

**Funktions- und Regulationsanalyse der zinkabhängigen  
Metalloprotease ADAM10, der bei der Alzheimer Demenz  
beteiligten  $\alpha$ -Sekretase**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von  
Johannes Prox  
Kiel, August 2012**

Referent/in: Prof. Dr. Paul Saftig

Korreferent/in: Prof. Dr. Matthias Leippe

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2012

Zum Druck genehmigt: 24.09.2012

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl (Dekan)

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I-1</b>
<b>II.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>II-9</b>
II. 1.	Proteasen .....	II-9
II. 1. 1.	Zinkabhängige Metalloproteasen.....	II-9
II. 1. 2.	<i>A Disintegrin and Metalloproteases (ADAMs)</i> .....	II-10
II. 1. 3.	<i>A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10)</i> .....	II-11
II. 1. 4.	Die Alzheimer Erkrankung.....	II-12
II. 1. 5.	Prozessierung des Amyloiden Vorläufer Proteins (APP).....	II-13
II. 1. 6.	Strategien zur Verminderung der A $\beta$ <sub>42</sub> -Produktion .....	II-14
II. 1. 7.	Die Identifikation der $\alpha$ -Sekretase(n) .....	II-16
II. 1. 8.	Weitere Substrate von ADAM10 im zentralen Nervensystem.....	II-17
II. 1. 9.	Identifikation von Proteinen zur Regulation von ADAM10 .....	II-18
II. 2.	Tetraspanine: Struktur und Funktion .....	II-20
II. 3.	Charakterisierung der ADAM10-Funktion durch <i>Loss-of-Function-</i> Modelle .....	II-22
II. 3. 1.	Die Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) .....	II-23
II. 3. 2.	Neurogenese im Telencephalon.....	II-23
II. 3. 3.	Radiale Migration von Neuronen während der ZNS-Entwicklung .....	II-25
II. 3. 4.	Tangentiale Migration von Neuronen.....	II-26
II. 3. 5.	Molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Neurogenese .....	II-27
II. 3. 6.	Der klassische Notch-Signalweg .....	II-28
II. 3. 7.	Der Notch-Signalweg in der Neurogenese .....	II-29
II. 3. 8.	Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten).....	II-31
II. 3. 9.	Die Entwicklung von Gliazellen im Vorderhirn.....	II-31
II. 3. 10.	Molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Gliogenese .....	II-32
II. 4.	Aufbau, Funktion und Modulation von Synapsen .....	II-33

<b>III.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>III-35</b>
<b>IV.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>IV-36</b>
IV. 1.	Geräte.....	IV-36
IV. 2.	Labor- und Verbrauchsmaterialien .....	IV-37
IV. 3.	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme .....	IV-39
IV. 4.	Kits.....	IV-42
IV. 5.	Oligonukleotide/Primer .....	IV-43
IV. 6.	Antikörper.....	IV-44
IV. 7.	Sekundäre Antikörper .....	IV-45
IV. 8.	Zelllinien.....	IV-46
IV. 9.	Mausstämme .....	IV-46
IV. 9. 1.	Generierung der konditionalen ADAM10 <sup>Flox</sup> -Maus.....	IV-46
IV. 9. 2.	Nestin-Cre Mausstamm (Tg(Nes-cre)1Kln).....	IV-47
IV. 9. 3.	CamKIIalpha-Cre Mausstamm.....	IV-47
IV. 10.	Computersoftware.....	IV-48
IV. 11.	Plasmide.....	IV-48
IV. 12.	Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	IV-49
IV. 13.	Molekularbiologische Methoden .....	IV-51
IV. 13. 1.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	IV-51
IV. 13. 1. 1.	Genotypisierungs-PCR.....	IV-52
IV. 13. 1. 2.	Klonierungs-PCR .....	IV-54
IV. 13. 2.	Agarosegelelektrophorese.....	IV-55
IV. 13. 3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	IV-56
IV. 13. 4.	Restriktion von PCR-Produkten und Plasmiden.....	IV-56
IV. 13. 5.	Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren/Plasmiden.....	IV-57
IV. 13. 6.	Ligation.....	IV-57
IV. 13. 7.	Herstellung von elektrokompetenten <i>E.Coli</i> XL1 Blue.....	IV-58
IV. 13. 8.	Transformation von elektrokompetenten <i>E.Coli</i> XL1 Blue .....	IV-58

---

IV. 13. 9. Präparation von Plasmiden aus transformierten <i>E. Coli</i> XL1 Blue .....	IV-59
IV. 13. 9. 1. Midi-Präparation .....	IV-59
IV. 13. 9. 2. Mini-Präparation .....	IV-59
IV. 13. 10. Sequenzierung .....	IV-60
IV. 13. 11. Isolierung von mRNA aus Zellen bzw. Geweben .....	IV-60
IV. 13. 12. cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA-Präparationen .....	IV-61
IV. 13. 13. Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR .....	IV-61
IV. 13. 14. Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> (NMY51) .....	IV-62
IV. 13. 15. Transformation von kompetenten Hefen (NMY51) .....	IV-62
IV. 13. 16. Testexpression des ADAM10- <i>Bait</i> -Konstrukts und Interaktionstests .....	IV-63
IV. 13. 17. <i>Large-Scale</i> -Transformation für Test- und Interaktionsscreen .....	IV-63
IV. 13. 18. Isolierung von Plasmiden aus Hefen .....	IV-64
IV. 14. Methoden zur Bearbeitung von Mausmodellen .....	IV-64
IV. 14. 1. Tierhaltung .....	IV-64
IV. 14. 2. Schwanzbiopsie und Vorbereitung der genomischen DNA .....	IV-65
IV. 14. 3. Markierung und Zucht der Mäuse .....	IV-65
IV. 14. 3. 1. Dauerverpaarung (DVP) .....	IV-66
IV. 14. 3. 2. Terminverpaarung (TVP) .....	IV-66
IV. 14. 3. 3. Zuchtschemata der verwendeten Mäuse .....	IV-66
IV. 14. 4. Präparation von Mausedembryonen (E11-E18) .....	IV-67
IV. 14. 5. Präparation von ZNS-Bereichen der adulten Maus .....	IV-67
IV. 14. 6. Perfusion von Mäusen .....	IV-68
IV. 14. 7. Verhaltensanalysen von Mäusen .....	IV-68
IV. 15. Histologische Methoden .....	IV-69
IV. 15. 1. 1. Hämatoxylin- und Eosin-Färbung .....	IV-69
IV. 15. 1. 2. Durchführung HE- und DAB-Färbung .....	IV-69
IV. 16. Proteinbiochemische Methoden .....	IV-70
IV. 16. 1. Herstellung von Zell- bzw. Gewebelysaten .....	IV-70

---

IV. 16. 2. BCA-Assay (Proteinbestimmung) .....	IV-70
IV. 16. 3. SDS-PAGE .....	IV-71
IV. 16. 4. Western Blot .....	IV-72
IV. 16. 5. Koimmunpräzipitation .....	IV-73
IV. 16. 6. <i>Pulse-Chase</i> -Markierung von Proteinen.....	IV-73
IV. 16. 7. Nachweis radioaktiv markierter Proteine .....	IV-74
IV. 16. 8. Sandwich-ELISA .....	IV-74
IV. 16. 9. Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	IV-75
IV. 17. Zellbiologische Methoden .....	IV-75
IV. 17. 1. Passagieren von Zellen .....	IV-75
IV. 17. 2. Zählen von Zellen .....	IV-75
IV. 17. 3. Langzeitlagerung und Auftauen von Zelllinien.....	IV-76
IV. 17. 4. Transiente Transfektion von Zellen.....	IV-76
IV. 17. 5. Ernte von Zellen .....	IV-76
IV. 17. 6. Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence-Activated-Cell-Sorting, FACS</i> ) .....	IV-76
IV. 17. 7. Immunfluoreszenz-Analysen .....	IV-77
IV. 17. 8. Präparation primärer Neuronen .....	IV-78
IV. 17. 9. Transfektion bzw. Infektion neuronaler Zellen .....	IV-79
IV. 17. 10. Kultivierung und Differenzierung von Neurosphären.....	IV-80
IV. 18. Statistik .....	IV-80
<b>V. Ergebnisse .....</b>	<b>V-81</b>
V. 1. Analyse der ADAM10-Funktion während der ZNS-Entwicklung.....	V-81
V. 1. 1. Genotypisierung.....	V-81
V. 1. 2. Embryonale Letalität der ADAM10-cKO-Mäuse .....	V-82
V. 1. 3. Verifizierung der ADAM10-Deletion im embryonalen ZNS.....	V-83
V. 1. 4. Morphologische Charakterisierung der ADAM10-cKO-Mäuse .....	V-84
V. 1. 5. Histologische Charakterisierung des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten (E12.5, E15.5, E17.5). .....	V-85

---

V. 1. 6.	Färbung des neuronalen Proteins ( <i>Neuronal Nuclei</i> , NeuN) im ZNS .....	V-87
V. 1. 7.	Spezifische Färbung (Ki67) mitotisch aktiver Zellen im ZNS .....	V-89
V. 1. 8.	Generierung von Neurosphären aus neuronalen Stammzellen der ADAM10-cKO- und Kontrollembryonen .....	V-91
V. 1. 9.	Molekulare Ursache der gestörten Differenzierungsprozesse in ADAM10-cKO-Embryonen/Mäusen .....	V-93
V. 1. 10.	Störungen des Notch1-Signalweges durch ADAM10-Deletion in neuronalen Vorläuferzellen .....	V-95
V. 1. 11.	Untersuchung anderer <i>in vitro</i> beschriebener Substrate von ADAM10.....	V-96
V. 2.	Untersuchung der ADAM10-Funktion im adulten ZNS der Maus .....	V-100
V. 2. 1.	Charakterisierung und Identifizierung der konditionalen ADAM10- (CamKIIalpha)-Knockout-Mäuse .....	V-100
V. 2. 2.	Untersuchung der Deletionseffizienz von ADAM10 im postnatalen Kortex zu unterschiedlichen Zeitpunkten (P5, P10 und P17).....	V-101
V. 2. 3.	Grob-morphologische Charakterisierung der ADAM-cKO-Mäuse .....	V-103
V. 2. 4.	Kaplan-Meier-Statistik der cKOs mit bzw. ohne Weichfuttergabe.....	V-106
V. 2. 5.	Histologische Untersuchung des „adulten“ ZNS der ADAM10-cKO- Mäuse.....	V-107
V. 2. 6.	Das zelluläre Prionprotein ein ADAM10-Substrat des adulten ZNS .....	V-113
V. 2. 7.	ADAM10 spaltet das Amyloide Vorläufer Protein (APP) im adulten ZNS.....	V-116
V. 2. 8.	Verhaltens- und Gedächtnisanalyse der ADAM10-cKO-Mäuse .....	V-117
V. 2. 9.	ADAM10-cKO-Mäuse zeigen eine reduzierte Ausbildung von LTP .....	V-121
V. 2. 10.	Proteinbiochemische Charakterisierung der ADAM10-cKO- Mäuse .....	V-123
V. 3.	Interaktionsscreen mit ADAM10 zur Identifikation neuer modulatorischer bzw. regulatorischer Proteine. ....	V-126
V. 3. 1.	Überprüfung des ADAM10-Cub-LexA-VP16-Fusionsproteins im Hefesystem .....	V-127
V. 3. 2.	Sequenzanalyse der potentiellen neuen Interaktionspartner von ADAM10 .....	V-128

V. 3. 3.	Verifizierung der TSPAN15/ADAM10-Interaktion im Hefesystem.....	V-128
V. 3. 4.	Überprüfung der ADAM10/TSPAN15-Interaktion in eukaryotischen Zelllinien.....	V-129
V. 3. 5.	Einfluss von TSPAN15-myc auf ADAM10-Maturierung.....	V-132
V. 3. 6.	Analyse der subzellulären Lokalisation von ADAM10 nach TSPAN15-myc-Expression .....	V-134
V. 3. 7.	Untersuchung der ADAM10-Expression in Abhängigkeit von der TSPAN15-myc-Expression (qRT-PCR).....	V-137
V. 3. 8.	Analyse der posttranslationalen Mechanismen zur erhöhten ADAM10-Expression nach TSPAN15-myc-Expression .....	V-139
V. 3. 9.	Analyse der ADAM10-Aktivität nach TSPAN15-myc-Expression.....	V-140
V. 3. 10.	Analyse der APP-Prozessierung nach TSPAN15-myc-Expression .....	V-141
V. 3. 11.	Beeinflusst ein TSPAN15-Knockdown in N2A-Zellen die Prozessierung von APP durch ADAM10.....	V-142
V. 3. 12.	Untersuchung der Expression weiterer Tetraspanine und ADAM-Proteasen nach TSPAN15-Knockdown.....	V-143
V. 3. 13.	Analyse der Prozessierung von APP im humanen System.....	V-144
<b>VI.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>VI-146</b>
VI. 1.	ADAM10 ist essentiell für die Entwicklung des murinen zentralen Nervensystems .....	VI-148
VI. 1. 1.	ADAM10 und nicht ADAM17 ist verantwortlich für die Initiation des klassischen Notch-Signalings im ZNS .....	VI-149
VI. 1. 2.	ADAM10 reguliert den Prozess der lateralen Inhibition im ZNS .....	VI-149
VI. 1. 3.	ADAM10-Defizienz beeinflusst die interkinetische nukleäre Migration..	VI-150
VI. 1. 4.	ADAM10 reguliert den Zellzyklus neuronaler Vorläuferzellen.....	VI-151
VI. 1. 5.	ADAM10-Defizienz in neuronalen Stammzellen führt zur Störung des vaskulären Systems bzw. der Blut-Hirn-Schranke .....	VI-152
VI. 1. 6.	ADAM10 reguliert den Prozess der Gliogenese .....	VI-153
VI. 1. 7.	ADAM10 ist die relevante APP- $\alpha$ -Sekretase in primären neuronalen Zellen .....	VI-155



VI. 2.	Funktionen von ADAM10 im adulten ZNS .....	VI-157
VI. 2. 1.	Ist der Notch1-Rezeptor bzw. dessen veränderte Proteolyse für die Phänotypen der ADAM10-(CamKIIalpha)-cKOs verantwortlich?.....	VI-157
VI. 2. 2.	Presenilin 1 und 2 doppeldefiziente Mäuse zeigen vergleichbare Phänotypen zu den ADAM10-cKOs .....	VI-159
VI. 2. 3.	Das zelluläre Prionprotein (PrPc) ist ein ADAM10-Substrat im adulten ZNS .....	VI-162
VI. 2. 4.	N-Cadherin-Prozessierung durch ADAM10 im adulten ZNS .....	VI-163
VI. 2. 5.	NMDA-Rezeptoren im adulten ZNS .....	VI-164
VI. 2. 6.	APP-Prozessierung durch ADAM10 in Tiermodellen für Morbus Alzheimer .....	VI-165
VI. 2. 7.	Konsequenzen der löslichen APPalpha-Reduktion in ADAM10-cKOs ...	VI-166
VI. 3.	Identifikation neuer Interaktionspartner bzw. Regulatoren von ADAM10 .....	VI-170
VI. 3. 1.	<i>Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Screen</i> mit ADAM10.....	VI-171
VI. 3. 2.	Tetraspanine und die ADAM-Proteasen 10 und 17 .....	VI-172
VI. 3. 3.	TSPAN15 ein vielversprechender Kandidat zur spezifischen Regulation der Lokalisation von ADAM10 .....	VI-173
VI. 3. 4.	TSPAN15 reguliert die ADAM10-Aktivität und auch dessen Halbwertszeit .....	VI-173
VI. 3. 5.	TSPAN15 ein neuer Regulator für ADAM10 .....	VI-174
VI. 3. 6.	TSPAN15 als therapeutisches Zielmolekül .....	VI-175
<b>VII.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII-177</b>
<b>VIII.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>VIII-179</b>
<b>IX.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>IX-181</b>
IX. 1. 1.	Abbildungsverzeichnis .....	IX-182
IX. 1. 2.	Tabellenverzeichnis .....	IX-184
<b>X.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>X-186</b>
<b>XI.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI-216</b>

---

<b>XII.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XII-223</b>
<b>XIII.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>XIII-224</b>
<b>XIV.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>XIV-225</b>
<b>XV.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XV-226</b>

## II. Einleitung

### II. 1. Proteasen

Proteasen, oder auch proteolytische Enzyme, katalysieren das Aufbrechen von Peptidbindungen von Proteinen durch Hydrolyse und spielen bei diversen zellulären und extrazellulären Prozessen eine wichtige Rolle im Organismus unterschiedlichster Lebewesen. Durch bioanalytische Analysen des Genoms von Mäusen und des humanen Organismus konnte gezeigt werden, dass nahezu 2% der genomischen Sequenzen für Proteasen kodieren (500-600 Proteasen), von denen viele Orthologe in anderen Spezies gefunden werden (Puente and Lopez-Otin, 2004; Puente et al., 2003; Rawlings et al., 2004). Während der Evolution entwickelten sich verschiedenste Subklassen an proteolytischen Enzymen, die optimal an unterschiedliche Hydrolyse-Bedingungen (pH-Variation, reduzierende Bedingungen etc.) angepasst sind. Anhand ihrer Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum und ihres Hydrolyse-Mechanismus können die Proteasen in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Diese umfassen Serin-, Cystein-, Threonin-, Aspartat-, Metallo- und Glutamatproteasen (nicht in Säugern zu finden). Substrate werden von Proteasen an verschiedenen Stellen (C-, N-Terminus oder in der „Mitte“ des Proteins) geschnitten, weshalb Proteasen auch als Carboxy-, Amino- oder Endopeptidasen bezeichnet werden. Ursprünglich wurde angenommen, dass Proteasen nur am Abbau und intrazellulärem Proteinturnover beteiligt sind. Jedoch konnten bis zum heutigen Tage viele physiologische Prozesse identifiziert werden, die der spezifischen Kontrolle von Proteasen unterliegen. Beispielsweise übernehmen sie wichtige Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation, der Apoptose, der DNA-Replikation, der Hämostase, der Wundheilung und bei Mechanismen der Immunabwehr. Natürlich sind Proteasen auch mit einer Vielfalt von pathophysiologischen Prozessen assoziiert, wie beispielsweise der Krebsentstehung, kardiovaskulären, neurodegenerativen, bakteriellen, viralen und parasitischen Erkrankungen. Wegen ihrer direkten Krankheitsassoziation sind Proteasen und ihre Regulation Gegenstand intensiver Forschung durch pharmazeutische Unternehmen und Institutionen der Grundlagenforschung (Abbenante and Fairlie, 2005; Turk, 2006).

#### II. 1. 1. Zinkabhängige Metalloproteasen

Zinkabhängige Metalloproteasen werden zur Familie der Metzincine zusammengefasst, zu denen Astacine, Serralysine, Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Adamalysine (*Snake*

*Venom Proteases* und *A Disintegrin and Metalloproteases (ADAMs)*) zählen. Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist ein konserviertes Aminosäuresequenzmotiv  $\text{HExxHxxGxxH}$ , wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt, welches auch zur Bindung des  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions im aktiven Zentrum benötigt wird. Zusätzlich befindet sich ein  $\beta$ -Turn in der Helix des aktiven Zentrums mit einem Methioninrest, der für die Aktivität der Metzincine wichtig ist (Gomis-Ruth, 2009). Unter den verschiedenen Familienmitgliedern besteht zu ca. 20 % Sequenzhomologie, wobei die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum hoch konserviert ist (Yong, 2005).

### II. 1. 2. *A Disintegrin and Metalloproteases (ADAMs)*

Bis zum heutigen Tage konnten 40 verschiedene ADAM-Metalloproteasen im Genom von Säugern identifiziert werden. Namensgebend für diese Proteinfamilie waren strukturelle Ähnlichkeiten zu *snake venom disintegrin* Proteasen, da sie eine Disintegrin-Domäne und eine Metalloprotease-Domäne aufweisen, wonach der Name „*A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM)*“ eingeführt wurde (Wolfsberg et al., 1995a; Wolfsberg et al., 1995b). Im Mausgenom umfasst die Familie der ADAMs 37 Mitglieder und im humanen System 21 (Puente and Lopez-Otin, 2004). Obwohl die ADAMs zu einer Familie zusammengefasst werden besitzen nur 12 Mitglieder (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33) das für die Zinkbindung und die proteolytische Aktivität benötigte Aminosäuresequenzmotiv (Bode et al., 1993). Zusätzlich besitzen Proteasen aus der ADAM-Familie charakteristische Domänen, die an der Regulation der Aktivität beteiligt sind. Nach der Synthese der ADAMs im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und dem Transport zum Golgi-Apparat wird hier die Prodomäne durch Proproteinkonvertasen oder Furin abgespalten und komplexe Glykosylierungen angefügt. Hierbei dient die Prodomäne einerseits als Inhibitor für die Metalloproteaseaktivität und andererseits als Chaperon zur korrekten Faltung des ADAMs (Anders et al., 2001; Endres et al., 2003; Gonzales et al., 2004; Moss et al., 2007). Lokalisiert sind die ADAMs hauptsächlich in ER- und Golgi-Kompartimenten, jedoch wird auch ein geringer Anteil an der Plasmamembran exprimiert (Gutwein et al., 2003; Lammich et al., 1999; Schlondorff et al., 2000). Der Prozess des „Ektodomänen-Sheddings“ wird durch ADAMs reguliert und findet an der Plasmamembran statt. Hierbei prozessieren die proteolytisch aktiven ADAMs Substrate in plasmamembrannahen Bereichen und generieren ein lösliches (Ektodomäne) und ein membrangebundenes Fragment, die parakrine und autokrine Signalwege beeinflussen können (Blobel, 2005; Deuss et al., 2008; Tousseyn et al., 2006). Hierbei scheinen die ADAMs keine identische Konsensussequenz zu nutzen, sondern es spielen eher Membranstrukturen und die Expressionsmuster eine wichtige Rolle für die

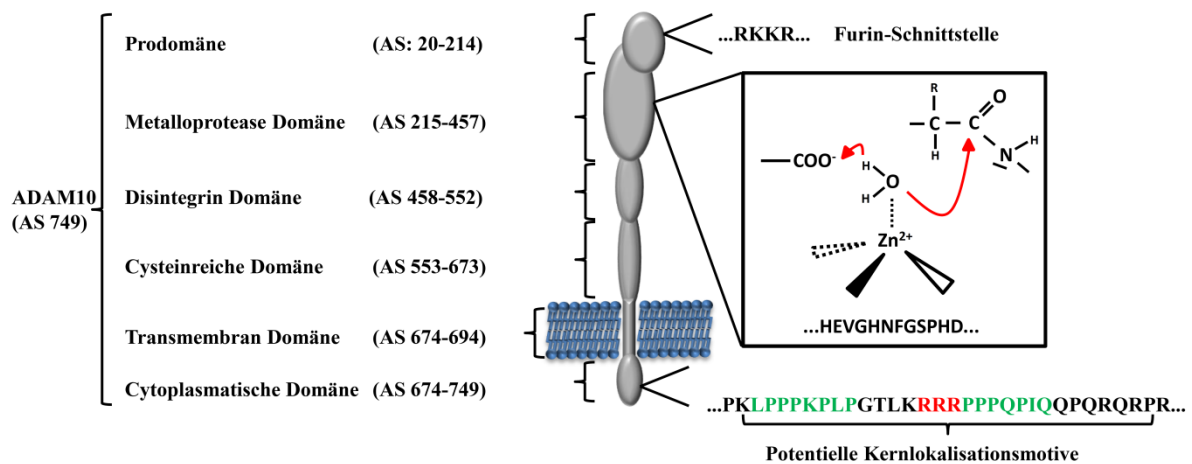
Erkennung der Substrate. Strukturell können die ADAMs allgemein vom N- zum C-Terminus weiter in verschiedene Domänen unterteilt werden. Gefolgt vom n-terminalen Signalpeptid liegt die Prodomäne, die Metalloprotease-Domäne (MP), die Disintegrin-Domäne (Dis), die Cysteinreiche-Domäne (Cys), die EGF-ähnliche-Domäne, gefolgt von einer Transmembrandomäne und cytoplasmatischen Abschnitten im Bereich des C-Terminus, die in der Länge bei den ADAMs variieren. Durch die unterschiedlichen Expressionsmuster, Strukturen und Domänen der ADAMs sind sie an einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, wie beispielsweise der Fertilisierung, Neurogenese, neurodegenerativen Erkrankungen, Entzündungsprozessen und bei der Krebsentstehung, beteiligt (Reiss and Saftig, 2009).

### II. 1. 3. *A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10)*

Ursprünglich wurde ADAM10 als Nebenprodukt während einer Präparation von myelinhaltigen Membranen aufgereinigt und als Protease für das cytosolische *myelin basic protein* (MBP) beschrieben. Zunächst wurde diese Protease als *Mammalian Disintegrin-Metalloprotease* (MADM) bezeichnet (Chantry et al., 1992; Chantry et al., 1989). Weitere Studien zeigten, dass ADAM10 in verschiedenen Geweben von Rindern und interessanterweise auch im menschlichen Gehirn und anderen Organen des Organismus exprimiert wird (Howard et al., 1996; Karkkainen et al., 2000; Marcinkiewicz and Seidah, 2000). Strukturell werden im ADAM10-Protein alle für ADAMs beschriebenen Domänen gefunden, jedoch fehlt die EGF-ähnliche-Domäne (Janes et al., 2005). ADAM10 ist ein Typ-I-Transmembranprotein und wird während des Transports durch den sekretorischen Weg an vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen komplex glykosyliert, wovon die Glykosylierung an Aminosäureposition 278 essentiell für den Transport und die Prozessierung von ADAM10 durch Furin oder die Proproteinkonvertase 7 ist (Anders et al., 2001; Escrevente et al., 2008; Janes et al., 2005; Lopez-Perez et al., 1999; Lopez-Perez et al., 2001). Nach der proteolytischen Abspaltung der Prodomäne ist ADAM10 aktiv und spaltet Substrate in späten Kompartimenten des sekretorischen Weges und reguliert Ektodomänen-*Shedding* an der Plasmamembran (Lichtenthaler, 2011). Zusätzlich zur Rolle als Protease wird ADAM10 wahrscheinlich durch weitere ADAM-Proteasen (ADAM9 und ADAM15) an der Plasmamembran prozessiert. Diese Proteolyse resultiert in der Bildung einer potentiell proteolytisch aktiven Ektodomäne und eines membrangebundenen Fragments, welches nach Intramembranproteolyse durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex freigesetzt wird. Das lösliche intrazelluläre c-terminale Fragment hat möglicherweise Signalfunktion und weist bei Analyse der Aminosäuresequenz mögliche Kernlokalisationsmotive auf (Parkin and Harris, 2009;

Tousseyn et al., 2009). Weiterhin wird im Bereich des C-Terminus von ADAM10 ein Triple-Arginin-Motiv (Aminosäuren:722-724) gefunden, dass bei eingehender Charakterisierung (Deletionsmutanten) den Austritt von ADAM10 aus ER-Bereichen inhibiert (Marcello et al., 2010) (s. Abb. 1). In den Fokus enormen wissenschaftlichen Interesses rückte ADAM10 nach der Identifikation der Protease als APP-spaltendes Enzym (Esch et al., 1990). Eine Steigerung der Spaltung in der Sequenz des Amyloiden Peptids (A $\beta$ ) durch ADAM10 wird als potentieller Ansatz zur Therapie von Morbus Alzheimer diskutiert (Lichtenthaler, 2011).

### Struktur von murinem ADAM10



**Abb. 1: Struktur und Sequenzmotive von murinem ADAM10.**

Das gesamte murine ADAM10-Protein ist ein Typ-I-Transmembranprotein, umfasst 749 Aminosäuren (AS) und kann in verschiedene Domänen unterteilt werden. Im Bereich der Prodomäne und Übergang zur Metalloproteasedomäne befindet sich eine Furin/Proteinkonvertaseschnittstelle (RKKR). Das zinkbindende Metalloproteasezentrum ist für die Funktion von Metalloproteasen essentiell (Struktur modifiziert nach Stryer, Spektrum akademischer Verlag, 2003). Hierbei wird durch eine Base (häufig Glutamatrest) ein Wassermolekül aktiviert, welches als Nukleophil das polarisierte Carbonyl-C-Atom der Peptidkette angreift und somit die Spaltung der Peptidkette einleitet. Zusätzlich befinden sich im Bereich des C-Terminus potentielle Kernlokalisationsmotive (grün) und ein Triple-Arginin-Bereich (rot) (Abbildung modifiziert nach (Endres and Fahrenholz, 2010)).

#### II. 1. 4. Die Alzheimer Erkrankung

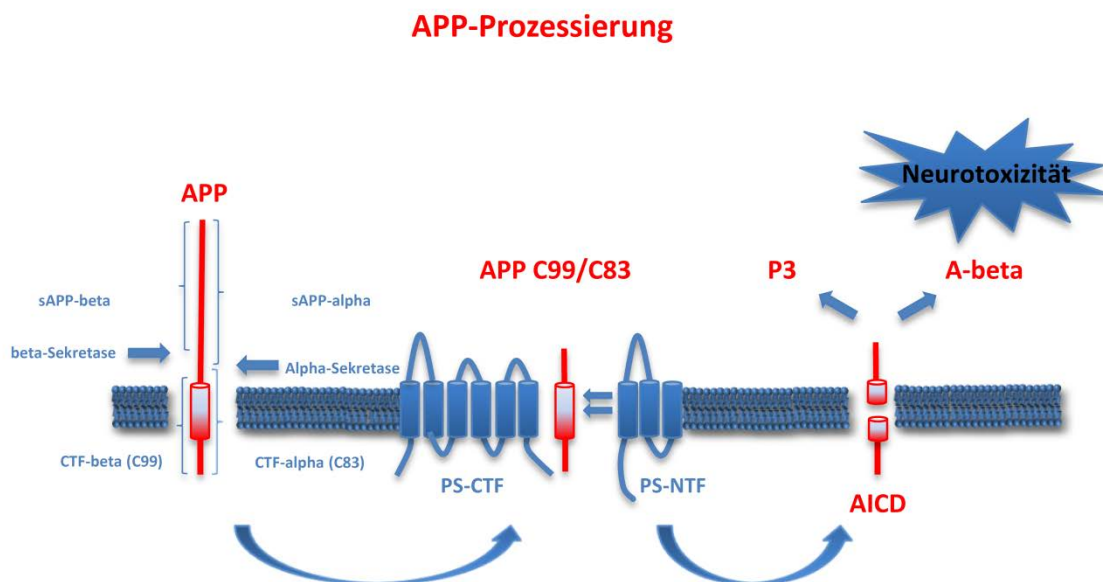
Die Alzheimer Erkrankung (*Alzheimer's disease* (AD)) ist die häufigste Ursache für Demenz und betrifft mehr als 10% der Menschen über 65 Jahren. Klinisch äußert sich die Alzheimer Erkrankung im frühen Stadium durch einen eintretenden Verlust an Erinnerungsvermögen. Im Verlaufe der Erkrankung kommt es zu schweren kognitiven und körperlichen Einschränkungen, die im Durchschnitt innerhalb von 9 Jahren nach Erstdiagnose zum Tod der Patienten führen (Samuels and Davis, 1998). Merkmale der Erkrankungen konnten an post-mortem Analysen humaner AD-Patienten identifiziert werden, die in kognitiv und motorisch

assoziierten Bereichen des Kortex und Hippocampus Läsionen aufwiesen. Zusätzlich kann eine starke Aktivierung des Immunsystems in diesen Hirnarealen bei AD-Patienten festgestellt werden (McGeer and McGeer, 2007). Als Ursache dieser Läsionen wurden senile Plaques angenommen, in denen pathologisch oligomere Formen von prozessierten oder modifizierten Peptiden/Proteinen ( $A\beta$ -Peptide, Tau-Protein) gefunden werden konnten. Die Alzheimer Demenz kann aufgrund verschiedener Ursachen und auch verschiedener Zeitpunkte des Auftretens weiter in *Early-Onset-Alzheimer's Disease* (EOAD) und *Late-Onset-Alzheimer's Disease* (LOAD) unterteilt werden. Mutationen in Genen der *PRESENILINE 1* und 2 (*PS1/2*) und dem *AMYLOID PRECURSOR PROTEIN* (*APP*) konnten als Risikofaktoren für EOAD identifiziert werden (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Jedoch ist dies die weit weniger häufig auftretende Erkrankungsform. Als einer der genetischen Risikofaktoren für LOAD konnte das  $\epsilon 4$  Allel des *APOLIPOPROTEIN E* (*APOE*) identifiziert werden (Corder et al., 1993). Zusätzlich zu genetischen Risikofaktoren konnten auch epidemiologische Ursachen für Morbus Alzheimer festgestellt werden. Beispielsweise werden auch Depression, kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Faktoren (Zigarettenkonsum, hoher Blutdruck, Fettleibigkeit und Diabetes) diskutiert das Risiko, an Alzheimer Demenz zu erkranken, zu erhöhen (Citron, 2010). Trotz intensiver Forschung und Ansätzen zur Analyse der molekularen Ursachen für die Alzheimer Erkrankung, ist es bis zum heutigen Tage nicht gelungen ein geeignetes frühzeitiges, diagnostisches Verfahren oder gar eine wirksame Therapie zu entwickeln (Prox et al., 2012a).

### II. 1. 5. Prozessierung des Amyloiden Vorläufer Proteins (APP)

Als ein auslösender Faktor der Alzheimer Erkrankung wird die „pathologische“, amyloidogene Prozessierung des Amyloiden Vorläufer Proteins betrachtet, welches durch die  $\beta$ -Sekretase und anschließend durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex geschnitten wird. Dies führt zur Freisetzung verschiedener  $A\beta$ -Moleküle, unter denen das  $A\beta_{42}$ -Peptid als pathologisch und Alzheimer-auslösend diskutiert wird (Chow et al., 2010) (s. Abb. 2). Obwohl die APP-Prozessierung durch verschiedene Sekretasen nachgewiesen werden konnte, blieb die Identität der verantwortlichen  $\beta$ -Sekretase lange Zeit unbekannt. 1999 postulierten vier verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Aspartyl-Protease  *$\beta$ -site-APP-cleaving-enzyme* (BACE1) als verantwortliche  $\beta$ -Sekretase (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Später zeigten BACE1-Knockout Mäuse, dass diese Aspartyl-Protease das einzige physiologische Enzym zur Prozessierung des APP-Moleküls an der  $\beta$ -Schnittstelle im Gehirn ist (Cai et al., 2001; Dominguez et al., 2005; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Zusätzlich ließen sich Morbus Alzheimer-assoziierte Symptomatiken (amyloide

Pathologie und kognitive Defekte) durch heterozygote Deletion von BACE1 oder auch RNAi vermittelten Knockdown von BACE1 in Tiermodellen für Morbus Alzheimer verringern (McConlogue et al., 2007; Singer et al., 2005). Jedoch ist BACE1 nicht das einzige Enzym welches zur Prozessierung des APP-Moleküls befähigt ist. Schon im Jahre 1990 beschrieben *Esch et al.* die proteolytische Prozessierung von APP in der Sequenz des A $\beta$ -Peptids durch eine bis zu diesem Zeitpunkt nicht beschriebene Protease, die als  $\alpha$ -Sekretase bezeichnet wurde. Aufgrund der Möglichkeit der nicht-amyloidogenen Prozessierung des APP-Moleküls wurde dieser zur Prozessierung durch BACE1 alternative Weg, als potentieller therapeutischer Ansatz in Erwägung gezogen und intensive Forschung zur Identifizierung der verantwortlichen Protease(n) betrieben.



**Abb. 2: Prozessierung von APP durch verschiedene Sekretasen und Presenilinen.**

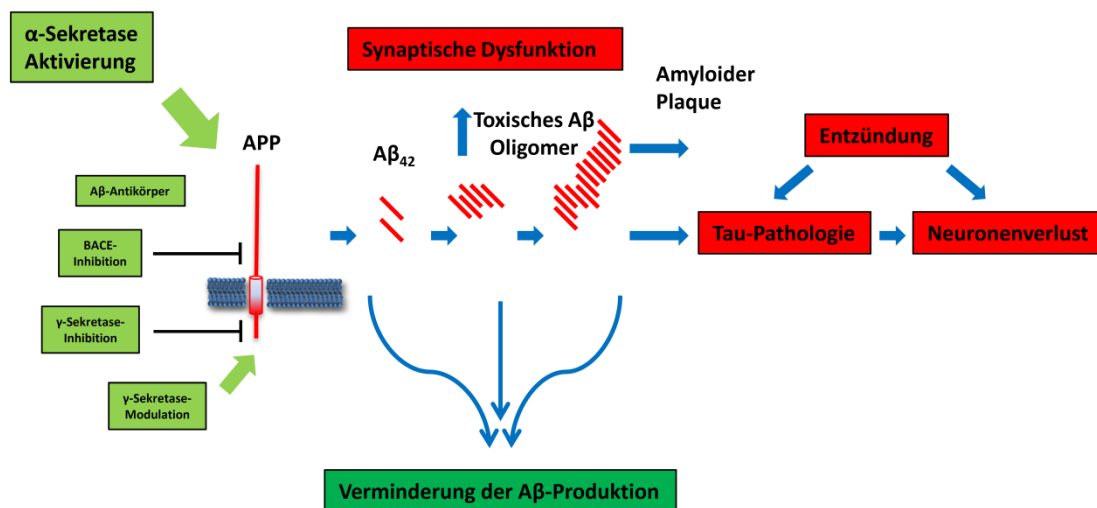
Das Amyloide Vorläufer Protein (APP) kann durch verschiedene Sekretasen ( $\beta$ - und  $\alpha$ -Sekretase) prozessiert werden, wobei sich einerseits ein lösliches (*soluble*, s) APP-beta-Fragment (amyloidogener Weg) oder lösliches APP-alpha-Fragment (nicht-amyloidogener Weg) durch Ektodomänen-Prozessierung entstehen. Die weitere Prozessierung des membrangebundenen Fragments (CTF-beta (C99), CTF-alpha (C83)) führt entweder zur Entstehung des neurotoxischen amyloid-beta Peptids oder zur Entstehung des P3-Fragments. Zusätzlich entsteht durch Intramembranproteolyse, die durch Presenilinen (PS) reguliert wird, ein lösliches intrazelluläres Fragment (*APP-intracellular c-terminal domain* (AICD), das diskutiert wird Signalfunktion zu besitzen. Abkürzungen: c- bzw. n-terminales Fragment (CTF/NTF), (Abbildung modifiziert nach Prox et al., 2012).

### II. 1. 6. Strategien zur Verminderung der A $\beta_{42}$ -Produktion

Seit über zehn Jahren wird durch verschiedene Forschungsansätze versucht in die Prozessierung und Produktion des toxischen A $\beta$ -Peptids einzugreifen und die Entstehung der neuropathologischen Form A $\beta_{42}$  zu verringern.  $\gamma$ -Sekretase-Inhibition war eine der ersten



Strategien zur Modulation der Produktion des A $\beta$ -Peptids *in vitro* und *in vivo*. Presenilin 1 (PS1) wurde als Komponente des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes identifiziert, welches an der Prozessierung der Notch-Rezeptoren beteiligt ist und essentielle Schritte der Entwicklung und Differenzierung im Organismus reguliert (Citron, 2010; De Strooper and Konig, 1999). Hohe Dosen an strukturell unterschiedlichen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren im Tiermodell führten zu drastischen Nebeneffekten, wie beispielsweise der Blockade der T-Zellentwicklung und der Reifung von B-Zellen der Milz (Milano et al., 2004; Wong et al., 2004). Verschiedene kleine Moleküle zur Modulation der  $\gamma$ -Sekretase (*small-molecule  $\gamma$ -secretase modulators*, GSMs) wurden beschrieben die Produktion an A $\beta_{42}$  zu reduzieren und gleichzeitig die Bildung kleinerer A $\beta$ -Moleküle (A $\beta_{40}$ ) zu fördern. Unter diesen befinden sich nichtsteroid-basierte, antiinflammatorische Substanzen (*non-steroidal-antiinflammatory-drugs* (NSAIDs)) wie z.B. Dapsone und Enantiomere von Flurbiprofen. Zusätzlich wird die Freisetzung der intrazellulären Domänen von APP, Notch und ErbB4 nicht beeinflusst, jedoch eventuell die Positionierung des Substrates in der Membran verändert, so dass im Falle von APP vermehrt A $\beta_{40}$  gebildet wird (Jarrett et al., 1993; Kukar and Golde, 2008; Weggen et al., 2001). Die Modulation des Substrates oder des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes stellt eventuell einen spezifischeren Ansatz als die direkte  $\gamma$ -Sekretase-Komplex-Inhibition dar. Weitere Therapieansätze adressieren die Aggregation des A $\beta$ -Moleküls, dessen Entfernung aus betroffenen Hirnarealen und die BACE1-Inhibition. Auch Studien mit dem Einsatz A $\beta$ -spezifischer Antikörper werden durchgeführt, auf die im Detail hier nicht näher eingegangen wird (Citron, 2010) (s. Abb. 3).



**Abb. 3: Mechanismen/Ansätze zur Verringerung der Aβ-Produktion.**

Bei der Prozessierung von APP werden durch die  $\gamma$ -Sekretase verschieden große Fragmente an A $\beta$ -Molekülen gebildet, von denen das A $\beta_{42}$  durch seine Hydrophobizität vermehrt zur Aggregation neigt und toxische Oligomere (rot) bildet. Die Bildung von Oligomeren und später den amyloiden Plaques führen erst zur synaptischen Dysfunktion, eventuell auch zur Tau-Pathologie (Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein), und abschließend zu einem Entzündungsprozess und damit verbundenem Neuronenverlust (rot markierte Textfelder). Verschiedene Strategien zur Verminderung des A $\beta$ -Anteils befinden sich derzeit in der Entwicklung im Tiermodell und auch in klinischen Phasen (Details siehe Text, Abbildung modifiziert nach (Citron, 2010)).

