicht selbst die Zielzelle der ADAM15-Funktion darstellt.

4.4.2 Wachstumsverhalten von dorsalen Spinalganglien

Die mögliche Auswirkung des in Schwannzellen exprimierten ADAM15-Proteins auf andere Zellen konnte durch die Untersuchungen an dorsalen Spinalganglien bestätigt werden. Vergleiche unterschiedlicher GST-ADAM15-Fusionsproteine auf das Wachstum von dorsalen Spinalganglien zeigten, dass ausschließlich die Disintegrin-Domäne (DIS) das Auswachsen von Neuriten über die Schwannzellen hinaus hemmen kann (Abbildung 26). Obwohl die durchschnittliche Größe des Feldes der Schwanzzellmigration von DRG auf einer Mischung aus Laminin und GST-ADAM15-Fusionsproteinen konstant bleibt (Abbildung 30), nimmt die durch Neuriten und Axone bewachsene Fläche ab (Abbildung 29). Die zeitliche Verlaufsstudie belegt klar, dass es sich normalerweise bei dem Auswandern der mitosegehemmten Schwannzellen aus dem DRG-Explantat und dem Auswachsen der Neuriten und Axone um zwei unabhängige Prozesse handelt (Abbildung 32). Zuerst wachsen auf purem Laminin oder einer Mischung aus Laminin und GST die Neuriten und Axone, bevor die migrierenden, mitosegehemmten Schwannzellen folgen. Wird die Kulturschale jedoch mit einer Mischung aus Laminin und dem DIS-Fusionsprotein (GST und Disintegrin-Domäne) beschichtet, so ist ein vorauseilendes Auswachsen der Neuriten und Axone vor

der Front der migrierenden Schwanzzellen nicht mehr zu beobachten (Abbildung 33). Neuritenwachstum ist nur noch dort zu beobachten, wo die Schwanzzellen schon migriert sind, also nicht mehr auf der beschichteten Oberfläche. Die Hemmung des Neuriten- und Axonwachstums wird nicht mit den anderen GST-ADAM15-Fusionsproteinen wie zum Beispiel DIS-MEP (Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne) oder DIS-CYS (Disintegrin- und Cysteinreiche-Domäne) erzielt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Fachliteratur, die eine Aktivierung bzw. die Interaktion der Disintegrin-Domäne erst dann beschreibt, wenn eine Abspaltung der Metalloprotease stattgefunden hat. Dies wurde z.B. bereits bei der initialen Entdeckung der Funktion von ADAM-Proteinen bei der Fusion von Spermium und Ei festgestellt (Blobel, 1997). Erweitert wurde dieses Modell dann durch Schlomann und Mitarbeiter (2002). Das ist vermutlich auch der Grund, warum das Fusionsprotein aus Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne (DIS-MEP) nicht die gleichen Funktionen ausübt wie die Disintegrin-Domäne (DIS) alleine. Bleibt zu diskutieren, warum das Fusionsprotein aus der Disintegrin-Domäne und Cysteinreicher-Domäne (DIS-CYS) nicht auch einen hemmenden Einfluss ausübt.

Dies könnte zwei Gründe haben.

Erstens könnte die Faltung bzw. die Ausbildung von Disulfidbrücken im cysteinreichen Teil des Fusionsproteins durch die rekombinante Expression in Prokaryonten fehlerhaft sein.

Zweitens wird die Anzahl und die Modulation von Cysteinresten in ADAM-Proteinen dafür verantwortlich gemacht, ob die Interaktionsfähigkeit der Disintegrin-Domäne (Van Wart und Brikedal-Hansen, 1990; Smith *et al.*, 2002) gegeben ist.

Genau dies könnte durch den fehlenden Modulationspartner im heterologen Bakteriensystem, ein Grund für die fehlende inhibitorische Wirkung des DIS-CYS-Proteins sein. Von untergeordneter Bedeutung ist die beobachtete, generelle Verminderung der DRG-Ausdehnungsgröße durch jegliche Fusionsproteine einschließlich der Kontrolle (GST) (Abbildung 29). Dieser Effekt entsteht ausschließlich durch die veränderte Stöchiometrie von Lamininmolekülen pro Quadratzentimeter. Denn dies wirkt sich nicht nur auf das axonale Wachstum aus, sondern auch auf die Ausdehnung der Schwanzzellen (Abbildung 30). Unverändert durch die Fusionsproteine bleibt die Ausdehnung/Migration der Schwanzzellen, sie liegt in etwa immer auf dem gleichen Niveau wie die GST-Kontrolle. Spezifisch und

signifikant ist aber die Verminderung des Neuritenwachstums durch DIS. Dies erkennt man nicht nur an der um etwa 25% verminderten Gesamtfläche der dorsalen Spinalganglien (Abbildung 29), sondern ebenso an dem veränderten Verhältnis von Neuriten- zu Schwanzzellausdehnung (Abbildung 31). Beträgt das normale Verhältnis ca. 45 bis 55%, so ist dieses Verhältnis durch die Wirkung der Disintegrin-Domäne auf das Neuritenwachstum auf einen Wert von über 80% verschoben. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des Wachstums auf GST und DIS (Abbildung 32, 33 und 34), so stellt man fest, dass das Neuritenfeld unter Kontrollbedingungen auf GST etwa 2,4 mal so schnell wächst wie das Schwanzzellfeld.

Interessanterweise lässt sich der inhibitorische Effekt der Disintegrin-Domäne durch synthetische Peptide, welche von der Putativen TDD-Bindedomäne (homolog zur humanen RGD-Bindedomäne) abgeleitet wurden, nicht nachstellen (Abbildung 35). Keines der getesteten Peptidderivate erzielte einen ähnlichen Effekt wie das Fusionsprotein DIS.

Das Verhältnis zwischen Neuriten- und Schwanzzellfeld liegt bei allen Peptiden, einschließlich der Kontrollen, im Bereich von ca. 50-65%, jedoch nicht, wie durch das DIS-Fusionsprotein, bei 80% und mehr. Das humane ADAM15 kann über eine RGD Sequenz an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden (Nath *et al.*, 1999; Krätzschar *et al.*, 1996). Eine Untersuchung von Eto und Mitarbeitern (2000) an ADAM15 der Maus, welches statt der RGD-Sequenz eine TDD-Sequenz besitzt, zeigt, dass das ADAM15-Protein der Maus nicht an das $\alpha_v\beta_3$ Integrin bindet, sondern das $\alpha_9\beta_1$ Integrin als Interaktionspartner hat. Für diese Wechselwirkung ist die Bindesequenz TDD nicht verantwortlich, sondern die ganze sich ausbildende Struktur der Disintegrin-Domäne. Auch das ADAM15-Protein der Ratte besitzt diese TDD-Sequenz anstelle der RGD-Sequenz.