### II. 1. 7. Die Identifikation der $\alpha$ -Sekretase(n)

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Wegen die Produktion von A $\beta_{42}$  zu verringern, bildet auch die Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Proteolyse von APP. Jedoch ist die Identität der verantwortlichen  $\alpha$ -Sekretase *in vivo* noch ungeklärt. Mehrere ADAM-Proteasen (ADAM9, ADAM10, ADAM17 und ADAM19) werden diskutiert, bei Prozessierung des APP-Moleküls an der  $\alpha$ -Sekretaseschnittstelle (nicht amyloider Weg) involviert zu sein (Buxbaum et al., 1998; Hartmann et al., 2002; Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999). Verschiedene klassische, konditionale Knockout-Maus- und transgene, überexprimierende Maus-Modelle sollten Aufschluss darüber geben, welche der *in vitro* beschriebenen ADAM-Proteasen, die relevante(n)  $\alpha$ -Sekretase(n) *in vivo* sein könnte(n). Für ADAM9 konnte mit einem klassischen Knockout-Maus-Modell gezeigt werden, dass die Defizienz dieser Protease zu keinen signifikanten Änderungen der Prozessierung von APP führt (Weskamp et al., 2002). Jedoch konnte für ADAM17 gezeigt werden, dass zumindest unter Stimulationsbedingungen durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in Zellkultur (Fibroblasten), diese Protease an der Prozessierung von APP beteiligt ist (Buxbaum et al., 1998). Jedoch zeigten *in situ* Hybridisierungsanalysen in Mäusen eine sehr geringe Expression von ADAM17 in neuronalem Gewebe (Karkkainen et al., 2000) und zusätzlich führte auch ein lentiviraler

Knockdown von ADAM17 in primären neuronalen Kulturen zu keinerlei Veränderungen in der APP-Prozessierung (Kuhn et al., 2010). Die Analyse der Beteiligung von ADAM10 an der Prozessierung von APP *in vivo* konnte durch ein klassisches Knockout-Maus-Modell nicht eindeutig geklärt werden. Die Mäuse wiesen einen früh-embryonal, letalen Notch-abhängigen Phänotyp auf, sodass die Analyse der Prozessierung von APP in murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF) durchgeführt wurde. Erstaunlicherweise führten diese Experimente zu heterogenen Ergebnissen hinsichtlich der Regulation des  $\alpha$ -Sekretase-Weges durch ADAM10 (Hartmann et al., 2002). Für eine Beteiligung von ADAM10 an der APP-Prozessierung *in vivo* sprach die Überexpression von bovinem HA-markiertem ADAM10 unter Kontrolle eines neuronalen Promoters. In einem Tiermodell für Morbus Alzheimer führte die Überexpression von ADAM10 zur Steigerung der Sekretion von löslichem APPalpha, zu einem verringerten Auftreten an senilen Plaques und zu einer teilweisen Wiederherstellung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse (Postina et al., 2004).

### II. 1. 8. Weitere Substrate von ADAM10 im zentralen Nervensystem

Nach der Identifizierung erster Substrate für ADAM10 und der Generierung ADAM10 spezifischer Knockout-MEFs, wurde eine fast unüberschaubare Anzahl weiterer ADAM10-Substrate identifiziert. Das Substratspektrum umfasst aufgrund der ubiquitären Expression von ADAM10 nicht nur Proteine des zentralen Nervensystems (ZNS), sondern auch weitere Proteine, wie z. B. den Tumor Nekrose Faktor alpha (TNFalpha), den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), das Vaskuläre Endotheliale (VE)-Cadherin, einige Notch-Liganden, CD23 usw. (Reiss and Saftig, 2009), die in unterschiedlichste physiologische und pathophysiologische Prozesse des Organismus involviert sind (Reiss and Saftig, 2009). Viele dieser ADAM10-Substrate wurden anhand von zellulären Modellen, *in vitro* Spaltungsexperimenten synthetischer Peptide und Überexpressionsstudien identifiziert, jedoch ist die physiologische Bedeutung des Ektodomänen-*Sheddings* dieser Substrate *in vivo* noch wenig verstanden und wenig charakterisiert. Zu „spezifisch“ neuronalen ADAM10-Substraten zählen unter anderen, neben APP, einige Mitglieder der Cadherin-Familie (Neuronales (N)-Cadherin,  $\gamma$ -Proto-Cadherin (C3)), L1, Ephrine und Ephrinrezeptoren (Gutwein et al., 2003; Janes et al., 2005; Litterst et al., 2007; Reiss et al., 2006; Reiss et al., 2005) (s. Tab. 1).

**Tab. 1: Auswahl einiger ZNS-Substrate von ADAM10 und ihrer potentiellen Funktion**

Bezeichnung	Funktion	Publikationen
Amyloides Vorläufer Protein (APP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>pathologische Prozessierung durch BACE1 und <math>\gamma</math>-Sekretase-Komplex wird als ein AD-auslösender Faktor diskutiert</li> <li>lösliches APP<math>\alpha</math> beeinflusst neuronale Integrität unter proteasomalem Stress</li> </ul>	De Strooper et al., 1999; Copanaki et al., 2010
N-Cadherin	<ul style="list-style-type: none"> <li>Homophile Interaktion über <math>Ca^{2+}</math>-vermittelte Bindung</li> <li>Interaktion mit <math>\beta</math>-Catenin</li> <li>Proteolyse durch ADAM10/<math>\gamma</math>-Sekretase beeinflusst <math>\beta</math>-Catenin-regulierte Genexpression</li> <li>Proteolyse beeinflusst Modulation der dendritische Dornfortsätze und reguliert postsynaptische AMPA-Rezeptorlokalisierung</li> </ul>	Reiss et al., 2005; Malinverno et al., 2010
$\gamma$ -Proto-Cadherin (C3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>angereichert an Synapsen</li> <li>Regulation von Synapsenbildung und neuronaler Differenzierung</li> <li>Komposition verschiedener Cadherine beeinflusst möglicherweise Synapsenspezifikation</li> </ul>	Reiss et al., 2006
L1-Adhäsionsmolekül	<ul style="list-style-type: none"> <li>beeinflusst neuronale Zell- und Tumorzellmigration</li> </ul>	Gutwein et al., 2003
Ephrin-A2 (Ligand)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proteolyse beeinflusst „Kontakt-Abstossung“ zwischen Eph-Rezeptor und Liganden exprimierenden Zellen</li> </ul>	Hattori et al., 2000
Ephrin-A5 (Ligand)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proteolyse von Ephrin-A5 in trans nach Rezeptorkontakt (EphA3)</li> <li>Cysteinreiche Domäne interagiert mit Ephrin-A5/EphA3 über neues Erkennungsmotiv</li> </ul>	Janes et al., 2005
EphB2 (Rezeptor)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eph-System reguliert die Entwicklung des ZNS und des vaskulären Systems</li> <li>Proteolyse des Rezeptors reguliert Auflösung von Zell-Zell-Kontakten</li> </ul>	Litterst et al., 2007
Prion	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pathogene Isoform (PrP<sup>Sc</sup>) verantwortlich für die übertragbare neurodegenerative Prionerkrankung</li> <li>Prozessierung durch ADAM10</li> </ul>	Altmeppen et al., 2011
Nectin-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Calciumunabhängiges Adhäsionsmolekül</li> <li>Spaltung durch ADAM10 moduliert möglicherweise synaptische Funktion bzw. Plastizität</li> </ul>	Kim et al., 2010

### II. 1. 9. Identifikation von Proteinen zur Regulation von ADAM10

Aufgrund des enormen Substratspektrums von ADAM10 und der teilweisen Überlappung dieses Spektrums mit der eng verwandten ADAM-Metalloprotease (ADAM17), ist für eine detaillierte Charakterisierung der ADAM10-abhängigen proteolytischen Prozesse die Analyse der Regulation, des Transports und der Aktivität des ADAM10-Proteins essentiell (Saftig and

Reiss, 2011). Das *Synapse-associated protein 97* (SAP97) wurde ursprünglich als *Shuttle-Molekül* für Glutamatrezeptoren an postsynaptische Bereiche exzitatorischer Synapsen identifiziert (Gardoni et al., 2003; Mauceri et al., 2004). Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch ADAM10 durch eine über die *Src-Homology* (SH3)-Domäne im C-Terminus vermittelte Bindung an SAP97 bindet und dadurch an die Postsynapse dirigiert wird. Dieser Vorgang wird durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoraktivierung gesteuert und reguliert dadurch auch die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität in Bereichen postsynaptischer Membranen (Marcello et al., 2010). Zusätzlich zeigten Analysen eines Mausmodells bei dem der Transport von ADAM10 durch SAP97 zur Postsynapse blockiert wurde, Phänotypen, die frühe Ereignisse der Alzheimer Erkrankung im humanen Organismus widerspiegeln könnten. Die Interaktion zwischen ADAM10 und SAP97 wurde durch intraperitoneale Injektion eines Peptids aus der prolinreichen Domäne von ADAM10 und des Tat-Pro-Peptids (Tat-Transportersequenz) aus dem HIV-Virus spezifisch unterbrochen, wobei ein Peptid (Tat-Ala-Peptid), bei dem alle Proline durch Alanine ersetzt wurden, als Spezifitätskontrolle diente (Epis et al., 2010).

Weiterhin konnten durch die Analyse der Promotorstruktur des humanen *ADAM10*-Gens Bindungsstellen für *retinoic acid responsive elements* (RAREs) identifiziert werden, die die Expression von ADAM10 als  $\alpha$ -Sekretase regulieren. Funktionelle Studien in Zellkultur konnten zeigen, dass die Zugabe des Vitamin A Metaboliten all-trans Retinsäure (atRA) einen Effekt auf die Expression von ADAM10 auf mRNA- und Proteinebene über die Aktivierung von Retinsäurerezeptoren (RARs) hatte. Die erhöhte Expression von ADAM10 korrelierte auch mit einer Erhöhung der APP-Prozessierung durch den  $\alpha$ -Sekretase-Weg (Holback et al., 2005; Prinzen et al., 2005; Tippmann et al., 2009). Zusätzlich werden derzeit klinische Studien an Psoriasis- und AD-Patienten durchgeführt, in denen therapeutisch Acitretin (synthetisches Vitamin A Analog) eingesetzt wird, um eine Erhöhung der ADAM10-Aktivität über transkriptionelle Regulation zu erreichen. Hierbei wirkt Acitretin nicht direkt auf RARs, sondern atRA wird von *cellular retinoic-binding proteins* (CRAPs) verdrängt und so der Anteil an freier atRA erhöht, was zu einer erhöhten Aktivierung der Retinsäurerezeptoren (RARs) führt (Tippmann et al., 2009).

Die Deacetylierung bestimmter Proteine bietet einen regulativen Mechanismus zur Aktivitätskontrolle beispielsweise von Histonen oder Transkriptionsfaktoren (Bao and Sack, 2010). Die transkriptionelle Aktivität des Retinsäurerezeptors beta (RAR $\beta$ ) und dessen Aktivierung über Deacetylierung wird von der NAD-abhängigen Deacetylase (SIRT1) kontrolliert, was einen direkten Einfluss auf die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität im Tiermodell hatte.

Hirnspezifische Knockout-Mäuse von SIRT1 zeigten bei Kreuzung mit Mäusen eines Tiermodells für Morbus Alzheimer (Überexpression von APP<sup>swe</sup> und PSEN1<sup>dE9</sup>) eine drastische Verstärkung von AD-assoziierten Symptomen (Plaquetbildung und Verhaltensstörungen), die zum Tod der Tiere innerhalb von 3-5 Monaten führten, während der SIRT1-Knockout und die Mäuse des Tiermodells für Morbus Alzheimer ein Alter von 1,5 Jahren erreichten. Zusätzlich zeigte eine transgene Überexpression von SIRT1 im Mausmodell bei Kreuzung mit Mäusen desselben AD-Tiermodells eine deutliche Verringerung der Plaquetbildung und Verminderung der Verhaltensstörungen, was auf eine Aktivierung des  $\alpha$ -Sekretase-Weges der APP-Prozessierung zurückgeführt werden konnte (Donmez et al., 2010).

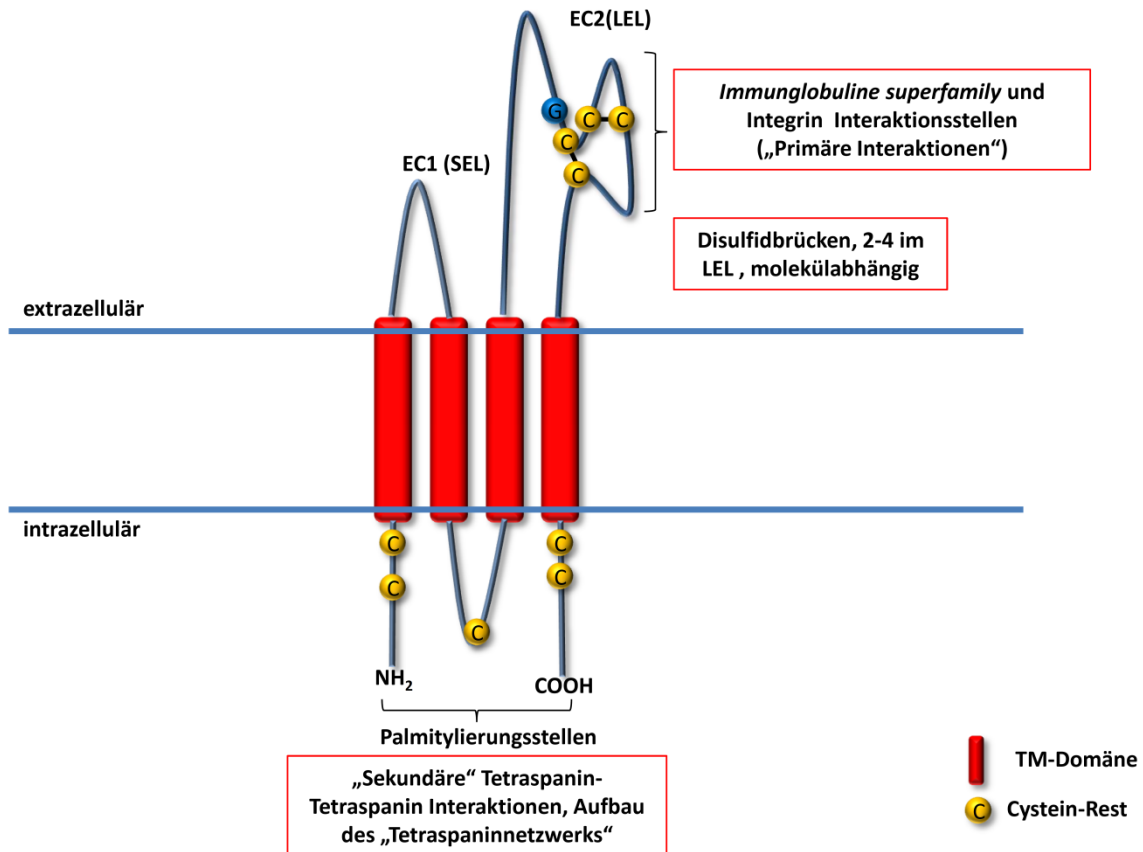
Weiterhin konnten Tetraspanine (TSPAN12, CD9 und CD81) als Modulatoren der ADAM10-Aktivität identifiziert werden, auf die in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen wird.

## II. 2. Tetraspanine: Struktur und Funktion

Tetraspanine bilden eine Familie an multimeren Transmembranproteinen, die vierfach die Membran durchspannen und dadurch strukturell einen kleinen extrazellulären Bereich (*small extracellular loop*, SEL) und einen großen extrazellulären Bereich (*large extracellular loop*, LEL) bilden (Hemler, 2003; Kitadokoro et al., 2001). Der LEL kann weiter in einen konstanten (drei  $\alpha$ -Helices) und variablen Teil unterteilt werden, wobei letzterer für die meisten Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Seigneuret et al., 2001). Intrazellulär besitzen sie kurze n- und c-terminale Domänen, die über potentielle Palmitoylierungsstellen die Interaktion zwischen weiteren Tetraspaninen ermöglichen. Charakteristisch für die Molekülfamilie der Tetraspanine sind konservierte Cysteine im Bereich des LEL, deren Anzahl unter den Tetraspaninen zwischen 4-8 Cysteinen variieren kann. Zusätzlich besitzt der LEL ein konserviertes CCG-Motiv, welches bei allen Tetraspaninen gefunden wird (s. Abb. 4).

Tetraspanine werden in verschiedenen Spezies gefunden, 20 in *C. elegans*, 35 in *Drosophila* und 32 in Säugern. Aufgrund ihres teilweise ubiquitären Expressionsmusters im Organismus und ihrer großen Anzahl sind Tetraspanine an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie z. B. der Zellmigration und Fusion von Zellen. Weiterhin werden Tetraspanine als funktionelle Organisatoren von multimolekularen Membrankomplexen und Signalkomplexen beschrieben, die durch die Integration in das „Tetraspaninweb“ beeinflusst werden (Hemler,

2005). Neueste Untersuchungen zeigen auch, dass Tetraspanine bei der Organisation und Regulation von Membranproteasen eine Rolle spielen. Sie beeinflussen dadurch Prozesse wie „Ektodomänen-*Shedding*“ oder „*RIPing*“-Prozesse (Yanez-Mo et al., 2011).



**Abb. 4: Allgemeine Struktur der Tetraspanine.**

Tetraspanine besitzen vier Transmembrandomänen (TM-Domänen, rot) und bilden dadurch charakteristische extrazelluläre oder luminale Domänen (EC1 oder SEL, EC2 oder LEL). „Primäre“ Interaktionen zwischen Intergrinen und Molekülen aus der *Immunglobuline Superfamily* ermöglicht der LEL. Die Bildung des Tetraspaninnetzwerks über Tetraspanin-Tetraspanininteraktionen wird über Palmitylierungsstellen (Cysteine) im Bereich des N- und C-Terminus erreicht, die auch als „sekundäre“ Interaktionen bezeichnet werden. Charakteristisch für die Proteinfamilie der Tetraspanine ist ein konserviertes CCG-Motiv (blauer Kreis (G), gelbe Kreise (C)) und eine bestimmte Anzahl an Cysteinen im Bereich des LEL (Abbildung modifiziert nach (Hemler, 2005)).

ADAM17 ist eine ADAM-Metalloprotease, die durch die Spaltung von TGFalpha und TNFalpha wichtige Funktionen bei der Entstehung von Tumoren und bei der Regulation inflammatorischer Prozesse einnimmt. Die Regulation dieser *Shedding*-Ereignisse auf molekularer Ebene ist noch wenig verstanden und 2010 wurde erstmals das Tetraspanin CD9 als potentieller Interaktionspartner von ADAM17 an der Zelloberfläche beschrieben. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von ADAM17 mit CD9 bei Überexpression von CD9 zu einer Reduktion ADAM17-vermittelten *Sheddings* führte, was durch Zugabe von CD9-spezifischen Antikörpern verhindert wird. Außerdem zeigte der

Knockdown von CD9 nachfolgend eine erhöhte Aktivität von ADAM17 in Zellkultur (Gutierrez-Lopez et al., 2011). Zusätzlich konnten auch CD9 und CD81 als Interaktoren von ADAM10 identifiziert werden. Diese Interaktion wurde ursprünglich durch die Charakterisierung eines generierten Antikörpers (11G2) beschrieben, der ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDA präzipitierte und CD81 kopräzipitierte. Tryptischer Verdau und nachfolgende massenspektrometrische Analysen identifizierten ADAM10 als präzipitiertes Molekül. Zusätzlich zur Interaktion zeigten Analysen bei Zugabe von CD9 und CD81 spezifischen Antikörpern, dass ADAM10-reguliertes *Shedding* von Substraten (EGF, TNFalpha) in Zellkulturen gesteigert wurde (Arduise et al., 2008). Auch TSPAN12 konnte als Interaktionspartner von ADAM10 identifiziert werden, wobei Analysen ergaben, dass der LEL und Palmitoylierungsstellen die Interaktion beider Proteine beeinflussen. Zusätzlich deuteten erste Ergebnisse auch eine Regulation der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität von ADAM10 an, wobei der Mechanismus der Aktivierung nicht detailliert betrachtet wurde (Xu et al., 2009).

### II. 3. Charakterisierung der ADAM10-Funktion durch *Loss-of-Function*-Modelle

Neben der Identifikation von potentiellen Regulatoren/Interaktoren eines Zielproteins *in vitro* bilden Tiermodelle eine wesentliche Grundlage zur Untersuchung von Proteinen und deren *in vivo* Funktionen. Häufig werden *Loss-of-Function*-Modelle genutzt, um einen ersten Einblick in physiologische Prozesse zu erhalten, die ein Protein steuert oder in die ein Protein involviert ist.

Erste *Loss-of-Function*-Studien zu Kuzbanian (Ortholog: murines ADAM10) wurden in *Drosophila* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Kuzbanian essentiell für die Trennung von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen während der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems von *Drosophila* ist (Rooke et al., 1996). Zusätzlich ist Kuzbanian auch an der Organisation und der Strukturierung von Axonen beteiligt (Fambrough et al., 1996). In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass ein dominant-inaktives, homologes Protein zu Kuzbanian, den Mechanismus der lateralen Inhibition im ZNS, welcher durch die Notch-Signalkaskade gesteuert wird, stören kann (Pan and Rubin, 1997). Ähnliche Notch-assoziierte Phänotypen konnten auch bei der Untersuchung von Sup17 dem Ortholog von Kuzbanian/ADAM10 in *C. elegans* nachgewiesen werden (Wen et al., 1997). Diese *in vivo* Studien und die erste klassische Knockout-Maus von ADAM10 konnten zeigen, dass ADAM10 eine essentielle Rolle bei Entwicklungsprozessen des Organismus einnimmt (Hartmann et al., 2002). Besonders drastisch treten Störungen der Entwicklung neuronaler



Strukturen in Erscheinung, aufgrund dessen in den folgenden Abschnitten die Entwicklung des ZNS bei Säugern eingehender betrachtet wird.

### **II. 3. 1. Die Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS)**

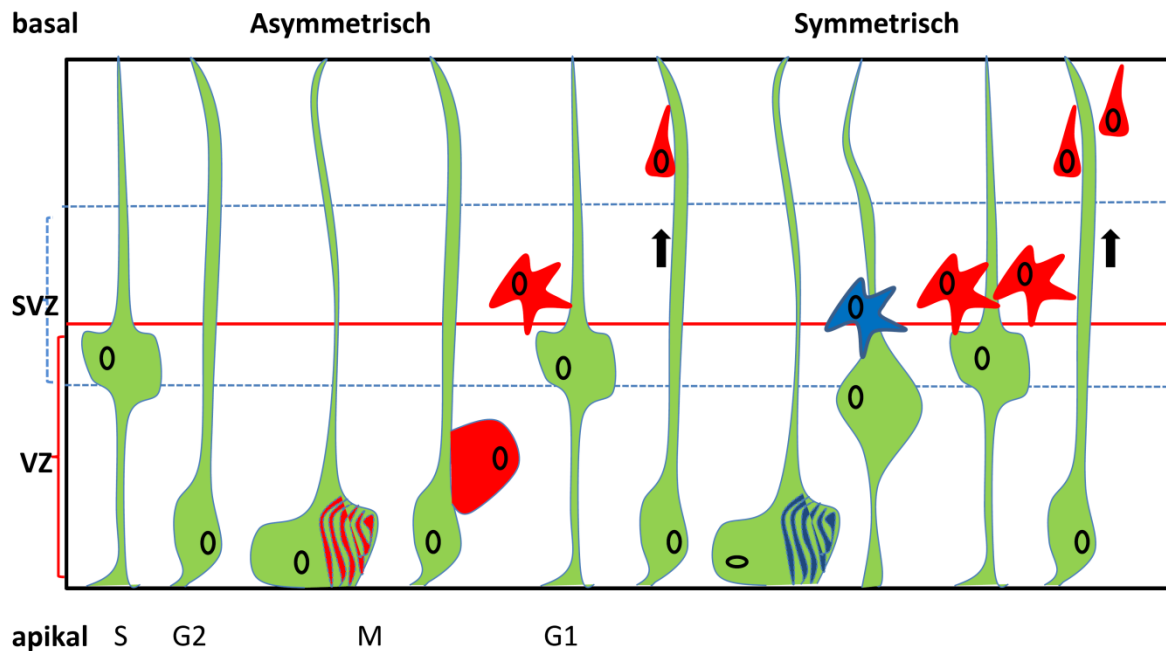
Neueste Modelle zur Entwicklung des ZNS basieren größtenteils auf tierexperimentellen Daten der Maus als Modellorganismus und Ergebnissen aus primären Zellkulturen. Jedoch besitzt der Neokortex (der Neokortex wird nur bei Säugern gefunden) der Maus viele auf alle Säuger zutreffende Funktionen und Eigenschaften, wie z. B. eine sechslagige Organisation und eine Regionalisierung in sensorisch und motorisch assoziierte Bereiche.

Das außerordentlich komplizierte ZNS entwickelt sich während der Gastrulation aus einer Schicht multipotenter, pseudostratifizierter, neuroepithelialer Zellen, die vor der Neurogenese die Neuralplatte und später nach dem Prozess der Neurulation das Neuralrohr bilden. Nach dem Schließen des Neuralrohrs bilden sich die drei primären Hirn-Vesikel (Proencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon). Die Entwicklung des cerebralen Kortex ist einzigartig bei Säugern und relativ konserviert beim Vergleich verschiedener Spezies. Sowohl in Mäusen als auch beim Menschen entstehen Neurone aus dem pseudostratifizierten Neuroepithel an der Grenze zu den embryonalen, cerebralen Ventrikeln (Ayala et al., 2007; Rakic, 1982).

### **II. 3. 2. Neurogenese im Telencephalon**

Neuronale Stammzellen (Neuroepitheliale Zellen) bilden die Grundlage für die Entwicklung des gesamten ZNS, da sie den Ausgangspunkt für die Differenzierung verschiedener neuronaler Zellen (neuronaler Vorläuferzellen, Neurone) und glialer Zellen (Radiale Gliazellen, gliale Vorläufer, Astrozyten und Oligodendrozyten) darstellen. Während der Neurogenese treten verschiedene symmetrisch-proliferative, asymmetrisch-neurogene und symmetrisch-neurogene Schritte der Zellteilung und Differenzierung auf (Gotz and Huttner, 2005; Gotz and Sommer, 2005). Zu Beginn treten symmetrische Zellteilungen auf, bei denen aus einer neuroepithelialen Zelle jeweils zwei Zellen mit identischen Charakteristika gebildet werden. Auf diese Weise wird eine Art Grundpopulation an Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone (VZ) aufgebaut. Diese Grundpopulation weist epitheliale Charakteristika auf und besitzt eine hochpolarisierte Struktur entlang ihrer basalen-apikalen Achse. Zum Zeitpunkt der Bildung von Neuronen transformiert das Neuroepithel in einen Bereich aus mehreren Zellschichten, wobei die Zellschicht, die an das Ventrikel angrenzt auch die meisten Progenitoren enthält (McConnell, 1995a; McConnell, 1995b; Wodarz and Huttner, 2003).

Am Startpunkt der Neurogenese bilden Neuroepithelzellen einen Zelltyp, der sowohl epitheliale als auch astrogliale Charakteristika aufweist. Diese Zellen werden als radiale Gliazellen bezeichnet (Fishell and Kriegstein, 2003; Huttner and Brand, 1997; Kriegstein and Gotz, 2003). Sie bilden eine Gruppe von Vorläuferzellen, die im Laufe der neuronalen Entwicklung die neuroepithelialen Zellen ersetzen. Als Beispiel für die Expression eines charakteristisch neuroepithelialen Proteins wird die Expression des Intermediärfilamentproteins Nestin auch in radialen Gliazellen beibehalten (Hartfuss et al., 2001). Während jedes Zellzyklus bewegen sich die Soma der radialen Gliazellen in der ventrikulären Zone von der apikalen ventrikulären Oberfläche in Richtung basaler Oberfläche, wobei die Zellausläufer an basaler und apikaler Oberfläche verankert bleiben. Durch den Prozess der asymmetrischen Zellteilung werden aus einer radialen Gliazelle sowohl eine weitere radiale Gliazelle als auch eine neuronale Zelle gebildet. Weiterhin können zu Beginn der Neurogenese in der VZ neuroepitheliale Zellen und radiale Gliazellen durch asymmetrische Zellteilung eine gleichartige Zelle und eine basale neuronale Vorläuferzelle (IP, *intermediate Progenitor* oder *basal progenitor (BP)*) bilden (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004)(s. Abb. 5). Basale neuronale Vorläuferzellen entfernen sich von der VZ und bilden zu späteren Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung eine mitotisch aktive Zone, die sogenannte Subventrikuläre Zone (SVZ), in der die Teilung und Differenzierung in zwei gleichartige neuronale Zellen erfolgt. Am häufigsten werden basale Progenitorzellen im Bereich des späteren Telencephalons gefunden (Haubensak et al., 2004).



**Abb. 5: Entwicklung neuronaler Zellen aus radialen Gliazellen in der VZ des sich entwickelnden Kortex.** Die Soma der radialen Gliazellen bewegen sich in der VZ von apikaler zu basaler Oberfläche und zurück. Nuklei sind als schwarze Kreise angedeutet. An der basalen Grenzfläche der VZ befinden sich die Zellen in der Synthese-Phase (S-Phase) und an der Grenzfläche zum cerebralen Vesikel findet die Mitose (M) statt. Neu gebildete Neurone (rot) und Intermediäre Vorläufer (engl. *intermediate progenitor (IP)*) oder basale Vorläufer (engl. *basal progenitor (BP)*) (blau) werden durch asymmetrische Zellteilung gebildet. BP wandern in die Subventrikuläre Zone (SVZ) und teilen sich dort symmetrisch, um zwei postmitotische neuronale Zellen (rot) zu bilden. Der Hauptteil der neu gebildeten neuronalen Zellen wandert radial entlang der Zellausläufer der radialen Gliazellen in Richtung basaler Oberfläche des sich entwickelnden Kortex (Pfeil deutet radiale Migrationsrichtung an), (Abbildung modifiziert nach (Noctor et al., 2004)).

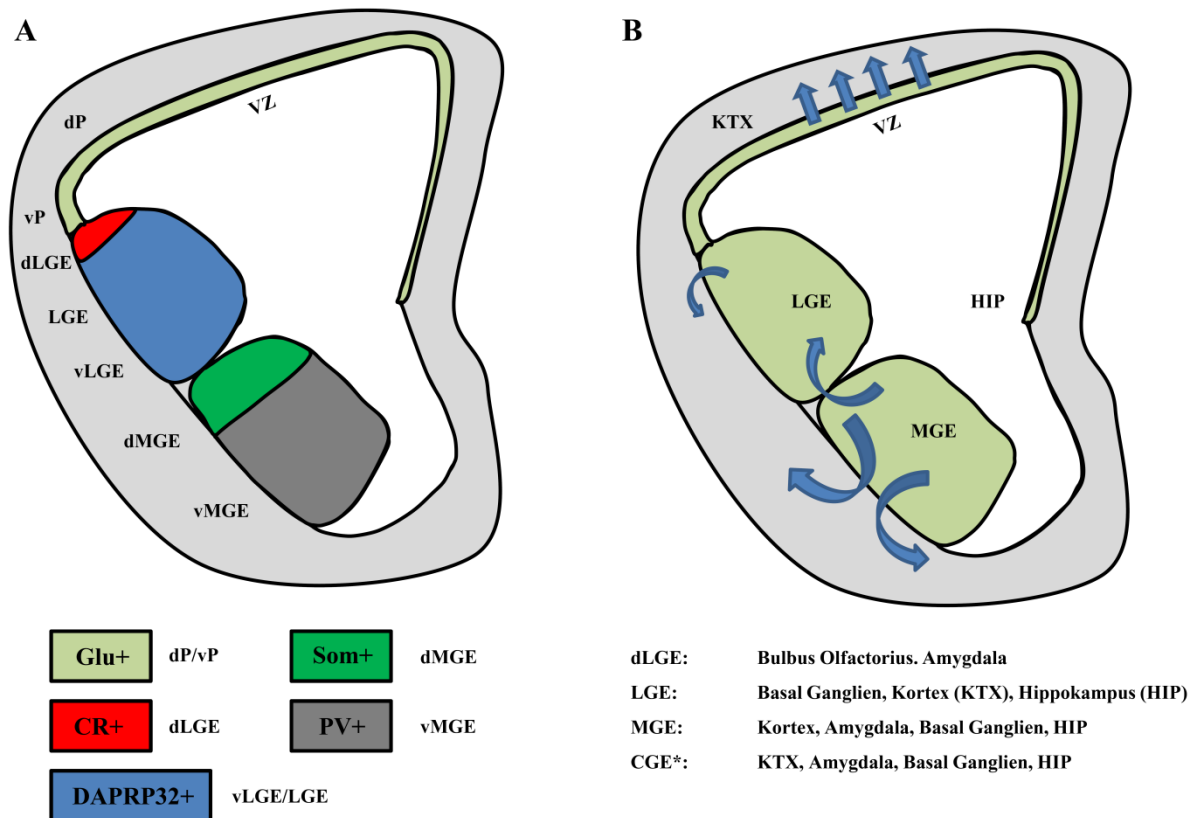
### II. 3. 3. Radiale Migration von Neuronen während der ZNS-Entwicklung

80-90% der kortikalen Neurone entwickeln sich in proliferativen Zonen des dorsalen Telencephalons und bewegen sich, durch einen Prozess der radiale Migration genannt wird, in Richtung ihres Platzes im Kortex. Durch radiale Migration werden hauptsächlich vielfältig geschichtete Bereiche, wie z. B. cerebrale und cerebellare Hemisphären, das Rückenmark, das Striatum und der Thalamus gebildet (Ayala et al., 2007; McConnell, 1995a; McConnell, 1995b). Hierbei nutzen die neu gebildeten Neurone die Zellausläufer der radialen Gliazellen, welche sich orthogonal von der Wand des Neuralrohrs in Richtung pialer Oberfläche spannen, wobei der Kern der radialen Gliazellen im Bereich der ventrikulären Zone angeordnet ist (Kriegstein and Noctor, 2004). Radiale Migration von Neuronen tritt bei der Maus zwischen Embryonaltag E11-E18 auf (Bayer and Altman, 1991). Die erste Welle an neu gebildeten Neuronen bildet an der Oberfläche der cerebralen Vesikel, die Präplatte (PP). Diese sehr früh gebildete Struktur wird an E13 durch die Einwanderung von Neuronen der kortikalen Platte (CP) in zwei Bereiche, die sogenannte Marginalzone (MZ) und die Subplatte (SP),

aufgespalten (Uylings and van Eden, 1990). Zwischen E14-18 werden kontinuierlich Wellen an neuronalen Zellen produziert, die die SP radial passieren und die Schichten der kortikalen Platte bilden. „Neugeborene“ Neuronen bilden die tiefergelegenen Schichten in der Nähe der VZ der kortikalen Platte, während „spätgeborene Neurone“ die darüberliegenden Schichten besetzen, so dass die verschiedenen neuronalen Schichten von innen nach außen gebildet werden (Angevine and Sidman, 1961). Neurone der MZ bilden die erste kortikale Schicht (I), während nach der vollständigen Entwicklung der kortikalen Platte die Zellen der Subplatte degenerieren und der daraus resultierende sechslagige Aufbau (I-VI) des Neokortex bis ins Alter beibehalten wird (Gupta et al., 2002).

#### II. 3. 4. Tangentiale Migration von Neuronen

Obwohl der größte Teil der neugebildeten Neuronen im Kortex durch radiale Migration seinen Platz einnimmt, existieren weitere Formen der Migration im sich entwickelnden ZNS.  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-abhängige Interneuronen und einige Oligodendrozyten entstehen im Subpallium. Durch einen Prozess der tangentialen Migration wandern diese Zellen in verschiedene Bereiche des sich entwickelnden ZNS. Ausgehend von der *medial ganglionic eminence (MGE)* wandern sie in den Neokortex oder den Hippokampus, oder von der *lateral ganglionic eminence (LGE)* in Richtung Bulbus Olfactorius (Kriegstein and Noctor, 2004). Als *ganglionic eminence* wird eine morphologische Struktur bezeichnet, die während der neuronalen Entwicklung verschiedene Subtypen an Neuronen hervorbringt, die in unterschiedlichste Bereiche des sich entwickelnden ZNS wandern. Projektions-Neurone (radiale Migration) werden vermehrt in der ventrikulären Zone gebildet. Hingegen werden GABA-anhängige Interneurone (tangentiale Migration) hauptsächlich in Bereichen der *ganglionic eminence* gebildet ((Ayala et al., 2007), Details zu Subtypen von Neuronen s. Abb. 6). Zusätzlich zu den verschiedenen Bereichen der neuronalen Entstehung, wandern die Neuronen auch zeitlich gekoppelt in unterschiedliche Bereiche des ZNS.



**Abb. 6: Migration und Entwicklung verschiedener Subtypen von Neuronen.**

**A:** Bereiche der Bildung verschiedener neuronaler Zellen: Verschiedene Bereiche der *ganglionic eminence* (GE) bilden die Grundlage zur Bildung unterschiedlicher Neuronensubtypen (glutamat-abhängige Neurone (Glu+, graugrün), calretinin-positive Neurone (CR+, rot), dopamin- und cAMP-phospho-protein (DARPR32+, blau) positive Neurone, somatostatin-abhängige Neurone (SOM+, grün), parvalbumin-positive GABA-abhängige Interneurone (PV+, grau)). \*Aus Gründen der Komplexität wird auf die Darstellung der caudalen *ganglionic eminence* (CGE) verzichtet. Abkürzungen: dorsales/ventrales Pallium (d/vP), dorsale laterale *ganglionic eminence* (dLGE), laterale *ganglionic eminence* (LGE), ventrale laterale *ganglionic eminence* (vLGE), dorsale mediale *ganglionic eminence* (dMGE), ventrale mediale *ganglionic eminence* (vMGE). **B:** Migrationsereignisse während der ZNS-Entwicklung: Aus der ventrikulären Zone wandern neugebildete Neurone radial in Richtung Kortexoberfläche, während neugebildete Neurone aus den Bereichen der *ganglionic eminence* durch tangentielle Migration in verschiedene Bereiche des ZNS migrieren. Regionen der *ganglionic eminence* bilden Neurone, die in verschiedenen Bereichen des ZNS ihre Position finden und Neurone aus der VZ bilden hauptsächlich Zellen der kortikalen Schichten (Abbildung modifiziert nach (Ayala et al., 2007) und (Corbin et al., 2008)).

### II. 3. 5. Molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Neurogenese

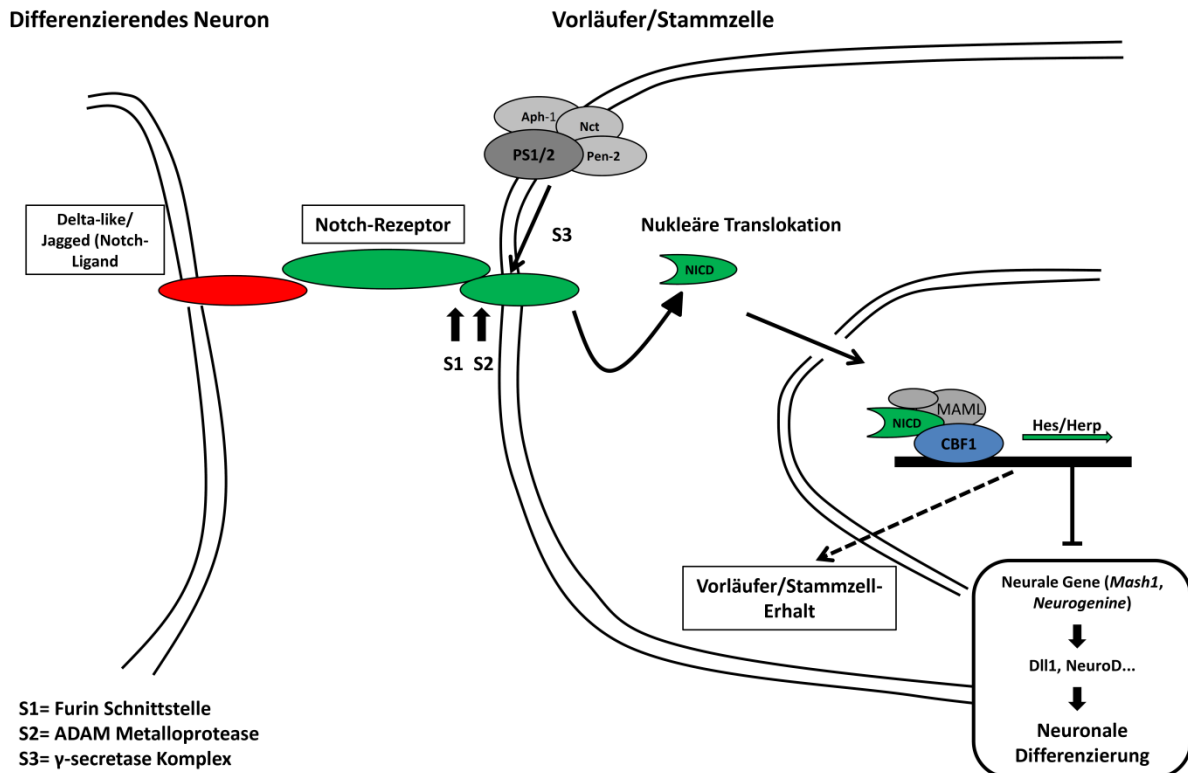
Der Notch-Signalweg ist einer der am besten charakterisierten und am häufigsten bearbeiteten Signalwege. Dieser Signalweg ist funktionell und strukturell bei den verschiedensten Spezies von *Drosophila*, *C. elegans* bis hin zu höheren Wirbeltieren konserviert. In diesen Organismen kontrolliert der Notch-Signalweg eine Vielfalt von Entscheidungen über das Schicksal von Zellen sowie Differenzierungsprozessen in vielen unterschiedlichen Geweben und Organen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung bis hin zum adulten Organismus (Kopan and Ilagan, 2009). Schon 1940 assoziierte Poulson den damals noch unbekanntem Notch-Signalweg mit Entscheidungen über das Zellschicksal durch den homozygoten Verlust

X-chromosomaler Bereiche, der in *Drosophila* einen embryonal letalen Phänotyp zur Folge hatte. Die Notch-Deletion führte zu einer Hypertrophie an neuronalem Gewebe und einem Verlust früher epidermaler Anlagen (Poulson, 1940).