Das unveränderte Wachstum auf den Peptiden lässt vermuten, dass diese TDD-Sequenz für die modulatorische Wechselwirkung nicht oder nicht allein von Belang ist. Es ist außerdem wahrscheinlicher, dass der beobachtete inhibitorische Effekt auf das Wachstum der Neuriten und Axone Integrin-vermittelt ist. Untersuchungen der DRG-Ausdehnung in Gegenwart von spezifischen Integrin-Antikörpern gegen die β -Untereinheiten, entweder im Kulturmedium, oder zusammen mit Laminin gebunden an die Oberfläche des Kultur-

gefäßes, erzielen ähnliche Effekte wie das DIS-Fusionsprotein (Abbildung 36). Ein polyklonales Serum gegen die Integrin- β_3 -Untereinheit hemmt das Wachstum der Neuriten und Axone, so dass das Verhältnis des Schwanzzellfeldes zum Neuritenfeld auf etwa 70% ansteigt. Noch stärker ist dieser Effekt durch ein polyklonales Serum gegen die Integrin- β_4 -Untereinheit, hier liegt das Verhältnis bei etwa 94%. Dieser Effekt ist sogar noch stärker als die Reduktion des Neuritenwachstums durch die Disintegrin-Domäne (88%). Besondere Betrachtung verdient die Beobachtung, dass es unerheblich ist, ob die Antikörper gegen die β_3 - und β_4 -Untereinheiten auf der beschichteten Oberfläche gebunden sind, oder ob sie dem Medium zugesetzt werden. Da selbst die Interaktion von den Neuritenausläufern mit der Oberfläche eine Reduktion des Neuritenwachstum hervorruft, handelt es sich weniger um ein passives Binden an die Integrin-Untereinheit, sondern eher um ein durch die Bindung hervorgerufenes spezifisches Signal, welches das weitere Auswachsen der Neurite dann verhindert. Integrine sind weniger als pure Bindungsmoleküle bekannt, sie stellen durch ihre inside-out-Modulation einen Bindungsrezeptor mit Signaleigenschaften dar (Arnaout *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 1996). Hierbei kann es einmal durch interne Signalwege zu einer Konformationsänderung des Integrins kommen, aber auch umgekehrt kann eine extrazelluläre Bindung an das Integrin eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen (Shimizu *et al.*, 2003). Ständen hier also ausschließlich adhäsive Aspekte im Vordergrund, dann müsste durch die Bindung zwischen Neuriten und Antikörpern auf der Oberfläche eine bessere Adhäsion und damit ein besseres Wachstum der Neuriten protokollierbar sein. Ein vermindertes Axon/Neuriten-Wachstum ist mit den verwendeten zwei polyklonalen Seren gegen die β_1 - und β_2 -Untereinheit von Integrinen nicht erzielbar, hier liegt das Verhältnis von Schwanzzellfeld und Neuritenfeld bei etwa 50% und ist vergleichbar mit Laminin oder GST.

Trotz des Ergebnisses, dass die Seren gegen die β_1 - und β_2 -Integrinuntereinheit keinen Effekt haben, ist eine Interaktion des ADAM15-Protein mit diesen Integrintypen (β_1 und β_2) denkbar, denn möglicherweise binden die Antikörper nicht an die gleiche Stelle wie das DIS-Fusionsprotein und können somit den inhibitorischen Signal-Effekt nicht nachahmen. Denkbar ist auch, dass diese Antikörper aus speziesspezifischen Unterschieden gar nicht an die β_1 - und β_2 -Integrinuntereinheiten der Ratte binden. Jedoch lässt sich aus dem Un-

vermögen dieser beiden Antikörper, das Neuritenauswachsen zu hemmen schließen, dass die beobachteten Effekte der Antikörper gegen die β_3 - und β_4 -Integrinuntereinheit keine unspezifische Reaktionen durch das Serum selbst sind.

Durch die gerade geschilderten Ergebnisse rückt erstmalig auch ein Integrin mit β_4 -Untereinheit in den Fokus als möglicher Partner von ADAM15 der Ratte. Dies ist interessant, da das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin der Rezeptor des Laminin-5 ist und nur von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (Feltri *et al.*, 1992, Einheber *et al.*, 1993). Interaktionen von ADAM15 mit diesem Integrin im Kontext der Vorgänge bei der Nervenregeneration sind somit denkbar. In der Maus wurde, wie schon erwähnt, durch Eto und Mitarbeitern (2000) eine Interaktion zu $\alpha_9\beta_1$ gezeigt. Sie postulierte nach der Auswertung von Mutationsversuchen, dass alle ADAM-Proteine, die ein RX_6DLPEF -Motiv besitzen, eine Bindung zu diesem Integrin aufnehmen können. Auch das ADAM15-Protein der Ratte weist ein solches Motiv auf. Warum aber der monoklonale Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit bei den verwendeten dorsalen Spinalganglien keine vermindertes Neuritenwachstum zeigt, ist unklar.

Es ist weiterhin von Bedeutung, dass durch die vorliegenden Experimente eine funktionelle Verbindung zwischen ADAM15 und der β_3 -Integrinuntereinheit gezeigt werden konnte. Für das humane ADAM15-Protein ist sogar eine molekulare Wechselwirkung mit einem β_3 -Integrin beschrieben und ist dort von der RGD-Sequenz abhängig (Nath *et al.*, 1999), jedoch besitzt das Rattenhomolog von ADAM15 keine RGD-Sequenz, sondern eine TDD-Sequenz. Da das verhinderte Neuritenwachstum jedoch nicht durch die alleinige Zugabe von TDD- oder RGD-Peptiden ins Kulturmedium nachgeahmt werden kann, ist eine Bindung des β_3 -Integrintyps nur über diese Region unwahrscheinlich. Eine effiziente Integrin-Interaktion von ADAM15 benötigt, wie schon durch Eto und Mitarbeiter (2000) diskutiert, eine exakte Ausbildung einer Loopstruktur, so dass der TDD-Aminosäuresequenz eher eine untergeordnete Rolle bei der Ausbildung der spezifischen Wechselwirkung zufällt.