### II. 3. 6. Der klassische Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg reguliert die Zell-Zell-Kommunikation und Differenzierung in Säugern in den verschiedensten Organen durch die Expression eines Notch-Liganden (Delta- und Jagged-Familie) und die Expression eines der vier heterodimeren Notch-Rezeptoren. Sowohl bei Liganden als auch bei Rezeptoren handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Weinmaster et al., 1991; Weinmaster et al., 1992). Die Expression eines der Notch-Liganden auf der signalsendenden Zelle und die anschließende Bindung an den Notch-Rezeptor auf der signalempfangenden Zellen induziert eine Serie verschiedener proteolytischer Prozesse. Durch Ligandenbindung wird als erster Schritt der Aktivierung der Notch-Kaskade, die über  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte, nicht-kovalent-gebundene Ekto-domäne des Notch-Rezeptors gelöst. Anschließend erfolgt die Proteolyse (S2) des verbliebenen, membrangebundenen Fragments (*Transmembran and intracellular domain*, TMIC) durch eine ADAM-Protease. Darauf folgt die Intramembranproteolyse (S3) des *Notch extracellular truncation* (NEXT)-Fragments durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex, was zur Freisetzung der löslichen *Notch intracellular domain* (NICD) führt (Blaumueller et al., 1997; Jarriault et al., 1995; Kopan and Ilagan, 2009; Kopan and Turner, 1996; Mumm and Kopan, 2000; Yoon and Gaiano, 2005). Dieser durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex vermittelte Prozess wird auch als regulierte Intramembranproteolyse („*RIPing*“) bezeichnet (Brown et al., 2000). Anschließend transloziert die NICD in den Nukleus und wandelt einen CBF1, Su(H), Lag1 (CSL1, RBP-Jk)-Repressorkomplex in einen Aktivatorkomplex um, der die Expression der Proteine aus der *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH)-Familie (*Hes*, *Hej*, *Herp*) induziert (Brown et al., 2000; Kopan and Ilagan, 2009; Yoon and Gaiano, 2005) (s. Abb. 7). Durch die Inhibition der Expression proneuraler Gene (*Mash1*, *Neurogenine*) durch die Hes-Proteine wird die Differenzierung einer neuronalen Stammzelle in Richtung neuronaler Zellstadien inhibiert, was auch als laterale Inhibition bezeichnet wird (Simpson, 1990) und somit dem Erhalt einer Stammzellpopulation beispielsweise im Bereich der ventrikulären Zone dient.

### Der klassische Notch-Signalweg



**Abb. 7: Der klassische Notch-Signalweg.**

Nach Ligandenbindung und Entfernung der Ektodomäne des Notch-Rezeptors (grün) durch Endozytose des Liganden-Rezeptor-Komplexes durch das differenzierende Neuron, wird der membrangebundene Teil des Notch-Rezeptors zugänglich für eine Reihe proteolytischer Ereignisse auf der neuronalen Vorläufer/Stammzelle. ADAM-Proteasen vermitteln den S2-Schnitt, dem der S3-Schnitt durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex (Presenilin 1/2 (PS1/2), *Anterior pharynx defective 1* (Aph-1), Nicastrin (Nct), *Presenilin enhancer 2* (Pen-2)) folgt, welcher zur Freisetzung des NICDs von der Membran führt. Nach der Translokation in den Nucleus wird daraufhin ein Transkriptionsrepressor in einen Aktivator-Komplex umgewandelt, der aus CBF1, dem NICD, Mastermind (MAML) und weiteren Proteinen besteht. Das führt zur Expression von Genen der *Hes/Hej*- und *Herp*-Familie, die die Differenzierung in Richtung neuronaler Stadien inhibiert (laterale Inhibition). Die Expression proneuraler Gene wie *Mash1* und der *Neurogenine* wird unterdrückt (Abbildung modifiziert nach (Yoon and Gaiano, 2005)).

#### II. 3. 7. Der Notch-Signalweg in der Neurogenese

Eine der ersten Studien zur Beteiligung des Notch-Signalweges an der Regulation der Neurogenese in Mäusen zeigte in Knockout-Mäusen für *Recombination signal binding sequence for Jk genes* (*RBP-Jk*, *CBF1*) und den *Notch1-Rezeptor* Störungen der neuronalen Differenzierung zu frühen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. Die Embryonen dieser Mäuse zeigten an Embryonaltag 9 eine veränderte Expression an Zielgenen des klassischen Notch-Signalweges (*Hes-5* (hochreguliert), *Mash-1* (reduziert)) und zusätzlich eine erhöhte Expression an neuronalen Differenzierungsmarkern (*Math4a*, *NeuroD*), wobei der Phänotyp der *CBF1*-Deletion drastischere Auswirkungen als die Deletion des Notch1-Rezeptors zeigte.

Dies spricht für teilweise überlappende Funktionen der Notch-Rezeptoren oder für zusätzliche Phänotypen durch Störung der Notch1-4 regulierten Signalwege über RBP-Jk als zentrale Schnittstelle (Conlon et al., 1995; de la Pompa et al., 1997; Swiatek et al., 1994). Die klassischen Knockout-Ansätze führten zur frühen embryonalen Letalität der Mäuse an Embryonaltag 10 (de la Pompa et al., 1997; Yoon and Gaiano, 2005). Weiterhin zeigten klassische Knockout-Mäuse für *Presenilin 1 (PS1)*, einer essentiellen Komponente des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, Störungen der Somitogenese, Skelettveränderungen und Einblutungen im Bereich der Ventrikel und Hirnhäute (Vergleichbar zu *Dll1*-Knockouts (Hrabe de Angelis et al., 1997)) (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). Anhand der hohen Vergleichbarkeit der Knockout-Modelle für *PS1* und verschiedenen am Notch1-Signalweg beteiligten Proteinen wurde vermutet, dass PS1 direkt an der Regulation des klassischen Notch-Signalweges *in vivo* beteiligt ist. Später konnte gezeigt werden, dass die Intramembranproteolyse des Notch1-Rezeptors durch die Substitution von Val1744 durch ein Glycin essentiell für den klassischen Notch-Signalweg ist, da Mäuse mit einer homozygoten Mutation eine Phänokopie der *Notch1-Rezeptor* bzw. *PS1* und *CBF-1*-Mutanten auch im Bereich des ZNS aufwiesen (Huppert et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die konditionale Deletion von *Notch1* unter der Kontrolle des *engrailed 2 promoters* zu frühen Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung (ab Embryonaltag 9) zu einer verfrühten neuronalen Differenzierung des Neuroepithels im Bereich des Vorder- und Hinterhirns führt, was wegen der unvollständigen, neuronalen Differenzierung zur Apoptose und später zu einer Verkleinerung des Cerebellums führt (Lutolf et al., 2002).

Störungen des Notch-Signalweges konnten auch bei konditionaler Überexpression des NICDs unter Kontrolle des *chicken- $\beta$ -actin*-Promotors nachgewiesen werden. Hierbei trat eine Notch-induzierte p53-abhängige Apoptose in neuronalen Vorläuferzellen der ventrikulären Zone auf, die im perinatalen Stadium der Mäuse zu einer Reduktion der MAP2-positiven Neuronenzahl und einer verringerten Größe des Telencephalons führte. Untersuchungen der konditionalen Überexpression des NICDs unter Kontrolle des *Synapsin-1*-Promotors (spezifisch neuronal) und des *CamKII*-Promotors zeigten keine erhöhte Apoptose in postmitotischen Neuronen (Yang et al., 2004).

Neben der Kontrolle der Neurogenese unterliegt auch die Entwicklung glialer Zellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) der Kontrolle des klassischen Notch-Signalweges. Deshalb wird in den folgenden Abschnitten die Funktion und Entwicklung glialer Zellen eingehender betrachtet.



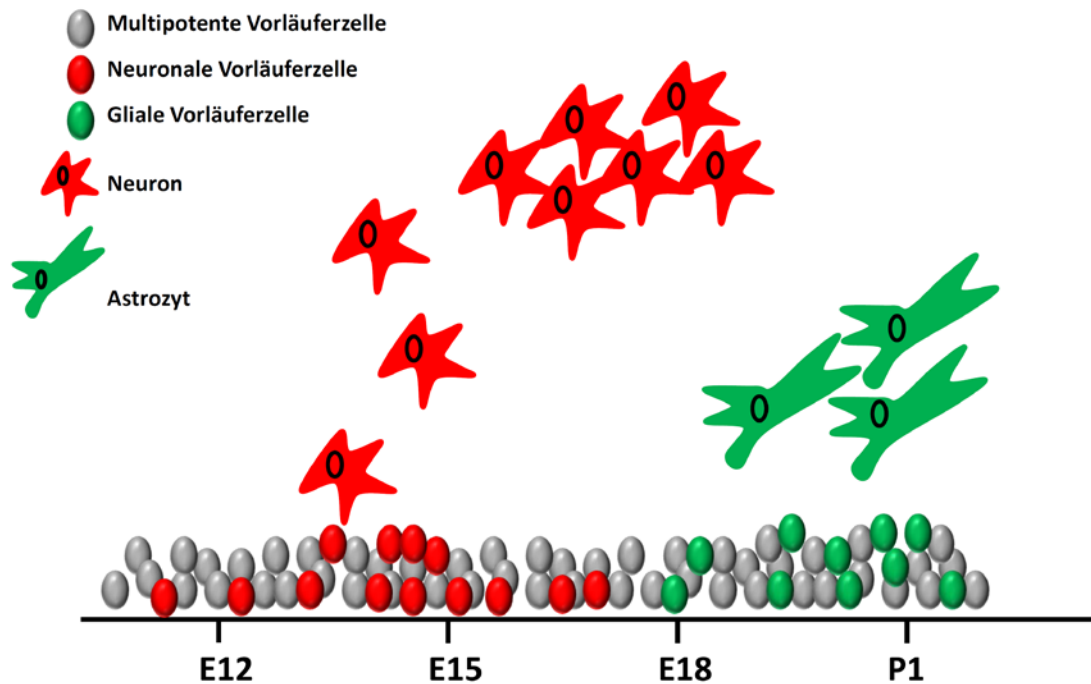
### **II. 3. 8. Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten)**

Gliazellen umfassen verschiedene Subtypen an Zellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) mit unterschiedlichsten Funktionen im zentralen Nervensystem. Astrozyten spielen bei verschiedenen Prozessen der Entwicklung und auch der Funktion des ZNS eine wichtige Rolle, da sie Neuronen mit Metaboliten versorgen, neuronales Überleben und neuronale Differenzierung, Neuritenwachstum und Synapsenbildung beeinflussen (Schipke and Kettenmann, 2004). Ebenso beeinflussen sie die ZNS-Homöostase, die lokalen Konzentrationen an Neurotransmittern und Ionen und kontrollieren zusätzlich den cerebralen Blutfluss (Huang and Bergles, 2004; Metea and Newman, 2006; Schousboe, 2003; Seifert et al., 2006; Wallraff et al., 2006). Untersuchungen im letzten Jahrzehnt deuten zusätzlich daraufhin, dass Astrozyten an der neuronalen Netzwerkfunktion beteiligt sind und nicht wie bis zu diesem Zeitpunkt angenommen, als passive „Versorger“-Zellen betrachtet werden können (Araque and Navarrete, 2010).

Im ZNS bildet kompaktes Myelin die Grundlage für die effiziente und schnelle Übertragung elektrischer Reize durch die Isolierung axonaler Bereiche und durch die Möglichkeit der saltatorischen Reizweiterleitung durch die Ranvier'schen Schnürringe. Oligodendrozyten bilden kompaktes Myelin und bilden um fortlaufende Axone aus mehreren Membranschichten die sogenannte Myelinscheide. Im peripheren Nervensystem findet die Myelinisierung von Axonen der Motorneuronen durch Schwann-Zellen statt (Bear, Connors, Paradiso, Neurowissenschaften, 2009).

### **II. 3. 9. Die Entwicklung von Gliazellen im Vorderhirn**

Während der Entwicklung des ZNS bei Vertebraten werden zuerst Neuronen und als zweite Zellpopulation Gliazellen gebildet. Jedoch werden beide Zelltypen bei niedrigeren Organismen, beispielsweise bei Fruchtfliegen, gleichzeitig gebildet (Bayer and Altman, 1991). Neuronen werden bei Mäusen von E11-E18 gebildet, während Astrozyten zwischen E18 und neonatalen Perioden der ZNS-Entwicklung gebildet werden. Die Bildung von Oligodendrozyten erfolgt erst postnatal. Die zeitliche Kopplung der Entwicklung dieser verschiedenen Zelltypen zeigten auch neuronale Kulturen, da Kulturen von E10-E12 die ersten Tage nur Neurone bilden, gefolgt von einem deutlichen Anstieg der Bildung von Astrozyten und Oligodendrozyten (Bayer and Altman, 1991) (s. Abb. 8).



**Abb. 8: Der Wechsel zwischen Neurogenese und Gliogenese des sich entwickelnden Neokortex.**

Während der Entwicklung des ZNS bei Wirbeltieren findet die Neurogenese zuerst und nachfolgend eine Periode der Gliogenese statt. Neuronen (rot, sternförmig) werden aus multipotenten Vorläuferzellen (grau) oder neuronalen Vorläuferzellen (rot) von E11-E18 gebildet. Astrozyten (grün, sternförmig) werden erst ab E18 aus glialen Vorläuferzellen gebildet (Abbildung modifiziert nach (Miller and Gauthier, 2007)).

### II. 3. 10. Molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Gliogenese

Ein wichtiger Signalweg beim Übergang von der Neurogenese zur Gliogenese ist der Notch-Signalweg. Neuronale Vorläuferzellen und „junge“ Neuronen exprimieren die Notch-Liganden *Jagged1* und *Delta-like-1*, was zur Aktivierung des klassischen Notch-Signalwegs in radialen Gliazellen führt und die Bildung von Astrozyten zu Zeitpunkten nach der Neurogenese fördert (Campos et al., 2001; Miller and Gauthier, 2007; Namihira et al., 2009; Yoon et al., 2008). Wichtige Faktoren bei dieser Umstellung der Differenzierung sind die Hes-Proteine, die proneurale Gene/Proteine inhibieren, und zusätzlich Zytokine die den JAK-STAT-Signalweg aktivieren, welcher zur Demethylierung der Promotoren astrozyten-spezifischer Gene führt (Kamakura et al., 2004). In Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des klassischen Notch-Signalweges essentiell für die Bildung von Oligodendrozyten ist, da Doppel-Mutanten mit Notch-Liganden-Defizienz einen Verlust neuronaler Vorläuferzellen, eine erhöhte Anzahl an Neuronen und einen kompletten Verlust von Oligodendrozyten zeigten. Zusätzlich zeigte die konditionale Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von Notch einen Block der neuronalen Differenzierung und eine gesteigerte Bildung von Vorläuferzellen für Oligodendrozyten im ventralen Teil des

Rückenmarks (Park and Appel, 2003). Weiterhin zeigten Neurosphären, die aus kultivierten neuronalen Stammzellen einer Dll1-defizienten Mauslinie (Hrabe de Angelis et al., 1997) gewonnen wurden, Defekte hinsichtlich astrozytenspezifischer Differenzierungsprozesse und präferentiell mehr Bildung MAP2-positiver Neurone. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung Dll1-defizienter Neurosphären in Medium mit löslichem Jagged1 ( $J1^{EC}$ ) eine Verschiebung in Richtung astrozytenspezifischer Differenzierung zur Folge hatte (Grandbarbe et al., 2003). Auch die retrovirale Infektion von Zellen des murinen Vorderhirns vor Beginn der Neurogenese mit einer modifizierten intrazellulären Domäne von Notch1 (NIC) hatte die vermehrte Bildung radialer Gliazellen und später GFAP-positiver Astrozyten zur Folge (Gaiano et al., 2000). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der aktivierte klassische Notch-Signalweg eine zentrale, regulative Schaltstelle ZNS-spezifischer Differenzierungsprozesse darstellt und dem Erhalt neuronaler und oligodendrozyten-spezifischer Vorläuferzellen dient und zu späteren Zeitpunkten der ZNS-Entwicklung die Bildung von Astrozyten fördert.

#### II. 4. Aufbau, Funktion und Modulation von Synapsen

Neben der Differenzierung verschiedener neuronaler und glialer Zellpopulationen, sind der Aufbau und die Modulation von Synapsen zur Aufrechterhaltung der Funktion des zentralen Nervensystems essentiell. Synapsen im ZNS sind spezialisierte Bereiche von Zell-Zell-Kontakten, die dem Informationsaustausch zwischen Neuronen dienen. In neuronalen Netzwerken bilden Synapsen Schlüsselstellen zur Regulation neuronaler Aktivität, durch unterschiedliche Multiprotein-Komplexe in prä- und postsynaptischen Bereichen. Die Bildung von Synapsen erfordert die Zusammenlagerung von Proteinkomplexen aus Rezeptoren, Signalmolekülen und Gerüstproteinen (Li and Sheng, 2003; Waites et al., 2005). Auf der präsynaptischen Seite der Synapse modulieren Proteine (Beispielsweise: SNARE-Proteine, SNAP-25 und Synaptophysin) Vesikelfusion und Vesikelrecycling, zur Kontrolle der Freisetzung und Aufnahme von Neurotransmittern (Halim et al., 2003). Auf der postsynaptischen Seite befinden sich Bereiche besonders hoher Elektronendichte (*post-synaptic-density*, PSD) an der Grenze zum synaptischen Spalt der dendritischen Dornfortsätze, die ursprünglich in elektronenmikroskopischen Analysen identifiziert wurden. Bestandteile der PSD sind Rezeptoren ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazolpropionsäure- (AMPA), N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und Ephrinrezeptoren), Zelladhäsionsmoleküle (N-Cadherin, Proto-Cadherine und Neuroligine), Signalmoleküle (Calcium-Calmodulin-abhängige Kinasen (CamKII) und Phosphatasen), Gerüst- und

Adaptormoleküle (PSD95, SAP102 und SAP97), Zytoskelettproteine (Aktin), Motorproteine und Proteine zur Regulation des Zytoskeletts, die durch Integration in die Membran oder auch Assoziation an Proteine der Membran und Membranbereiche die Funktion der Synapse regulieren (Halim et al., 2003; Jordan et al., 2004; Peng et al., 2004; Yoshimura et al., 2004).

Nach Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt bindet der Neurotransmitter an glutamatabhängige Rezeptoren/Kanäle (NMDA und AMPA) an der postsynaptischen Oberfläche, was eine Öffnung der Kanäle und einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Ionen in die dendritischen Dornfortsätze und eine Depolarisierung der Membran zur Folge hat. Eine Depolarisierung hat strukturelle und funktionelle Änderung an der Prä- und Postsynapse zur Folge, die die Effektivität der Synapse bei erneuter Erregung steigert. Dieser Prozess wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet und kann weiter in Kurzzeit-LTP (unabhängig von Gentranskription) und Langzeit-LTP (Gentranskription, Dauer: Stunden-Wochen) unterteilt werden. Teilweise wird die LTP durch Kinasen (CamKII und Protein-Kinase-C (PKC)) reguliert, die nach Einstrom von Calcium in postsynaptische Bereiche aktiviert werden (Sweatt, 1999). Bei der LTP ändert sich beispielsweise die Rezeptorzusammensetzung an der postsynaptischen Membran, der Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren (AMPA), die Oberfläche des dendritischen Dornfortsatzes und auch die Ausschüttung der Menge an Neurotransmitter an der präsynaptischen Membran (Malenka, 2003; Stanton et al., 2005). Viele dieser Prozesse werden durch Proteine oder auch Proteinkomplexe der PSD reguliert und Störungen der Zusammensetzung haben signifikante Einflüsse auf die Funktion glutamatabhängiger Synapsen (Dalva et al., 2007).

Einen ersten Einfluss von ADAM10 auf die Funktion von Synapsen konnten Untersuchungen zeigen, bei denen der postsynaptische Transport von ADAM10 durch SAP97 spezifisch blockiert wurde (s. Abschnitt I.1.9.). In *Triton-Insoluble-Fraction* (TIF)-Präparationen einer hippocampalen Neuronenkultur zeigte sich, dass bei Inhibition des postsynaptischen Transports von ADAM10, das ungeschnittene N-Cadherin-Protein (*Full length*, FL) bei Pro-Peptid-Behandlung signifikant akkumulierte. Zusätzlich bewirkte die N-Cadherin-FL-Akkumulation *in vivo* eine Erhöhung der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors in TIF-Präparationen bei intraperitonealer Injektion des Pro-Peptids im Vergleich zum Ala-Peptid. Weiterhin wurde eine Vergrößerung der dendritischen Dornfortsätze hippocampaler Neurone und ein veränderter AMPA-Rezeptor-Strom beobachtet, wodurch gezeigt werden konnte, dass ADAM10, als Metalloprotease, wichtig für die Modulation glutamatabhängiger Synapsen ist (Malinverno et al., 2010).

### III. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion von ADAM10 durch die Generierung konditionaler Knockout-Maus-Modelle im murinen zentralen Nervensystem (ZNS) *in vivo* zu charakterisieren. Aufgrund der frühen embryonalen Letalität des klassischen Knockouts für ADAM10 war die Isolierung primärer Zellen eingeschränkt und die Charakterisierung der ADAM10-Funktion im adulten Organismus nicht möglich. Zusätzlich wurden viele ADAM10-Substrate durch Peptidspaltungsexperimente, Knockout-Fibroblasten und Überexpressionsstudien identifiziert, jedoch konnte die physiologische Relevanz des Ektodomänen-*Sheddings* und die Funktion der verschiedenen gebildeten Fragmente *in vivo* nicht überprüft werden. Zur Analyse der Funktion von ADAM10 im ZNS sollte eine konditionale Mauslinie etabliert werden, deren Cre-Rekombinase-Expression unter der Kontrolle des Ratten-Nestin-Promotors steht. Hierbei sollte die Deletion von ADAM10 zu einem frühen Zeitpunkt der embryonalen ZNS-Entwicklung (ca. Embryonaltag 10) in Neuroepithelzellen und neuronalen Vorläuferzellen induziert werden. Anschließend sollte eine Charakterisierung des Phänotyps Mutanten unter Verwendung verschiedener histologischer, protein-biochemischer, molekularbiologischer und zellkulturbasierter Techniken erfolgen.

Als weiterer Fokus dieser Arbeit sollte die Charakterisierung der ADAM10-Funktion im adulten ZNS der Maus erfolgen. Hierzu sollten konditionale Knockout-Mäuse unter der Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors (postnatal aktiv) generiert und der Phänotyp der Mäuse charakterisiert werden. Die Analyse der Mausmutanten sollte Aufschluss darüber geben, welchen der *in vitro* beschriebenen ADAM10-Substrate und deren Spaltung *in vivo* eine Funktion zugeordnet werden kann. Gleichzeitig sollte aufgeklärt werden zu welchen Zeitpunkten Substrat-Spaltungsereignisse durch ADAM10 im murinen Organismus von Bedeutung sind.

Zusätzlich sollte aufgrund des enormen Substratspektrums von ADAM10 und seiner ubiquitären Expression eine Interaktionsstudie durchgeführt werden, um neue Interaktionspartner bzw. putative Regulatoren zu identifizieren. Hierbei sollte ein *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid*-System verwendet werden, das spezifisch zur Interaktionsanalyse von Membranproteinen geeignet ist.

## IV. Material und Methoden

### IV. 1. Geräte

**Tab. 2: Liste der verwendeten Geräte**

Geräte	Gerätebezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Agarosegelkammer	Modell H5	Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, US
Agarosegeldokumentations- anlage	Gel Jet Imager UV System	Intas, Göttingen D
Analysenwaage	Kern 770	Kern & Sohn, Dürrewangen, D
Autoklav	Tecnomara	Integra Bioscience, Fernwald, D
Brutschrank	Memmert Modell 200	Memmert, Schwabach, D
Chemilumineszenzdetektions- system	LAS3000 Mini LAS4000	GE Healthcare, München, D
Durchflusszytometer	FACS-Canto™	BD-Biosciences, Heidelberg, D
Elektroporationsgerät	Pulse Controller Gene Pulser	BioRad, München, D
Feinwaage	L420P	Sartorius AG, Göttingen, D
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Homogenisator	Precellys	Peqlab, Erlangen, D
Inkubatoren (Hefe)	Multitron Standard Inkubator Serie B	INFORS-HAT Bottmingen, CH Binder, Tuttlingen, D
Konfokales Laserscanning Mikroskop	FV1000	Olympus, Hamburg, D
Lichtmikroskope	CKX41 SZ61	Olympus, Hamburg, D
Magnetrührer	IKAMAG RCT, REO	IKA, Staufen, D
Mehrkanalpipette	200 µl / 300 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikropipetten	10 µl 100 µl 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D Gilson, Limburg-Offheim, D Gilson, Limburg-Offheim, D
Mikrowellenherd	NN-E245W	Panasonic, Hamburg, D
Mini/Midi-Inkubator	Multitron II	INFORS-HAT, Sulzemoos, D
Multifunktionsplattenreader	Synergy HAT	BioTek, Bad-Friedrichshall, D
PCR-Cycler	GenAmp 2400 PCR Gene AMP PCR 9700 T-Gradient	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, D Applied Biosystems, Darmstadt, D Biometra, Göttingen, D

<b>Geräte</b>	<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Krick, Langensfeld, D
Pipetboy	acu	Integra Bioscience, Fernwald, D
Pipetboy	Easyjet	Eppendorf, Hamburg, D
Reinstwasseranlage	Milli-Q Plus	Millipore, Schwalbach D
Rollator	RM5	Karl Hecht KG, Sondheim, D
Real-Time PCR Cycler	Light-Cycler 480 II 7900HT Fast Real time PCR System	Roche, Mannheim, D Applied Biosystems, Darmstadt, D
SDS-Page Kammer	Mini-ProteanII™ XCell SureLock™ Mini Cell	BioRad, München, D Invitrogen, Karlsruhe, D
Spannungsquellen	Powerpack 200/300	BioRad, München, D
Sterilbank	VFR1806	CLAUS DAMM A/S, Allerød, DK
Tank-Blot-System	Criterion™	BioRad, München, D
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Tischkühlzentrifuge	Fresco21	Thermo Fisher, Schwerte, D
Tischzentrifuge	EM 900	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson, Dietzenbach, D
Ultrazentrifuge	Optima TLX J2-HS	Beckman, Fullerton, USA Beckman, Fullerton, USA
UV-Tisch	Reprostar	Lamag, Berlin, D
Vortexer	Vortex Genie	Bender & Hobein, Bruchsaal, D
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel, D
Zellkulturinkubator	HeraCell240	Heraeus, Hanau, D
Zellkulturmikroskop	T1-SNCP	Nikon, J
Zellzählsystem	CASY®	Roche, Mannheim, D

## IV. 2. Labor- und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 3: Liste der verwendeten Labor- und Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Bechergläser	Roth, Karlsruhe, D
Cryo-Gefäß, 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Deckgläser	Assistent, Sondheim, D
Einmalkantülen	Becton Dickinson, Heidelberg, D

<b>Material</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Einmalküvetten (REF 67.742)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalpipetten (verschiedene Volumina)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalspritzen (verschiedene Volumina)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen, D
Entsorgungsbox	Sarstedt, Nümbrecht, D
Erlenmeyerkolben	Roth, Karlsruhe, D
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filter Tips Biosphere® (verschiedene Volumina)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Glasfibre Prefilter	Sartorius, Göttingen, D
Handschuhe, Latex, Nitril	Roth, Karlsruhe, D
6-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
12-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Maustransportboxen (verschiedene Größen)	Express House, Birmingham, UK
Messzylinder	Roth, Karlsruhe, D
Multisafe, 2,31	Sarstedt, Nümbrecht, D
Nitrozellulosemembran	Roth, Karlsruhe, D
Objektträger	Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
Objektträger Superfrost®	Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
Parafilm	American National Can, Greenwich, UK
Pasteurpipetten	Assistant, Sondheim, D
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Stripes, Multiply µStrip 8er	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pinzette, INOX 2	FST, Heidelberg, D
Pinzette, INOX 7	FST, Heidelberg, D
Pinzette, Dumont 5	FST, Heidelberg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Präparationsschere (Nr. 15000-04)	FST, Heidelberg, D
Präparationsschere (Nr. 14001-12)	FST, Heidelberg, D
Präparationsschere (Nr. 14084-08)	FST, Heidelberg, D
Präparationsschere (Nr. 14060-09)	FST, Heidelberg, D
PVDF-Membran Immobilon P	Millipore, Schwalbach, D



<b>Material</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße für Ultrazentrifugation	Beckman, Fullerton, US
Rotilabo Spritzenfilter PFTE (25 mm)	Roth, Karlsruhe, D
Sterile Plastikröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzenaufsatz, Microlance (verschiedene Stärken)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Chirurgischer Skalpell	Aesculap, Tuttlingen, D
Timer, DigiLock	Roth, Karlsruhe, D
Tissue Box	Roth, Karlsruhe, D
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, D
Whatman-Papier	Roth, Karlsruhe, D
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D

### IV. 3. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Grundchemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von folgenden Herstellern bezogen:

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Merck KGaA , Darmstadt, D

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Invitrogen, Karlsruhe, D

Fermentas, ST-Leon-Rot, D

**Tab. 4: Liste der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid, Rotiphorese	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Lonza, Köln, D
Ampicillin	Melford Laboratories, Chelworth, UK
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, D
AraC	Fluka, Buchs, CH
B27-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, US
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, D
DAB (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DABCO (1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octan)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DMEM, High Glucose	PAA, Laboratories, Linz, A
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg, D
DNA-Leiter (100 bp, 1 kb)	Roche, Mannheim, D
DNA-Polymerasen (Taq, Pfu)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNase	Roche, Mannheim, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate (NTPs) (2mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Enhance™	Perkin Elmer, Rodgau-Jügeheim, D
Eosin	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ethanol 99,8% p.a.	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Eukitt	Sigma Aldrich, Steinheim, D
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Rockford, US
Fötales Kälberserum (FKS, FCS)	PAA, Laboratories, Linz, A
Fugene® HD Transfektions Reagenz	Roche, Mannheim, D
Glukose	Sigma Aldrich, Steinheim, D
GlutaMAX™	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim, D

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt, D
Hämatoxylin nach Harris	Roth, Karlsruhe, D
Inhibitor X	Merck, Darmstadt, D
Ionomycin	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
6x-Ladepuffer, Agarosegele	Fermentas, St-Leon-Rot, D
Lipofectamin2000®	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, D
MEM	Invitrogen, Karlsruhe, D
2-Mercaptoethanol (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Methanol (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol	Calbiochem, LaJolla CA, US
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, D
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen, Seelze, D
Neurobasalmedium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs, CH
Penicillin/Steptomycin	PAA-Laboratories, Linz, A
Pepstatin A 100x	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Perhydrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ponceau S-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St-Leon-Rot, D
Protein G-Agarose Beads	Pierce, Rockford, US
Restriktionsenzyme	Fermentas, St-Leon-Rot, D

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
[35S]-Methionin/Cystein	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Streptavidin Sepharose Beads	Thermo Fisher Scientific, Rockford, US
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Tetrazyklin	Merck, Darmstadt, D
Tissue-Tek®	Weckert Labortechnik, Kitzingen, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Turbofect® Transfektions Reagenz	Fermentas, St-Leon-Rot, D
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Xylol	SDS, Peypin, F
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, D

#### IV. 4. Kits

**Tab. 5: Liste der verwendeten Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Amyloid-beta (1-42) ELISA (mouse/rat)	IBL, Hamburg, D
BCA-Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, US
DNA-Extraktionskit	Analytik Jena, Jena, D
Dual Membrane Kit	MoBiTec, Göttingen, D
ECL Advanced/Plus Western Blot Detection Kit	GE Healthcare, München, D
High Pure PCR-Purification Kit	Roche, Mannheim, D
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim, D
Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St-Leon-Rot, D
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St-Leon-Rot, D
sAPPalpha ELISA Kit (mouse/rat)	IBL, Hamburg, D
Universal Probe Library	Roche, Mannheim, D

## IV. 5. Oligonukleotide/Primer

Tab. 6: Liste der verwendeten Oligonukleotide/Primer

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
pFROG-h	GAGAACCCACTGCTTACTGG
pF3r	GAGACTCCATTCGGGTGTTCT
CamKII Cre f.	ATGCGCTGGGCTCTATGGCTCTG
CamKII Cre r.	TGCACACCTCCCTCTGCATGCACG
LoxP f.	ATGGATTGCCCTTTTATGTATTTA
LoxP r.	GCCGATGTGCCAGATGAGTG
Nestin Cre f.	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
Nestin Cre r.	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
Bri2-nterminal-myc f.	TGCCAAGCTTACGCCACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGA GGATCTGGTGAAGGTGACGTTCAA
Bri2-nterminal-myc r.	GATCGGATCCTCAAGAACAAATTAAGTCTCCAC
Bri2 f.	ACCCATGGTTGAAGGTGACGTTCAAC
Bri2 r.	GGGATCCAGAACAAATTAAGTCTCCACAG
TSPAN3 f.	ACCCATGGGCCAATGCGGCATCAC
TSPAN3 r.	GGGATCCCGCGTAGGTTCCGCCAGTG
TSPAN15 f.	ACCCATGGCTCGCGGGGACTCG
TSPAN15 r.	CGGATCCATCGGGATAGCACAGGCAGC
TSPAN15 m f. sequencing	GTACCATGACTGCAGCGCCCCCGGGCCCCT
A10-Bait f.	ACGCCATTACGGCCAAAAATGGTGTGCCGACAGTGTTAATTC TGCTCCTCTCC
A10-Bait r.	GCCTTTGGCCGAGGCGGCCCTGCGTCGCATGTGTCCATTTGAT AACTTTCTCGGGG
A15 (UPL)	AGCACAGGAATGTCAAGAAA
A15 (UPL) r.	TTGAGCTGGGTCATGCAGT
A10 (UPL)	CTGTACAGCAGGGTCCCTTGAC
A10 (UPL) r.	GGGAAGAAATGCAAGCTGAA
A17 (UPL)	CTTTGGTGCCTTTCGTCT
A17 (UPL) r.	GAGCAAAGAATCAAGCTTCTCAA
A9 (UPL)	TCCGGCAGTGAGTACAAGAA
A9 (UPL) r.	GCATTGAAGCTTCCACACA
TSPAN12 (UPL)	AACTGGCTTGCGGTGTGT
TSPAN12 (UPL) r.	TCAAAGTAACCATATCTGACCACTG

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
A10 (qRT-PCR)	Mm00545742_m1 (Applied Biosystems)
T15 (qRT-PCR)	Mm01150417_m1 (Applied Biosystems)
GAPDH (qRT-PCR)	Mm99999915_g1 (Applied Biosystems)
Hes1 (qRT-PCR)	Mm00468601_m1 (Applied Biosystems)
Hes5 (qRT-PCR)	Mm00439311_g1 (Applied Biosystems)
Hey1 (qRT-PCR)	Mm00468865_m1 (Applied Biosystems)
Hey2 (qRT-PCR)	Mm00469280_m1 (Applied Biosystems)

## IV. 6. Antikörper

**Tab. 7: Liste der verwendeten Antikörper**

Bezeichnung/Produkt Nr.	Spezifität	Spezies	Hersteller/Quelle	Anwendung
Pin-1	m ADAM10	Kaninchen, monospezifische IgG- Fraktion	Pineda, Berlin, D	WB (1:1000), IF (1:500)
B42.1	m ADAM10	Kaninchen, polyklonales Serum	Wim Aennert, Leuven, B	WB (1:10000)
11G2	h ADAM10	Maus, monoklonal IgG1	Gen-Probe, San Diego, US	IF (1:300)
Mab946	m ADAM10	Ziege, totale IgG- Fraktion	R&D-Systems, Wiesbaden, D	FACS (1 µg/10 <sup>5</sup> -Zellen), IF (1:500)
610921	h, m, c, N-cadherin	Maus, monoclonal IgG1	BD-Transduktion Laboratories, Heidelberg, D	WB (1:2500)
Pom-1	m Prion	Maus, monoklonal	A. Aguzzi, Zürich, CH	WB (1:1000)
B63.3	m, h APP	Kaninchen, polyklonales Serum	Wim Aennert, Leuven, B	WB (1:5000)
NMDAR-2A/B	h, r, m, Ratte	Kaninchen, polyklonal	Millipore, Schwalbach, D	WB (1 µg/ml)
GFAP	m GFAP	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich, Steinheim, D	WB (1:2500), IHC
9B11	c-myc	Maus, monoklonal	Cell Signaling, Danvers, US	WB (1:2500), IF (1:1000)
A2066	h, m Aktin	Kaninchen, polyklonal	Sigma Aldrich, Steinheim, D	WB (1:2500)

Bezeichnung/Produkt Nr.	Spezifität	Spezies	Hersteller/Quelle	Anwendung
FL-335	h, m GAPDH	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	WB (1:2500)
mN1A	m Notch1	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich, Steinheim, D	WB (1:1000)
Ab8925	m, h NICD	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	WB (1:500)
PDI	m, h PDI	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	IF (1:300)
H68.4	h, m TFR	Maus, monoklonal	IB Life Technologie GmbH, Darmstadt, D	WB (1:1000)
Nectin-1	m Nectin-1	Kaninchen, polyklonal	Howard Federoff	WB (1:1000)
HM-2	m MAP2	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich, Steinheim, D	IF (1:300)
GFAP	m GFAP	Kaninchen, polyklonal	DaKo, Hamburg, d	IF (1:500), IHC
Ab16667	h, m, Ratte Ki67	Kaninchen, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	ICH
S5768	m Synaptophysin	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich, Steinheim, D	WB (1:500), ICC
135303	m VGLUT1	Kaninchen, polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen, D	WB (1:10000)
GC3108	m GAD65/67	Maus, monoklonal	BIO TREND, Köln, D	WB (1:20000)
AB1504	m GluR1	Kaninchen, polyklonal	Millipore, Schwalbach, D	WB (1:1000)
GFP	GFP, EGFP	Maus, monoklonal	Roche, Mannheim, D	WB (1:1000), IF (1:500)

H, h = human, M, m = murin, c = chicken

## IV. 7. Sekundäre Antikörper

**Tab. 8: Liste der verwendeten sekundären Antikörper**

Bezeichnung/Produkt Nr.	Spezies	Spezifität	Hersteller/Quelle	Anwendung
Esel- $\alpha$ -Kaninchen-IgG-HRP	Esel, polyklonales Serum	Kaninchen-IgG-FC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	WB (1:10000)
Schaf- $\alpha$ -Maus-IgG-HRP	Schaf, polyklonales Serum	Maus-IgG-FC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	WB (1:10000)

Bezeichnung/Produkt Nr.	Spezies	Spezifität	Hersteller/Quelle	Anwendung
Ziege- $\alpha$ -Maus-Alexa488	Ziege, polyklonales Serum	Maus-IgG-FC	Invitrogen, Karlsruhe, D	IF (1:500)
Ziege- $\alpha$ -Ratte-Alexa594	Ziege, polyklonales Serum	Ratte-IgG-FC	Invitrogen, Karlsruhe, D	IF (1:500), FACS (1 $\mu$ g/10 <sup>5</sup> -Zellen)
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-Alex594	Ziege, polyklonales Serum	Kaninchen-IgG-FC	Invitrogen, Karlsruhe, D	IF (1:500)

## IV. 8. Zelllinien

Tab. 9: Liste der verwendeten Zelllinien, Hefe- und Bakterienstämme

Zelllinie	Eigenschaft	Referenz
Cos-7	Nierengewebszellen der grünen Meerkatze, SV-40-immortalisiert	DMSZ, Braunschweig, D
HeLa	Zervix-Karzinom-Zellen (Henrietta Lacks)	DMSZ, Braunschweig, D
Hek 293	Humane Nierengewebszellen	DKFZ, Heidelberg, D
N2A	Murine Neuroblastomazellen	Olmsted et al., 1970
A10 <sup>-/-</sup>	Murine Embryonale Fibroblasten (MEF)	Hartmann et al., 2002
A10 <sup>+/+</sup>	Murine Embryonale Fibroblasten (MEF)	Hartmann et al., 2002
SHSY	Humane Neuroblastomazellen	Biedler et al., 1978
NMY51	Hefe-Reporterstamm	Dualsystems, Schlieren, CH
<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i> XL1 Blue	Agilent Technologies, Santa Clara, US

## IV. 9. Mausstämme

### IV. 9. 1. Generierung der konditionalen ADAM10<sup>Flox</sup>-Maus

Aus einer 129/ola Cosmid Bibliothek (RZPD clone ID F11444Q2) wurde ein Maus Cosmid Klon isoliert, der die 5'-Region und Exon 2 des *Adam10* Gens enthält. Zur Herstellung eines *Targeting*-Vektors wurden ein 8,2 kb KpnI-PsfI großes DNA-Restriktionsfragment mit Exon 2 von *Adam10*, die 7,3 kb lange 5'-Region und die 3'-Region in den Plasmidvektor pUC-18 kloniert. Die Hygromycin B-Resistenzkassette (Phosphoglycerate Kinase Promotor, PGK) flankiert von zwei Flip-Rekombinase-Erkennungssequenzen und eine LoxP-Erkennungssequenz (nach der Hygromycin B-Resistenzkassette) wurden über NotI-ApaI 5'-*upstream* von Exon 2 des *Adam10* Gens in Intron 1 inseriert. Eine zweite LoxP-



Erkennungssequenz wurde über SphI-SpeI in Intron 2 inseriert. Nach Linearisierung des Konstrukts über KpnI wurde das Konstrukt über Elektroporation in embryonale Stammzellen (E14 129 SvEv, ITL) eingebracht. Klone wurden über die Antibiotikaresistenz selektioniert und mit Hilfe von Southern Blot Verfahren analysiert (Jorissen et al., 2010). Genetisch modifizierte ES-Zell-Klone wurden durch Mikroinjektion in Blastozysten von C57/BL/6J Mäusen eingebracht. Chimäre Männchen wurden gezüchtet und diese mit Weibchen (C57/BL/6J) verpaart, um Keimbahntransmission des modifizierten *Adam10*-Allels zu erreichen. Zur Deletion von *Adam10* können verschiedene transgene Cre-Rekombinase Mauslinien eingekreuzt werden, wobei die Kontrolle der Cre-Expression des jeweiligen organspezifischen Promotors unterliegt.