4.4.3 Metalloproteaseaktivität von ADAM15

ADAM-Proteine weisen aufgrund ihrer Multi-Domänenstruktur zahlreiche Funktionen auf. Es ist deshalb im Kontext dieser Arbeit interessant, dass ADAM-Proteine auch über ihre Metalloprotease-Domäne inhibitorisch auf das Axonwachstum wirken können. Ephrine sind axonale Membranproteine, die durch einen GPI-Anker in der Membran verankert sind. Wird nun z.B. Ephrin-A2 durch die Metalloproteaseaktivität von ADAM10 an der Membran gespalten (Hattori *et al.*, 2000) so hat das dramatische Auswirkungen auf den Wachstumskegel des Axons, der letztendlich sogar vollständig kollabiert. Dieses Beispiel bedingt aber eine aktive Metalloprotease, die in dieser Arbeit, wie z.B. dem proteolytischen Abbau von MBP (Myelin-Basic Protein) durch das EXTRA-Fusionsprotein (alle extrazellulären Domänen), oder das DIS-MEP-Fusionsprotein (Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne) leider nicht nachweisbar war. Diese Tatsache ist etwas überraschend, da ADAM8 unter gleichen Bedingungen MBP spaltet (Schlomann *et al.*, 2002). Möglicherweise war das in dieser Arbeit gewählte prokaryontische Expressionssystem zur Herstellung der GST-ADAM15-Fusionsproteine nicht geeignet, um eine funktionsfähige Metalloprotease zu generieren. Humanes ADAM15 besitzt desweiteren die Fähigkeit membrangebundenes CD23 zu spalten (Fourie *et al.*, 2003). CD23, auch „low-affinity“-IgE-Receptor genannt, kann bei Bindung von IgE eine Induktion von inflammatorischen Cytokinen auslösen (Bonney *et al.*, 1996). Untersuchungen von ADAM15 und ADAM8 in Bezug auf ihr Vermögen synthetische Peptide zu spalten, haben gezeigt, dass sich beide Proteine in ihrem Substratspektrum sehr ähneln, während sie sich beide stark in der Substratwahl von ADAM17 unterscheiden (Fourie *et al.*, 2003).

4.4.4 Expression von ADAM15 nach Ischiasnerv-Quetschläsion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ischiasnerv-Quetschläsions-Experimente weisen ADAM15 ein etwas anderes mRNA-Expressionsprofil nach einer Quetschläsion zu, als zuvor durch Northern-Blot-Analysen beschrieben wurde (Bosse *et al.*, 1994 und 2000). Bei Messungen auf der Basis quantitativer RT-PCR wurde keine signifikante Erhöhung von ADAM15 am 1. und 2. Tag nach Lädierung des Ischiasnervs festgestellt. Vielmehr ist die mRNA-Expression von ADAM15 kurz nach der Läsion etwas reduziert, um dann

zu späteren Zeitpunkten während der Regenerationsphase eine erhöhte Expression zu zeigen (Abbildung 42). Dieser veränderte Expressionsverlauf konnte mit drei verschiedenen Primerpaaren validiert werden.

Wo diese Diskrepanz der hier gezeigten mRNA-Expression von ADAM15 mit der zuvor publizierten Regulation herrührt, ist unklar, jedoch zeigt die gleichzeitig durchgeführte Analyse der Expression des Peripheren-Myelin-Proteins 22 (PMP22) die schon bekannte, schnelle und starke Erniedrigung der mRNA Menge vier Tage nach der Läsion, welche auch die Northern-Blot-Analysen von Bosse und Mitarbeitern (2000) beschreiben. Möglicherweise detektierte die für die Northern-Blot-Analysen verwendeten Sonden nicht nur ADAM15-mRNA, sondern auch noch weitere Vertreter dieser sehr großen Proteinfamilie. Dies ist denkbar, da die ADAM-Familie in manchen Bereichen eine starke Sequenzhomologie zeigt. Betrachtet man beispielsweise die Expression von ADAM8 im selben Läsionsparadigma, so ist tatsächlich eine starke Erhöhung am ersten Tag auf mehr als das 13-fache des Kontrollniveaus zu beobachten (Abbildung 43).

4.4.5 Einfluss von inflammatorischen Cytokinen auf ADAM15

Betrachtet man eine Entzündung des PNS, wie zum Beispiel bei einer Experimentellen- Autoimmunen-Neuritis (EAN) oder aber die Verletzung des Ischiasnervs, so findet man immer eine erhöhte Menge an $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ (Kiefer *et al.*, 1995; Rufer *et al.*, 1994; Wagner und Myers, 1996). Schwannzellen besitzen sowohl Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$ (Skoff *et al.*, 1998), als auch für $\text{TGF}\beta$. Betrachtet man nun die in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationen von Schwannzellen mit $\text{TNF}\alpha$ und/oder $\text{TGF}\beta$, so ruft die durch geringe Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ simulierte Entzündungsreaktion in Schwannzellen eine Erhöhung der Expression von ADAM15 und ADAM8 hervor (Abbildung 20). In Astrozyten wirkt $\text{TNF}\alpha$ anders (Abbildung 23), hier wird erst durch höhere Dosen eine geringe Verstärkung der mRNA-Expression beider untersuchter ADAM sichtbar. Im Gegensatz dazu moduliert $\text{TGF}\beta$ in beiden Zelltypen eine Verringerung der ADAM15- sowie der ADAM8-mRNA-Expression. In Schwannzellen ist diese Verringerung erst bei höheren Dosen festzustellen (Abbildung 21), wogegen die Astrozyten sensitiver reagieren und

die Expressionsveränderung schon bei geringen Dosen von TGF β zeigen (Abbildung 24). Kombiniert man nun die Gabe von TNF α und TGF β , erzielt man eine andere Wirkung als durch die Stimulation mit den einzelnen Cytokinen. War mit TNF α noch eine schwache Expressionserhöhung im Fall von ADAM15 zu beobachten und mit TGF β eine Erniedrigung, so ist bei der Kombination keine Aufhebung der beiden gegensätzlichen Effekte zu erkennen, sondern es resultiert eine verstärkte Erniedrigung der ADAM15-mRNA-Expression. Diese ist bei einer Stimulation mit jeweils 20ng/ml am stärksten ausgeprägt und reduziert in Schwannzellen die mRNA-Expression von ADAM15 auf 28% und die mRNA-Expression von ADAM8 sogar auf 18% (Abbildung 22). Dies ist eine Reduktion um das 4- bzw. 5-fache. Bei Astrozyten ist eine ähnliche Wirkung durch die kombinierte Gabe beider Cytokine zu beobachten (Abbildung 25). Auch in diesen Zellen gleichen sich die gegensätzlichen Effekte der unterschiedlichen Mediatoren nicht aus (Erhöhung mit TNF α , Erniedrigung mit TGF β bei jeweils 20ng/ml), sondern bewirken eine Expressionserniedrigung, die, anders als in den Schwannzellen, jedoch nicht stärker ist, als bei der alleinigen Gabe von TGF β . Die mRNA-Expression von ADAM15 fällt bei der Stimulation mit beiden Cytokinen auf 56%, die ADAM8-mRNA-Expression auf 69%. Da Astrozyten bei der Stimulation mit beiden Cytokinen einen ähnlichen, aber nicht so dramatischen Verlauf der mRNA-Expression von ADAM15 und ADAM8 zeigen, ist zu vermuten, dass sie auch Rezeptoren für TNF α und TGF β besitzen und somit auf homologe Signalwege wirken.