#### **IV. 9. 2. Nestin-Cre Mausstamm (Tg(Nes-cre)1Kln)**

Ursprünglich wurde dieser transgene Mausstamm von Rüdiger Klein (Max-Planck Institut für Neurobiologie) generiert. Die heterozygoten Tiere (*ADAM10<sup>+/+</sup> Nestin Cre<sup>tg/+</sup>*) sind vital, fertil, weisen eine normale Körpergröße auf und zeigen keine besonderen Verhaltensauffälligkeiten. Die Expression der Cre-Rekombinase unterliegt der Kontrolle des Nestin-Promotors der Ratte, welcher ab ca. Embryonaltag 10 (E10) im gesamten ZNS-Bereich der Maus aktiv ist. Dieser Mausstamm diente der spezifischen Deletion von *ADAM10* in neuronalen Stammzellen (neuroepithelialen Zellen), glialen und neuronalen Vorläuferzellen. Genauere Informationen zum verwendeten Mausstamm sind auf der Internetseite der Jackson Laboratories (<http://jaxmice.jax.org/strain/003771.html>) und in der Publikation von (Tronche et al., 1999) zu finden.

#### **IV. 9. 3. CamKIIalpha-Cre Mausstamm**

Ursprünglich wurde dieser transgene Mausstamm von Rüdiger Klein (DKFZ, Heidelberg, D) generiert. Bei diesem Mausstamm kann durch die Expression einer codon-optimierten Variante der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CamKIIalpha Promotors die Deletion eines geflochten Zielgens zu frühen postnatalen Zeitpunkten in Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) der Maus erreicht werden. Aktiv ist der Promotor ab P5 (Hippocampus, Kortex) mit einer Steigerung der Expression bis P15. Hypothalamus, Thalamus, Striatum und Cerebellum weisen in histologischen Untersuchungen eine sehr geringe Cre-Expression auf (Casanova et al., 2001).

IV. 10.      **Computersoftware****Tab. 10: Liste der verwendeten Software**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Referenz/Quelle</b>
Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, US
Adobe Illustrator	Adobe Systems Inc., San Jose, US
Cell* Image Analysis Software	Olympus, Hamburg, D
DNASTAR Lasergene 8	Lasergene, Madison, US
EndNoteX4	Thomson Reuters, Carlsbad, CA
Fluo View 1000 ASW 3.0	Olympus, Hamburg, D
Gen5™	BioTek, Bad-Friedrichshall, D
Image J	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
MS-Office	Microsoft Corporation, Redmond, US
WinMDI 2.8	FACS Core Facilities, Scripps Research Institute, La Jolla

IV. 11.      **Plasmide****Tab. 11: Liste der verwendeten Plasmide**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>
pcDNA3.1 (+/-)	Eukaryotischer Expressionsvektor, Größe 5,4 kb, MCS (+/-), CMV-Promotor, T7-Promotor ( <i>in vitro</i> Transkription), SV40-Promotor (Neomycin-Resistenz), prokaryotische Ampicillin-Resistenzkassette, pUC-Ursprung (Replikation), BGH pA und SV40 pA (Polyadenylierung der mRNA), Quelle: Invitrogen, Karlsruhe, D
pEGFP-N1	4,7 kb, enthält rotverschobene EGFP-Variante als Insert, prokaryotische Kanamycin-Resistenzkassette
pFrog	Abwandlung des pcDNA3-Vektors (D, ZMNH, Hamburg, Abteilung: Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch), 5,7 kb, MCS, enthält zusätzlich die 5' und 3' untranslatierten Bereiche des $\beta$ -Globingens ( <i>Xenopus laevis</i> ), wird zur cRNA-Synthese verwendet
pTMBV4	Hefe- <i>E. Coli</i> -Shuttle-Vektor, 7,85 kb, cDNAs (Bait) werden als Fusionsproteine mit Cub-LexA-VP16 exprimiert, prokaryotische Kanamycinresistenzkassette, LEU2-Gen für auxotrophe Hefeselektion, Quelle: Dualsystems Biotech AG, Zürich, CH

Bezeichnung	Beschreibung
pPR3-N NubG-X	Hefe- <i>E. Coli</i> -Shuttle-Vektor, 6,204 kb, cDNAs aus ZNS-cDNA-Bibliothek werden als N-terminale Fusionsproteine mit NubG exprimiert, <i>TRP1</i> -Gen für auxotrophe Hefeselektion, prokaryotische Ampicillin-Resistenzkassette, Quelle: MoBiTec, Göttingen, D

#### IV. 12. Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tab. 12: Liste der verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
ADAM10-Lyse-Puffer	1 mM EGTA 5 mM Tris 250 mM Saccharose 1% Triton X-100 pH 7,4
Biotin-Lösung	PBS-CM 1 mg/ml Biotin
Blockierungspuffer IF	10% FCS 0,2% Saponin
Blockierungslösung WB	PBS 5% Milchpulver
DAPI-Lösung	PBS 1mg/ml DAPI
DMEM <i>High Glucose</i> (komplett)	DMEM 10% FCS 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin
Durchflusszytometriepuffer	PBS 1% BSA 0,01% Natriumazid
EBC-Lyse-Puffer	120 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 0,5% NP-40 bzw. Triton X-100 0,04% Complete pH 7,4
Einbettungspuffer IF	1 ml Mowiol Lösung 100 µl DABCO 1 µl DAPI-Lösung
Fixierungslösung IF, IHC	PBS 4% PFA
LB-Medium	10 g Trypton/Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl in 950 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Agar-Platten	10 g Trypton/Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl in 950 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0 15 g Agar-Agar 1000 ml ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren Autoklavieren, in 10 cm Schalen gießen
LiPEG	100 mM Lithium Acetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 40% PEG 3350 pH 8,0
LiSorb	100 mM Lithium Acetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 1 M Sorbitol pH 8,0
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PBS-CM	PBS 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub>
<i>Quenching</i> -Puffer	PBS-CM 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 6,8
SC-Leu, -Leu/-Trp, -Leu/-Trp/-His Medium (1l)	6,7 g Hefe nitrogen base w/o AS 2 g Drop-out Mix 20 g Glukose
SC-Leu, -Leu/-Trp, -Leu/-Trp/-His-Platten (1l)	6,7 g Hefe nitrogen base w/o AS 2 g Drop-out Mix 20 g Glukose 20 g Agar-Agar
SDS-PAGE-Puffer 10x	1,92 M Glycin 250 mM Tris-HCl 35 mM SDS
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)	2,5 ml Tris/HCl pH 6,8 1 g SDS 2,5 ml ddH <sub>2</sub> O 0,05 g Bromphenolblau 5 ml Glycerol 100-200 mM DTT (denaturierend)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
SDS-PAGE-Puffer 1x	10% SDS-Page-Puffer 10x 90% ddH <sub>2</sub> O
<i>Stripping</i> -Puffer	100 mM Glycin 20 mM MgAc pH 2,2
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) (50x)	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA 1000 ml ddH <sub>2</sub> O pH 8,0
Tank-Blot-Transfer-Puffer (10x)	250 mM Tris 2 M Glycin pH 8,3
Tank-Blot-Puffer (1x)	10% Tank-Blot-Puffer 10x (v/v) 20% Methanol, techn. (v/v) 70% ddH <sub>2</sub> O (v/v)
TBS-T	20 mM Tris HCl 150 mM NaCl pH 7,5 0,1% Tween20
Transformationsmix (Hefe)	3,6 ml 50% PEG 3,350 540 µl 1 M Lithium Acetat 1,5 mg Carrier DNA (150 µl einer 10 mg/ml Stock-Lösung) 1,1 ml Wasser
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 8,8
Waschpuffer IF	PBS, 0,2% Saponin

## IV. 13. Molekularbiologische Methoden

### IV. 13. 1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

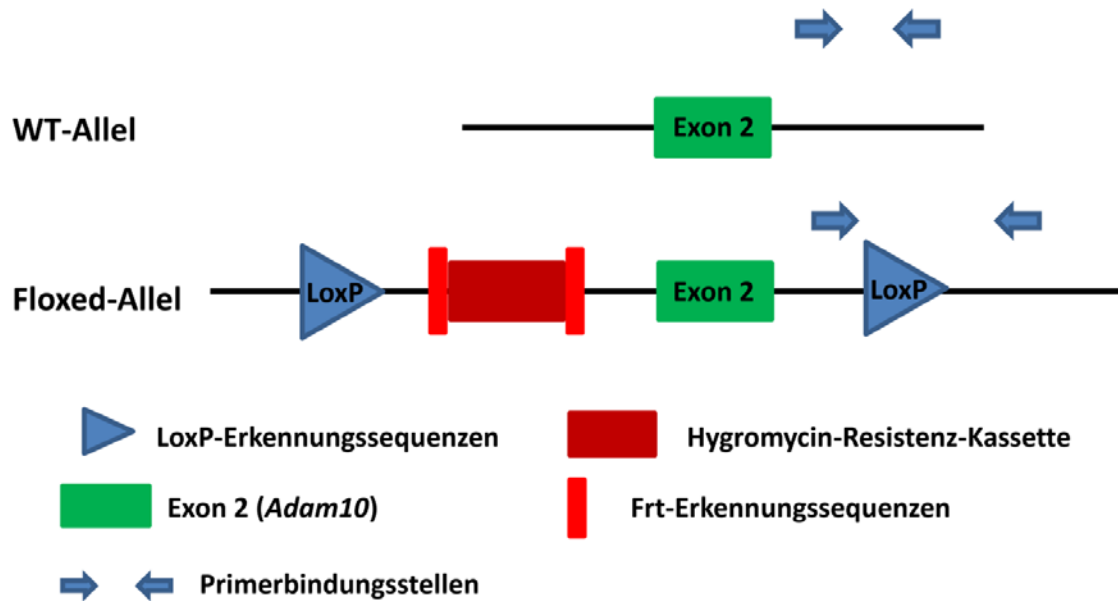
Die Polymerasekettenreaktion dient der selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten (*Template*). Die PCR-Reaktion kann in verschiedene Teilschritte (Denaturierung, *Annealing*, Elongation) unterteilt werden. Voraussetzung für die Amplifikation ist ein kurzer doppelsträngiger DNA-Abschnitt, der ein freies 3'-OH- Ende besitzt, das an dieser Stelle durch die Anknüpfung weiterer Nukleotide entsprechend verlängert werden kann. Nach der Trennung des DNA-Doppelstranges (Denaturierung) wird ein solches Ende durch die Zugabe von Oligonukleotiden (Primern, ca. 20 Nukleotide) generiert, die an entsprechende

komplementäre Einzelstrangbereiche des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren (*Annealing*). Eine Verdopplung des DNA-Abschnittes wird durch die Zugabe von zwei Primern erreicht, wobei einer an den *Sense*- und der andere an den *Antisense*-Strang bindet. Nach der Hybridisierung verlängern thermostabile DNA-Polymerasen in 5'-3'-Richtung den durch die Primer festgelegten DNA-Abschnitt; ein Prozess, der als Elongation bezeichnet wird. Nach der Elongation wird erneut denaturiert und der Amplifikationsprozess wird wiederholt, wobei Denaturierung, *Annealing* und Elongation zu einem „Zyklus“ zusammengefasst werden (Saiki et al., 1986).

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Als *Template* dienten sowohl genomische DNA-Bereiche (Schwanzbiopsie), Plasmid-DNA und auch cDNAs.

#### IV. 13. 1. 1. Genotypisierungs-PCR

Zur klaren Identifikation der Genotypen bei der Untersuchung von *Loss-of-function-/Gain-of-Function*-Tiermodellen oder anderen genetisch modifizierten Organismen dienen Genotypisierungs-PCRs. Hierbei werden selektiv genetisch modifizierte bzw. nichtmodifizierte Bereiche des Genoms amplifiziert. Anschließend können durch Auftrennung im Agarosegel und Identifikation des Bandenmusters eindeutig die verschiedenen Genotypen der Tiere identifiziert werden.



**Abb. 9: Beschreibung des WT- und Floxed (*Adam10*)-Allels.**

Dargestellt sind ein WT-Allel einer Kontrollmaus und ein „gefloxtes“ Allel des *Adam10*-Gens für einen konditionalen Knockout. Eingezeichnet sind LoxP-Erkennungssequenzen (blaue Dreiecke), Exon 2 des *Adam10*-Gens (grüne Rechtecke), Flip-Rekombinase (Frt)-Erkennungssequenzen (hellrote Rechtecke) und eine Hygromycin-Resistenz-Kassette (dunkelrotes Rechteck). Zusätzlich ist die Lokalisation der Genotypisierungsprimer-Bindungsstellen (blaue Pfeile) eingezeichnet. Amplifiziert wird hierbei für das WT-Allel ein DNA-Fragment von 262 bp und für das „gefloxte“ Allel ein DNA-Fragment von 420 bp Größe.

**Tab. 13: Klassischer Ansatz einer Genotypisierungs-PCR**

10x Dream Taq-Puffer	5 µl
dNTPs (2mM)	5 µl
Primer ( <i>forward</i> ) (10 µM)	1 µl
Primer ( <i>reverse</i> ) (10 µM)	1 µl
Dream Taq Polymerase	0,25-0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	X µl
genomische DNA	ca. 500 ng

**Tab. 14: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von ADAM10<sup>Flox</sup>-Mäusen (Floxed-PCR)**

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	96	300	1
Denaturierung	96	60	30
Annealing	56	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	600	1
Kühlung	10	∞	1

**Tab. 15: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von Nestin-Cre transgenen Mäusen**

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	96	300	1
Denaturierung	96	60	35
<i>Annealing</i>	51	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	600	1
Kühlung	10	∞	1

**Tab. 16: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von CamKII-Cre transgenen Mäusen**

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	96	300	1
Denaturierung	96	60	35
<i>Annealing</i>	65	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	600	1
Kühlung	10	∞	1

#### IV. 13. 1. 2. Klonierungs-PCR

Alle in dieser Arbeit erstellten Konstrukte zur Expression in Hefen oder eukaryotischen Zelllinien wurden nach folgendem PCR-Ansatz hergestellt.

**Tab. 17: Klassischer Ansatz einer Klonierungs-PCR**

10x Pfu-Polymerase Puffer	5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Primer (forward) (10 µM)	1 µl
Primer (reverse) (10 µM)	1 µl
Turbo-Pfu (Stratagene)	1 µl
DNA (Template)	20-100 ng
ddH <sub>2</sub> O	X µl



**Tab. 18: PCR-Protokoll für Klonierungs-PCR**

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	96	300	1
Denaturierung	96	60	35
<i>Annealing</i>	51-65*	60	
Elongation	72	60-180*	
Finale Elongation	72	600	1
Kühlung	10	∞	1

\* die *Annealing*-Temperatur wurde ca. 5 °C unterhalb der jeweiligen Schmelztemperatur der Primer gewählt, die Elongationszeit war abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Templates

#### IV. 13. 2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Masse. Jedoch wandert DNA auch in Abhängigkeit ihrer Struktur im elektrischen Feld, wobei zirkuläre DNA (ungeschnittene Plasmide, Superspiralisierung) im Gel schneller wandert, als geschnittene bzw. offene DNA-Formen. Zur optimalen Auftrennung eignen sich verschiedene Konzentrationen an Agarose im Gel, die je nach erwarteter Fragmentgröße angepasst werden können (McDonnell et al., 1977).

**Tab. 19: Größentrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration**

Agarose-Konzentration (% w/v)	DNA-Fragmentgröße (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2	0,1-2

(Tabelle modifiziert nach Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)

Zur Herstellung eines Agarosegels wird eine bestimmte Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zur Aushärtung in eine entsprechende Gießform gegeben. DNA-haltige Proben werden mit 6x-DNA-

Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese bei einer elektrischen Feldstärke von 5V/cm durchgeführt.

#### **IV. 13. 3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau wird das „*High Pure PCR Purification Kit*“ verwendet. Nach der Agarosegelelektrophorese werden die Banden aus dem Gel mit einem Skalpell auf einem Transilluminator ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Pro 100 mg Agarose-Gel-Stück werden 300 µl Bindungspuffer zugesetzt, kurz gevortext und ca. 10 min bei 56°C auf einem Schüttelinkubator bis zur vollständigen Auflösung der Agarose inkubiert. Danach werden Pro 100 mg Agarose-Gel-Stück 150 µl Isopropanol zugegeben, ein „*High Pure Filter Tube (Säule)*“ auf ein „*Collection Tube*“ gesteckt und die DNA-haltige Lösung auf die Säule gegeben. Danach wird 1 min bei maximaler Drehzahl (*Centrifuge 5415 C*, Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule 1x mit 500 µl und nachfolgend 1x mit 200 µl Waschpuffer durch 1 min Zentrifugation gewaschen. Abschließend werden 30 µl ddH<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben, 5 min inkubiert und die DNA durch Zentrifugation eluiert. Hier wurde nach Angaben des Herstellers verfahren (Roche, Mannheim, D)

#### **IV. 13. 4. Restriktion von PCR-Produkten und Plasmiden**

Restriktionsenzyme sind bakteriellen Ursprungs, spalten DNA-Stränge hydrolytisch und unterscheiden sich in ihrer Spaltstelle, dem Ursprungsorganismus und der Erkennungssequenz. Ihre biologische Funktion besteht darin, die Bakterien vor Fremd-DNA (Phagen-DNA) zu schützen, wobei bestimmte Methylierungsmuster die eigene genomische DNA vor Restriktion schützen. Durch die Erkennung spezifischer häufig palindromischer Sequenzen in der DNA werden Restriktionsenzyme in der Molekularbiologie zur Modifikation von DNA verwendet. Durch Hydrolyse entstehen je nach Enzym stumpfe Enden (*blunt-ends*) oder kohäsive Enden (*sticky-ends*), wobei am 3'-Ende in der Regel eine Hydroxygruppe und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe verbleiben.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsverdau wurden nach Angaben (*Double Digest*) des Herstellers/Vertriebs (Fermentas, St-Leon-Rot, D) der Restriktionsenzyme durchgeführt.

**Tab. 20: Exemplarischer Ansatz eines Restriktionsverdaus mit BamHI und HindIII**

10x BamHI-Puffer	2 $\mu$ l
BamHI-Enzym	1 $\mu$ l
HindIII-Enzym	2 $\mu$ l
DNA	1-2 $\mu$ g
ddH <sub>2</sub> O	X $\mu$ l

Der Restriktionsverdaus wurde in einem Volumen von 20  $\mu$ l angesetzt und für Plasmide 1 h bei 37°C und für PCR-Produkte mindestens 6 h bei 37°C inkubiert. Restriktionsverdaus mit SfiI wurden bei 50°C durchgeführt.

#### IV. 13. 5. Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren/Plasmiden

Zur Verhinderung der Religation von geschnittenen Vektoren wurden dem aufgereinigten Vektor FastAP<sup>TM</sup> (alkalische Phosphatase) zur Dephosphorylierung der 5'-Enden des Vektors hinzugefügt, 10 min bei 37°C inkubiert und zur Inaktivierung des Enzyms vor Ligation der Reaktionsansatz für 5 min auf 75°C erhitzt. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers/Vertriebs (Fermentas, St-Leon-Rot, D) verfahren.

#### IV. 13. 6. Ligation

Die T4-DNA-Ligase ist ein Enzym, welches die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxy-Ende unter ATP-Verbrauch katalysiert. Bei dieser Reaktion können sowohl kohäsive als auch stumpfe Enden miteinander verknüpft werden. Beispielsweise werden über eine Ligationsreaktion bestimmte DNA-Fragmente (*Inserts*) in Zielvektoren eingebracht, wenn Vektor und DNA-Fragment über die gleichen Restriktionsenzyme vorbehandelt wurden.

**Tab. 21: Exemplarische Darstellung einer Ligationsreaktion**

10x DNA-Ligase-Puffer	1 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	1 $\mu$ l
Vektor-DNA-Lösung	X $\mu$ l
<i>Insert</i> -DNA-Lösung	X $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	X $\mu$ l

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Ligationsreaktionen wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ l angesetzt und es wurde nach den Angaben des Herstellers/Vertriebs (Fermentas, St.-Leon-Rot, D) verfahren. Der hergestellte Ligationsansatz wurde ü. N. bei 17°C inkubiert und nachfolgend für 10 min bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms erhitzt.

**IV. 13. 7. Herstellung von elektrokompetenten *E.Coli* XL1 Blue**

Elektrokompetente *E.Coli* XL1 Blue wurden für die Transformation von Plasmiden und anschließender Vermehrung benötigt. Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurden aus einer Bakterien-Stock-Lösung 20 µl entnommen, diese auf einer LB-Platte mit Selektionsantibiotikum (Tetracyclin) unter Verwendung einer sterilen Impföse fraktioniert ausgestrichen und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine einzelne Kolonie „gepickt“ und in 50 ml tetracyclinhaltigem LB-Medium ü. N. unter Schütteln inkubiert. Währenddessen wurden 2 l LB-Medium bei 37°C vorgewärmt und 2 l steriles ddH<sub>2</sub>O vorbereitet. Am darauffolgenden Tag wurden 20 ml Vorkultur zu einem Liter LB-Medium gegeben und die Bakteriensuspension bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5-0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Währenddessen wurden 150 ml einer 10%igen Glycerin-Lösung in ddH<sub>2</sub>O vorbereitet, steril filtriert und das Wasser und die Glycerinlösung auf 4°C abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. 1 l der Bakteriensuspension wurde auf 4x 250 ml Reaktionsgefäße verteilt, die Suspension bei 5000 rpm (J2-HS-Centrifuge, Beckmann Coulter, Krefeld, D, Rotor: JA-14) 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, jeweils 2 Fraktionen vereinigt, die Reaktionsgefäße mit eiskaltem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und erneut bei 5000 rpm, 15 min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Bakterien in 20 ml eiskalter Glycerin-Lösung aufgenommen und die Reaktionsgefäße mit 40 ml Glycerin-Lösung ausgespült. Danach wurde die Bakteriensuspension 20 min, bei 4°C und 3200 rpm (Multifuge 3SP+-Centrifuge, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) in 50 ml Sarstedt-Röhrchen abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml eiskalter Glycerinlösung resuspendiert, die Bakteriensuspension in 60 µl Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und für Langzeitlagerung bei -80°C eingefroren.

**IV. 13. 8. Transformation von elektrokompetenten *E.Coli* XL1 Blue**

Die elektrokompetenten *E.Coli* XL1 Blue wurden auf Eis aufgetaut, Elektroporationsküvetten gereinigt, getrocknet und auf Eis gestellt. Zur aufgetauten Bakteriensuspension wurden 1 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid (20 ng/µl) pipettiert und die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω durchgeführt. Danach wurden ca. 200 µl LB-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert, die Bakterien resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37°C auf einem Schüttelinkubator 30 min kultiviert. Anschließend wurden die transformierten *E.Coli* auf einer LB-Platte mit entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert.

### IV. 13. 9. Präparation von Plasmiden aus transformierten *E.Coli* XL1 Blue

Zur Gewinnung und Vermehrung von Plasmiden wurden transformierte Bakterien kultiviert, anschließend lysiert und die Plasmide aufgereinigt.

#### IV. 13. 9. 1. Midi-Präparation

Eine Kolonie transformierter Bakterien wurde mit einem sterilen Zahnstocher „gepickt“ und dieser in einen Erlenmeyer-Kolben mit 150 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt. Danach wurden die Bakterien bei 37°C ü. N. kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 3500 rpm (Multifuge 3SP+-*Centrifuge*, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) abzentrifugiert und für ca. 1 h bei -20°C eingefroren. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim, D). Danach erfolgte die Resuspendierung der Bakterienpellets in 6 ml Resuspendierungspuffer (*Resuspension-Buffer*), dann eine Zugabe von 6 ml Lyse-Puffer (*Lysis-Buffer*) und anschließend wurde der Reaktionsansatz mehrfach invertiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 ml Neutralisationspuffer (*Neutralisation-Buffer*). Danach wurde die Reaktionslösung bei 15000 rpm (J2-HS-*Centrifuge*, Beckmann Coulter, Krefeld, D, Rotor: JA-17) für 15 min bei 4°C zentrifugiert, ein *PureYield<sup>TM</sup> Clearing Column* auf ein *PureYield<sup>TM</sup> Binding Column* (Säule) gesetzt. Der Überstand wurde anschließend auf die Säule aufgetragen und durch Anschließen an das Hausvakuum abgesaugt. Danach wurde der *PureYield<sup>TM</sup> Clearing Column* entfernt und die Säule einmal mit 5 ml *Endotoxin Removal*-Lösung und anschließend mit 20 ml Waschlösung gewaschen und die Flüssigkeiten durch das Hausvakuum entfernt. 600 µl ddH<sub>2</sub>O wurden auf die Membran der Säule pipettiert, 5 min bei RT inkubiert und zur Eluierung der DNA 5 min bei 3500 rpm in einem 50 ml Sarstedt-Röhrchen zentrifugiert.

#### IV. 13. 9. 2. Mini-Präparation

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Kolonie transformierter *E.Coli* „gepickt“ und in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt. Danach wurden die Bakterien ü. N. bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag durch Zentrifugieren pelletiert und der Überstand verworfen. Die Mini-Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers/Vertriebs (Fermentas, St-Leon-Rot, D). Anschließend wurden die Bakterien in 250 µl *Resuspension-Buffer* aufgenommen, danach erfolgte die Zugabe von 250 µl *Lysis-Buffer* und darauffolgend wurde die Probe mehrfach invertiert. Nach Zugabe von 350 µl *Neutralisation-Buffer* wurden genomische DNA und Zelldebris durch Zentrifugieren bei 5000 rpm (*Centrifuge* 5415 C,

Eppendorf, Hamburg, D) für 5 min entfernt. Der Überstand wurde auf ein *GeneJET-Spin Column* (Säule) mit *Collection-Tube* aufgetragen und 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 µl Waschpuffer-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Säule ohne Puffer zentrifugiert, um Pufferreste abzutrennen und das *Collection-Tube* verworfen. Danach wurden 50 µl ddH<sub>2</sub>O auf die Membran der Säule aufgetragen, 5 min bei RT inkubiert und zur Eluierung der Plasmid-DNA bei 8500 rpm für 1 min zentrifugiert.

#### **IV. 13. 10. Sequenzierung**

Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma GATC in Konstanz durchgeführt. Plasmide wurden in einem Endvolumen von 30 µl und einer maximalen Konzentration von 100 ng/µl und die entsprechenden Sequenzierungsprimer (Sigma Aldrich, Steinheim, D) separat vorbereitet. Die Analyse der Sequenzierung erfolgte mit der Analyse Software DNASTAR Lasergene 8.

#### **IV. 13. 11. Isolierung von mRNA aus Zellen bzw. Geweben**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen *Real-Time-PCR* Experimente wurde Gesamt-RNA aus Zellen bzw. Organen unter Verwendung des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kits isoliert. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Maximal 30 mg Gewebe bzw. Zellen wurden mit 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt, im Precellys<sup>®</sup> (Programm: 2x 5000 rpm, 15 s mit 15 s Pause) die Organe bzw. Zellen aufgebrochen und die Lösung auf Eis gestellt. Danach wurde das Lysat durch ein *Filtration-Column* (Filtrations-Säule) durch Zentrifugieren bei 11000xg filtriert und zur Anpassung der Bindungsbedingungen der RNA 350 µl 70%iger Ethanol zugegeben. Anschließend wurde die Lösung auf ein *Binding-Column* (Bindungs-Säule) überführt, 30 s bei 11000xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur Entsalzung der Membran wurden 350 µl MDB Puffer auf das *Binding-Column* gegeben und 30 s bei 11000xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 95 µl DNase-Lösung auf die Membran gegeben und der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Daraufhin folgten mehrere Waschriffe mit 200 µl Puffer RA2, 600 µl RA3 und 250 µl RA3, wobei 30 s bei 11000xg zentrifugiert und abschließend 2 min bei 11000xg zentrifugiert wurde. Zur Eluierung der RNA wurden 60 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und 1 min bei 11000xg zentrifugiert. Zur Langzeitlagerung wurde die RNA bei -80°C eingefroren.

**IV. 13. 12. cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA-Präparationen**

Zur Synthese der cDNA, welche in dieser Arbeit zur quantitativen *Real-Time-PCR* verwendet wurde, wurde das *RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

**Tab. 22: Exemplarischer Ansatz der cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA**

Gesamt-RNA	2 µg
Oligo (dT) <sub>18</sub> -Primer	1 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	X µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, 60 min bei 42°C inkubiert und zum Abbruch der Reaktion 5 min bei 70°C inkubiert. Für die Langzeitlagerung wurde die cDNA bei -20°C eingefroren.

**IV. 13. 13. Quantitative Real-Time-PCR**

In dieser Arbeit wurde das TaqMan<sup>TM</sup>-System der Firma Applied Biosystems und das *Universal Probe Library* (UPL) System der Firma Roche verwendet und nach Angaben der Hersteller verfahren.

**Tab. 23: Exemplarischer Ansatz einer qRT-PCR (TaqMan-System)**

qPCR-Mix	4,5 µl
cDNA	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,5 µl
Assay-Mix	0,5 µl

**Tab. 24: Exemplarischer Ansatz einer qRT-PCR (UPL-System)**

Light Cycler 480 Probe Master	4,5 µl
Assay-Mix	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,5 µl
cDNA	0,5 µl

Alle durchgeführten qPCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 10 µl im Doppelansatz angesetzt und in 384-well-Platten durchgeführt. *ADAM9*, *ADAM17* und *TSPAN12* wurden mit dem UPL-System analysiert und *ADAM10*, *TSPAN15*, *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Hey2*, *RP2* und *Gapdh* wurden mit dem TaqMan<sup>TM</sup>-System analysiert.

**Tab. 25: Protokoll zur Durchführung von qRT-PCRs**

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	40*/45
Annealing/Elongation	60°C	60	
Kühlung	10°C	∞	1

\*40 Zyklen wurden bei der Verwendung des 7900HT Fast Real Time PCR System durchgeführt.

#### IV. 13. 14. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* (NMY51)

Hefezellen (NMY51) wurden auf einer Platte mit Nährmedium (YPAD) fraktioniert ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden mehrere Hefeklone mit einer sterilen Glaspipette „gepickt“ und in 10 ml YPAD-Medium (10 g *Bacto Yeast extract*, 20 Pepton, 20 g Glukose, 40 mg Adeninsulfat, für 1l Medium) ü. N. bei 30°C in einem Schüttelinkubator kultiviert (Vorkultur). Am darauffolgenden Tag wurde die OD600 der Vorkultur bestimmt (Verdünnung 1:50, 20 µl Vorkultur + 980 µl H<sub>2</sub>O in Küvette), die OD in einem Gesamtvolumen von 50 ml Medium auf 0.4 eingestellt und die Zellen bei 30°C bis zu einer OD 0,6-0,8 bei 30°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 ml Sarstedt-Röhrchen durch Zentrifugieren bei 4°C und 3200 rpm (Multifuge 3SP+-*Centrifuge*, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) für 2 min gerntet und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, das Volumen anschließend auf 50 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und danach bei 3200 rpm für 2 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurden die Hefen mit 10 ml LiSorb gewaschen, unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Hefen in 300 µl LiSorb resuspendiert, 30 µl denaturierte *Carrier-DNA* (Lachs-Sperma) zugesetzt und die Hefen in 50 µl Aliquots in Schraubdeckelgefäßen bei -80°C eingefroren. Mit bereits transformierten Hefen (*Bait-Konstrukt*) wurde zur Herstellung kompetenter Hefen gleich verfahren, mit der Änderung dass die Kultivierung in Selektionsmedium (SC-Leu) durchgeführt wurde.

#### IV. 13. 15. Transformation von kompetenten Hefen (NMY51)

Zur Transformation von Plasmiden (*ADAM10-Bait-Konstrukt*, Plasmide aus cDNA-Bibliothek, NubG (Negativkontrolle), NubI (Positivkontrolle) in Hefen wurde jeweils ein halbes Aliquot der kompetenten Hefen mit 1 µl Plasmid versetzt, 300 µl LiPEG zugegeben und gevortext. Danach wurde der Transformationsansatz 20 min bei RT belassen, anschließend 15 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert und die Hefen abschließend 1 min bei



3000 rpm (*Centrifuge 5415 C*, Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zell-Pellet wurde in 75 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf entsprechenden Selektionsplatten fraktioniert ausgestrichen und drei Tage bei 30°C kultiviert.

#### **IV. 13. 16. Testexpression des ADAM10-Bait-Konstrukts und Interaktionstests**

Zur Testexpression des ADAM10-Bait-Konstrukts wurden die kompetenten Hefen wie in Abschnitt I.13.12 beschrieben mit dem ADAM10-Bait-Konstrukt transformiert und kultiviert. Alle weiteren Schritte wurden auch bei der Retransformation potentieller Interaktionspartner von ADAM10 durchgeführt. Danach wurde eine 2 ml ü. N. Kultur in SC-Leu bzw. -Leu/-Trp-Medium angesetzt und bei 30°C inkubiert. Am Folgetag wurde zur Ermittlung der gleichen Zellzahlen eine Bestimmung der OD600 der unterschiedlichen Ansätze durchgeführt und die Zellzahlen angeglichen. Anschließend wurden 4 µl der transformierten Hefen in verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:1, 1:100, 1:1000) auf entsprechenden Selektionsplatten (SC-Leu, SC-Leu/-Trp, SC-Leu/-Trp/-His) aufgetragen und bei 30°C drei Tage inkubiert.

#### **IV. 13. 17. Large-Scale-Transformation für Test- und Interaktionsscreen**

Für die Transformation der cDNA-Bibliothek aus Maushirn wurden transformierte (pTMBV4, ADAM10-Bait-Konstrukt) Hefen in 150 ml SC-Leu-Medium bis zu einer Zelldichte von  $2 \times 10^7$ /ml in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3200 rpm (*Multifuge 3SP+-Centrifuge*, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und anschließend die Zellen mit 100 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 3 ml 100 mM Lithiumacetat-Lösung aufgenommen und bei 30°C 15 min inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 3200 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5,4 ml „Transformations Mix“ aufgenommen. An diesem Punkt wurden 50 µl Zellsuspension entnommen, die ohne Plasmidzugabe als Negativkontrolle in allen weiteren Schritten mitbehandelt wurden. Danach wurden 15 µg Vektor-DNA oder cDNA-Bibliothek-DNA zugegeben, gevortext und der Transformationsansatz 30 min bei 30°C und anschließend 40 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die transformierten Hefen wurden bei 3200 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurden 5 µl des Transformationsansatzes entnommen, eine 1:10 Verdünnung in H<sub>2</sub>O hergestellt und diese auf einer 10 cm SC-Leu/-Trp-Platte zur Ermittlung der Transformationseffizienz (TE) ausplattiert. Folgende Berechnung wurde zur Ermittlung der Transformationseffizienz unter

Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungsfaktoren verwendet: TE = theoretisch berechnete Kolonienzahl/  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA. Für den Interaktionsscreen wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der transformierten Hefen auf einer 20 cm Platte (SC-Leu/-Trp/-His) mit sterilen Glasperlen durch Rotation ausplattiert und anschließend drei Tage bei 30°C inkubiert. Am zweiten und am dritten Tag nach der Transformation wurden Klone mit einem sterilen Holzspatel „gepickt“ und auf 10 cm Platten (SC-Leu/-Trp/-His) ausgestrichen und erneut drei Tage bei 30°C inkubiert.

#### **IV. 13. 18. Isolierung von Plasmiden aus Hefen**

Von einer 10 cm SC-Leu/-Trp/-His-Platte wurden Hefen mit einer sterilen Glaspipette abgekratzt und in 500  $\mu\text{l}$  Puffer 1 (0,9 M Sorbitol, 0,1 M EDTA, 0,25 mg/ml Zymolase 20T, pH 8) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde, wobei das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig invertiert wurde. Danach wurden die Hefen bei 3000 rpm für 1 min zentrifugiert und das entstandene Zell-Pellet in 500  $\mu\text{l}$  Puffer 2 (50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert und 50  $\mu\text{l}$  einer 10%igen SDS-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 65°C inkubiert, danach 200  $\mu\text{l}$  3 M Kaliumacetat-Lösung zugegeben, der Ansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 14000 rpm (*Centrifuge 5415 C*, Eppendorf, Hamburg, D) für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser Schritt wiederholt. Danach wurden zum Überstand 700  $\mu\text{l}$  Isopropanol zugegeben, der Ansatz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauffolgend wurde die präzipitierte DNA durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol gewaschen und bei RT 10 min inkubiert. Danach wurde erneut bei 14000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA bei 37°C bei geöffnetem Gefäßdeckel zur Abtrennung von Restethanol auf einem Schüttelinkubator belassen. Abschließend wurde die DNA in 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und wie in Abschnitt I.13.8 in elektrokompetente *E.Coli* XL1 Blue eingebracht.

#### **IV. 14. Methoden zur Bearbeitung von Mausmodellen**

##### **IV. 14. 1. Tierhaltung**

Die verwendeten Mäuse wurden in einer Barrierehaltung des VHH der CAU-Kiel gezüchtet und gehalten. Halbjährlich wurden verschiedene Kontroll-Tiere in den entsprechenden

Zuchträumen auf potentielle Pathogenkontaminationen nach Vorgaben der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) überprüft.

#### IV. 14. 2. Schwanzbiopsie und Vorbereitung der genomischen DNA

2-6 Wochen alte Mäuse wurden fixiert und ein kleines Stück (0,3-0,5 cm) Schwanz mit einer Präparationsschere abgeschnitten. Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen und zum Verschließen der Wunde wurde das Präparationsbesteck zusätzlich auf 250°C erhitzt. Die genomische DNA wurde unter Verwendung des *DirectPCR-Lysis-Kits* (Peqlab, Erlangen, D) isoliert. Hierzu wurden 200 µl *DirectPCR-Lysis-Puffer* und 2 µl Proteinase-K-Lösung (Konz.: 10 mg/ml) zur Schwanzspitze gegeben, der Ansatz ü. N. bei 56°C inkubiert und abschließend die Proteinase-K durch Erhitzen für ca. 60 min auf 85°C inaktiviert. Anschließend konnte die DNA-haltige Lösung zur Genotypisierung der Mäuse verwendet werden.

#### IV. 14. 3. Markierung und Zucht der Mäuse

Zusätzlich zur Schwanzbiopsie wurden bei 2-6 Wochen alten Mäusen Ohrlochmarkierungen mit einer sterilen Ohrlochzange gesetzt, um die Tiere später zweifelsfrei ihrem jeweiligen Genotyp zu ordnen zu können. Dazu wurde die Ohrlochmarkierung auf einer speziellen Zuchtkarte direkt am Käfig und auch in zusätzlichen Zuchtlisten protokolliert.

**Tab. 26: Strategie zur Ohrlochmarkierung bei Mauszuchten**

Markierung	Bezeichnung
Kein Ohrloch	-
Ohrloch links	l
Ohrloch rechts	r
Ohrloch links und rechts	rl
Zweifachohrloch links	ll
Zweifachohrloch rechts	rr

Die Liste konnte nach diesem Schema beliebig fortgesetzt werden.

Weiterhin wurden Geschlecht und Geburtsdatum der Mäuse protokolliert und jeder Maus einer Zucht in fortlaufender Reihenfolge eine Nummer zugewiesen. Zur Optimierung der Zuchtplanung wurden zusätzlich auch Wurfgrößen von Dauerverpaarungen (DVP) und Terminverpaarungen (TVP) notiert.

#### IV. 14. 3. 1. Dauerverpaarung (DVP)

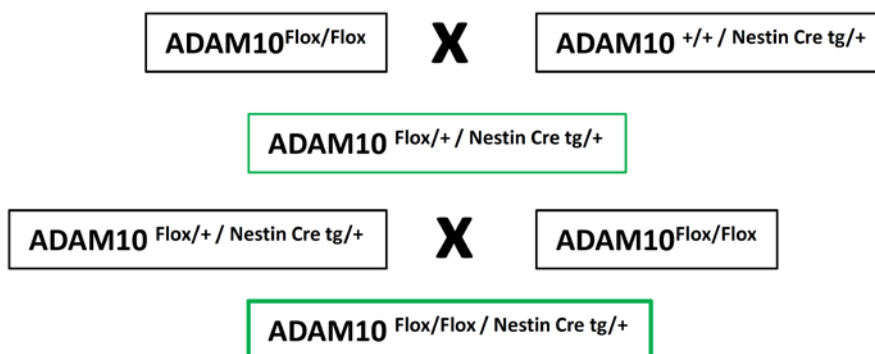
Zur Verbreiterung einer Mauszucht wurde eine bestimmte Anzahl von Dauerverpaarung angesetzt. Hierzu wurden ein Weibchen und ein Männchen dauerhaft zusammen in einem Käfig gehalten und die Jungtiere nach der Entwöhnungsphase herausgenommen und geschlechterspezifisch getrennt.

#### IV. 14. 3. 2. Terminverpaarung (TVP)

Zur Analyse verschiedener embryonaler und postnataler Stadien von Mäusen sind Terminverpaarungen essentiell. Hierzu wurde nach Möglichkeit ein Männchen (optimal 3-6 Monate alt) aus einer bereits bestehenden DVP entnommen und einzeln für drei Tage in einen Käfig gesetzt, damit dieses Männchen die Reviermarkierung zum Zeitpunkt der TVP abgeschlossen hatte. Danach wurde am Abend ein Weibchen (optimal 3-6 Monate alt) zugesetzt und am nächsten Tag eine „Plug-Kontrolle“ durchgeführt, das Gewicht des Weibchen protokolliert und dieses in einen anderen Käfig gesetzt. Nach 7 und 10 Tagen wurde das Weibchen erneut gewogen.

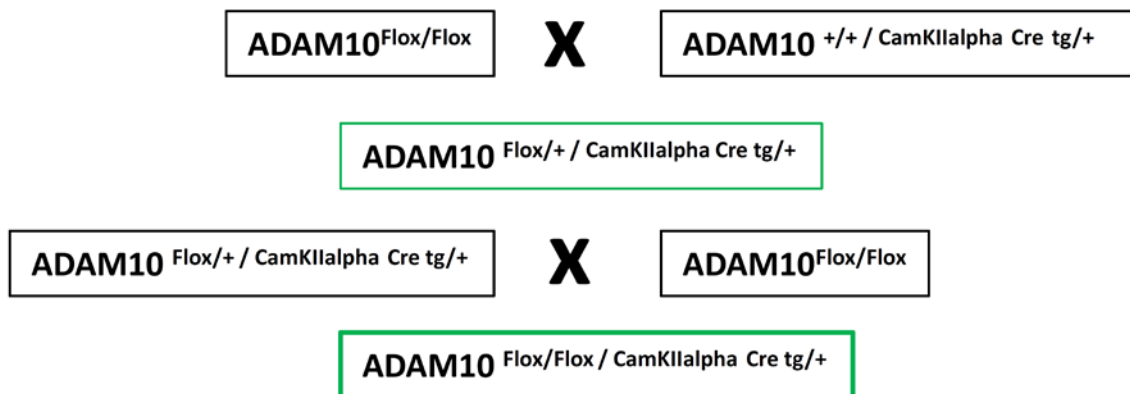
#### IV. 14. 3. 3. Zuchtschemata der verwendeten Mäuse

Die in den Experimenten verwendeten konditionalen Knockout-Mauslinien wurden nach folgenden Zuchtschemata generiert (s. Abb. 10, 11). Hierbei wurde darauf geachtet, dass das *Cre-Rekombinase*-Transgen aufgrund der Toxizität bei Homozygotie nur heterozygot in den Tieren auftrat (Forni et al., 2006).



**Abb. 10: Verpaarungsschema zur konditionalen Deletion von ADAM10 in neuronalen Stammzellen.**

Mäuse mit doppelt „geflochten“ ADAM10 Loci ( $ADAM10^{Flox/Flox}$ ) wurden mit heterozygoten Nestin-Cre<sup>tg/+</sup>- Mäusen verpaart. Nach Mendel sollten 50% der Nachkommen den benötigten Genotyp  $ADAM10^{Flox/+} / Nestin-Cre^{tg/+}$  für die weitere Zucht aufweisen (Mendel G., 1865). Anschließend wurden  $ADAM10^{Flox/Flox}$  mit  $ADAM10^{Flox/+} / Nestin-Cre^{tg/+}$  verpaart und ein  $ADAM10^{Flox/Flox} / Nestin-Cre^{tg/+}$  (konditionaler Knock-Out) mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% erhalten.



**Abb. 11: Verpaarungsschema zur konditionalen Deletion von ADAM10 im adulten ZNS.**

Mäuse mit doppelt „gefloxten“ ADAM10 Loci ( $ADAM10^{Flox/Flox}$ ) wurden mit heterozygoten CamKIIalpha-Cre<sup>tg/+</sup>- Mäusen verpaart. Nach Mendel sollten 50% der Nachkommen den benötigten Genotyp  $ADAM10^{Flox/+} / CamKIIalpha-Cre\ tg/+$  für die weitere Zucht aufweisen. Anschließend wurden  $ADAM10^{Flox/Flox}$  mit  $ADAM10^{Flox/+} / CamKIIalpha-Cre\ tg/+$  verpaart und ein  $ADAM10^{Flox/Flox} / CamKIIalpha-Cre\ tg/+$  (konditionaler Knock-Out) mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% erhalten.

#### IV. 14. 4. Präparation von Mausembryonen (E11-E18)

TVPs wurden entsprechend angesetzt und das tragende Muttertier durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Maus an den Läufen auf einer Präparationsunterlage fixiert, der Bauchbereich mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Bauchdecke geöffnet. Die Embryonen wurden entnommen und in 4°C kaltes PBS/HBSS überführt und dort der Dottersack und die Nabelschnur entfernt. Die präparierten Embryonen konnten anschließend zur neuronalen Präparation, Histologie und proteinbiochemischer Charakterisierung weiterverwendet werden.

#### IV. 14. 5. Präparation von ZNS-Bereichen der adulten Maus

Mäuse wurden je nach Alter entweder durch Dekapitation oder CO<sub>2</sub>-Atmosphäre getötet. Der Kopfbereich wurde abgetrennt, mit 70%igem Ethanol desinfiziert und in caudaler, rostraler Richtung das Fell bis zur Nase mit einer sterilen Präparationsschere eingeschnitten. Der Schädel wurde anschließend in caudaler, rostraler Richtung zwischen den cerebellaren Hemisphären und den beiden Großhirnhälften aufgeschnitten. Der Schädelknochen wurde entfernt, die verschiedenen Nervenfasern und das Stammhirn abgetrennt und anschließend bestimmte ZNS-Bereiche (Kortex, Hippokampus, Cerebellum, Mittelhirn) präpariert und für weitere Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C eingelagert.

#### IV. 14. 6. Perfusion von Mäusen

Zur Vorbereitung von Organen zur histologischen Charakterisierung wurden die Tiere perfundiert. Hierzu wurden die Tiere mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin (12 mg Ketamin und 1,6 mg Xylazin pro ml in 0,9%iger NaCl-Lösung) narkotisiert und der Lid- oder Kneifreflex bis zur tiefen Narkose kontrolliert. Anschließend wurde die Maus an den Läufen auf einer Präparationsunterlage fixiert, der Bauch- und Brustbereich mit 70%igem Ethanol behandelt und der Brustkorb der Maus zur Freilegung des Herzens aufgeschnitten. Danach wurde in den linken Ventrikel des Herzens eine Kanüle eingeführt, ein Druck von ca. 80 mmHg aufgebaut und der rechte Vorhof des Herzens mit einer Präparationsschere aufgeschnitten. Der Druck von 80 mmHg wurde während des gesamten Perfusionsvorgangs aufrecht erhalten. Als Lösungen wurden erst PBS oder andere isotonische Lösungen verwendet und anschließend die Gewebe durch Perfusion mit 4%iger PFA- oder Glutaraldehyd-Lösung in PBS fixiert.

#### IV. 14. 7. Verhaltensanalysen von Mäusen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten aus Verhaltensanalysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Rudi d'Hooge*, Leuven, Belgien gewonnen. Die LTP-Analysen wurden von *Dr. Tariq Ahmed* durchgeführt. Langzeitpotenzierungs-Analysen (*long-term-potential*, LTP) der Schaffer-Kollaterale dienten hierbei als Modell der synaptischen Reizweiterleitung und der frühen synaptischen Plastizitäts-Analyse der konditionalen ADAM10-Mäuse unter Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors im Vergleich zu Kontrollen. Hierbei wurden Neurone der CA3-Region des Hippocampus durch einen kurzen Hochfrequenzpuls (*Tetanus-Burst-Stimulation*) stimuliert und in der CA1-Region des Hippocampus das entstehende frühe postsynaptische Potential (*excitatory-postsynaptic potential*, EPSP) detektiert (Van der Jeugd et al., 2011). Mehrere dieser Hochfrequenzpulse führen zu einer Modifikation und Optimierung der synaptischen Effektivität, die mehrere Wochen anhalten kann und ein Modell für das deklarative Gedächtnis darstellt. Weiterhin wurden verschiedene Neuromotor- (Griffsstärken-, Käfigaktivitäts- und Rotarodanalysen), Explorations- (*Open-field*- und *elevated-plus-maze*-Analysen) und Lern- und Gedächtnistests (*passive avoidance*- und *morris water maze*-Analysen) durch *Dr. Stijn Stroobants* durchgeführt (Blanz et al., 2008; Sydow et al., 2011). Die experimentellen Grundlagen und Details sind in den zitierten Publikationen beschrieben.

## IV. 15. Histologische Methoden

Zur histologischen Analyse wurden Mausembryonen und das adulte Maus-ZNS präpariert und in 4% PFA in PBS gelagert. Alle histologischen Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Markus Glatzel* der Neuropathologie-Abteilung des UKE Hamburg durchgeführt.

### IV. 15. 1. 1. Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Zur spezifischen Färbung zellulärer und organspezifischer Kompartimente eignet sich die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung). Das Prinzip der HE-Färbung beruht auf der Verwendung von zwei unterschiedlichen Farbstoffen. Hierbei wird zwischen einem sauren Farbstoff (Eosin), der eine negative Ladung trägt und einem „basischen“ Farbstoff (Hämatoxylin), der eine positive Ladung trägt, unterschieden. Der „basische“ Farbstoff reagiert in einer pH-Wert-abhängigen Reaktion mit Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, Sulfatgruppen von Glykosaminoglykanen und Carboxylgruppen von Proteinen. Dagegen bindet der saure Farbstoff Eosin hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen an kationische Gruppen im Cytoplasma und an extrazelluläre Fasern. Diese Bindung ist jedoch weit weniger spezifisch als die Bindung des basischen Farbstoffes. Durch diese unterschiedlichen Bindungsspezifitäten der verwendeten Farbstoffe wird eine klare Differenzierung zwischen einigen zellulären Strukturen und Organellen der präparierten Organe möglich (Jorundsson et al., 1999).

### IV. 15. 1. 2. Durchführung HE- und DAB-Färbung

Fixierte Embryonen oder Hirne wurden nach dem Fixierungsprozess in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in niedrig schmelzendes Paraffin eingebettet. Hierbei wurde nach Standardprotokollen der Neuropathologie des UKE-Hamburg verfahren. Anschließend wurden 4 µm Schnitte angefertigt und eine HE-Färbung nach Standardlaborprotokollen durchgeführt. Weitere Färbungen wurden in einem Färbeautomat Ventana Benchmark XT (Ventana, Arizona, US) durchgeführt. Entparaffinierte Schnitte wurden 30-60 min in Citrat-Puffer bei pH 6,0 zur Freilegung der Antigene aufgekocht. Anschließend wurden die Schnitte in Erstantikörper-Lösung (5% Ziegen-Serum (Dianova, Hamburg, D), 45% TBS-Lösung, pH 7,6, 0,1% Triton X-100 Antikörperverdünnungs-Lösung (Zytomed, Berlin, D)) 1 h inkubiert. Danach wurde zur Detektion der Erstantikörper ein anti-Kaninchen oder anti-Ziege *histofine Simple Stain MAX PO Universal polymer*, oder *mouse staining kit* (zur Detektion von Maus-Antikörpern auf Mausschnitten) (Nichirei Bioscience, Tokyo, J) verwendet. Alle weiteren Detektionsschritte wurden mit dem

*ultraview universal DAB detection kit* (Ventana, Arizona, US) durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen dienten interne Kontrollen und zweitantikörperbehandelte Schnitte.

#### **IV. 16. Proteinbiochemische Methoden**

##### **IV. 16. 1. Herstellung von Zell- bzw. Gewebelysaten**

Zur Herstellung von Zell- oder Gewebelysaten wurde je nach Anwendung ein bestimmtes Puffersystem (ADAM-Lyse-Puffer oder EBC-Puffer) verwendet. Hierbei wurde immer auf Eis oder einer Temperatur von 4°C gearbeitet und dem entsprechenden Puffer ein Proteaseinhibitorcocktail (Complete®) nach Angaben des Herstellers/Vertreibers zugesetzt. Das Volumen des Lysepuffers wurde der Zellpellet- bzw. Gewebegröße oder den Anwendungen angepasst und Gewebe mit dem Precellys® und Zellpellets durch Ultraschallbehandlung (4°C, 15 s Ultraschall, 1 min auf Eis) aufgeschlossen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 30 min auf Eis belassen. Danach wurde bei 13000 rpm (Fresco 21 *Centrifuge*, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) 4°C für die Dauer von 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine BCA-Proteinbestimmung und das Lysat wurde zur Langzeitlagerung bei -20°C eingefroren oder direkt für die SDS-PAGE vorbereitet. Zur Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden die Proben mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 60°C oder 95°C je nach experimentellen Bedingungen denaturiert.

##### **IV. 16. 2. BCA-Assay (Proteinbestimmung)**

Der BSA-Proteinstandard wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Der BCA-Assay kombiniert die Biuret-Reaktionen mit dem sensitiven Nachweis von  $\text{Cu}^+$  durch *Bicinchoninic Acid* (BCA). Peptide mit mehr als drei AS reduzieren unter alkalischen Bedingungen  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , wobei das  $\text{Cu}^+$  in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration einen wasserlöslichen stabilen Komplex mit BCA bildet, der Licht bei 562 nm absorbiert. Mit geeigneten Proteinstandards konnte der Proteingehalt einer unbekannt Probe/Lysat bestimmt werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 10 µl Standard-Lösung verschiedener Konzentrationen und 10 µl einer unbekannt Probe in eine 96-well-Platte gegeben, 200 µl einer Mischung aus Lösung A und B (Verhältnis 50:1) zugegeben und die Platte bei 37°C 20-30 min inkubiert und danach bei 562 nm in einem SynergyHT-Multifunktionsplattenmessgerät vermessen.



### IV. 16. 3. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE eignet sich zur molekulargewichtsspezifischen Trennung von Proteinen. Zur Herstellung der Gele kommt Acrylamid zum Einsatz, welches mit einem Vernetzer meist N,N-Methylenbisacrylamid zu einer festen Gelmatrix auspolymerisiert. Die Totalkonzentration an Acrylamid und Vernetzer und der Vernetzungsgrad bestimmen die Größe der entstehenden Poren bei der Polymerisationsreaktion und diese können je nach Molekulargewicht und Eigenschaften der zu untersuchenden proteinhaltigen Proben den jeweiligen Anforderungen angepasst werden.

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamidelektrophorese beruht auf der Maskierung der Eigenladung der Proteine durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat), welches mit den Proteinen micellenartige Protein-Detergenz-Komplexe, mit einem konstanten Masse-zu-Ladungsverhältnis, bildet. Zusätzlich werden Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine durch Hitze aufgelöst und durch den Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol bzw. Dithiothreitol Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen reduziert. Für die Auftrennung der Proteine bei einer diskontinuierlichen Elektrophorese wird ein von U.K. Laemmli et al. (1970) entwickeltes Puffersystem aus HCl/Tris-Glycin eingesetzt. Die Bestimmung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proteine kann durch einen Standard mit bekanntem Molekulargewicht, der bei der Elektrophorese mitgeführt wird, erfolgen.

**Tab. 27: Herstellung von SDS-Gelelen**

<b>Trenngel</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>Sammelgel 4x (4,5%)</b>
<b>Sammelgelpuffer</b>				1,35 ml
<b>Trenngelpuffer</b>	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	
<b>Polyacrylamid (30%)</b>	2,5 ml	3,3 ml	4,2 ml	1,75 ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	4,8 ml	4,0 ml	3,1 ml	6,85 ml
<b>10% APS</b>	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele wurden nach Tab. 27 angesetzt. Hierzu wurde das Mini-ProteanII<sup>TM</sup>- und das XCell SureLock<sup>TM</sup> Mini Cell-System verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Zur Herstellung der SDS-Gele für das Mini-ProteanII<sup>TM</sup>-System wurden 1,5 mm *Spacer*-Platten und geeignete Deckplatten verwendet. Die Kämme für

die Probentaschen wurden dem Ansatz entsprechend angepasst (10x- oder 15x-Kämme, 1,5 mm). Vor dem Starten der SDS-PAGE wurden die Gele in eine entsprechende Gelkammer eingesetzt und diese mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Gleiche Mengen an Protein der jeweiligen Proben und ein entsprechender Größenmarker wurden unter Verwendung einer Hamilton-Pipette (5-50  $\mu$ l) aufgetragen. Eine Spannungsquelle wurde angeschlossen und die SDS-PAGE bei 100 V für eine Dauer von etwa 90 min durchgeführt. Bei der Verwendung des *XCell SureLock<sup>TM</sup> Mini Cell*-System wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von vorgegossenen 4-12%igen Bis/TRIS-Gradienten-Gelen (10x- und 15x-Kämme) verfahren. Hier wurde ein spezieller *MES-Running-Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe, D) verwendet. Bei der Durchführung der SDS-PAGE variierten Spannung (100-160 V) und Dauer (90-120 min) je nach experimentellem Ansatz.

#### IV. 16. 4. Western Blot

Das Verfahren des Western Blots eignet sich zur anschließenden Immobilisierung von Proteinen auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran oder Nitrozellulose-Membran, die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Weitere Protein-Bindungsstellen auf der PVDF- bzw. Nitrozellulose-Membran werden durch die Inkubation mit einer proteinhaltigen Lösung abgesättigt. Im Anschluss an das Blotverfahren können Epitope bestimmter Proteine mit geeigneten, spezifischen Primärantikörper markiert und anschließend durch Sekundärantikörper, die sich gegen den Fc-Teil der Primärantikörper richten, identifiziert werden. Diese Sekundärantikörper sind mit *horse-raddish-peroxidase* (HRP) gekoppelt, welche in Anwesenheit von  $H_2O_2$  Luminol oxidiert und bei dieser Reaktion detektierbare Chemilumineszenz erzeugt.

Für die Durchführung von Western Blots wurde in dieser Arbeit das Criterion<sup>TM</sup>-System (BioRad, München, D) verwendet. Zur Vorbereitung wurden Whatman-Papiere und Nitrozellulose-Membranen ausgeschnitten und 1x Tank-Blot-Puffer vorgekühlt und ein „Sandwich“ geschichtet. Auf der Westernblotkassette wurden auf der roten Seite das Sandwich (Filter, Whatmanpapier, Membran, Gel, Whatmanpapier, Filter) geschichtet und in die Blotappartur eingesetzt. Das Tank-Blot-Verfahren wurde bei 20 V konstanter Spannung ü. N. und anschließend bei 70 V für 30 min durchgeführt. Zum Nachweis kleiner Proteine wurde bei 250 mA konstanter Stromstärke für 2 h und zur Übertragung größerer Proteine bei 800 mA für 2 h gearbeitet. Anschließend wurden die Membranen mit 5% Milchpulver in TBS-T blockiert und danach erfolgte die Markierung der immobilisierten Proteine mit verschiedenen primären und sekundären Antikörpern in 5% Milchpulver in TBS-T bzw. TBS-T. Nach Antikörperinkubation wurde 4x jeweils 15 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubationszeiten mit Primärantikörpern und die

Temperatur variierten je nach experimentellem Ansatz. Die Inkubationszeit mit HRP/POD-gekoppeltem Zweitantikörper betrug maximal eine Stunde. Anschließend wurde der Blot unter Verwendung des *ECL-Advance Western Blot Detection-Systems* (GE Healthcare, München, D) an einem LAS3000 Mini- bzw. LAS4000-Chemilumineszenzdetektor entwickelt.

#### **IV. 16. 5. Koimmunpräzipitation**

Zur Charakterisierung von nichtkovalent assoziierten Proteinkomplexen wurde das Verfahren der Immunpräzipitation angewandt. Hierbei wurde aus einem Gewebe- bzw. Zellysate mit einem geeigneten Antikörper ein Zielprotein präzipitiert und ein assoziiertes Protein kopräzipitiert. Eine anschließende SDS-PAGE und ein Western-Blot dienten dem spezifischen Nachweis beider Proteine.

Geerntete Zellen wurden in 500 µl EBC-Lyse-Puffer bei 4°C wie beschrieben lysiert und anschließend bei 13000 rpm (*Fresco 21 Centrifuge*, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 50 µl als Lysatkontrolle entnommen, das Restlysate mit 1,5 µl eines geeigneten Antikörpers versetzt und ü. N. auf einem Rotationsrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 µl Protein-G-Agarose-*Beads* durch mehrfaches Waschen mit EBC-Lyse-Puffer gewaschen und zum Lysat und Antikörper gegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 30 min auf einem Rotationsrad inkubiert, die *Beads* anschließend mehrfach mit EBC-Lyse-Puffer gewaschen und zur Denaturierung der Proteinkomplexe und Antikörper mit 50 µl 1x SDS-PAGE-Probenauftragspuffer für 30 min bei 60°C inkubiert.

#### **IV. 16. 6. Pulse-Chase-Markierung von Proteinen**

*Pulse-Chase*-Analysen dienen zur Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins, des *Proteinturnovers* und der zeitlich gekoppelten Analyse von posttranslationalen Proteinmodifikationen. Eine *Pulse-Chase*-Analyse wird mit radioaktiven Aminosäuren durchgeführt, die während der Translation in neusynthetisierte Proteine eingebaut werden. Hierbei bestimmt die Dauer (*Pulse*) der Inkubation der Zellen mit radioaktiven Aminosäuren die Proteinmenge, die radioaktiv markiert und zu verschiedenen *Chase*-Zeitpunkten analysiert wird. Die Arbeiten mit Radioaktivität wurden nach Einweisung und in speziell dafür vorgesehenen Räumlichkeiten mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt.

N2A-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden 24-36 Stunden vor dem radioaktiven *Pulse* transfiziert. Danach wurde das DMEM *High Glucose* Vollmedium abgenommen, die

Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und für 3 h bei 37°C in DMEM ohne L-Methionin/L-Cystein gehungert. Danach wurde DMEM ohne L-Methionin/L-Cystein mit 200µSi/ml 35S markiertem L-Methionin/L-Cystein auf die Zellen gegeben und ein radioaktiver *Pulse* für die Dauer von einer Stunde bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und DMEM *High Glucose* Vollmedium auf die Zellen gegeben und die Zellen zu unterschiedlichen *Chase*-Zeitpunkten (0 h, 2 h, 6 h, 18 h und 30 h) geerntet. Zum Ernten der Zellen wurden auf Eis 500 µl EBC-Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben, anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt und während weiterer *Chase*-Zeitpunkte bei -20°C eingefroren. Danach wurde bei 4°C und 13000 rpm (Fresco 21 *Centrifuge*, Heraeus, Thermo Fisher, Schwerte, D) für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Darauffolgend wurde eine BCA-Proteinbestimmung durchgeführt, gleiche Proteinmengen für die anschließende Immunpräzipitation eingestellt und 1,5 µl eines spezifischen Antikörpers und 30 µl gewaschene Protein-G-Agarose-*Beads* zum Lysat gegeben. Der Reaktionsansatz wurde ü. N. bei 4°C in einem Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* mehrfach mit 4°C kaltem EBC-Lyse-Puffer gewaschen, der Überstand abgenommen und die *Beads* in 30 µl 1x SDS-PAGE-Probenauftrags-Puffer bei 95°C erhitzt. Für die SDS-PAGE wurde das *XCell SureLock™ Mini Cell*-System verwendet.

#### IV. 16. 7. Nachweis radioaktiv markierter Proteine

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in Fixierungslösung (5% Essigsäure, 20% Methanol in ddH<sub>2</sub>O) 1,5 h fixiert und anschließend für 30 min in Enhance™-Lösung (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) gelegt. Währenddessen wurden Zellophan-Folien in ddH<sub>2</sub>O gelegt und die Geltrocknungslösung (200 ml Ethanol, 100 ml Methanol, 100 ml Isopropanol, 20 ml Glycerol, 580 ml ddH<sub>2</sub>O) vorbereitet. Anschließend wird das Gel mit etwas Geltrocknungslösung blasenfrei zwischen zwei Zellophan-Folien eingespannt und ü. N. getrocknet. Danach wird in Dunkelheit ein CL-Xposure™-Film (Thermo Fisher, Rockford, US) auf das Gel in einer Entwicklungskassette gelegt und der Film ca. 7 Tage bei -80°C exponiert. Danach erfolgte die Entwicklung des Films nach Angaben des Herstellers der Entwicklungs- und Fixier-Lösung (AGFA, Mortsel, Belgien).

#### IV. 16. 8. Sandwich-ELISA

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen von Zellkulturüberständen wurden mit dem *Mouse/Rat sAPPα Assay Kit* und dem *Mouse/Rat Amyloidβ (1-42) Assay Kit* (IBL, Hamburg, D) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

#### **IV. 16. 9. Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen**

Zur Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen wurden N2A-Zellen auf Eis abgekühlt, anschließend mit eiskaltem PBS-CM gewaschen und danach 3-4 ml Biotin-Lösung (1 mg/ml) pro 10 cm Schale auf die Zellen gegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Bei einer Temperatur von 4°C werden mögliche endozytotische Prozesse unterbunden, wodurch nur Zelloberflächenproteine mit Biotin markiert werden. Anschließend wurde die Biotin-Lösung abgenommen und 10 ml eiskalter Quenching-Puffer auf die Zellen gegeben und bei 4°C 10 min inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS-CM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und eine Zellyse mit 500 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0,1% SDS, Complete<sup>®</sup>) durchgeführt. Daraufhin folgte eine BCA-Proteinbestimmung, eine Lysatkontrolle wurde abgenommen und 75 µl gewaschene Streptavidin-*Beads* zum Restlysat gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Abschließend wurden die *Beads* mehrfach mit Lysepuffer gewaschen und die Probe in 50 µl 1x SDS-PAGE-Probenauftrags-Puffer bei 60°C für 20 min erhitzt. Danach erfolgten SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen.

#### **IV. 17. Zellbiologische Methoden**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank und mit desinfizierten bzw. autoklavierten Materialien, Geräten und Reagenzien gearbeitet. Hierbei wurden die Zelllinien, wenn nicht anders beschrieben, in DMEM *High Glucose* mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin in einen Zellkulturinkubator bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 37°C kultiviert.

##### **IV. 17. 1. Passagieren von Zellen**

Konfluent bewachsene 10 cm Zellkulturschalen wurden mehrfach mit PBS gewaschen, 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Leichtes Klopfen erleichterte das Ablösen der Zellen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und bei 500xg für 5 min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in neuem DMEM *High Glucose* Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt (CASY<sup>®</sup>) und in entsprechender Verdünnung für weitere Arbeiten ausgesät.

##### **IV. 17. 2. Zählen von Zellen**

Zum Zählen von Zellen wurde das CASY<sup>®</sup>-System (Roche, Mannheim, D) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Dazu wurden Zellen abgelöst und in 10 ml

Vollmedium aufgenommen. Danach wurden 100 µl der resuspendierten Zellen in 10 ml isotonischer CASY<sup>®</sup>-Ton-Lösung gegeben, das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig invertiert und die Zellzahl mit einem für diese Zelllinie etablierten Programm am CASY<sup>®</sup> vermessen.

#### **IV. 17. 3. Langzeitlagerung und Auftauen von Zelllinien**

Zur Langzeitlagerung wurden Zelllinien abgelöst und anschließend in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (Vollmedium + 10% DMSO) aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Danach wurden die Zellen für 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen von Zelllinien wurden eingefrorene Zellen möglichst schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 9 ml Vollmedium aufgenommen und zur Abtrennung des toxischen DMSO bei 300xg 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Vollmedium zur Kultivierung aufgenommen und in einer 10 cm Schale ausgesät.

#### **IV. 17. 4. Transiente Transfektion von Zellen**

Zur transienten Transfektion von Zellen wurde das Transfektionreagenz FuGENE<sup>®</sup>HD (Roche, Mannheim, D) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. DMEM *High Glucose* wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, die zu transfizierende DNA und abschließend das Transfektionsreagenz zugegeben. Danach wurde das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen, ein geringes Volumen Vollmedium auf die Zellen gegeben und der Transfektionsansatz ringförmig tropfenweise auf der Platte verteilt. Die Zellen wurden für 6 h bzw. ü. N. bei 37°C inkubiert, anschließend Vollmedium zugegeben und die Zellen für 36-48 h bei 37°C kultiviert.

#### **IV. 17. 5. Ernte von Zellen**

Zur Ernte von Zellen wurden diese mehrfach vorsichtig mit PBS gewaschen, 1 ml PBS auf die Zellen pipettiert und die Zellen bei 4°C ca. 5 min abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der entsprechenden Platte abgekratzt, in Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen bei 4°C, 300-700xg für 10 min abzentrifugiert, der Überstand entweder verworfen oder für ELISA-Analysen weiter verwendet und die Zellpellets bei -20°C bis zur Lyse eingefroren.

#### **IV. 17. 6. Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting, FACS)**

Fluoreszenz-aktivierte-Zellsorter (FACS) finden sowohl in der Routineanalytik als auch in der erweiterten Forschung Anwendung und eignen sich zur spezifischen Erkennung und

Quantifizierung bestimmter Zellpopulationen aus Blut- und Gewebeproben. Das Prinzip einer FACS-Messung beruht auf der spezifischen Markierung von Zellen durch fluoreszenzgekoppelte monoklonale Antikörper gegen zellcharakteristische Oberflächenmarker und der hydrodynamischen Fokussierung der Zellen, wodurch jede einzelne Zelle analysiert werden kann. Die Fluoreszenz bzw. die Emission nach Anregung der zellgebundenen Fluorophore durch Laser, kann durch verschiedene Kanäle mit unterschiedlichen Detektoren gemessen werden. Zusätzlich können Zellpopulationen auch an strukturellen Merkmalen wie Größe und Granularität unterschieden werden, indem Fotomultiplier die Lichtstreuung während der Messung analysieren. Die Vermessung einzelner Zellpopulationen oder komplexerer Zellzusammensetzungen gibt Aufschluss über Zellpopulationen, quantitative Verhältnisse, Expressionrate von Oberflächenmolekülen und die Vitalität der Zellen.

Zur Vorbereitung von FACS-Analysen wurden Zellen entsprechend transfiziert und mit Accutase (PAA, Cölbe, Deutschland) abgelöst, wobei nach Angaben des Herstellers verfahren wurde. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl im CASY<sup>®</sup> bestimmt.  $5 \cdot 10^5$  Zellen wurden mit  $1 \mu\text{g}$  Primärantikörper bei  $4^\circ\text{C}$  auf einem Rotationsrad inkubiert und anschließend die Zellen mehrfach mit FACS-Puffer gewaschen ( $500 \times g$ , 5 min, Überstand abnehmen). Danach erfolgte die Färbung mit einem spezifischen Zweitantikörper für 45 min und abschließend durch mehrfaches Waschen mit FACS-Puffer die Abtrennung ungebundener Antikörpermoleküle. Eine Propidium-Iodidfärbung diente zum Ausschluss toter Zellen während der Messung und eine geeignete Isotypkontrolle diente als Spezifitätskontrolle des verwendeten Primärantikörpers. Die Zellen wurden auf einem FACSCanto<sup>™</sup> vermessen und die Analyse der Daten erfolgte mit der Analysesoftware WinMDI 2.8.

#### **IV. 17. 7. Immunfluoreszenz-Analysen**

Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Glasplättchen ausgesät, entsprechend transfiziert und 36-48 h nach Transfektion mit PBS mehrfach vorsichtig gewaschen. Danach wurden die Zellen in 4%iger PFA/PBS-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,12% glycin- und 0,2 % saponinhaltiger PBS-Lösung für 10 min bei RT. Danach erfolgte ein Blockierungsschritt mit 10% FCS in 0,2% saponinhaltiger PBS-Lösung. In einer „dunklen Feuchtkammer“ wurden  $60 \mu\text{l}$  der Primärantikörperlösung (Antikörper in gewünschter Verdünnung, 0,2% Saponin, 10% FCS in PBS) vorgelegt, die Glasplättchen mit fixierten Zellen vorsichtig auf den Tropfen gelegt und

eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Glasplättchen mit den Zellen mehrfach in 0,2% saponinhaltiger PBS-Lösung in Bechergläsern gewaschen, anschließend 60 µl Sekundäntikörperlösung (Fluorophorgekoppelter Zweitantikörper in gewünschter Verdünnung in 0,2% saponin- und 10% FCS-haltiger PBS-Lösung) vorgelegt und die Glasplättchen vorsichtig auf den Tropfen gelegt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Glasplättchen erneut gewaschen und vor der Fixierung auf Objektträgern zweifach in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Fixierung der Glasplättchen wurden 1 µl Dapi-Lösung in eine Mischung aus DABCO/Mowiol (17% Mowiol, 33% Glycerol, 50 mg/ml DABCO, 1 µg/ml DAPI) pipettiert, der Ansatz auf 60°C erhitzt und 15 µl auf einem Objektträger vorgelegt. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in Dunkelheit getrocknet und gelagert. Die Auswertungen der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop FV1000 (Olympus, Hamburg, D).

#### IV. 17. 8. Präparation primärer Neuronen

Einen Tag vor Beginn der Präparation von primären Neuronen aus embryonalen Gewebe wurden die benötigten Medien, Puffer und Reagenzien vorbereitet und steril filtriert. Die verwendeten Zellkulturplatten wurden mit Poly-L-Lysin-Lösung vorbehandelt und am Tag der neuronalen Präparation mehrfach mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Folgende Lösungen werden für eine primäre neuronale Kultur verwendet:

**Tab. 28: Zusammensetzung der Medien und Lösungen für primäre neuronale Kulturen**

Medium/Lösung	Zusammensetzung
MEM-HS	10 ml MEM 10x 10 ml Pferdeserum 3 ml NaHCO <sub>3</sub> (7,5% w/v) 1 ml Glutamin 3 ml Glukose (20% w/v) 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin Auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
HBSS	10 ml HBSS 10x 1 ml HEPES 1M 500 µl NaHCO <sub>3</sub> (7,5% w/v) 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin Auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
Neurobasal Medium	100 ml Neurobasalmedium 2 ml <i>B27 Supplement</i> 250 µl Glutamin 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin



Medium/Lösung	Zusammensetzung
10x Boratpuffer (1M)	62 g Borsäure 1 l ddH <sub>2</sub> O pH mit NaOH auf 8,5 einstellen
Poly-L-Lysin-Lösung	Vorrat: 10 mg/ml Poly-L-Lysin in ddH <sub>2</sub> O Zur Verwendung auf 0,5 mg/ml in 1x Boratpuffer verdünnen
Arabinosylcytosin (AraC)-Lösung	0,1 M in ddH <sub>2</sub> O
2,5% Trypsin-Lösung	1:10 in HBSS verdünnen

Zur Präparation primärer Neuronen wurden TVPs angesetzt und Embryone (E14.5) präpariert. Anschließend wurde ein Teil des Schwanzes in ein Reaktionsgefäß zur Genotypisierung überführt und der Kopf des Embryos abgetrennt. Anschließend wurde der Kopf des Embryos in eine Schale mit HBSS überführt, der Schädel mit einer kleinen Präparationsschere mittig von caudal nach rostral aufgeschnitten und der Schädel abgetrennt. Hierbei wurde unter einem Binokular Mikroskopsystem gearbeitet. Danach wurde die Hirnhaut und die Medulla oblongata (verlängertes Mark) entfernt, das Hirn mittels einer Präparationsschere zerkleinert und in ein Sarstedt-Röhrchen mit 10 ml HBSS überführt. Anschließend wurde das HBSS abgenommen, 500 µl 0,25% Trypsin-Lösung zu den Hirnteilen gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Danach folgten mehrere Waschstschritte mit HBSS zu Abtrennung des Trypsins. Zum Vereinzeln der Neuronen wurden Pasteurpipetten mit einem Bunsenbrenner rundgeschmolzen und die Neuronen durch pipettieren vorsichtig vereinzelt. Anschließend wurden 300 µl der Zellsuspension pro Embryo in MEM-HS enthaltende 6 cm Schalen überführt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Medium abgenommen und durch Neurobasalmedium ersetzt. Am Folgetag wurde dem Neurobasalmedium AraC zugegeben, wobei die Endkonzentration 5 µM betrug und die Neuronen ca. 7 Tage bei 37°C kultiviert.

#### IV. 17. 9. Transfektion bzw. Infektion neuronaler Zellen

Die Infektion primärer neuronaler Zellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Bart de Strooper in Leuven, Belgien durchgeführt. Details zur Infektionsmethode können der Publikation von (Jorissen et al., 2010) entnommen werden. 3-5 Tage alte neuronale Kulturen wurden mit Medium mit Semliki Forest Virus (SFV) (pSFV-1 Plasmid mit APP-WT) 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 2 h Stunden mit Medium ohne Virus inkubiert. Die Überstände wurden über einen Zeitraum von 5 h gesammelt,

anschließend die Zellen geerntet und lysiert. Abschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot.

#### **IV. 17. 10. Kultivierung und Differenzierung von Neurosphären**

Die Generierung und Differenzierung von Neurosphären wurden von Ellen Jorissen in Zusammenarbeit mit *PD Dr. Christian Bernreuther* (Neuropathologie, UKE-Hamburg in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Markus Glatzel*) durchgeführt. Details zur Kultivierung und Differenzierung können der Publikation von (Jorissen et al., 2010) entnommen werden.

#### **IV. 18. Statistik**

In dieser Arbeit wurden alle statistischen Analysen mit dem *Microsoft Office* Programm Excel durchgeführt. Bei den Analysen wurden biologische Replikate betrachtet und der ungepaarte, zweiseitige, studentische T-Test verwendet. Die errechneten P-Werte der Analysen wurden in den entsprechenden Abbildungen mit \* gekennzeichnet (\*\* $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ).

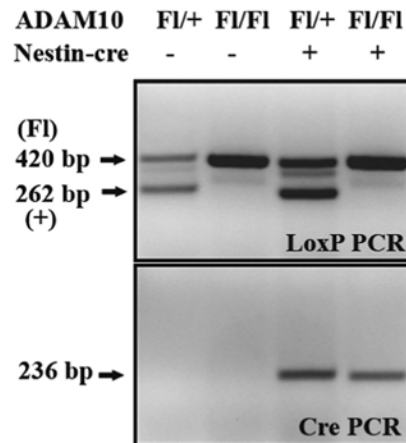
## V. Ergebnisse

### V. 1. Analyse der ADAM10-Funktion während der ZNS-Entwicklung

Zur Untersuchung der Funktion von ADAM10 während der Entwicklung des ZNS wurden ADAM10<sup>Flox/Flox</sup>-Mäuse mit ADAM10<sup>Flox/+</sup> Nestin-Cre<sup>tg/+</sup> Mäusen gekreuzt, um eine Deletion des ADAM10-Proteins in neuronalen Vorläuferzellen und neuroepithelialen Zellen ab ungefähr embryonalen Tag 10 (E10) zu erreichen. In den folgenden Abschnitten wird die Charakterisierung des Phänotyps beschrieben, wobei die Daten teilweise in Kooperation mit dem Labor von *Prof. Dr. Dr. Bart de Strooper* (Doktorandin: *Ellen Jorissen*) und dem Labor von *Prof. Dr. Markus Glatzel* (PD. Dr. *Christian Bernreuther*) erstellt wurden. Als Kontrolltiere wurden in allen Untersuchungen jeweils Wurfgeschwister verwendet, die keine Cre-Rekombinase-Expression zeigten. In den folgenden Abschnitten werden die ADAM10<sup>Flox/Flox</sup> Nestin-Cre<sup>tg/+</sup> Mäuse als konditionale Knockouts (cKO) und die ADAM10<sup>+/+</sup>-, ADAM10<sup>Flox/+</sup>- und die ADAM10<sup>Flox/Flox</sup>-Embryonen/Mäuse als Wildtyp (WT) oder Kontrolltiere bezeichnet.

#### V. 1. 1. Genotypisierung

Zur zweifelsfreien Identifikation der potentiellen konditionalen Knockout-Mäuse und ihrer entsprechenden Kontrollen wurden Genotypisierungs-PCRs aus lysierten Schwanzbiopsien der Mäuse bzw. Embryonen durchgeführt. Zur Amplifikation der WT bzw. geflochten Loci wurden eine entsprechende Genotypisierungs-PCR und eine entsprechende PCR für das Nestin-Cre-Allel nach den Angaben in IV. 13. 1. 1 durchgeführt.



**Abb. 12: Agarosegele der LoxP-PCR und PCR zum Nachweis des Nestin-Cre-Transgens.**

Schwanzbiopsien wurden von Embryonen am Embryonaltag 14 genommen und ü. N. in Lysispuffer mit Proteinase K lysiert. Anschließend wurden eine LoxP-PCR und eine Cre-PCR nach Angaben in Abschnitt IV. 13. 1. 1 durchgeführt, die Proben mit 6x-DNA-Ladepuffer versetzt und die DNA-Fragmente in einem ethidiumbromidhaltigen 2%igen Agarosegel aufgetrennt (IV. 13. 2). Gezeigt sind die erwarteten Bandenmuster für einfach „gefloxte“ ADAM10-Loci (420 bp Flox (Fl)) und 262 bp WT (+) und doppelt geflochte ADAM10-Loci. Eine schwache zusätzliche unspezifische Bande erscheint zwischen den Signalen der WT- und der geflochten Loci. Eine Bande auf Höhe von 236 bp zeigt das Vorhandensein des Cre-Allels an. Abkürzung: Basenpaar (bp).

In Abbildung 12 sind die verschiedenen nach Mendel zu erwartenden Genotypen der Mäuse/Embryonen nach den Genotypisierungs-PCRs und der Agarosegelelektrophorese dargestellt. Homozygot geflochte Embryonen/Mäuse (Banden: 420 bp Flox (Fl)) im Bereich von Exon 2 der ADAM10-Allele waren klar von heterozygoten Embryonen (Banden: 420 bp und 262 bp WT (+)) zu unterscheiden, wobei eine unspezifisch amplifizierte Bande zwischen dem Signal für den WT und dem geflochten Locus zu detektieren war. Das Nestin-Cre-Transgen konnte eindeutig durch eine spezifische PCR amplifiziert und anschließend in einer Bande (236 bp) im Agarosegel identifiziert werden.