Die Inkubation der Zellen mit beiden Cytokinen spiegelt die *in-vivo*-Situation nach einer Nervenläsion oder bei experimenteller Autoimmune Neuritis (EAN) eher wieder. TNF α reguliert bei einer alleinigen Stimulation von Schwannzellen das Interzelluläre-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1) hoch (Lisak und Bealmear, 1997), während die Stimulation mit der Kombination von TNF α und TGF β eine andere Reaktion auslöst. In diesem Fall ist bei einer Konzentration von 40ng/ml je Cytokin zuerst ein Ablösen der Schwannzellen vom Untergrund und eine erhöhte Apoptose zu beobachten (Skoff *et al.*, 1998). Weder die Zellablösung, noch die Degradation ist bei der in dieser Arbeit verwendeten Maximalkonzentration von 20ng/ml zu beobachten, es lässt sich jedoch eine Verminderung der ADAM15- und ADAM8-mRNA-Expression detektieren. Dies ähnelt den Veränderungen *in-vivo*, bei der sich die Schwannzellen aus dem Gewebeverband ablösen und migrieren

(Waller'sche Degeneration). Dies scheint aber weniger ein direkter Effekt bestimmter Gene zu sein, der durch die gezielte Expressionserhöhung eine Ablösung der Zelle verursacht, sondern vielmehr ein indirekter Prozess, in dem die Zellen durch Herunterregulation der Adhäsionsmoleküle dedifferenzieren. Bei starken Entzündungen und damit verbundenen hohen Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ gehen dann einige der Zellen in Apoptose über (Skoff *et al.*, 1998). Die übrig gebliebenen Zellen proliferieren, migrieren und redifferenzieren im Falle einer Regeneration wieder zu myelinisierenden Schwannzellen. Primär könnten in diesem Prozess ADAM15 und ADAM8 ähnliche Rollen spielen, jedoch zeigt ADAM8 nach der Ischiasnerv-Läsion keine signifikante Herunterregulation, wie sie aufgrund der *in-vitro*-Ergebnisse nach Gabe von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ zu erwarten gewesen wäre. Somit spielt ADAM8 im peripheren Nerv möglicherweise eine andere Rolle als ADAM15 und wird somit von anderen oder weiteren Modulatoren gesteuert.

4.5 Modell der ADAM15-Funktion im PNS

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das ADAM15-Protein der Ratte weniger die Schwannzellen als vielmehr die Neurone des peripheren Nervensystems beeinflusst. Die Vergleiche des Wachstums von dissoziierten DRG-Zellen und dissoziierten Cortexneurone auf GST-ADAM15-Fusionsproteinen deuten klare Unterschiede in der Reaktion von Neuronen des ZNS und PNS an. Der Effekt der Disintegrin-Domäne auf das verminderte Neuritenwachstum von DRG-Explantaten ist auch an dissoziierten Zellen von DRG zu beobachten. Hierbei sind zum einen deutlich weniger Neuriten als auf den weiteren Beschichtungen zu erkennen und zum anderen wurde auch eine verminderte Zellzahl auf dem mit DIS beschichteten Oberflächen beobachtet (Abbildung 37+38). Es binden etwa 30% weniger Zellen auf der mit der Disintegrin-Domäne und Laminin beschichteten Oberfläche im Vergleich zur Kontrolle (GST und Laminin). Interessanterweise verhalten sich dissoziierte Cortexneurone der Ratte anders (Abbildung 39). Es kann kein vermindertes Neuritenwachstum auf dem DIS-Fusionsprotein beobachtet werden, die Zellen verhalten sich auf allen beschichteten Oberflächen gleich. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ADAM15 weniger ein Faktor zur Modulation der Schwannzellen ist, wie in unserer Arbeitshypothese initial formuliert, sondern eher ein Modulator von Neuriten- bzw. Axonwachstum sensorischer Neurone. Unter dieser Annahme könnte sich ADAM15

als eine Art Wegweismolekül (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996) auf der Oberfläche von Schwannzellen verhalten, das dem nach einer Nervenverletzung erneut auswachsenden Axonkegel entlang der Schwannzellen die Richtung weist.

All diese Ergebnisse führen für die Regeneration nach Verletzung des Ischiasnervs zu folgendem Modell:

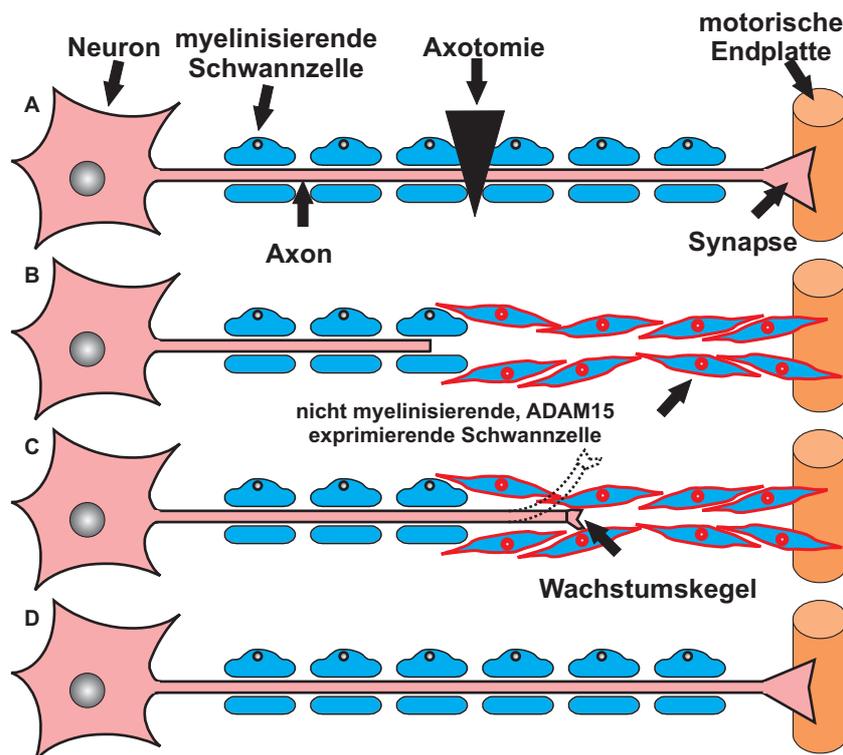


Abbildung 45: **Vermutetes Modell zur Funktion von ADAM15 bei der Regeneration im PNS am Beispiel des Ischiasnervs.** A: Durch eine Ischämie im peripheren Nervensystem wird die Verbindung des durch Schwannzellen myelinisierten Axons zur Synapse und damit zur motorischen Endplatte unterbrochen. B: Der distale Axonstumpf degeneriert, übrig bleibt der noch myelinisierte proximale Axonstumpf. Die Schwannzellen dedifferenzieren zu nicht mehr myelinisierten Schwannzellen. C: Die nicht mehr myelinisierten Schwannzellen bilden nun eine Leitstruktur, für das neu auswachsende Axon. Die nicht myelinisierten Schwannzellen exprimieren hierbei eine erhöhte Menge an ADAM15 und inhibieren somit das orthogonale Verlassen des Wachstumskegel des Axons. D: Hierdurch findet der Wachstumskegel des Axons entlang an den ADAM15 überexprimierenden Schwannzellen erneut bis zur motorischen Endplatte und bildet nach der Ausbildung einer Synapse eine funktionelle Einheit.

ADAM15 wird neben anderen Adhäsionsmolekülen zu Beginn einer Verletzung des Nerves in Schwannzellen und Astrozyten durch die beiden Entzündungsmediatoren $TNF\alpha$ und $TGF\beta$ herunter reguliert, wodurch die Schwannzellen sich aus dem Gewebeverband

ablösen können, um zu dedifferenzieren, zu proliferieren und zu migrieren. Sie bilden nun für das regenerierende Axon eine Leitstruktur, die das Axon fest umschließt. ADAM15 fungiert zu späteren Zeitpunkten während der Regenerationsphase als Molekül, welches dem Axon durch Inhibition eine Wachstumsrichtung weist. Es verhindert, dass sich ein normalerweise zufällig in alle Richtungen bewegender Axonwachstumskegel nicht orthogonal vom ursprünglichen Nervenbündel wegbewegt. Die Inhibition, die hierbei stattfindet, ist möglicherweise Integrin-vermittelt und bringt über eine Signalkaskade den in die falsche Richtung weisenden Wachstumskegel des Axons zum Kollabieren. Dies würde die in der frühen Phase nach einer Läsion verminderte Expression und die spätere stärkere Expression von ADAM15 erklären. Möglicherweise handelt es sich jedoch um ein Modell, das nur für das PNS Gültigkeit besitzt und nicht auf das ZNS übertragbar ist, denn an Cortexneuronen war, im Gegensatz zu den Neuronen aus den dorsalen Spinalganglien, kein vermindertes Neuritenwachstum durch die Behandlung mit der Disintegrin-Domäne zu beobachten.

Diese Ergebnisse und damit dieses Modell reiht ADAM15 als eines der ADAM-Familienmitglieder ein, die wie schon ADAM13 in *Xenopus* (Alfandari *et al.*, 2001) sowie ADAM10 (Hattori *et al.*, 2000) in *Drosophila* als Moleküle zur Nervenentwicklung oder Nervenregeneration entscheidende Rollen spielen. Die postulierte Funktion übt ADAM15 jedoch nicht über die Metalloprotease-Domäne aus, sondern über seine Disintegrin-Domäne.

4.6 Ausblicke

Zur Bestätigung der vermuteten Integrininteraktion von ADAM15 müsste im weiteren Verlauf der Untersuchungen eine direkte Verbindung von ADAM15 zu Integrinen zum Beispiel über Crosslinkerexperimente oder auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Analysen von nicht adhärenen Zellen, die mit verschiedenen Integrinen infiziert oder transfiziert werden und an eine mit Disintegrin beschichtete Oberfläche binden, könnten Aufschluss über den entsprechenden Integrinpartner von ADAM15 bringen. Denkbar wäre auch ein sogenanntes „Rescue“ des Axonwachstums von dorsalen Spinalganglien durch Verwendung von spezifischen Inhibitoren der Integrin-Signalmoleküle in der Zelle. In Frage kämen spezielle Proteinkinasen sowie -phosphatasen, die entscheidene Rollen in der

Signalkaskade von Integrinen spielen. Nach erfolgter Identifizierung wäre es interessant, die Bindedomäne von ADAM15 für diese Integrine zu detektieren. Sollte sich die Vermutung einer Interaktion mit der β_4 -Untereinheit erhärten, wäre dies besonders interessant, da bislang Interaktionen von β_4 -Integrinen und ADAM-Proteinen gänzlich unbekannt sind. Eine Mutationsanalyse von bestimmten Aminosäuren der putativen Bindedomäne könnte helfen, die essentiell wichtigen Aminosäuren für die Bindung zu detektieren. Eine Untersuchung verschiedener synthetischer Substratpeptide könnte zur Untersuchung der Aktivität der Metalloprotease-Domäne von entscheidender Wichtigkeit sein und zum besseren Verständnis möglicher zusätzlicher Modulationsmöglichkeiten von Membranproteinen oder Extrazellulärmatrix-Proteinen führen. Weitere Experimente zum unterschiedlichen Verhalten von ADAM15 im ZNS und PNS könnte darüber hinaus eine bessere Vorstellung der unterschiedlichen Regenerationsvermögen in diesen Regionen bringen.

5 Zusammenfassung

Initial entdeckt als lösliche Proteine, die den Schlangengiften stark verwandt sind, wurden die membranständigen ADAM-Proteine nach kurzer Zeit als interessante Modulationspartner im Nervensystem betrachtet. Durch ihre Multidomänenstruktur kam eine Vielzahl an Funktionen dieser Proteinfamilie (Adamalysinen) in Frage. Mitglieder der ADAM-Familie wurden nach Nerven-Läsion in ihrer Expression als reguliert gefunden und rückten damit in den Fokus der Nervenregeneration. Die genaue Funktion von ADAM15 in der Nervenregeneration war jedoch noch unbekannt, wurde aber in einer Modulation der Integrine von Schwannzellen als eine Cis-Interaktion mit ADAM-Proteinen und damit einer vermuteten Modulation der Adhäsion zur Extrazellulärmatrix verstanden. Daher sollte in dieser Arbeit die Funktion von ADAM15 im Nervensystem auf Proteinebene untersucht werden. In dieser Arbeit konnten erstmals durch die Generierung mehrerer Antikörper gegen verschiedene Domänen drei verschiedene Proteinformen von ADAM15 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine Expression von ADAM15 in Neuronen, Astrozyten und im Cytoplasma von myelinisierenden Schwannzellen zellulär lokalisiert werden.