### V. 1. 2. Embryonale Letalität der ADAM10-cKO-Mäuse

Während der Zucht der ADAM10 konditionalen Mäuse wurde festgestellt, dass nur einige ADAM10<sup>Flox/Flox</sup> Nestin-Cre<sup>tg/+</sup> Mäuse postnatale Stadien (P1) erreichten. In Tabelle 29 sind die erhaltenen Genotypen und Anzahl der Embryonen/Mäuse zu Zeitpunkten der Präparationen während der gesamten Studie dargestellt.

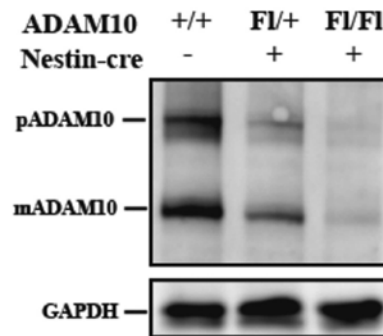
**Tab. 29: Übersicht über die erhaltenen Genotypen der untersuchten Embryonen/Mäuse.**

Alter	Anzahl (n)	F/+		F/F		ADAM10 Nestin- Cre
		-	+	-	+	
E12.5	62	6	20	21	15	
E15.5	110	24	28	33	25	
E17.5	108	26	39	18	25	
P1	72	16	23	27	6	

Tabelle 29 zeigt eine klassische zu erwartende Mendel'sche Verteilung der Genotypen am Embryonaltag 15.5 (E15.5). Durch das verwendete Verpaarungsschema wurde für die entsprechend angegebenen Genotypen eine Wahrscheinlichkeit von 25% nach Mendel ermittelt. Leichte Abweichungen von der erwarteten Mendel'schen Verteilung waren an E12.5 und E17.5 zu verzeichnen, jedoch zeigte die Analyse postnataler Stadien, dass den postnatalen Tag 1 (P1) keine ADAM10<sup>Flox/Flox</sup> Nestin-Cre<sup>tg/+</sup> Maus überlebte und auch schon an diesem Tag eine deutlich reduzierte Anzahl (n=6) an Tieren im Vergleich zur theoretisch erwarteten Tierzahl (n=18) auftrat. Hierdurch konnte festgestellt werden, dass die Deletion von ADAM10 zu frühen Zeitpunkten der murinen ZNS-Entwicklung einen drastischen, vermutlich spät embryonal bzw. früh postnatalen letalen Phänotyp verursachte.

### V. 1. 3. Verifizierung der ADAM10-Deletion im embryonalen ZNS

Durch die Genotypisierungs-PCRs konnten die verschiedenen Genotypen der Embryonen/Mäuse klar identifiziert werden. Jedoch ließen sich durch die PCR-Ergebnisse keinerlei Aussagen über die tatsächliche Deletionseffizienz oder den Verlust des ADAM10-Proteins im ZNS treffen. Aufgrund dessen wurde durch Western-Blot-Analyse die Expression des ADAM10-Proteins an E12.5 in Kompletthirnllysaten überprüft.



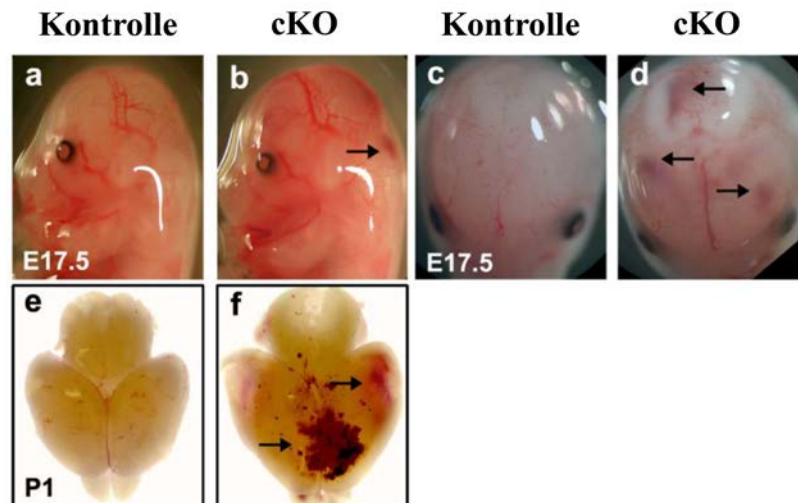
**Abb. 13: Western-Blot-Analyse von Komplettthirnlysaten von Embryonen an E12.5.**

Komplettthirnlysate wurden nach Angaben in Abschnitt IV. 16. 1 hergestellt, 20 µg Protein auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und anschließend die Proteine durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran bei 0,8 A für 2 h transferiert. Nach Blockierung der Membran mit 5% Milchpulver in TBS-T wurde das ADAM10-Protein unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums (B42.1) markiert. Anschließend erfolgte die Markierung der Erstantikörper mit HRP/POD-gekoppelten Zweitantikörpern und die Detektion der Signale durch ein Chemilumineszenzdetektionsgerät (LAS3000). GAPDH-Färbung diente als Ladekontrolle. Abkürzungen: pro (p), matures (m), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH).

Abbildung 13 zeigt, dass die Deletion des ADAM10-Proteins zu frühen Zeitpunkten der embryonalen ZNS-Entwicklung erfolgreich war, da das Signal der Proform von ADAM10 (pADAM10) und der maturen Form von ADAM10 (mADAM10) im Vergleich zur WT-Kontrolle reduziert war. Hierbei zeigte sich, dass die Deletion von Exon 2 des *Adam10*-Gens auf einem Allel ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des ADAM10-Proteins *in vivo* führte. Bei doppelt gefloxtem Exon 2 der ADAM10-Loci und Cre-Expression kommt es zu einem fast kompletten Verlust des ADAM10-Proteins im ZNS an E12.5. Lediglich minimale Anteile des ADAM10-Proteins waren auf dem Western-Blot nachweisbar, was auf eine Beteiligung weiterer Zellen ohne Cre-Rekombinase-Expression oder eine unvollständige Deletion des Exon 2 von *Adam10* in neuronalen Vorläuferzellen oder neuroepithelialen Zellen zurückzuführen sein könnte. Die zusätzliche Färbung des Western-Blots auf GAPDH zeigte eine gleiche Beladung der SDS-PAGE bezüglich der Proteinmenge.

#### V. 1. 4. Morphologische Charakterisierung der ADAM10-cKO-Mäuse

Die Analyse der Genotypen und die anschließende Western-Blot-Analyse von Komplettthirnlysaten zeigten, dass die konditionale Deletion des ADAM10-Proteins unter Verwendung des Nestin-Cre-Systems funktionierte und ein embryonal letaler Phänotyp zu verzeichnen war. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob eine Deletion von ADAM10 im sich entwickelnden ZNS zu morphologischen Auffälligkeiten führte.



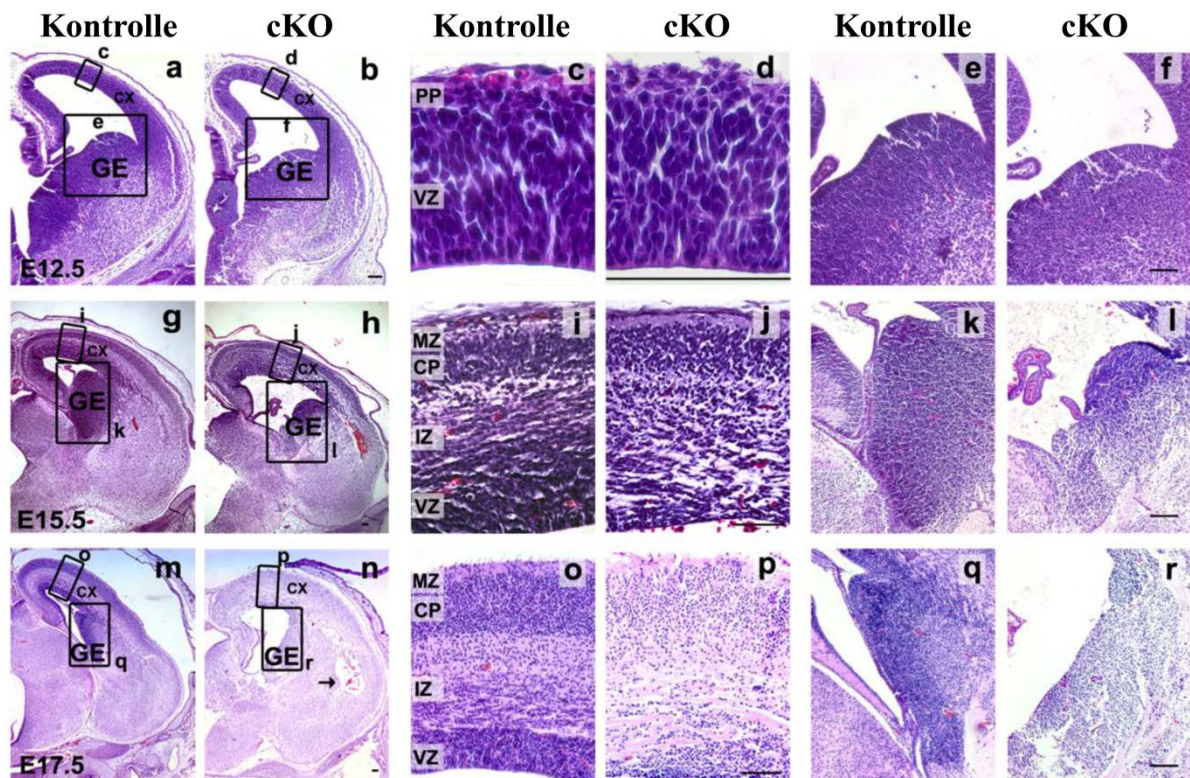
**Abb. 14: Grob-morphologische Charakterisierung der ADAM10-cKO-Embryonen**

Embryone wurden an E17.5 und das Gehirn der Mäuse an P1 präpariert (IV. 14. 4) und mittels eines Binokularsystems die äußerlichen Auffälligkeiten der Embryonen bzw. des isolierten Gehirn (P1) dokumentiert. Schwarze Pfeile deuten intrakranielle Blutungen im Bereich der Schädelhöhle bzw. des ZNS an (a-f). Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO).

Analysen unter Verwendung eines Binokularsystems zeigten bei der Untersuchung der Embryonen bzw. der Tiere an P1 keine Unterschiede in Bezug auf Größe und Entwicklung beim Vergleich der cKOs gegen Kontrollen. Auffällig waren bei genauer Betrachtung das Auftreten von verdunkelten Bereichen (intrakranielle Blutungen, schwarze Pfeile, s. Abb. 14, f) in der Schädelregion bei den konditionalen Knockouts im Vergleich zu den Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung bzw. früh postnatal (E14.5 (nicht gezeigt), E17.5, P1) (s. Abb. 14 a-f).

#### **V. 1. 5. Histologische Charakterisierung des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten (E12.5, E15.5, E17.5).**

Zur detaillierteren Analyse des sich entwickelnden ZNS der konditionalen Knockouts wurden koronale Serienschnitte paraffineingebetteter Hirne zu verschiedenen Zeitpunkten (E12.5, E15.5, E17.5) der embryonalen Entwicklung angefertigt und mit verschiedenen Techniken (HE, proteinspezifische Färbungen) gefärbt.



**Abb. 15: HE-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen.**

Koronale Serienschritte von paraffineingebetteten Hirnen von konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout- und Kontroll-Embryonen wurden erstellt und eine HE-Färbung (Hämatoxylin (blau), Eosin (rot)) nach den Angaben in IV. 15. 1. 2 angefertigt. Dargestellt sind Übersichts- und Detailaufnahmen unter starker Vergrößerung von Kortex (Cx) und *ganglionic eminence* (GE). Die abgebildeten Bereiche der Detailaufnahmen sind jeweils als schwarze Kästen in den Übersichtsaufnahmen angedeutet und mit Buchstaben in den Übersichtsaufnahmen gekennzeichnet. Diese wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der embryonalen ZNS-Entwicklung aufgenommen (E12.5 a-f, E15.5 g-l, E17.5 m-r). Ein schwarzer Pfeil zeigt intrakranielle Einblutungen im Bereich des Kortex an (n). Abkürzungen: Präplatte (PP), ventrikuläre Zone (VZ), Marginal Zone (MZ), kortikale Platte (CP), Intermediär Zone (IZ) konditionaler Knockout (cKO).

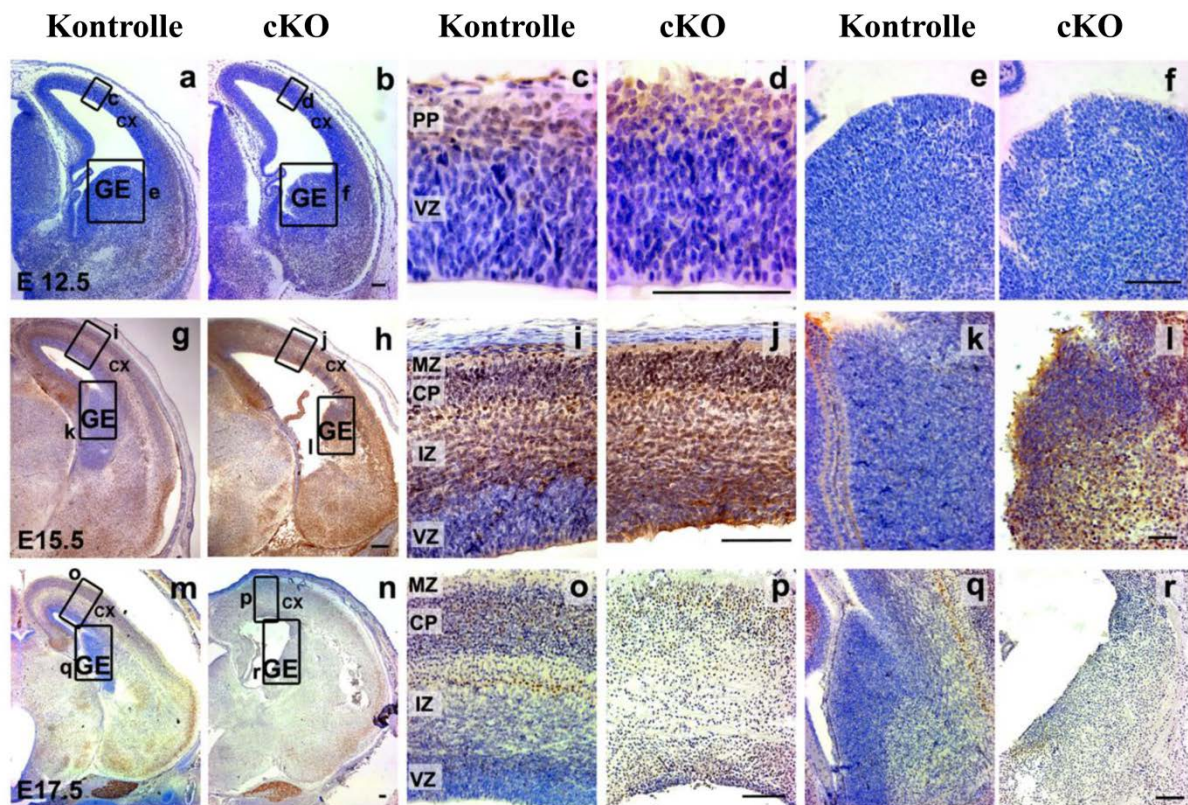
Zu frühen Zeitpunkten der embryonalen ZNS-Entwicklung (E12.5) zeigten koronale Serienschritte des ZNS der ADAM10-cKO-Embryone im Vergleich zu Kontrollen in der Übersicht (s. Abb. 15 a, b) keinerlei morphologische Auffälligkeiten. Bei starker Vergrößerung zeigten auch kortikale Regionen wie die Präplatte (PP) und die ventrikuläre Zone (VZ) keine Veränderungen (s. Abb. 15 c, d), lediglich die *ganglionic eminence* (GE) wirkte leicht verkleinert bei Analyse des konditionalen Knockouts im Vergleich zur Geschwisterkontrolle (s. Abb. 15 e, f). An E15.5 waren klare Unterschiede zwischen konditionalen Knockouts und den Geschwisterkontrollen in den Übersichtsaufnahmen und in den Detailvergrößerungen zu erkennen (s. Abb. 15 g-l). Die GE war bei den konditionalen Knockouts deutlich reduziert, die lateralen Ventrikel vergrößert und auch die Farbintensität von Hämtoxylin im Bereich der VZ und in der GE reduziert, was auf eine veränderte Anzahl von Zellkernen in diesen Bereichen zurückzuführen sein könnte. Zusätzlich konnten bei den



cKOs erste Anzeichen einer Veränderung der kortikalen Schichten identifiziert werden (s. Abb. 15 i, j). An E17.5 zeigten die konditionalen Knockouts im Vergleich zu den Kontrollen die stärksten Veränderungen. Die GE war fast vollständig degeneriert (s. Abb. 15 q, r) und die Intensität der Hämatoxylinfärbung war im gesamten ZNS-Bereich deutlich reduziert (s. Abb. 15 m, n). Zusätzlich wiesen die kortikalen Bereiche bei Vergrößerung (s. Abb. 15 o, p) einen kompletten Verlust der geschichteten Struktur auf. Lediglich im Bereich der kortikalen Platte und der Marginal Zone ließ sich eine geordnete Struktur erkennen. Weiterhin war die proliferativ aktive VZ in den konditionalen Knockouts kaum noch zu identifizieren. Zusätzlich waren in den histologischen Schnitten intrakranielle Einblutungen zu erkennen (s. Abb. 15 n, schwarzer Pfeil).

#### **V. 1. 6. Färbung des neuronalen Proteins (*Neuronal Nuclei*, NeuN) im ZNS**

Die Ergebnisse aus den HE-Färbungen zeigten deutliche Veränderungen neuronaler Strukturen der konditionalen Knockouts im Bereich der GE und des Kortex, die durch eine Färbung eines spezifisch neuronalen Proteins (NeuN) überprüft werden sollten. NeuN ist ein nukleäres, neuronales Protein, das in Vertebraten zum Zeitpunkt der Entwicklung erster postmitotischer Neurone exprimiert wird. *In vitro* wurde NeuN beschrieben an DNA-Bereiche zu binden, jedoch wurde diese Funktion bisher *in vivo* nicht bestätigt (Mullen et al., 1992; Weyer and Schilling, 2003). Zur Markierung von NeuN wurden Serienschritte des ZNS von Embryonen verschiedener Altersstufen (E12.5, E15.5 und E17.5) mit einem NeuN-spezifischen Antikörper gefärbt und mit Hämatoxylin gegengefärbt.



**Abb. 16: NeuN-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen.**

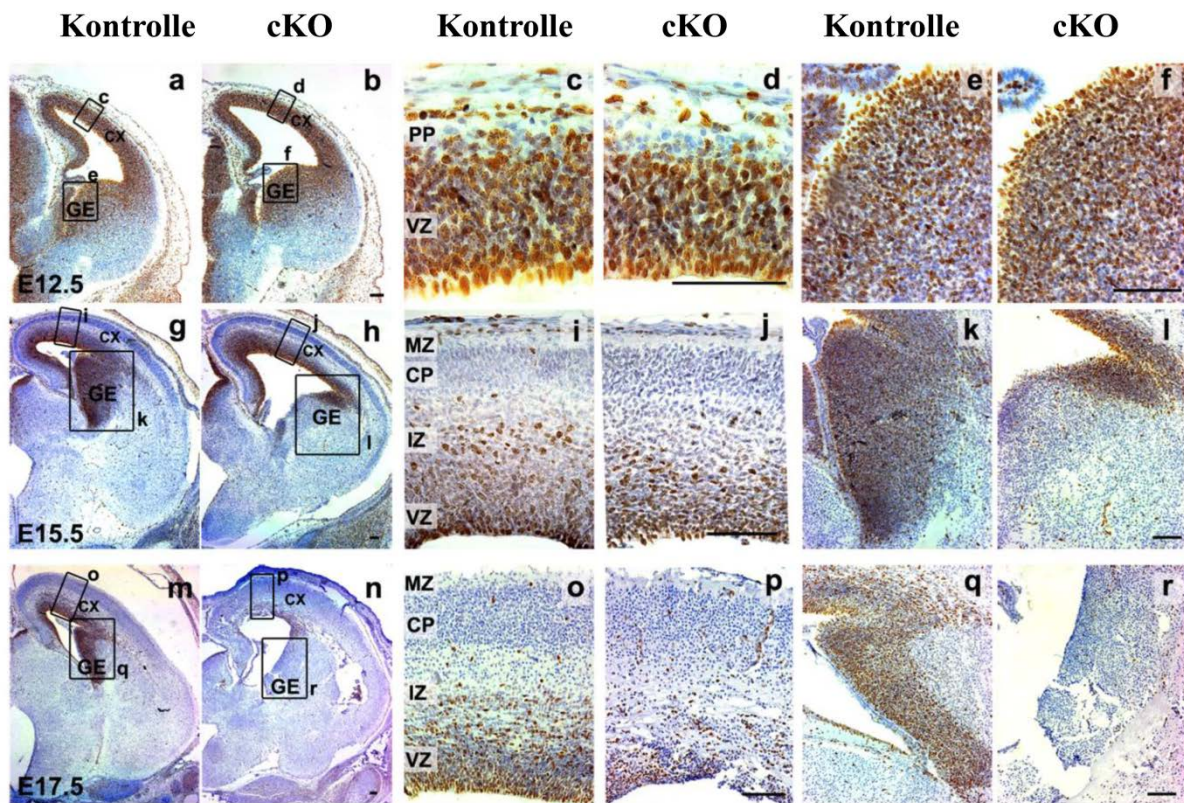
Koronale Serienschritte des ZNS von ADAM10-cKO-Mäusen und Kontrollen wurden hergestellt und eine Färbung des spezifisch neuronalen Proteins NeuN mittels DAB-Färbung durchgeführt (IV. 15. 1. 2). Dargestellt sind Übersichts- und Detailaufnahmen histologischer Schnitte von der ganglionic eminence (GE) und des Kortex (Cx) verschiedener Altersstufen (E12.5 (a-f), E15.5 (g-l) und E17.5 (m-r)) von konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout- und Kontrollembryonen. Die abgebildeten Bereiche der Detailaufnahmen sind jeweils als schwarze Kästen in den Übersichtsaufnahmen angedeutet und mit entsprechenden Buchstaben für die Detailaufnahmen in den Übersichtsaufnahmen gekennzeichnet. Eine bräunliche Färbung zeigt die Expression des Proteins NeuN an. Als Kofärbung wurde eine Hämatoxylinfärbung (blau) durchgeführt. Abkürzungen: Präplatte (PP), ventrikuläre Zone (VZ), Marginal Zone (MZ), kortikale Platte (CP), Intermediär Zone (IZ), konditionaler Knockout (cKO).

Vergleichbar zu den Ergebnissen der HE-Färbung wies das ZNS von ADAM10-cKO-Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen an E12.5 keinerlei Veränderungen auf. In der Präplatte (PP) befand sich ein großer Anteil postmitotischer Neurone, die das Protein NeuN exprimieren (s. Abb. 16 a-d). Zusätzlich zeigte die Hämatoxylinfärbung keinerlei Veränderung in Bereichen des Kortex oder der *ganglionic eminence* (GE) (s. Abb. 16 c-f). An E15.5 war die GE der konditionalen Knockouts im Vergleich zu den Geschwisterkontrollen deutlich verkleinert und das laterale Ventrikel vergrößert (s. Abb. 16 g, h). In den Detailaufnahmen der konditionalen Knockouts der kortikalen Regionen und der GE konnte eine Erhöhung der Anzahl NeuN-exprimierender Zellen im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden (s. Abb. 16 i-j). Besonders in Erscheinung trat diese starke NeuN-Expression in Bereichen der ventrikulären Zone und der GE, was auf eine verfrühte Differenzierung neuronaler

Vorläuferzellen bzw. neuroepithelialer Zellen in proliferativ aktiven Zonen hinweist. In Bereichen unterhalb der kortikalen Platte (CP) zeigten sich erste Veränderungen im Aufbau der Schichten des sich entwickelnden Kortex (s. Abb. 16 i, j). An E17.5 wurde eine schwächere NeuN-Färbung in den Schnitten der cKOs und der Kontrollen im Vergleich zu frühen Stadien der ZNS-Entwicklung festgestellt (s. Abb. 16 m-r). Erneut zeigte sich eine Verkleinerung der GE und eine Vergrößerung des lateralen Ventrikels bei den cKOs (s. Abb. 16 m, n und q, r). In den Detailaufnahmen des Kortexbereichs wiesen die konditionalen Knockouts ein komplett gestörten Aufbau und einen drastischen Verlust neuronaler Zellen im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen auf.

#### **V. 1. 7. Spezifische Färbung (Ki67) mitotisch aktiver Zellen im ZNS**

Die Daten des vorangegangenen Abschnitts zeigten, dass sich im Bereich proliferativ aktiver Zonen (GE und VZ) Zellen befanden, die das spezifische neuronale Protein NeuN exprimierten, was auf eine verfrühte Bildung postmitotischer Neurone hinweist. Eine verfrühte neuronale Differenzierung könnte Einflüsse auf die Anzahl proliferativ aktiver Zellen in Bereichen der neuronalen Stammzellregionen haben. Daher wurde eine spezifische Färbung mit Ki67 durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Zellzyklusprotein, das in mitotisch aktiven Zellen (Neuroepithelzellen und radialen Gliazellen) exprimiert wird.



**Abb. 17: Ki67-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen.**

Koronale Serienschritte des ZNS konditionaler ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout- und Kontrollembryonen verschiedener Altersstufen (E12.5 a-f, E15.5 g-l und E17.5 m-r) wurden nach Angaben in hergestellt und mit einem spezifischen Antikörper gegen Ki67 angefärbt (IV. 15. 1. 2). Gegengefärbt wurde mit Hämatoxylin (blau). Gezeigt sind Übersicht- und Detailaufnahmen koronaler Schnitte von konditionalen Knockouts im Vergleich zu ihren jeweiligen Geschwisterkontrollen. Die abgebildeten Bereiche der Detailaufnahmen sind jeweils als schwarze Kästen in den Übersichtsaufnahmen angedeutet. Abkürzungen: *ganglionic eminence* (GE), Kortex (Cx), Präplatte (PP), ventrikuläre Zone (VZ), Marginal Zone (MZ), kortikale Platte (CP), Intermediäre Zone (IZ), konditionaler Knockout (cKO).

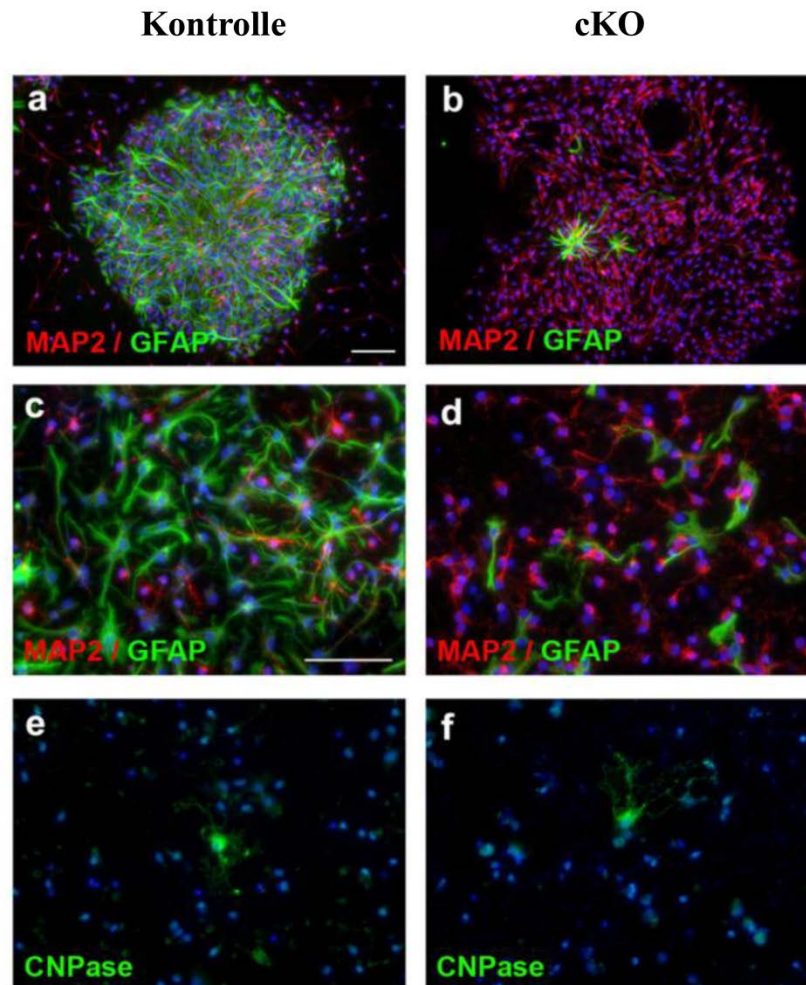
An E12.5 zeigten die koronalen Schnitte des ZNS von ADAM10-cKO- und Kontrollembryonen keine Unterschiede in der Färbung mit Ki67. Wie zu erwarten trat in proliferativ aktiven Zonen (VZ und GE) des ZNS die Expression des Zellzyklusproteins Ki67 auf (s. Abb. 17 a-f). Eine starke Reduktion der Ki67-Färbung konnte an E15.5 beobachtet werden. Hier zeigten sich in Übersichtsaufnahmen (s. Abb. 17 g, h) und noch deutlicher in Detailaufnahmen eine Verkleinerung der GE und auch eine verringerte Expression von Ki67 (s. Abb. 17 k, l). Zusätzlich verringerte sich der Anteil an mitotisch aktiven Zellen auch im Bereich der kortikalen Schichten, was eventuell auf einen Verlust basaler Progenitor-Zellen im Bereich der intermediären Zone (IZ) hinweist (s. Abb. 17 i, j). Ein starker Verlust mitotisch aktiver Zellen trat in den konditionalen Knockouts an E17.5 auf, da hier, wie schon in den vorigen Abschnitten gezeigt, die GE deutlich verkleinert war (s. Abb. 17 m, n und q, r). Zusätzlich zeigte sich, dass die VZ fast vollständig degenerierte und vermutlich nur ein sehr

geringer Anteil an mitotisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen bzw. neuroepithelialen Zellen in der VZ verblieb (s. Abb. 17 o, p).

#### **V. 1. 8. Generierung von Neurosphären aus neuronalen Stammzellen der ADAM10-cKO- und Kontrollembryonen**

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen des ZNS der ADAM10-cKO- und Kontrollembryonen wiesen darauf hin, dass die neuronale Differenzierung in den Knockout-Embryonen gestört sein könnte. Festgestellt wurde eine drastisch erhöhte NeuN-Expression in mitotisch aktiven Zonen und eine reduzierte Expression des Zellzyklusproteins Ki67 ab E15.5.

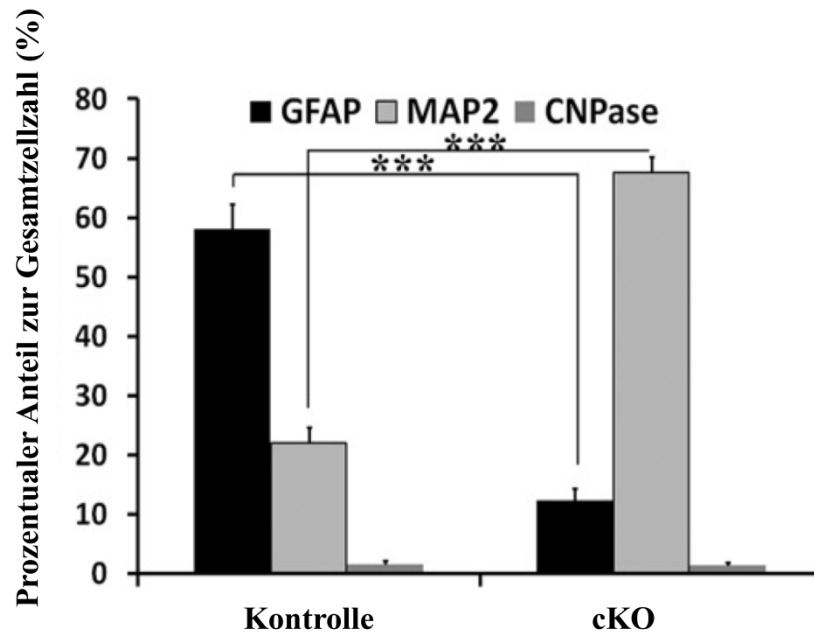
Ein Modell zur Untersuchung der Differenzierungskapazität oder von Differenzierungsprozessen neuronaler Stammzellen ist die Generierung von Neurosphären. Hierzu werden die mediale, caudale und laterale GE von Embryonen an E13.5 isoliert und dissoziiert. Durch Zugabe von *Epidermal Growth Factor* (EGF) proliferieren undifferenzierte, neuronale Vorläufer- und Stammzellen und bilden in nicht adhärenter Zellkultur Sphären. Weiteres Dissoziieren und Passagieren ermöglicht die Vermehrung der Neurosphären. Ein Entzug des EGF im Medium leitet Differenzierungsprozesse in Richtung neuronaler bzw. glialer Stadien ein. Durch die anschließenden Färbungen mit neuronalen (*microtubule associated protein 2* (MAP2)) und glialen Markern (*Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase* (CNPase)) können Störungen in Differenzierungsprozessen detektiert werden (Chojnacki and Weiss, 2008; Reynolds and Weiss, 1996).



**Abb. 18: Differenzierung von ADAM10-defizienten-, Kontroll-Neurosphären und Einzelzellkulturen.**

Die Generierung der Neurosphären bzw. adhärenenten Kulturen wurden wie in IV. 17. 10 beschrieben durchgeführt und die Kulturen durch Entzug von EGF differenziert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit neuronalen (MAP2, rot), glialen (GFAP, grün) und oligodendrozytenspezifischen Markern (CNPase, grün) durchgeführt (a-f). Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), *microtubule-associated-protein 2* (MAP2), *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase* (CNPase).

Nach Differenzierung der Neurosphären war deutlich zu erkennen, dass ADAM10-defiziente neuronale Vorläufer/Stammzellen zu einem signifikant größeren Anteil in Richtung neuronaler Zellstadien differenzierten als die Kontrollzellen. Kontrollsphären bildeten viele GFAP-positive Zellen (Astrozyten), dagegen bildeten ADAM10-defiziente Sphären kaum Astrozyten und deutlich vermehrt MAP2-positive Neurone (s. Abb. 18 a, b). Zusätzlich ließ sich dieser Effekt auch bei der Differenzierung adhärenenten Einzelzellkulturen beobachten, wobei hier die Unterschiede im Differenzierungsverhalten zwischen ADAM10-defizienten und Kontrollzellen nicht ganz so eindeutig wie bei der Differenzierung der cKO- und Kontroll-Sphären in Erscheinung traten (s. Abb. 18 c, d). Keinerlei Unterschiede traten beim Vergleich zwischen ADAM10-defizienten und Kontrollzellkulturen bei der Bildung von Oligodendrozyten (CNPase positiv) auf (s. Abb. 18 e, f).



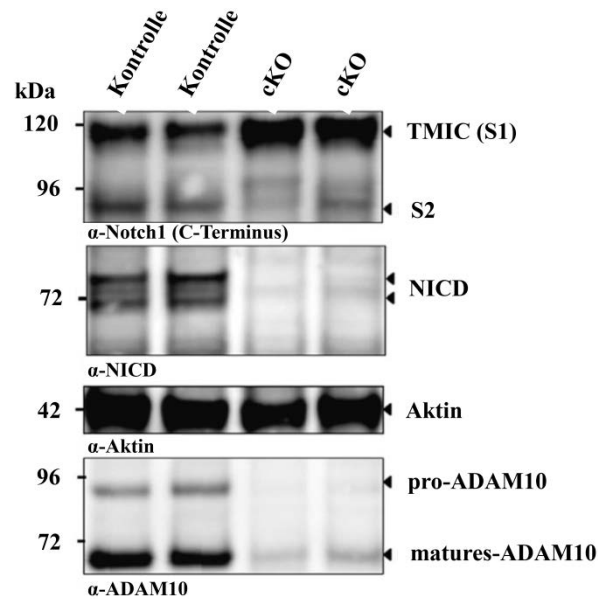
**Abb. 19: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Neurosphären/Kulturen.**

Die Anteile der Zellen nach Differenzierung wurden durch Mikroskopie bestimmt und ADAM10-(Nestin-Cre)-defiziente- und Kontrollzellen verglichen. Im Balkendiagramm sind die prozentualen Anteile bestimmter Zellpopulationen (Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten) im Verhältnis zur Gesamtzellzahl dargestellt. Statistik: \*\*\* $p < 0,001$ , Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), *microtubule-associated-protein 2* (MAP2), *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase* (CNPase).

Die Auswertung der mikroskopischen Analysen (s. Abb. 19) ergab, dass in Kontrollsphären/-kulturen der Anteil GFAP-positiver Zellen bei ca. 60% und der MAP2-positiven Zellen bei ca. 25% im Vergleich zur Gesamtzellzahl lag, während in ADAM10-defizienten Sphären/Kulturen der Anteil an GFAP-positiven Zellen bei ca. 15% und der Anteil an MAP2-positiven Zellen bei ca. 68% lag.

### V. 1. 9. Molekulare Ursache der gestörten Differenzierungsprozesse in ADAM10-cKO-Embryonen/Mäusen

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits beschrieben, dass die Neurogenese und auch die spätere Gliogenese der Kontrolle des klassischen Notch-Signalweges unterliegen. Aufgrund der hohen Vergleichbarkeit der Phänotypen von *Notch1-Loss of function*-Tiermodellen und den Daten aus dem klassischen Knockoutmausmodell von ADAM10 sollte überprüft werden, ob ein gestörtes klassisches Notch1-Signal in den ADAM10-defizienten Embryonen für den Differenzierungs-Phänotyp und die spät embryonale bzw. früh postnatale Letalität der Tiere verantwortlich sein könnte. Western-Blot-Analysen von Gesamthirnllysaten von ADAM10-cKO-Embryonen im Vergleich zu Kontrollen sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit ADAM10 in die Proteolyse des Notch1-Rezeptors während der ZNS-Entwicklung involviert ist.



**Abb. 20: Western-Blot-Analyse der Notch1-Proteolyse.**

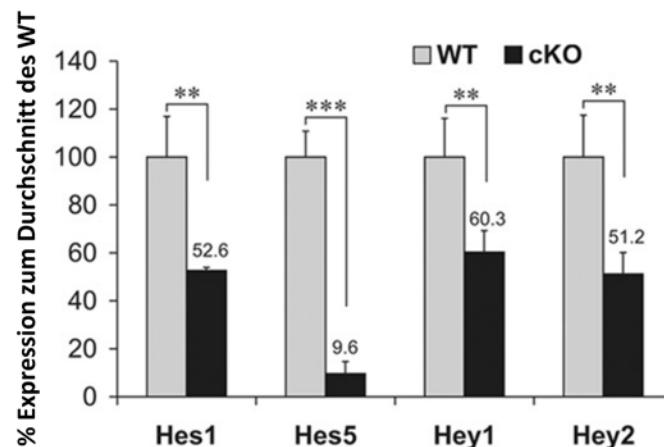
Gesamthirn wurde aus P1-Tieren präpariert, nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 1 lysiert, 20 µg Protein pro Spur auf ein 4-12%iges Bis-Tris-Gradientengel (Invitrogen, Karlsruhe, D) aufgetragen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Danach wurde ein Western-Blot bei konstanter Spannung von 20 V ü. N. durchgeführt und die PVDF-Membranen anschließend blockiert. Für den Nachweis der Notch1-Fragmente wurde eine PVDF-Membran 1 h bei RT mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper (mN1A) und eine weitere Membran ü. N. bei 4°C mit einem NICD-spezifischen Antikörper (ab8925) inkubiert. Anschließend wurde mit einem entsprechenden HRP/POD-gekoppelten Zweitantikörper der Erstantikörper markiert und die Blots in einem Chemilumineszenzdetektor (LAS3000) entwickelt (IV. 16. 3, IV. 16. 4). Danach wurde eine Färbung für ADAM10 und Aktin als Kontrollen durchgeführt. Abkürzungen: *Transmembrane Intracellular* (TMIC), *Notch Intracellular Domain* (NICD), kilo Dalton (kDa), konditionaler Knockout (cKO).

Die Western-Blot-Analyse der Fragmente des Notch1-Rezeptors zeigte eindeutige Unterschiede zwischen den konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout- und Kontrollgesamthirnllysaten an P1 (s. Abb. 20). Eine Akkumulation des *Transmembrane Intracellular*-Schnittproduktes (TMIC, S1 oder Furin-Schnitt-Produktes, ca. 120 kDa) des Notch1-Rezeptors und eine Reduktion des S2-Schnittproduktes (ADAM-Protease, ca. 90 kDa) konnten beim Vergleich von ADAM10-cKO-Mäusen zu Geschwisterkontrollen, nach spezifischer Färbung mit einem gegen den C-Terminus des Notch1-Rezeptors gerichteten Antikörper (mN1A), detektiert werden. Zusätzlich ließ sich unter Verwendung eines Antikörpers (ab8925) gegen die lösliche intrazelluläre Domäne des Notch1-Rezeptors (NICD, ca. 72-80 kDa) im Western-Blot zeigen, dass in Hirnen an P1 die Entstehung des NICD in ADAM10-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollen deutlich reduziert war. Zur Kontrolle wurden eine ADAM10 (pro-ADAM10 ca. 90 kDa, matures-ADAM10 ca. 65 kDa)- und eine Aktinfärbung (Aktin, 42 kDa) durchgeführt, die zeigten, dass die ADAM10-Expression reduziert und die Aktinmenge in den auf die SDS-PAGE aufgetragenen Gesamthirnllysaten vergleichbar war.