Die bis zum Beginn dieser Arbeit postulierte Funktion von ADAM15 auf die Schwannzelladhäsion konnte jedoch nicht bestätigt werden. ADAM15 zeigte in einem neu entwickelten sensitiven Adhäsionsassay keinen Einfluss auf die Adhäsion von Schwannzellen. Vielmehr konnte durch die Disintegrin-Domäne von ADAM15 ein verringertes Wachstum von Neuriten bei Kultivierung von embryonalen, dorsalen Spinalganglien auf Laminin hervorgerufen werden, während das Migrationsverhalten der Schwannzellen unbeeinflusst blieb.

Weiterhin konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Verminderung des Neuritenwachstums dem Effekt durch Antiseren gegen β -Untereinheiten von Integrinen ähnlich ist. Möglicherweise sind die schon von anderen ADAM-Proteinen bekannten Wechselwirkungen mit Integrinen auch hier der Grund für die eher signalabhängige Reduktion des Neuritenwachstums, so dass ADAM15 eher als ein Guidance-Molekül für das regenerierende Axon verstanden werden kann als ein Modulator der Schwannzelladhäsion. Der in dieser Arbeit untersuchte Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta$ auf die ADAM15-mRNA-Expression unterstützen die vermutete Funktion.

6 Literatur

C. L. Abram, D. F. Seals, I. Pass, D. Salinsky, L. Maurer, T. M. Roth, and S. A. Courtneidge. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J.Biol.Chem.* 278 (19):16844-16851, 2003.

D. Alfandari, H. Cousin, A. Gaultier, K. Smith, J. M. White, T. Darribere, and D. W. DeSimone. Xenopus ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr.Biol.* 11 (12):918-930, 2001.

E. A. Almeida, A. P. Huovila, A. E. Sutherland, L. E. Stephens, P. G. Calarco, L. M. Shaw, A. M. Mercurio, A. Sonnenberg, P. Primakoff, D. G. Myles, and . Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81 (7):1095-1104, 1995.

A. Anders, S. Gilbert, W. Garten, R. Postina, and F. Fahrenholz. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 15 (10):1837-1839, 2001.

D. J. Anderson. Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet.* 13 (7):276-280, 1997.

M. A. Arnaout, S. L. Goodman, and J. P. Xiong. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14 (5):641-651, 2002.

J. Arribas, L. Coodly, P. Vollmer, T. K. Kishimoto, S. Rose-John, and J. Massague. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J.Biol.Chem.* 271 (19):11376-11382, 1996.

R. Barouch and M. Schwartz. Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB J.* 16 (10):1304-1306, 2002.

B. A. Barres. New roles for glia. *J.Neurosci.* 11 (12):3685-3694, 1991.

R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385 (6618):729-733, 1997.

C. P. Blobel, T. G. Wolfsberg, C. W. Turck, D. G. Myles, P. Primakoff, and J. M. White. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356 (6366):248-252, 1992.

C. P. Blobel and J. M. White. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr.Opin.Cell Biol.* 4 (5):760-765, 1992.

C. P. Blobel. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 90 (4):589-592, 1997.

J. Y. Bonnefoy, C. Plater-Zyberk, S. Lecoanet-Henchoz, J. F. Gauchat, J. P. Aubry, and P. Graber. A new role for CD23 in inflammation. *Immunol.Today* 17 (9):418-420, 1996.

F. Bosse, G. Zoidl, S. Wilms, C. P. Gillen, H. G. Kuhn, and H. W. Muller. Differential expression of two mRNA species indicates a dual function of peripheral myelin protein PMP22 in cell growth and myelination. *J.Neurosci.Res.* 37 (4):529-537, 1994.

F. Bosse, G. Petzold, R. Greiner-Petter, U. Pippirs, C. Gillen, and H. W. Muller. Cellular localization of the disintegrin CRII-7/rMDC15 mRNA in rat PNS and CNS and regulated expression in postnatal development and after nerve injury. *Glia* 32 (3):313-327, 2000.

J. P. Brockes, K. L. Fields, and M. C. Raff. Studies on cultured rat Schwann cells. I.

Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165 (1):105-118, 1979.

J. D. Buxbaum, K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti, and R. A. Black. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J.Biol.Chem.* 273 (43):27765-27767, 1998.

H. R. Clarke, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, C. P. Huang, M. J. Gerhart, R. S. Johnson, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, V. L. Price, and R. A. Black. Expression and purification of correctly processed, active human TACE catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr.Purif.* 13 (1):104-110, 1998.

M. S. Dennis, W. J. Henzel, R. M. Pitti, M. T. Lipari, M. A. Napier, T. A. Deisher, S. Bunting, and R. A. Lazarus. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (7):2471-2475, 1990.

E. Diaz-Rodriguez, J. C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste, and A. Pandiella. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol.Biol.Cell* 13 (6):2031-2044, 2002.

S. Einheber, T. A. Milner, F. Giancotti, and J. L. Salzer. Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for alpha 6 beta 4 in myelination. *J.Cell Biol.* 123 (5):1223-1236, 1993.

M. Emi, T. Katagiri, Y. Harada, H. Saito, J. Inazawa, I. Ito, F. Kasumi, and Y. Nakamura. A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. *Nat.Genet.* 5 (2):151-157, 1993.

K. Eto, W. Puzon-McLaughlin, D. Sheppard, A. Sehara-Fujisawa, X. P. Zhang, and Y. Takada. RGD-independent binding of integrin $\alpha 9 \beta 1$ to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J.Biol.Chem.* 275 (45):34922-34930, 2000.

D. Fambrough, D. Pan, G. M. Rubin, and C. S. Goodman. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (23):13233-13238, 1996.

J. W. Fawcett and R. J. Keynes. Peripheral nerve regeneration. *Annu.Rev.Neurosci.* 13:43-60, 1990.

M. L. Feltri, S. S. Scherer, L. Wrabetz, J. Kamholz, and M. E. Shy. Mitogen-expanded Schwann cells retain the capacity to myelinate regenerating axons after transplantation into rat sciatic nerve. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (18):8827-8831, 1992.

A. M. Fourie, F. Coles, V. Moreno, and L. Karlsson. Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *J.Biol.Chem.* 278 (33):30469-30477, 2003.

A. Gaultier, H. Cousin, T. Darribere, and D. Alfandari. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J.Biol.Chem.* 277 (26):23336-23344, 2002.

C. Gillen, M. Gleichmann, P. Spreyer, and H. W. Muller. Differentially expressed genes after peripheral nerve injury. *J.Neurosci.Res.* 42 (2):159-171, 1995.

G. W. Goldstein and A. L. Betz. The blood-brain barrier. *Sci.Am.* 255 (3):74-83, 1986.

R. J. Gould, M. A. Polokoff, P. A. Friedman, T. F. Huang, J. C. Holt, J. J. Cook, and S. Niewiarowski. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 195 (2):168-171, 1990.

F. Grams, R. Huber, L. F. Kress, L. Moroder, and W. Bode. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* 335 (1):76-80, 1993.

J. W. Griffin and P. N. Hoffmann. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, editors. *Peripheral neuropathy*. 3rd Ed. Philadelphia, 1993. 376 pages.

H. Hanenberg, K. Hashino, H. Konishi, R. A. Hock, I. Kato, and D. A. Williams. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum.Gene Ther.* 8 (18):2193-2206, 1997.

M. Hattori, M. Osterfield, and J. G. Flanagan. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289 (5483):1360-1365, 2000.

E. Hauben, A. Gothilf, A. Cohen, O. Butovsky, U. Nevo, I. Smirnov, E. Yoles, S. Akselrod, and M. Schwartz. Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury. *J.Neurosci.* 23 (25):8808-8819, 2003.

P. D. Henion and J. A. Weston. Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124 (21):4351-4359, 1997.

S. Hermanns, N. Klapka, and H. W. Muller. The collagenous lesion scar—an obstacle for axonal regeneration in brain and spinal cord injury. *Restor.Neurol.Neurosci.* 19 (1-2):139-148, 2001.

S. Hermanns, P. Reiprich, and H. W. Muller. A reliable method to reduce collagen scar formation in the lesioned rat spinal cord. *J.Neurosci.Methods* 110 (1-2):141-146, 2001.

B. Herren, E. W. Raines, and R. Ross. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo. *FASEB J.* 11 (2):173-180, 1997.

K. Hofmann, P. Bucher, L. Falquet, and A. Bairoch. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27 (1):215-219, 1999.

M. A. Horton. The alpha v beta 3 integrin „vitronectin receptor“. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29 (5):721-725, 1997.

M. Hosaka, M. Nagahama, W. S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 266 (19):12127-12130, 1991.

L. L. Hsiao, J. Peltonen, S. Jaakkola, H. Gralnick, and J. Uitto. Plasticity of integrin expression by nerve-derived connective tissue cells. Human Schwann cells, perineurial cells, and fibroblasts express markedly different patterns of beta 1 integrins during nerve development, neoplasia, and in vitro. *J.Clin.Invest* 87 (3):811-820, 1991.

T. F. Huang, Y. J. Wu, and C. Ouyang. Characterization of a potent platelet aggregation inhibitor from *Agkistrodon rhodostoma* snake venom. *Biochim.Biophys.Acta* 925 (3):248-257, 1987.

T. F. Huang, J. C. Holt, H. Lukasiewicz, and S. Niewiarowski. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J.Biol.Chem.* 262 (33):16157-16163, 1987.

P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil, and M. H. Ginsberg. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J.Biol.Chem.* 271 (12):6571-6574, 1996.

K. Iba, R. Albrechtsen, B. Gilpin, C. Frohlich, F. Loechel, A. Zolkiewska, K. Ishiguro, T. Kojima, W. Liu, J. K. Langford, R. D. Sanderson, C. Brakebusch, R. Fassler, and U. M. Wewer. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J.Cell Biol.* 149 (5):1143-1156, 2000.

S. Jaakkola, O. Savunen, T. Halme, J. Uitto, and J. Peltonen. Basement membranes during development of human nerve: Schwann cells and perineurial cells display marked changes in their expression profiles for laminin subunits and beta 1 and beta 4 integrins. *J.Neurocytol.* 22 (3):215-230, 1993.

K. R. Jessen and R. Mirsky. Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2 (5):575-581, 1992.

T. Katagiri, Y. Harada, M. Emi, and Y. Nakamura. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. *Cytogenet.Cell Genet.* 68 (1-2):39-44, 1995.

R. Kiefer, W. J. Streit, K. V. Toyka, G. W. Kreutzberg, and H. P. Hartung. Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int.J.Dev.Neurosci.* 13 (3-4):331-339, 1995.

J. Kratzschmar, L. Lum, and C. P. Blobel. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J.Biol.Chem.* 271 (9):4593-4596, 1996.

G. Kuhn, A. Lie, S. Wilms, and H. W. Muller. Coexpression of PMP22 gene with MBP and P0 during de novo myelination and nerve repair. *Glia* 8 (4):256-264, 1993.

K. Kurohara, Y. Matsuda, A. Nagabukuro, A. Tsuji, T. Amagasa, and A. Fujisawa-Sehara. Meltrin beta (ADAM19) gene: cloning, mapping, and analysis of the regulatory

region. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 270 (2):522-527, 2000.

U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259):680-685, 1970.

R. P. Lisak and B. Bealmear. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on rat Schwann cells in vitro: comparison of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J.Peripher.Nerv.Syst.* 2 (3):233-243, 1997.

C. S. Lobsiger, V. Taylor, and U. Suter. The early life of a Schwann cell. *Biol.Chem.* 383 (2):245-253, 2002.

F. Loechel, B. J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen, and U. M. Wewer. Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J.Biol.Chem.* 273 (27):16993-16997, 1998.

L. Lum and C. P. Blobel. Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev.Biol.* 191 (1):131-145, 1997.

L. Lum, M. S. Reid, and C. P. Blobel. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J.Biol.Chem.* 273 (40):26236-26247, 1998.

S. K. McConnell. The determination of neuronal fate in the cerebral cortex. *Trends Neurosci.* 12 (9):342-349, 1989.

R. J. Mehta, B. Diefenbach, A. Brown, E. Cullen, A. Jonczyk, D. Gussow, G. A. Luckenbach, and S. L. Goodman. Transmembrane-truncated alphavbeta3 integrin retains high affinity for ligand binding: evidence for an 'inside-out' suppressor? *Biochem.J.* 330 (Pt 2):861-869, 1998.

J. E. Meredith, Jr., S. Winitz, J. M. Lewis, S. Hess, X. D. Ren, M. W. Renshaw, and M. A. Schwartz. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr.Rev.*

17 (3):207-220, 1996.

A. D. Miller, J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson, and M. V. Eiden. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J.Virol.* 65 (5):2220-2224, 1991.

R. Mirsky and K. R. Jessen. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6 (1):89-96, 1996.

R. Mirsky and K. R. Jessen. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol.* 9 (2):293-311, 1999.

E. Morgunova, A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider, and K. Tryggvason. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284 (5420):1667-1670, 1999.

M. L. Moss, S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer, and . Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385 (6618):733-736, 1997.

D. G. Myles, L. H. Kimmel, C. P. Blobel, J. M. White, and P. Primakoff. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (10):4195-4198, 1994.