### V. 1. 10. Störungen des Notch1-Signalweges durch ADAM10-Deletion in neuronalen Vorläuferzellen

Durch Western-Blot Analysen an P1 konnte gezeigt werden, dass für die Proteolyse des Notch1-Rezeptors im ZNS von Mäusen ADAM10 als Protease essentiell ist, da es bei ADAM10-Deletion zu frühen Zeitpunkten der ZNS-Entwicklung zu einer Akkumulation des S1-Schnittproduktes, zu einer Reduktion des S2-Schnittproduktes und zu einem fast vollständigen Verlust des S3-Schnittproduktes oder NICDs des Notch1-Rezeptors *in vivo* kam. Ein Verlust des NICDs könnte Konsequenzen für die Notch1-Signalkaskade haben, da die Translokation des NICDs benötigt wird, um im Nukleus transkriptionale Aktivität zu induzieren. Quantitative RT-PCR-Analysen sollten zeigen, ob die Expression Notch1-abhängig regulierter Gene (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1* und *Hey2*) an P1 in den ADAM10-cKO-Tieren beeinflusst war.



**Abb. 21: Quantitative RT-PCR-Analyse Notch1-abhängig regulierter Gene.**

Gesamt-mRNA wurde aus dem ZNS von Mäusen (ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout- und Kontrolltieren) an P1 (WT: n = 5, cKO n = 3) nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 11 isoliert und unter Verwendung des *RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit* cDNA synthetisiert (IV. 13. 12). Anschließend wurde die Expression Notch1-abhängig regulierte Gene durch das Taqman®-System der Firma Applied Biosystems bestimmt und für die qRT-PCR nach Angaben in Abschnitt IV. 13. 13 verfahren. Folgende Sonden wurden für die qRT-PCR verwendet: Mm00468601\_m1 (*Hes1*), Mm00439311\_g1(*Hes5*), Mm00468865\_m1(*Hey1*), Mm00469280\_m1(*Hey2*). Die durchschnittliche Expression von *Hes1*, *Hes5*, *Hey1* und *Hey2* des WT wurde auf 100% gesetzt und die Expression der Gene für den cKO als % Expression zum WT angegeben. Abkürzungen: Wildtyp (WT), konditionaler Knockout (cKO). Statistik: \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

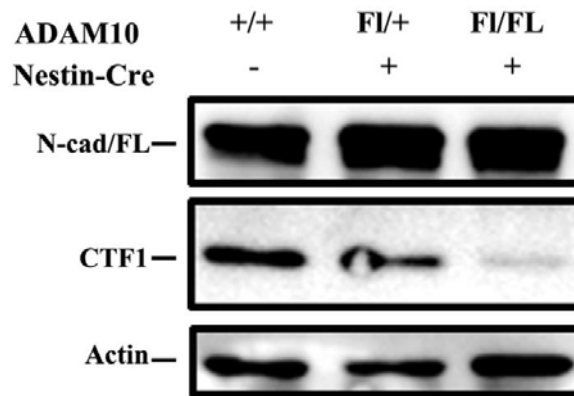
Aus den Ergebnissen der qRT-PCR-Analyse für Notch1-abhängig regulierte Gene (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1* und *Hey2*) ergab sich, dass vergleichbar zur Reduktion des NICD im Western-Blot auch die Expression einiger Zielgene des Notch1-Signalweges in den cKOs im Vergleich zu WT-Kontrollen signifikant reduziert waren (s. Abb. 21). Für *Hes1* ergab sich eine Reduktion von 52,6% im Vergleich zum WT. In den cKOs war die *Hes5*-Expression im Vergleich zu WT-Kontrollen am deutlichsten reduziert, da eine Restexpression von nur 9,6%

ermittelt wurde. Die *Hey1*-Expression war auf 60,3% und die *Hey2*-Expression auf 51,2% im Vergleich zu WT-Kontrollen reduziert. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse aus den qRT-PCR-Analysen eine Störung der Notch1-abhängigen Genexpression.

#### **V. 1. 11. Untersuchung anderer *in vitro* beschriebener Substrate von ADAM10**

In den vorangegangenen Abschnitten zeigten die Daten der histologischen Untersuchungen, der Stammzellkultur und der proteinbiochemischen Analysen, dass der Notch1-Rezeptor *in vivo* ein ADAM10-Substrat ist, dessen gestörte Proteolyse bei ADAM10-Defizienz zu Phänotypen aufgrund eines veränderten Differenzierungsverhaltens neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen führt. Aber ist der prädominant, auftretende Notch1-Phänotyp ursächlich für alle beobachteten Phänotypen der konditionalen Knockouts, oder trägt eventuell die gestörte Proteolyse weiterer *in vitro* beschriebener ADAM10-Substrate zur Ausprägung dieses letalen Phänotyps bei?

Neben der Proteolyse von APP durch ADAM10, die durch Untersuchungen des Labors von *Prof. Dr. Dr. Bart de Strooper* in ADAM10-defizienten und Kontrollneuronen charakterisiert wurde (Jorrissen et al., 2010), sollte analysiert werden, ob die Proteolyse weiterer *in vitro* beschriebener ADAM10-Substrate in den ADAM10-cKO-Mäusen/Embryonen verändert war. N-Cadherin wurde in einer vorangegangenen Studie des Arbeitskreises von *Prof. Dr. Paul Saftig*, durch Generierung von MEF-Zelllinien aus einem klassischen ADAM10-Knockout-Maus-Modell, als ADAM10-Substrat beschrieben (Reiss et al., 2005). Aufgrund dessen sollte nach Präparation primärer Neuronen aus Embryonen am Embryonaltag 14.5 und anschließender Kultivierung, die N-Cadherin-Proteolyse durch Western-Blot-Analyse untersucht werden.

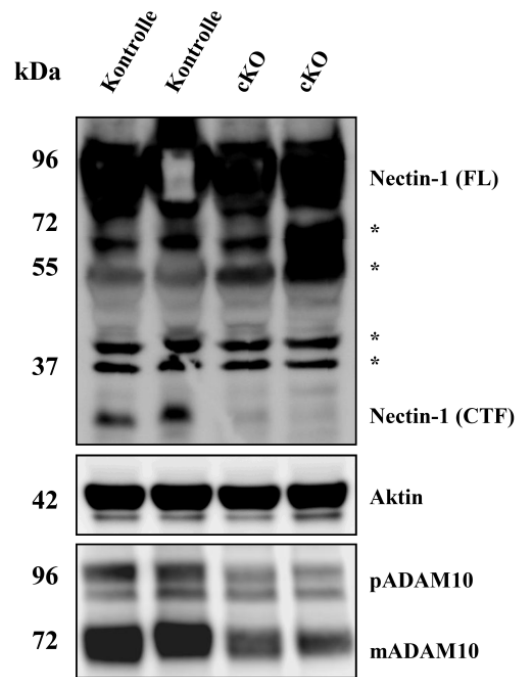


**Abb. 22: N-Cadherin-Proteolyse in primären ADAM10-defizienten Neuronen.**

Neurone wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 8 beschrieben präpariert und in Kultur genommen. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die Neurone geerntet (IV. 17. 5) und nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 1 lysiert. Anschließend wurden die Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen, ein Western-Blot bei konstanter Spannung (20V) ü. N. durchgeführt und die PVDF-Membranen im Anschluss blockiert. Das N-Cadherin-Protein wurde mit einem c-terminalen Antikörper (610921) markiert, der Erstantikörper mit einem entsprechenden Zweitantikörper markiert und der Western-Blot in einem Chemilumineszenzdetektionsgerät entwickelt (IV. 16. 3, IV. 16. 4.) Abkürzungen: N-Cadherin-Full length (N-cad/FL), c-terminales Fragment 1 (CTF1), WT (+/+), ADAM10<sup>Flox/+</sup> (Fl/+), ADAM10<sup>Flox/Flox</sup> (Fl/Fl).

Die Western-Blot-Analyse von 7 Tage kultivierten Neuronen zeigte, dass die Proteolyse des N-Cadherin-Proteins als ADAM10-Substrat signifikant reduziert war. In konditionalen Knockout-Neuronen und bei Deletion eines ADAM10-Allels akkumulierte das N-Cadherin-FL im Vergleich zur WT-Kontrolle (s. Abb. 22). Zusätzlich war auch die Bildung des c-terminalen Fragments 1 (CTF1) in Lysaten der konditionalen Knockout-Neuronen-Lysaten im Vergleich zu Kontrolllysaten deutlich reduziert. Die Aktinfärbung des Western-Blots zeigte eine gleiche Beladung der SDS-PAGE an.

Neben der Untersuchung der N-Cadherin-Spaltung in ADAM10-defizienten primären Neuronen sollten auch weitere bzw. neue *in vitro* identifizierte ADAM10-Substrate *in vivo* untersucht werden. Untersuchungen einer Kooperationsarbeitsgruppe hatten in primären kortikalen Neuronen mit verschiedenen Stimuli (NMDA, Ionomycin) und Inhibitoren ( $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor, GM6001) gezeigt, dass NMDA-Rezeptoraktivierung für die anschließende Proteolyse von Nectin-1 durch ADAM10 verantwortlich ist (Kim et al., 2010). Die postulierte Nectin-1-Proteolyse durch ADAM10 sollte in ADAM10-cKO-Lysaten des Gesamthirns am postnatalen Tag 1 durch Western-Blot-Analyse untersucht und verifiziert werden, ob Nectin-1 auch *in vivo* durch ADAM10 prozessiert wird.



**Abb. 23: Western-Blot-Analyse der Nectin-1-Proteolyse in Gesamthirnlysaten an P1.**

Lysate aus Gesamthirn wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 1 hergestellt, 60 µg Protein pro Spur auf eine SDS-PAGE aufgetragen und anschließend ein Western-Blot bei 0,8 A für 2 h durchgeführt. Nach Färbung auf Nectin-1 wurde anschließend auf Aktin und ADAM10 gefärbt (IV. 16. 2, IV. 16. 3, IV. 16. 4.), Abkürzungen: kDa (kilo Dalton), konditionaler Knockout (cKO), c-terminales Fragment (CTF), *Full length* (FL), pro (p), matures (m), unspezifische Antikörperbindung (\*).

Western-Blot-Analysen von P1-Gesamthirnlysaten von ADAM10-cKO-Mäusen und entsprechenden Kontrollen zeigten, dass die ADAM10-abhängige Proteolyse von Nectin-1 deutlich reduziert war. In der Färbung von Nectin-1 war eine Reduktion des c-terminalen Fragments (CTF) von Nectin-1 beim Vergleich der cKOs zu den Kontrollen zu erkennen (s. Abb. 23). Weiterhin zeigte die Färbung von ADAM10 eine deutliche Reduktion von pro-ADAM10 (pADAM10, 96 kDa) und maturem ADAM10 (mADAM10, 72 kDa) und die Aktinkontrolle eine gleichmäßige Beladung der SDS-Page.

Zusammenfassend zeigten die Daten der Analyse der konditionalen ADAM10-cKO-Mäuse mit der Cre-Rekombinase Expression unter Kontrolle des Nestin-Promotors, dass ADAM10 einen zentralen Schalter während der embryonalen Entwicklung des ZNS darstellt, der die Differenzierung von neuroepithelialen Zellen bzw. neuronalen Vorläuferzellen über die Regulation des klassischen Notch1-Signalweges kontrolliert. Zusätzlich war die Proteolyse anderer bereits beschriebener (APP, N-Cadherin) und neu charakterisierter Substrate (Nectin-1) von ADAM10 in den cKOs im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen verändert. Jedoch zeigte die morphologische, histologische und proteinbiochemische Charakterisierung der cKOs, dass die gestörte Proteolyse des Notch1-Rezeptors einen prädominanten, letalen

---

Phänotyp zur Folge hatte, wodurch die Analyse der ADAM10-Funktion im ZNS nur zu embryonalen Zeitpunkten möglich war. Dadurch konnte die Bedeutung der ADAM10-regulierten Spaltung von Substraten im adulten ZNS (APP, N-Cadherin, Notch1 usw.) nicht eindeutig geklärt werden.

## V. 2. Untersuchung der ADAM10-Funktion im adulten ZNS der Maus

Aufgrund der frühen Letalität der konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Embryonen/Mäuse wurde ein Modell zur Deletion von ADAM10 im adulten ZNS geplant und durchgeführt. Ziel dieses Ansatzes war es, den Notch1-abhängigen Entwicklungsphänotyp in neuronalen Stamm-/Vorläuferzellen zu umgehen, indem ADAM10 in postmitotischen Neuronen im adulten ZNS deletiert werden sollte. Zusätzlich sollte durch diesen Ansatz die Bedeutung des ADAM10-Proteins als Protease für die Spaltung zahlreicher beschriebener Substrate (APP, N-Cadherin, Notch1 usw.) und deren Einfluss auf die Integrität und Funktion innerhalb des adulten ZNS geklärt werden. Hierbei wurde ein transgener Mausstamm verwendet bei dem eine kodonoptimierte Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors steht, der in neuronalen Geweben ab dem postnatalen Tag 5 (P5) aktiv wird und ein Aktivitätsmaximum am postnatalen Tag 15 (P15) aufweist (Casanova et al., 2001). Die Untersuchungen der konditionalen Knockout-Mäuse wurden teilweise in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Rudi d'Hooge (Dr. Stijn Stroobants und Dr. Tariq Ahmed) und dem Labor von Prof. Dr. Markus Glatzel (PD. Dr. Christian Bernreuther) durchgeführt.

### V. 2. 1. Charakterisierung und Identifizierung der konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha)-Knockout-Mäuse

Zur Generierung der konditionalen Knockout-Mäuse zur Deletion von ADAM10 im adulten ZNS wurden Mäuse nach den Angaben in Abschnitt IV. 14. 3. 3 gezüchtet. Nach der Mendel'schen Verteilung sollten folgende Genotypen mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% erhalten werden ( $ADAM10^{Flox/Flox} CamKIIalpha-Cre^{tg/+}$ ,  $ADAM10^{Flox/+} CamKIIalpha-Cre^{tg/+}$ ,  $ADAM10^{Flox/Flox}$ ,  $ADAM10^{Flox/+}$ ). Die PCR zur Detektion des CamKIIalpha-Cre-Gens wurde nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 1. 1 durchgeführt, wobei bei dieser PCR ein PCR-Produkt von 250 bp Größe, bei vorhandenem Cre-Allel, entstand (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Abschnitten werden  $ADAM10^{Flox/Flox} CamKIIalpha-Cre^{tg/+}$  als konditionale Knockouts (cKOs) und  $ADAM10^{Flox/Flox}$ - und  $ADAM10^{Flox/+}$ -Mäuse als Kontrollen bzw. Wildtypen (WT) bezeichnet.

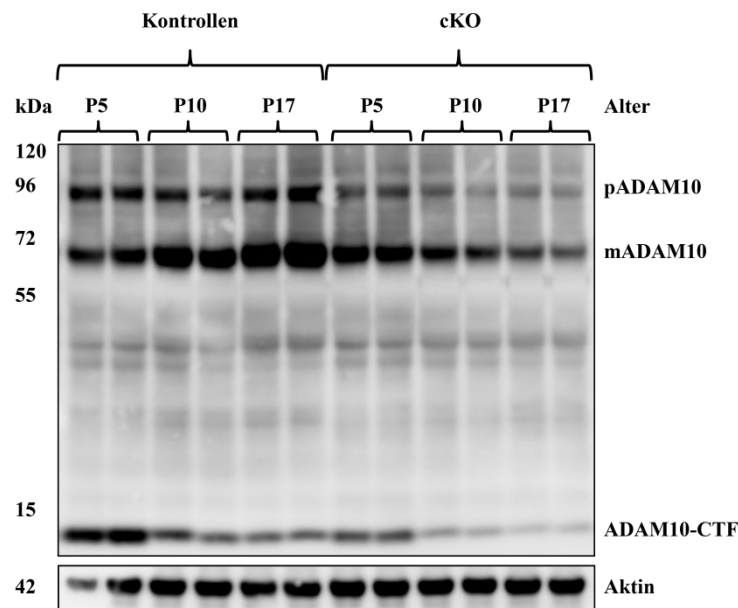
**Tab. 30: Zusammenstellung der Tierzahlen und der erhaltenen Genotypen**

Alter	Anzahl (n)	F/+		F/F		ADAM10 CamkIIa Cre
		-	+	-	+	
	649	196	183	168	102	
Tod (P19-24)		0	0	0	16	
Überleben (2 Monate)					23	
Präparation vor Tod					63	
Verteilung nach Mendel		30%	28%	26%	16%	

In Tabelle 30 ist dargestellt, dass bis auf den cKO alle zu erwartenden Genotypen der Nachkommen aus einer Verpaarung ( $ADAM10^{Flox/+} CamKIIalpha-Cre^{tg/+} \times ADAM10^{Flox/Flox}$ ) mit minimalen Abweichungen von der Mendel'schen Verteilung (25% je Genotyp erwartet) erhalten wurden. Lediglich cKO-Tiere wurden mit einer deutlich reduzierten Anzahl erhalten. Es zeigte sich, dass während der Studie nur wenige cKO-Nachkommen die Entwöhnungsphase zwischen dem postnatalen Tag 19 bis 26 (P19-26) überlebten. Unter normalen Umständen werden junge Mäuse im Alter von ca. 3 Wochen unabhängig von der Muttermilch und können ihren Energie- und Flüssigkeitsbedarf durch Wasser und Zuchtfutter decken. Durch Auswertung der Tierzahlen konnte festgestellt werden, dass von 102 untersuchten cKOs nur 23 Tiere das Alter von über 2 Monaten erreichten, wobei ein Großteil der Tiere für die weitere Analyse der cKOs für histologische und proteinbiochemische Analysen zwischen P18 und P24 präpariert wurde.

### V. 2. 2. Untersuchung der Deletionseffizienz von ADAM10 im postnatalen Kortex zu unterschiedlichen Zeitpunkten (P5, P10 und P17)

Die Veränderungen in der Mendel'schen Verteilung der Genotypen deuteten an, dass die potentielle Deletion von ADAM10 bei doppelt-geflochten ADAM10-Loci erfolgreich war. Zur Überprüfung der tatsächlichen Deletion des ADAM10-Proteins im postnatalen ZNS der cKOs wurden Kortexlysate hergestellt und die ADAM10-Expression durch Western-Blot-Analyse überprüft.



**Abb. 24: Western-Blot-Analyse der ADAM10-Expression in Kortexlysaten von ADAM10-cKO-Mäusen.**

Die Gehirne von konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäusen und Kontrollen (P5, P10 und P17) wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 14. 5 präpariert, Lysate hergestellt und 30 µg pro Spur auf eine SDS-PAGE aufgetragen (IV. 16. 1., IV. 16. 2, IV. 16. 3) Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, diese daraufhin in 5% Milchpulver in TBS-T blockiert und 1 h bei RT mit einem ADAM10-spezifischen Antikörper (B42.1) inkubiert. Nach spezifischer Markierung des Erstantikörpers mit geeignetem Zweitantikörper wurde die Membran an einem Chemilumineszenzdetektionsgerät (LAS3000) entwickelt (IV. 16. 4). Die Färbung von Aktin diente als Ladekontrolle für die SDS-PAGE. Abkürzungen: pro (p), matures (m), postnatal (P), kilo-Dalton (kDa), konditionaler Knockout (cKO).

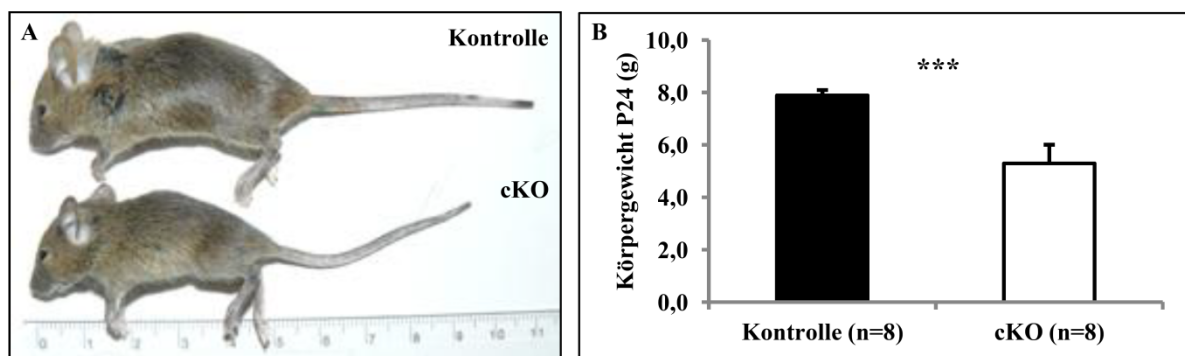
Die Expressionsanalyse von ADAM10 zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten (P5, P10 und P17) in Abbildung 24 zeigte, dass in Kortexlysaten der Kontrolltiere zu späten Zeitpunkten (P17) eine Zunahme der Expression der muren Form von ADAM10 (mADAM10, ca. 65 kDa) zu verzeichnen war. Die Expression der Proform von ADAM10 (pADAM10, ca. 95 kDa) blieb unverändert. Bei der Expressionsanalyse der Kortexlysate der konditionalen Knockout-Mäuse zeigte sich, dass von Zeitpunkt P5-P17 die Expression beider Formen des ADAM10-Proteins abnahm. Zusätzlich zeigte sich, dass die Bildung der c-terminalen Fragmente von ADAM10 in Kontrolllysaten zu frühen Zeitpunkten (P5) vermehrt auftrat und zu späteren Zeitpunkten reduziert war, was gleichzeitig auch mit einer Zunahme der muren Form von ADAM10 (P10, P17) korrelierte. In den konditionalen Knockouts nahmen zusätzlich zu den Signalen der Proform bzw. der muren Form auch die Signale für die c-terminalen Fragmente des ADAM10-Proteins ab. Die entsprechende Aktinkontrolle zeigte eine gleichmäßige Beladung der SDS-PAGE an. Zusätzlich zu kortikalen Bereichen ist der CamKIIalpha-Promotor auch in Bereichen des Hippokampus aktiv (Casanova et al., 2001). Aufgrund dessen wurde eine Western-Blot-Analyse von Hippokampi-Lysaten durchgeführt. Auch hier wurde eine deutliche Reduktion der ADAM10-Expression im



Hippokampus des adulten ZNS bei den cKOs im Vergleich zu den Kontrollen detektiert (Daten nicht gezeigt).

### V. 2. 3. Grob-morphologische Charakterisierung der ADAM-cKO-Mäuse

Die Analyse der Genotypisierung und der Western-Blots zur Überprüfung der Deletion des ADAM10-Proteins in Neuronen des adulten ZNS zeigten, dass in Kortexlysaten an P17 und in hippokampalen Lysaten an P18 im Vergleich zu Kontrollen das ADAM10-Protein deutlich reduziert war. Weitere Analysen sollten zeigen, ob die Deletion von ADAM10 im adulten ZNS zu Veränderungen im Bereich des Gehirns oder zu Verhaltensauffälligkeiten bei den Mäusen führte.

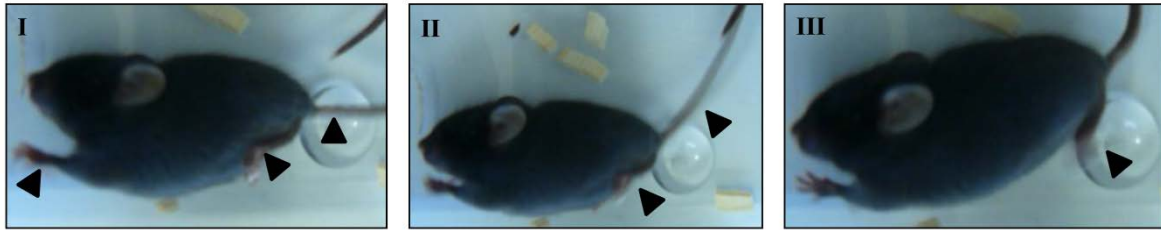


**Abb. 25: Grob-morphologische Charakterisierung der ADAM10-cKO-Mäuse.**

**A:** Konditionale ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäuse und geeignete Geschwisterkontrollen wurden nach der Genotypisierung an P24 vom Muttertier getrennt und zum Vergleich fotografiert. **B:** Zusätzlich wurde nach Genotypisierung das Gewicht von acht cKOs und acht geeigneten Geschwisterkontrollen dokumentiert. Im Balkendiagramm ist das Körpergewicht (g) der Kontrollen (schwarz) im Vergleich zu den cKOs (weiss) an P24 dargestellt. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), postnatal (P), Gramm (g), Statistik: \*\*\* $p < 0,001$ .

Bei der Analyse der Mäuse war zu erkennen, dass die cKOs zu frühen Zeitpunkten nach der Entwöhnung (P24) deutlich kleiner im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern waren (s. Abb. 25 A). Zusätzlich zeigte sich beim Wiegen der Tiere ein reduziertes Körpergewicht beim Vergleich von cKOs zu Kontrollen (s. Abb. 25 B). Hierbei konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Geschlechtern der Tiere festgestellt werden.

Weiterhin waren die cKOs aggressiver, zeigten koordinative Störungen (Klammerreflex der Hinterläufe, Daten nicht gezeigt) und bei Stresssituationen (Schwanzbiopsie, Umsetzen) teilweise Zuckungen der Vorder- und Hinterläufe (eventuell Epilepsie), die bis zu 30 Sekunden dauern konnten.

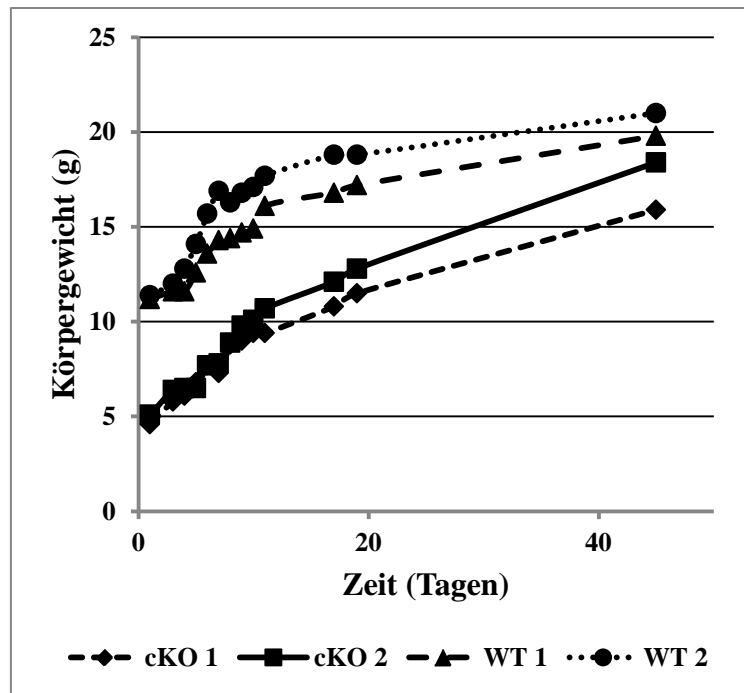


**Abb. 26: Aufnahmen der Zuckungen und Spastiken der Vorder- und Hinterläufe einer ADAM10-cKO-Maus.**

**I, II und III:** Aufnahmen verschiedener Zeitpunkte eines epileptischen Anfalls einer konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Maus an P19. Dieser Videofilm wurde mit einer Kamera (LUMIX-FZ8, Panasonic, Hamburg, D) aufgenommen. Schwarze Pfeile markieren typische Bewegungen und Spastiken im Bereich der Vorder- und Hinterläufe und des Schwanzes während eines epileptischen Anfalls.

Abbildung 26 zeigt Momentaufnahmen eines Videofilms von Zuckungen/Anfällen einer cKO-Maus nach dem Umsetzen in einen neuen Käfig. Gekennzeichnet waren diese Anfälle durch Sprünge und starke Bewegungen durch den Käfig und einem Verlust jeglicher Körperkontrolle. Charakteristisch für diese Anfälle waren rotierende Schwanzbewegungen (s. Abb. 26 I und II, schwarze Pfeile), Zuckungen der Vorder- und Hinterläufe der Maus mit einigen Sekunden andauernden Unterbrechungen. Zusätzlich traten auch zeitweise Spastiken der Hinterläufe ein (s. Abb. 26 I und II, schwarzer Pfeil). Teilweise befand die Maus sich während dieser Anfälle in Seitenlage (s. Abb. 26 I, II und III). Häufig waren die cKOs nach einem solchen Anfall sehr geschwächt. Danach könnten die Zuckungen und Spastiken eine mögliche Ursache für den Tod der Mäuse während der Entwöhnungsphase vom Muttertier sein. Der früheste Zeitpunkt, an dem ein solcher Anfall beobachtet werden konnte, war der postnatale Tag 10.

Aufgrund der Gewichtsunterschiede nach der Entwöhnungsphase und der möglichen Epilepsie, die auch durch Hungerzustände ausgelöst werden kann (Harney et al., 2002), wurde versucht durch Weichfütterergänzung im Käfig den letalen Phänotyp abzumildern.



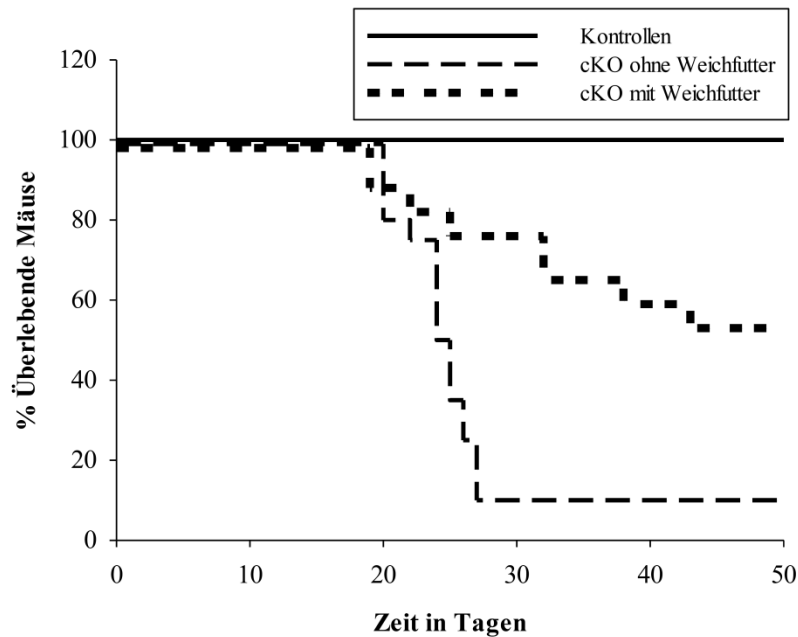
**Abb. 27: Gewichtsverlauf der cKOs im Vergleich zu Kontrollen nach Weichfutterzugabe.**

Zwei ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockoutmäuse und zwei entsprechende Geschwisterkontrollen ( $ADAM10^{Flox/+}$  CamKIIalpha-Cre $^{tg/+}$ ) wurden nach Genotypisierung (IV. 13. 1. 1) ab P18 mit zusätzlichem Weichfutter im Käfig versorgt. Nach ca. 30 Tagen wurde die Weichfuttergabe gestoppt und das Körpergewicht nach weiteren 30 Tagen erneut bestimmt. Aufgrund fehlender geeigneter Geschwisterkontrollen ohne Cre-Expression wurden als WT-Kontrollen  $ADAM10^{Flox/+}$  CamKIIalpha-Cre $^{tg/+}$  Tiere verwendet. Gezeigt ist der Körpergewichtsverlauf der Mäuse über einen Zeitraum von 2 Monaten (cKO 1 (Rauten), cKO 2 (Quadrate), WT 1 (Dreiecke), WT 2 (Kreise)). Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Wildtyp (WT), Gramm (g).

Zu Beginn der Tests der zusätzlichen Weichfuttergabe zeigten die cKOs im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern bzw. Kontrollen ( $ADAM10^{Flox/+}$  CamKIIalpha-Cre $^{tg/+}$ , WT) ein über 50% reduziertes Körpergewicht an P18 (s. Abb. 27). Es war zu beobachten, dass sowohl die „WT“- als auch die cKO-Mäuse während der Phase der Weichfutterzugabe in den ersten 30 Tagen gleichmäßig zunahmen. Anschließend nahmen die Tiere im nächsten Monat weiterhin auch unter Standardbedingungen (keine zusätzliche Weichfuttergabe) konstant zu, wobei sich die konditionalen Knockouts dem Körpergewicht der WT-Mäuse nach zwei Monaten annäherten. Am Ende der Beobachtungsphase betrug der Körpergewichtsunterschied zwischen cKOs und Kontrollen nur noch 16% im Vergleich zum Startpunkt der Beobachtungsphase an P18. Die Weichfutterzugabe hatte nur einen minimalen Einfluss auf das Auftreten epileptischer Zuckungen, da während der Beobachtungsphase bei einem cKO und auch während späterer Verhaltensanalysen bei einem konditionalen Knockout Zuckungen und Spastiken beobachtet werden konnte.

#### V. 2. 4. Kaplan-Meier-Statistik der cKOs mit bzw. ohne Weichfuttergabe

Zur detaillierteren Analyse des letalen Phänotyps wurde eine Kaplan-Meier-Überlebensstatistik der ADAM10-cKO-Mäuse und entsprechender Kontrollen erstellt. Hierbei wurden exemplarisch jeweils 5 Würfe von Mäusen ohne Weichfuttergabe und mit Weichfuttergabe analysiert und der Einfluss des Weichfutters auf das Überleben dokumentiert.



**Abb. 28: Kaplan-Meier-Überlebensstatistik der ADAM10-cKO-Mäuse.**

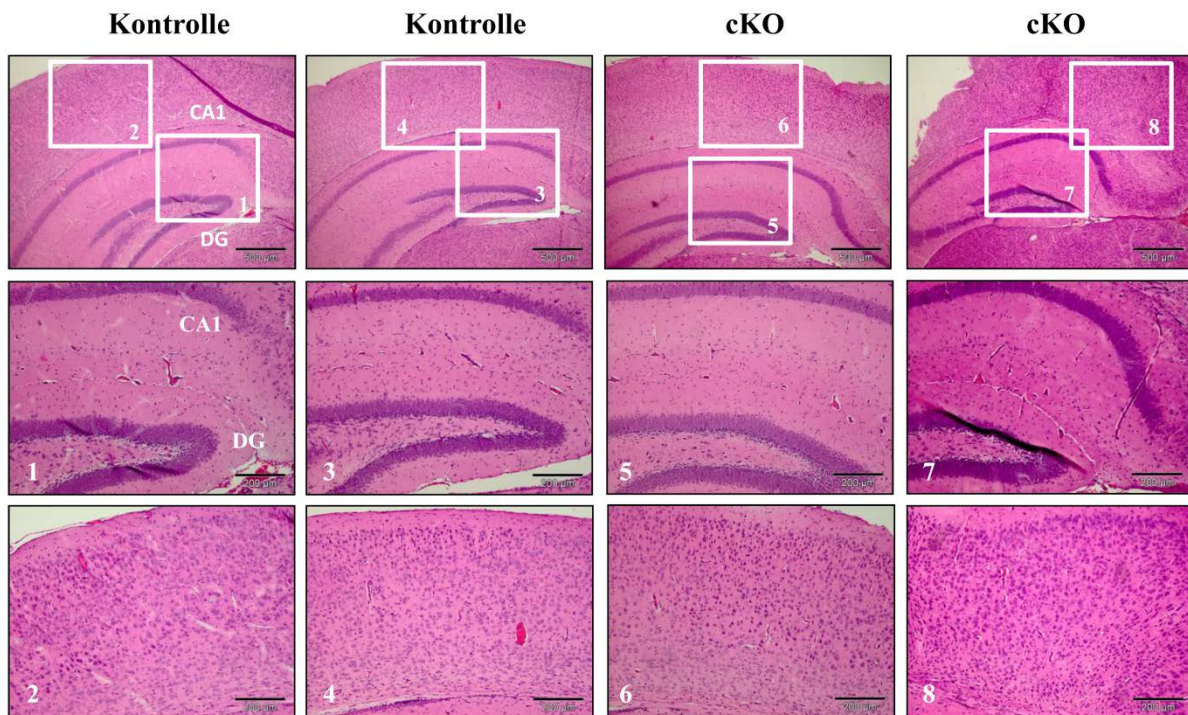
Das Überleben von jeweils 5 Würfen an Nachkommen aus Verpaarungen ( $ADAM10^{Flox/+}$  CamKIIalpha-Cre<sup>tg/+</sup> X  $ADAM10^{Flox/Flox}$ ) wurde in Abhängigkeit von Weichfuttergabe oder ohne Weichfuttergabe während der Entwöhnungszeit vom Muttertier dokumentiert. Im Kaplan-Meier-Diagramm ist die Anzahl an überlebenden Tieren im Vergleich zur ursprünglich genotypisierten Anzahl an Tieren in % in einem Zeitraum von 50 Tagen dargestellt. Ein vertikaler Verlauf einer Linie repräsentiert den Todeszeitpunkt eines oder mehrerer Tiere während des Experiments. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO).

Aus der Kaplan-Meier-Statistik ist klar zu entnehmen, dass 90% der ADAM10-cKO-Mäuse ohne Weichfuttergabe zwischen dem postnatalen Tag 19 und 27 starben (s. Abb. 28, Linie gestrichelt), wobei eine senkrecht zur X-Achse verlaufende Linie den Tod eines oder mehrerer Tiere darstellt. Durch Weichfuttergabe konnte die Überlebensrate der konditionalen Knockout-Mäuse um 40% bis zum postnatalen Tag 50 gesteigert werden (s. Abb. 28, Linie punktiert). Alle im Versuch untersuchten Kontrolltiere hatten die ersten 50 Tage nach der Geburt ohne Verluste überstanden, was an einer waagrechten durchgezogenen Linie im Kaplan-Meier-Diagramm zu erkennen ist (s. Abb. 28).

Aus den vorangegangenen Analysen war zu entnehmen, dass zwischen den einzelnen cKO eine große Diversität der phänotypischen Ausprägung (teilweise Zuckungen und Spastiken, Tod zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten) der Deletion von ADAM10 im adulten ZNS auftrat und es zu einem hohen Verlust an Mausmutanten kurze Zeit nach der Entwöhnung vom Muttertier kam.

#### **V. 2. 5. Histologische Untersuchung des „adulten“ ZNS der ADAM10-cKO-Mäuse**

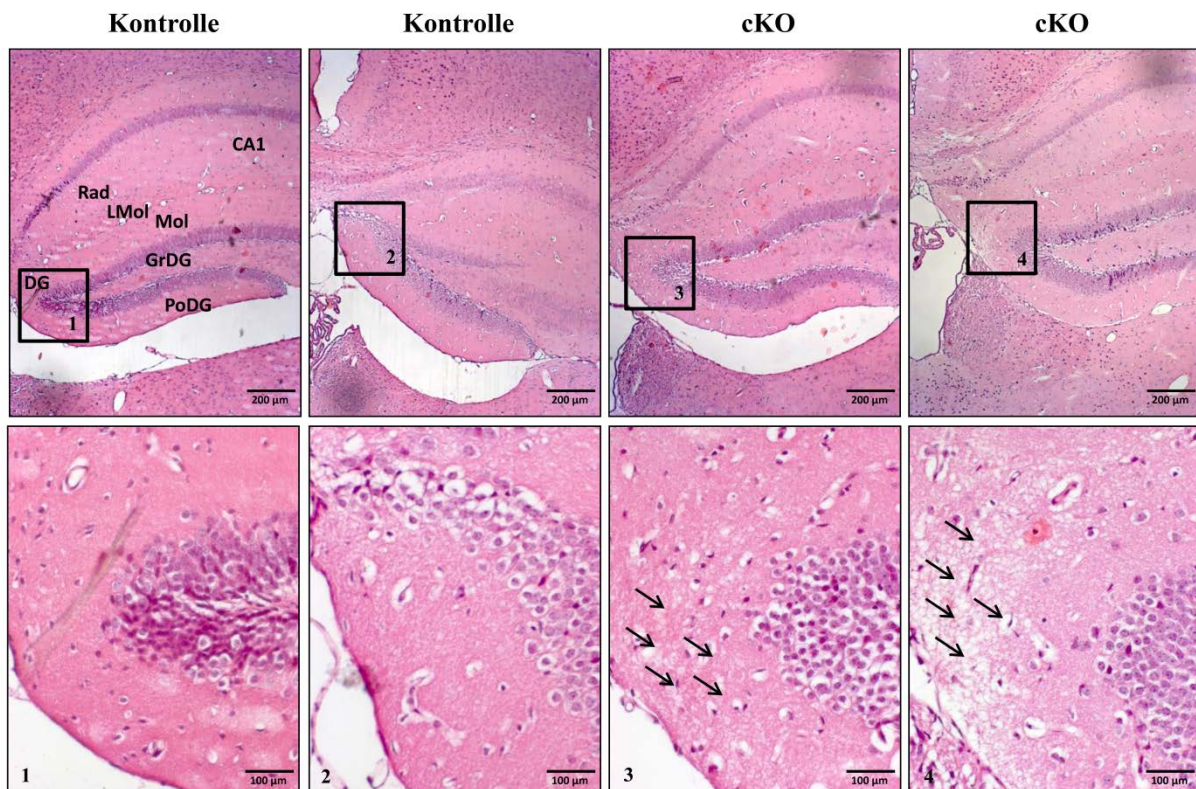
Zur detaillierteren Analyse der ADAM10-cKO-Mäuse wurden Gehirne der Mäuse nach Perfusion an P18-24 präpariert, in Paraffin eingebettet und koronale Serienschnitte hergestellt. Hierbei wurde der Fokus auf ZNS-Bereiche gelegt, in denen hippokampale und kortikale Regionen klar zu erkennen waren, da in diesen Bereichen die stärkste CamKIIalpha-Promotoraktivität zu erwarten war. Anschließend wurde eine Hämatoxylin- und Eosinfärbung (HE) durchgeführt. Durch eine Hämatoxylinfärbung werden Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, Sulfatgruppen von Glykosaminoglykanen und Carboxylgruppen von Proteinen angefärbt. Eosin färbt primär kationische Gruppen im Bereich des Cytoplasma sowie extrazelluläre Fasern.