D. Nath, P. M. Slocombe, P. E. Stephens, A. Warn, G. R. Hutchinson, K. M. Yamada, A. J. Docherty, and G. Murphy. Interaction of metargidin (ADAM-15) with $\alpha 3 \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins on different haemopoietic cells. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 4):579-587, 1999.

- D. Pan and G. M. Rubin. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90 (2):271-280, 1997.
- T. Pawson. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373 (6515):573-580, 1995.
- E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith. Ligand binding to integrins. *J.Biol.Chem.* 275 (29):21785-21788, 2000.
- H. Qi, M. D. Rand, X. Wu, N. Sestan, W. Wang, P. Rakic, T. Xu, and S. Artavanis-Tsakonas. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283 (5398):91-94, 1999.
- S. Rahman, A. Aitken, G. Flynn, C. Formstone, and G. F. Savidge. Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of alphaIIb beta3 and alpha5 beta1 integrin complexes. Replacement of elegantin alanine-50 with proline, N-terminal to the RGD sequence, diminishes recognition of the alpha5 beta1 complex with restoration induced by Mn²⁺ cation. *Biochem.J.* 335 (Pt 2):247-257, 1998.
- A. C. Rapraeger. Molecular interactions of syndecans during development. *Semin.Cell Dev.Biol.* 12 (2):107-116, 2001.
- P. H. Roche, D. Figarella-Branger, L. Daniel, N. Bianco, W. Pellet, and J. F. Pellissier. Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumors. *J.Neurol.Sci.* 151 (2):127-133, 1997.
- M. Roghani, J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst, and C. P. Blobel. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J.Biol.Chem.* 274 (6):3531-3540, 1999.

J. Rooke, D. Pan, T. Xu, and G. M. Rubin. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273 (5279):1227-1231, 1996.

M. Rufer, K. Flanders, and K. Unsicker. Presence and regulation of transforming growth factor beta mRNA and protein in the normal and lesioned rat sciatic nerve. *J.Neurosci.Res.* 39 (4):412-423, 1994.

J. L. Salzer and R. P. Bunge. Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury. *J.Cell Biol.* 84 (3):739-752, 1980.

F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74 (12):5463-5467, 1977.

U. Schlomann, D. Wildeboer, A. Webster, O. Antropova, D. Zeuschner, C. G. Knight, A. J. Docherty, M. Lambert, L. Skelton, H. Jockusch, and J. W. Bartsch. The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J.Biol.Chem.* 277 (50):48210-48219, 2002.

K. M. Schulze, C. O. Hanemann, H. W. Muller, and H. Hanenberg. Transduction of wild-type merlin into human schwannoma cells decreases schwannoma cell growth and induces apoptosis. *Hum.Mol.Genet.* 11 (1):69-76, 2002.

D. F. Seals and S. A. Courtneidge. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17 (1):7-30, 2003.

E. Shimizu, A. Yasui, K. Matsuura, N. Hijiya, Y. Higuchi, and S. Yamamoto. Structure and expression of the murine ADAM 15 gene and its splice variants, and difference of interaction between their cytoplasmic domains and Src family proteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 309 (4):779-785, 2003.

K. Shirakabe, S. Wakatsuki, T. Kurisaki, and A. Fujisawa-Sehara. Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J.Biol.Chem.* 276 (12):9352-9358, 2001.

M. Simonen, V. Pedersen, O. Weinmann, L. Schnell, A. Buss, B. Ledermann, F. Christ, G. Sansig, Putten H. van der, and M. E. Schwab. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38 (2):201-211, 2003.

A. M. Skoff, R. P. Lisak, B. Bealmear, and J. A. Benjamins. TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. *J.Neurosci.Res.* 53 (6):747-756, 1998.

K. M. Smith, A. Gaultier, H. Cousin, D. Alfandari, J. M. White, and D. W. DeSimone. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J.Cell Biol.* 159 (5):893-902, 2002.

S. Sotillos, F. Roch, and S. Campuzano. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs. *Development* 124 (23):4769-4779, 1997.

E. B. Springman, E. L. Angleton, H. Birkedal-Hansen, and H. E. Van Wart. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a cysteine switch mechanism for activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (1):364-368, 1990.

K. Takeuchi, T. Tsuji, S. Hakomori, and T. Irimura. Intercellular adhesion induced by anti-alpha 3 integrin (VLA-3) antibodies. *Exp.Cell Res.* 211 (1):133-141, 1994.

M. Tessier-Lavigne and C. S. Goodman. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274 (5290):1123-1133, 1996.

H. E. Van Wart and H. Birkedal-Hansen. The cysteine switch: a principle of regulation of

metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (14):5578-5582, 1990.

R. Wagner and R. R. Myers. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience* 73 (3):625-629, 1996.

G. Weskamp, J. Kratzschmar, M. S. Reid, and C. P. Blobel. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J.Cell Biol.* 132 (4):717-726, 1996.

J. M. White. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15 (5):598-606, 2003.

T. G. Wolfsberg, J. F. Bazan, C. P. Blobel, D. G. Myles, P. Primakoff, and J. M. White. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (22):10783-10787, 1993.

T. G. Wolfsberg and J. M. White. ADAMs in fertilization and development. *Dev.Biol.* 180 (2):389-401, 1996.

E. Wu, P. I. Croucher, and N. McKie. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 235 (2):437-442, 1997.

X. P. Zhang, T. Kamata, K. Yokoyama, W. Puzon-McLaughlin, and Y. Takada. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. *J.Biol.Chem.* 273 (13):7345-7350, 1998.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Hans Werner Müller für die stets hilfsbereite und anregende Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit. Die kritischen Fragen und Diskussionen haben diese Arbeit zum erfolgreichen Abschluss geführt. In gleicher Weise gilt dies für Herrn Professor Frank Wunderlich, der darüber hinaus freundlicherweise als weiterer Betreuer zur Verfügung stand. Auch bei Dr. Frank Bosse möchte ich mich für die Betreuung und der Hilfestellung bei dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht darüber hinaus an Birgit Hasse, Dr. Michael Hamacher und Dr. Patrick Küry, die mir im Rahmen der proteinbiochemischen und molekularbiologischen Anforderungen dieser Arbeit mit Anregungen helfen konnten. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors, die das Arbeitsklima im Labor zu etwas Besonderem gemacht haben. Für die wertvollen Ratschläge bei der Zellkultur möchte ich mich bei Brigida Ziegler bedanken und ebenso bei Regine Greiner-Petter für die Fülle an Tips für den Labor-Alltag.

Nicht ausreichend danken kann ich meiner ganzen Familie, ohne die dieses Studium gar nicht möglich gewesen wäre, sowie meiner Frau Diana Stephan, der ich darüber hinaus diese Arbeit widmen möchte.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Düsseldorf, den