**Abb. 29: HE-Färbung koronaler Schnitte des ZNS der cKOs im Vergleich zu Kontrollen.**

Vor dem Absetzen der Jungtiere wurden Schwanzbiopsien genommen und die Tiere nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 1. 1 genotypisiert. Anschließend wurden cKOs und entsprechende Geschwisterkontrollen ausgewählt, nach den Angaben in Abschnitt IV. 14. 6 perfundiert und die Gehirne der Mäuse präpariert (IV. 14. 5). Danach wurden die Gehirne in 4%-PFA in PBS bis zur Einbettung in Paraffin bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Gehirne eingebettet, koronale Serienschritte der cKOs und der Kontrollen hergestellt und eine HE-Färbung nach den Angaben in Abschnitt IV. 15. 1. 2 durchgeführt. Dargestellt sind Übersicht- und Detailaufnahmen von ZNS-Bereichen in denen hippokampale und kortikale Regionen klar zu identifizieren sind. In den Übersichtsaufnahmen sind die Bereiche der Detailaufnahmen durch weiße Rechtecke angedeutet und mit einer entsprechenden Nummer versehen. Maßstabsbalken in Übersichtsaufnahmen (500 µm) in Detailaufnahmen (200 µm), Abkürzungen: Cornus Ammonis 1 (CA1), Gyrus dentatus (DG), konditionaler Knockout (cKO).

In den Übersichtsaufnahmen der koronalen Schnitte des ZNS der ADAM10-cKO-Mäuse waren keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen am postnatalen Tag 19 zu erkennen (s. Abb. 29). Kortikale und hippokampale Strukturen (CA1, Gyrus dentatus) waren klar zu identifizieren. Auch in den Detailvergrößerungen (s. Abb. 29 1-8) waren keine Unterschiede in der kortikalen Schichtung oder des Aufbaus des Hippokampus zu erkennen. Zur genaueren Analyse möglicher Zeichen von Neurodegeneration in cKO-Mäusen wurden Detailbereiche des Hippokampus von koronalen Serienschritten nach HE-Färbung unter starker Vergrößerung (20x) untersucht.



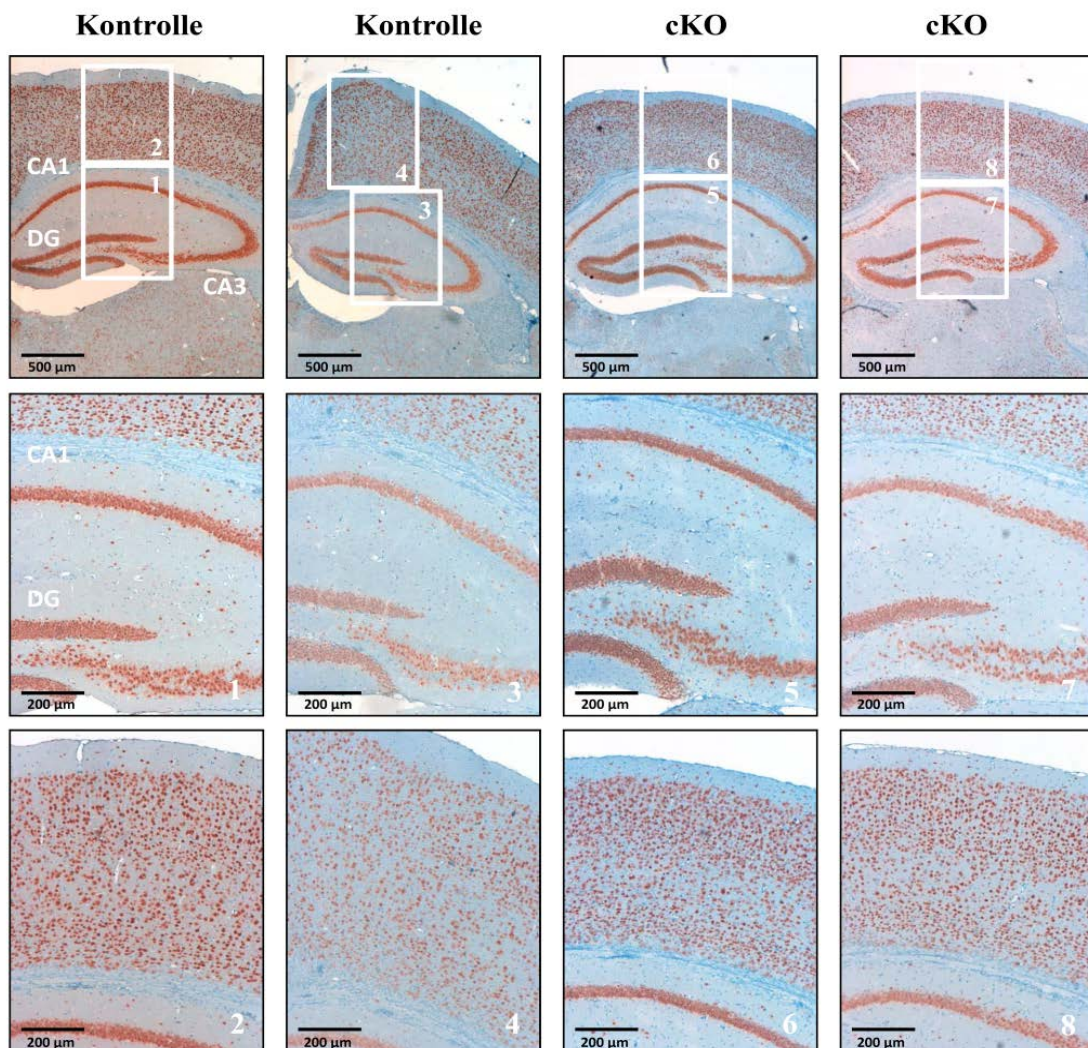
**Abb. 30: Detailaufnahmen von hippocampalen Bereichen der cKOs und geeigneten Kontrollen (P24).**

cKO und Kontrollmäuse wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 14. 6 perfundiert. Anschließend wurden die isolierten Gehirne der Mäuse in Paraffin eingebettet, koronale Serienschritte hergestellt und eine HE-Färbung durchgeführt (IV. 15. 1. 2). Dargestellt sind Übersicht- und Detailaufnahmen hippocampaler Strukturen, wobei in den Übersichtsaufnahmen fotografierte Bereiche der Detailaufnahmen durch einen schwarzen Kasten markiert und mit einer entsprechenden Nummer versehen sind. Maßstabsbalken in Übersichtsaufnahmen (200 µm) in Detailaufnahmen (100 µm) Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Cornus Ammonis 1 (CA1), Stratum Radiatum des Hippokampus (Rad), Stratum lacunosum-moleculare (LMol), *molecular layer* (Mol), Gyrus dentatus (DG), *granular Gyrus dentatus* (GrDG), *polymorph Gyrus dentatus* (poDG).

In der Grundstrukturierung des Hippokampus (CA1, Rad, LMol, Mol, GrDG und poDG) wurden auch in den Detailaufnahmen keine Unterschiede zwischen den Genotypen am postnatalen Tag 24 detektiert (s. Abb. 30). Jedoch zeigten sich bei den ADAM10-cKOs im Vergleich zu den Kontrollen erste Anzeichen von Neurodegeneration. In Regionen des Hippokampus, speziell in Bereichen des medialen Gyrus dentatus traten erste Anzeichen der Rückbildung bzw. der Verlust von Zellausläufern (eventuell dendritische oder axonale Degeneration) auf (s. Abb. 30 1-4, schwarze Pfeile). Ein Verlust neuronaler Zellen ist zu diesen Zeitpunkten in den HE-Färbungen noch nicht zu erkennen, da in der Hämatoxylinfärbung keine ersichtliche Änderung der Anzahl an Nuklei in Bereichen des medialen Gyrus dentatus auftrat (s. Abb. 30 1-4). Diese ersten Anzeichen einer möglichen Neurodegeneration zeigten sich bei der HE-Färbung von koronalen Schnitten an P18 noch nicht (Daten nicht gezeigt), so dass daraus geschlossen werden kann, dass stärkere Effekte der

Neurodegeneration vermutlich zu späteren Zeitpunkten in den ADAM10-cKOs detektiert werden könnten.

Die HE-Färbung zeigt nur sehr drastische morphologische oder zelluläre Veränderung in Geweben oder Organen an. Deshalb wurden zur detaillierteren Charakterisierung des Phänotyps der ADAM10-cKO-Mäuse spezifische Färbungen ausgewählter Markerproteine (NeuN, Synaptophysin und GFAP) des ZNS durchgeführt. Zur Analyse der neuronalen Zellen in Bereichen des Kortex und des Hippokampus wurden koronale Paraffinserienschnitte von cKOs und Kontrollen mit dem spezifisch neuronalen Marker NeuN gefärbt.



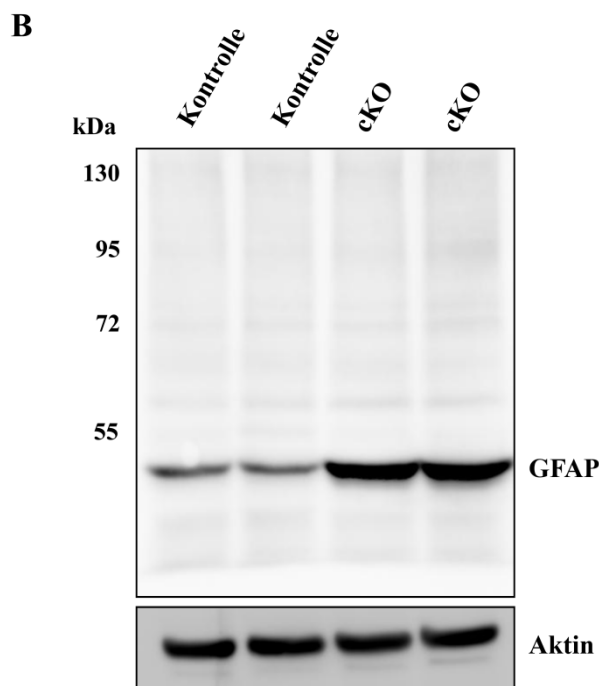
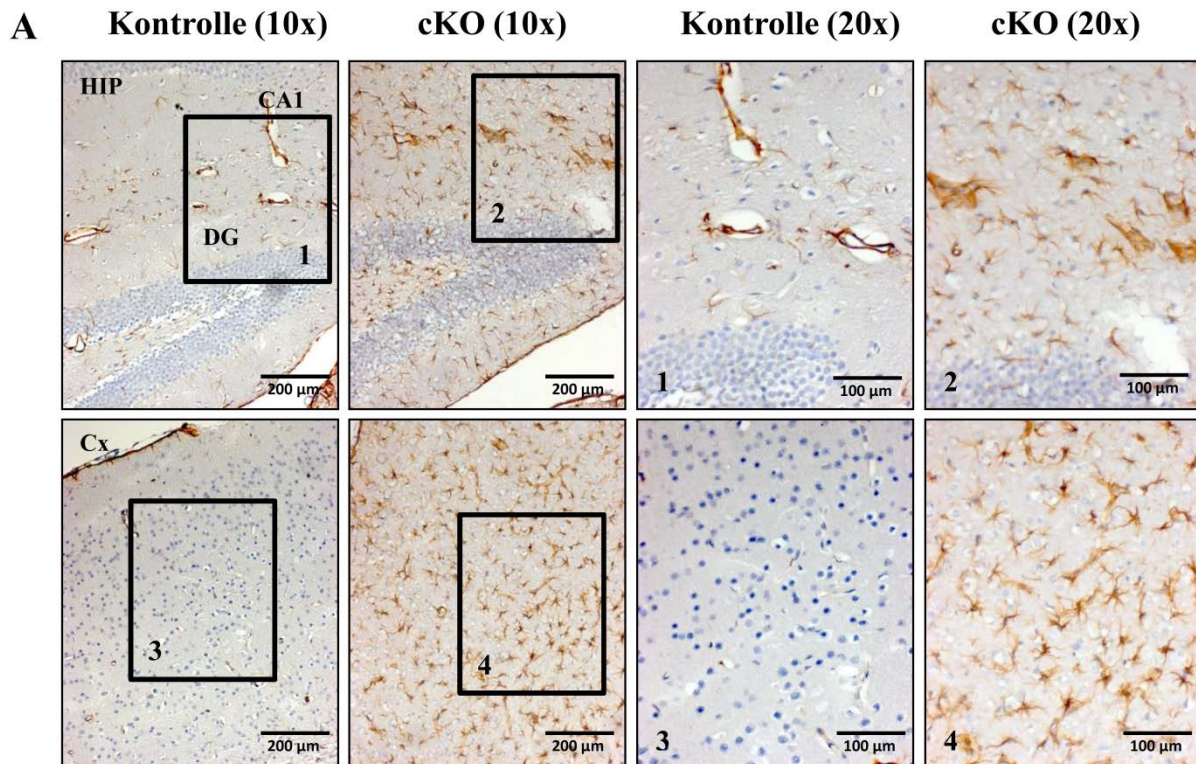
**Abb. 31: NeuN-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS von ADAM10-cKO-Mäusen.**

Mäuse wurden an P24 nach den Abgaben in Abschnitt IV. 14. 6 perfundiert, das Gehirn der Mäuse präpariert (IV. 14. 5) und koronale Paraffinserienschnitte erstellt. Anschließend wurden die Schnitte spezifisch mit NeuN durch DAB-Färbung gefärbt (IV. 15. 1. 2). Dargestellt sind Übersicht- und Detailaufnahmen von kortikalen und hippokampalen Regionen. Weisse Rechtecke markieren in den Übersichtsaufnahmen die Ausschnitte der Detailaufnahmen und sind mit einer entsprechenden Nummer versehen. Maßstabsbalken in Übersichtsaufnahmen (500 µm) in Detailaufnahmen (200 µm), Abkürzungen: Cornus Ammonis 1 und 3 (CA1 und CA3), Gyrus dentatus (DG), konditionaler Knockout (cKO).



In den Übersichts- und Detailaufnahmen der koronalen, histologischen Schnitte war zu erkennen, dass NeuN spezifisch in nukleären Bereichen der Neurone im Kortex und in Regionen des Hippokampus (CA1, CA3 und DG) gefärbt wurde (s. Abb. 31). Zwischen den verschiedenen Genotypen der Mäuse zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Anzahl an neuronalen Zellen in kortikalen und hippokampalen Strukturen. Zusätzlich konnte dieses Ergebnis durch Färbung des präsynaptischen Protein Synaptophysin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), da keine Expressionsunterschiede des Proteins zwischen den Genotypen festgestellt wurden. Somit war der beobachtete Phänotyp vermutlich auf eine funktionelle Störung des ZNS zurückzuführen und nicht auf einen massiven Rückgang neuronaler Zellen, da mit den hier verwendeten Markerproteinen und der HE-Färbung keinerlei Auffälligkeiten im Bereich des Kortex und Hippokampus, sowie der Zellzahlen detektiert wurden.

Als Antwort auf funktionelle Störungen innerhalb des ZNS oder auf den Verlust neuronaler Zellen tritt häufig der Prozess der reaktiven Astroglie auf, bei dem Astrozyten vermehrt aktiviert werden. Die Ursachen und Wirkungen der reaktiven Astroglie werden noch wenig verstanden. Oft ist die starke Expression des Intermediärfilaments *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) in Astrozyten ein Anzeichen für eine reaktive Astroglie. In schweren Fällen der reaktiven Astroglie kommt es zur Proliferation von murenen Astrozyten und einer späteren Schädigung des Gewebes und zusätzlich zu einer Inhibition der Axonregeneration in diesen ZNS-Bereichen (Sofroniew, 2009). Durch Färbung von GFAP sollte untersucht werden, ob in den ADAM10-cKO-Mäusen eine reaktive Astroglie auftrat.



wurde an P20 nach Angaben in Abschnitt IV. 14. 5 präpariert, kortikale Regionen präpariert und die Expression von GFAP durch Western-Blot-Analyse überprüft (IV. 16. 1., IV. 16. 2, IV. 16. 3, IV. 16. 4) Die Färbung auf Aktin diente als Ladekontrolle für die SDS-PAGE. Maßstabsbalken in Übersichtsaufnahmen (200 µm) in Detailaufnahmen (100 µm), Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Cornus Ammonis 1 (CA1), Gyrus dentatus (DG), kilo Dalton (kDa), *Glial Fibrillary Acidic Protein*(GFAP), Kortex(Cx), Hippokampus(HIP).

**Abb. 32: GFAP-Färbung koronaler Schnitte des ZNS der ADAM10-cKO-Mäuse und geeigneter Kontrollen und Western-Blot-Analyse der GFAP-Expression in kortikalen Regionen.**

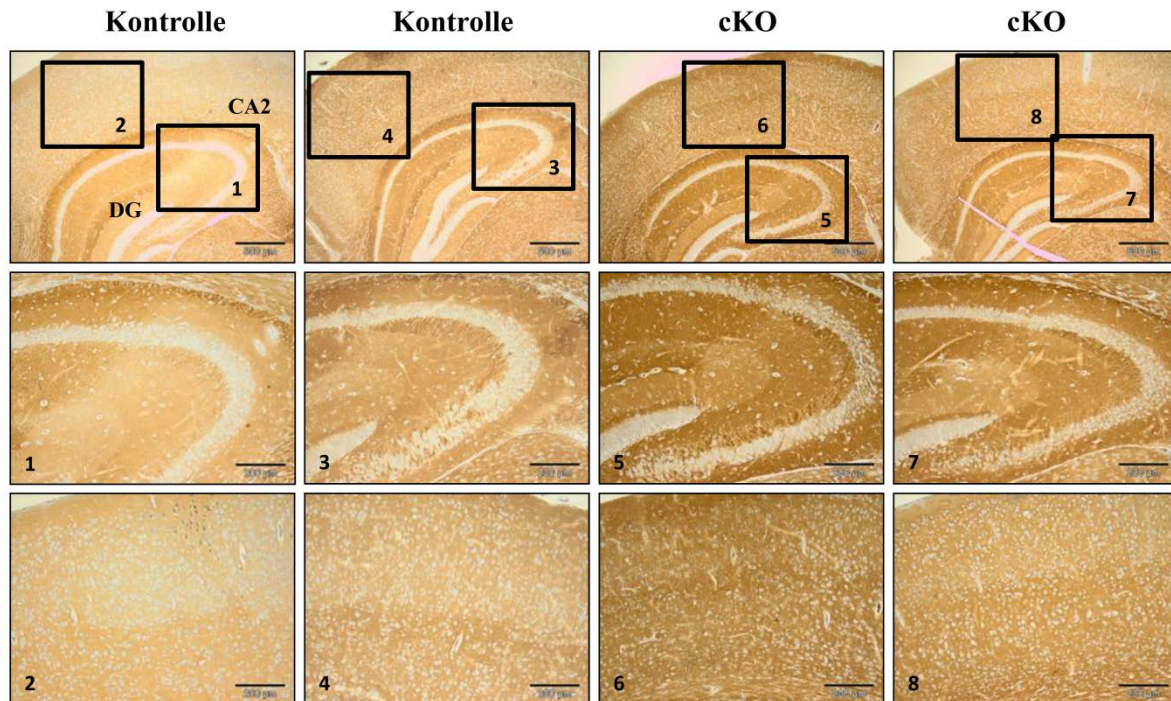
**A:** Von konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäusen und Kontrollen wurden Schwanzbiopsien genommen, Genotypisierungen nach Angaben in Abschnitt durchgeführt und die Tiere (P20) perfundiert (IV. 14. 6). Danach wurde das Gehirn der Mäuse, wie in Abschnitt IV. 14. 5 beschrieben, präpariert und das Gehirn anschließend in 4% PFA in PBS fixiert. Danach wurden koronale Paraffinserienschnitte des ZNS hergestellt und anschließend GFAP durch DAB-Färbung markiert. Eine Hämatoxylinfärbung wurde als Gegenfärbung durchgeführt (IV. 15. 1. 2). Dargestellt sind Aufnahmen aus Bereichen des Kortex und des Hippokampus. In den Übersichtsaufnahmen sind die Detailaufnahmen als schwarze Kästen angedeutet und mit einer entsprechenden Nummer versehen. **B:** Das Gehirn von cKOs und Geschwisterkontrollen

Beim Vergleich der Paraffinschnitte der ADAM10-cKO-Mäuse mit denen der Geschwisterkontrollen war in den Übersichtsaufnahmen zu erkennen, dass es zu einer moderaten, reaktiven Astroglie in Bereichen der Hippokampi und der Kortices kam (s. Abb.

32 A). In den Detailaufnahmen der Kortextbereiche der cKOs waren klar sternförmige GFAP-positive Zellen zu erkennen, wobei beim WT im Kortext kaum Färbung auftrat (s. Abb. 32 A 3 und 4). In Bereichen des Hippokampus war sowohl in WT- als auch in cKO-Schnitten eine Färbung von GFAP zu erkennen, wobei es in Bereichen der medialen DG-Region und des Kortext im cKO zu einer verstärkten Färbung von sternförmigen GFAP-positiven Astrozyten kam (s. Abb. 32 A 1, 2 und 4). In den Kontrollschnitten wurde vermutlich an Grenzflächen zu Gefäßen die Peroxidaseaktivität/Färbung in Endothelzellen detektiert, die nicht auf eine spezifische GFAP-Färbung zurückzuführen ist (s. Abb. 32 A 1). Zusätzlich stützten biochemische Analysen von Kortextlysaten von ADAM10-cKO-Mäusen im Vergleich zu Kontrollen den histologischen Befund der reaktiven Astroglie oder der Vermehrung von Astrozyten, da in den cKOs eine deutliche Expressionerhöhung von GFAP detektiert werden konnte (s. Abb. 32 B).

#### **V. 2. 6. Das zelluläre Prionprotein ein ADAM10-Substrat des adulten ZNS**

Während der Studien zur konditionalen Deletion von ADAM10 unter Kontrolle des Nestin-Promotors konnte das zelluläre Prionprotein (PrP<sup>c</sup>) als *in vivo* Substrat von ADAM10 in primären kortikalen Kulturen von konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout-Embryonen identifiziert werden (Altmeyen et al., 2011). Zusätzlich zeigten Untersuchungen von transgenen Mäusen einer anderen Arbeitsgruppe, die transgen eine cytoplasmatische Variante des Prionprotein (cyPrP) im murinen Vorderhirn überexprimierten, Verhaltensauffälligkeiten (Hinterlaufklammerreflex und Hyperaktivität). Ergänzend wurde eine reaktive Astroglie in hippokampalen und kortikalen Bereichen beschrieben, jedoch wurden keinerlei morphologische oder entwicklungsbedingte Veränderungen im Bereich der Vorderhirns dokumentiert (Wang et al., 2009a). Aufgrund dieser Daten und der teilweisen Übereinstimmung des Phänotyps der transgenen cyPrP-Mäuse mit den konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäusen sollte untersucht werden, ob das Prionprotein auch im adulten ZNS der Maus ein Substrat von ADAM10 darstellt.

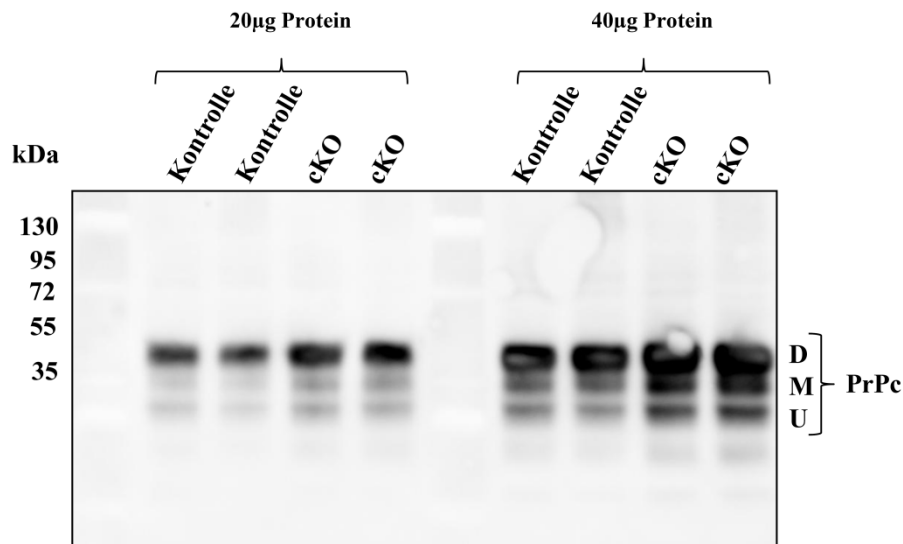


**Abb. 33: Färbung des zellulären Prionproteins im Bereich des ZNS von ADAM10-cKO-Mäusen.**

Schwanzbiopsien von Mäusen wurden an P19 genommen, die Mäuse nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 1. 1 genotypisiert und anschließend perfundiert (IV. 14. 6). Koronale Paraffinserienschnitte wurden hergestellt und spezifische Färbungen des zellulären Prionproteins unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (Pom1) nach den Angaben in Abschnitt IV. 15. 1. 2 erstellt. Dargestellt sind Übersichts- und Detailaufnahmen von Regionen des Kortex und des Hippokampus, wobei die Detailaufnahmen, als schwarze Kästen in den Übersichtsaufnahmen angedeutet, und mit einer entsprechenden Nummer gekennzeichnet sind. Maßstabsbalken in Übersichtsaufnahmen (500  $\mu\text{m}$ ) in Detailaufnahmen (200  $\mu\text{m}$ ), Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Cornus Ammonis 2 (CA2), Gyrus dentatus (DG).

Bei der Analyse der Expression des zellulären Prionproteins in Paraffinschnitten war zu erkennen, dass PrPc deutlich in allen Zellen des ZNS im Bereich des Hippokampus und des Kortex an P19 exprimiert wurde. Eine besonders starke Expression konnte in äußeren Schichten des Kortex und im Bereich der CA1- und DG-Region des Hippokampus nachgewiesen werden (s. Abb. 33). Beim Vergleich der ADAM10-cKO-Mäuse mit den entsprechenden Geschwisterkontrollen konnte gezeigt werden, dass das Prionprotein in neuronalen Zellen des ZNS erhöht exprimiert wurde (s. Abb. 33). Besonders deutlich war eine verstärkte Expression des Prionproteins in Bereichen des Hippokampus beim Vergleich der Detailaufnahmen zwischen WT und cKOs zu erkennen (s. Abb. 33 1, 3, 5, und 7). Aufgrund dieser Daten konnte geschlossen werden, dass die Spaltung des Prionproteins nicht nur während der neuronalen Entwicklung durch ADAM10 reguliert (Altmeppen et al., 2011), sondern PrPc wahrscheinlich auch im adulten ZNS durch ADAM10 gespalten wird.

Zusätzlich zur Expressionsanalyse des Prionproteins in Schnitten der cKOs im Vergleich zu Kontrollen, sollte in Western-Blot-Analysen von kortikalen Präparationen an P18 überprüft werden, ob sich der Effekt der erhöhten Expression des Prionproteins bei ADAM10-Defizienz mit einer anderen Methode verifizieren ließ.



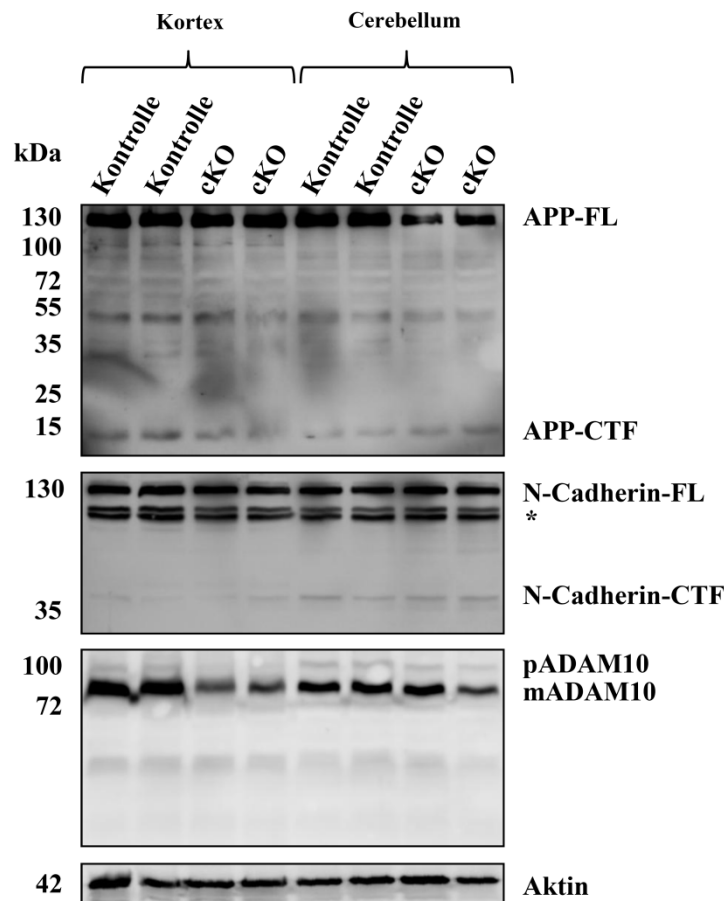
**Abb. 34: Western-Blot-Analyse des zellulären Prionproteins in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse.**

Das Gehirn von konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäusen wurde an P20 präpariert (IV. 14. 5), kortikale Lysate hergestellt (IV. 16. 1) und die Expression des zellulären Prionproteins mittels Western-Blot-Analyse nach Angaben in Abschnitt IV. 16. 4 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Pom1 (Aguzzi, Schweiz) durchgeführt. 20 bzw. 40 µg wurden auf die SDS-PAGE geladen und der Western-Blot an einem Chemilumneszenzdetektor (LAS4000) entwickelt. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), kilo Dalton (kDa), unglykosyliert (U), monoglykosyliert (M), diglykosyliert (D), zelluläres Prionprotein (PrPc).

Stützend zu den Analysen in histologischen Schnitten des ZNS konnte bei der Western-Blot-Analyse von kortikalen Lysaten der cKOs im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Expression des Prionproteins nachgewiesen werden (s. Abb. 34). Hierbei war zu erkennen, dass nicht nur diglykosyliertes „reifes“ PrPc (D-PrPc) des sekretorischen Weges erhöht exprimiert vorlag, sondern auch frühe Formen des Proteins (M-PrPc und U-PrPc), die nur teilweise oder gar nicht glykosyliert waren, verstärkt detektiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass eine reduzierte Spaltung von PrPc durch ADAM10-Defizienz an der Plasmamembran zu Störungen beim Transport von PrPc durch den sekretorischen Weg oder ein Verlust von ADAM10 zu transkriptionellen Änderungen hinsichtlich der PrPc-Expression führt.

### V. 2. 7. ADAM10 spaltet das Amyloide Vorläufer Protein (APP) im adulten ZNS

Zusätzlich zum Prionprotein sollte untersucht werden, ob die Prozessierung der *in vivo* in den konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout-Mäusen charakterisierten ADAM10-Substrate (N-Cadherin und APP) auch in den konditionalen ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäusen verändert war. Hierzu wurden kortikale und cerebellare Regionen der cKOs und geeigneter Kontrollen präpariert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.



**Abb. 35: Western-Blot-Analyse der Prozessierung von N-Cadherin und APP in kortikalen und cerebellaren Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse.**

Kortikale und cerebellare Regionen von Mäusen wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 14. 5 an P18 präpariert und Lysate hergestellt (IV. 16. 1). Die Proben für die APP-Analyse wurden auf einem 4-12%iges Bis-Tris-Gradientengel (Invitrogen, Karlsruhe, D) aufgetragen und der anschließende Western-Blot bei 250 mA konstanter Stromstärke für 2 h durchgeführt. Für die Analyse von N-Cadherin und ADAM10 wurden 10%ige SDS-PAGEs verwendet, der Western-Blot bei 20 V konstanter Spannung ü. N. durchgeführt und am nächsten Tag für 30 min bei 70 V konstanter Spannung gearbeitet. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen mit 5% Milchpulverlösung in TBS-T blockiert, APP, N-Cadherin, ADAM10 und Aktin mit spezifischen Antikörpern markiert und die Membranen an einem Chemilumineszenzdetektor (LAS4000) entwickelt (IV. 16. 2., IV. 16. 3, IV. 16. 4). Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), kilo Dalton (kDa), pro (p), matures (m), C-terminales Fragment (CTF), *Full length* (FL), \* (unspezifische Antikörperbindung).

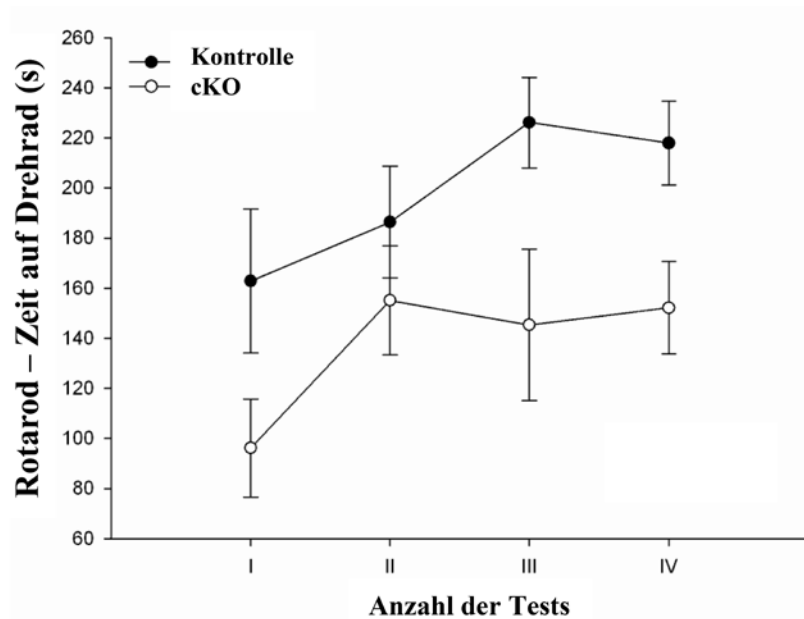
Die Analyse der Expression des ADAM10-Proteins in kortikalen und cerebellaren Lysaten zeigte, dass in Bereichen des Kortex die Expression beider Formen des ADAM10-Proteins

(pADAM10, 95 kDa und mADAM10, 70 kDa) in den cKOs reduziert war, während in den cerebellaren Lysaten zwischen den verschiedenen Gentoypen keine Unterschiede auftraten (s. Abb. 35). Zusätzlich zeigte sich bei der Western-Blot-Analyse der APP-Prozessierung, dass das Signal für das APP-CTF (ca. 10 kDa) in cKO-Lysaten im Vergleich zu Kontrolllysaten reduziert war (s. Abb. 35). Die Analyse der Prozessierung des N-Cadherin-Proteins (FL 130 kDa, CTF 37 kDa) mittels Western-Blot zeigte in kortikalen und cerebellaren Lysaten der cKOs und der Kontrollen keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Jedoch war die Expression des c-terminalen Fragments von N-Cadherin unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen in Kortexlysaten sehr gering. Ein Western-Blot auf Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle der Proteinmenge der SDS-PAGE.

### V. 2. 8. Verhaltens- und Gedächtnisanalyse der ADAM10-cKO-Mäuse

Glutamatabhängige Rezeptoren und deren Regulation in postsynaptischen Bereichen des Hippokampus spielen eine wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung und werden auch zur Behandlung von Epilepsie spezifisch durch Pharmaka reguliert (Anovadiya et al., 2012; Lisman and Raghavachari, 2006). Erste Indizien, dass eventuell eine Verhaltensänderung oder Gedächtnisbeeinträchtigung bei den ADAM10-cKO-Mäusen vorliegen könnte, lieferte die Zugabe von Weichfutter direkt in den Käfig der cKOs. Dadurch wurde eine erhebliche Steigerung der Überlebensrate der cKOs bis P50 erreicht, die eventuell mit dem direkten Zugang bzw. Auffinden der Nahrung und Wasser zusammenhängen könnte. Zusätzlich wiesen die auftretenden Zuckungen (möglicherweise Epilepsie) auf eine mögliche Fehlregulation glutamatabhängiger Rezeptoren in den cKOs hin. Aufgrund dessen wurden mit den überlebenden, 4-8 Wochen alten cKOs und Kontrollen verschiedene Verhaltens- (Neuromotortest: Rotarodanalysen) und Gedächtnistests (Lern- und Gedächtnistests: *Passive-avoidance*- und *Morris-water-maze*-Analysen) in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Rudi d'Hooge und Dr. Stijn Stroobants durchgeführt.

Während der Verhaltensanalysen wurde zusätzlich die Käfigaktivität der cKOs im Vergleich zu den Kontrollen untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung zeigte keinerlei Unterschiede zwischen cKOs und WT-Mäusen in einem Zeitraum von 24 Stunden. Zur Untersuchung der Motorkoordination wurde eine Rotarodanalyse durchgeführt, da der Motorkortex willkürliche Bewegungen und komplexe Bewegungsabläufe steuert. Auf einem Rotarod müssen die Mäuse durch komplexe Bewegungsabläufe, bei ansteigender Drehgeschwindigkeit in einem bestimmten Zeitintervall, durch Laufen einen möglichst langen Zeitraum auf dem Rad verbleiben.



**Abb. 36: Rotarod-Motorkoordinationstests der ADAM10-cKO-Mäuse.**

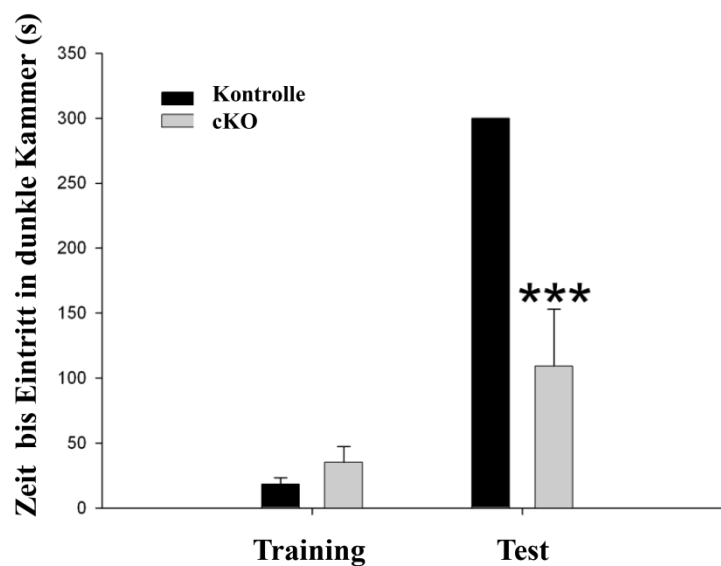
4-8 Wochen alte konditionale ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäuse und geeignete Geschwisterkontrollen wurden für den Rotarodtest verwendet. Die Mäuse wurden 2 min vor dem Test bei 4 rpm auf dem Drehrad trainiert. Während eines Tests wurde die Geschwindigkeit des Drehrads in einem Zeitintervall von 5 min von 4 auf 40 rpm gesteigert und die Zeit der Mäuse auf dem Drehrad protokolliert. Jeder Test wurde mit einer Pause von 10 min unterbrochen und vier Tests durchgeführt (IV. 14. 7). Dargestellt ist die Anzahl der Test und die Zeit der Mäuse auf dem Drehrad in Sekunden. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Sekunden (s).

Die Motorkoordinationstests auf dem Rotarod zeigten Unterschiede zwischen 4-8 Wochen alten cKOs und den Geschwisterkontrollen (s. Abb. 36). Im ersten Test (I) nach der Trainingsphase zeigten die cKOs eine reduzierte Zeit auf dem Drehrad bei ansteigender Rotationsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Geschwisterkontrollen. Beide Genotypen der Mäuse wiesen bei einem zweiten Testdurchlauf (II) eine Steigerung der Zeit auf dem Drehrad auf, wobei die Zeit des Verbleibens der cKO-Mäuse auf dem Drehrad immer noch geringer war als die Zeit der WT-Mäuse im ersten Test. Zusätzlich zeigte sich bei den cKOs im Vergleich zu den Geschwisterkontrollen bei weiteren Tests (III, IV), dass es nach dem zweiten Test zu keiner weiteren übungsbedingten Steigerung des Zeitintervalls der cKO-Mäuse auf dem Drehrad kam. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die cKOs und Kontrollen das Verbleiben auf dem Drehrad bei ansteigender Rotationsgeschwindigkeit von Beginn bis zum Ende der Testphase (I-IV) um ca. 40% steigern konnten. Die cKOs zeigten jedoch schon zu Beginn der Tests erhebliche Einschränkungen bezüglich der Motorkoordination im Vergleich zu WT-Mäusen des gleichen Alters.

Neben der Deletion des ADAM10-Proteins in motorisch assoziierten Bereichen wurde durch die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors auch die Deletion des ADAM10-Proteins in hippokampalen Bereichen des ZNS der Mäuse



erreicht. Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob die ADAM10-Deletion im Hippokampus zu Beeinträchtigungen oder Veränderung der Gedächtnisleistung der cKOs im Vergleich zu den Kontrollen führte. Zum Test der Gedächtnis-Leistung der Mäuse wurde ein *Passive-avoidance*-Test durchgeführt, da Mäuse als nachtaktive Fluchttiere instinktiv lichtdurchflutete Bereiche meiden und wenn die Möglichkeit besteht, sich in dunklere Bereiche zurückziehen. Beim *Passive-avoidance*-Test wird der Maus bei Betreten einer dunklen Kammer ein milder elektrischer Schock versetzt, an den sich die Tiere bei weiteren Testungen erinnern und in der angrenzenden hellen Kammer, in die sie zu Beginn des Tests gesetzt wurden, länger verbleiben.



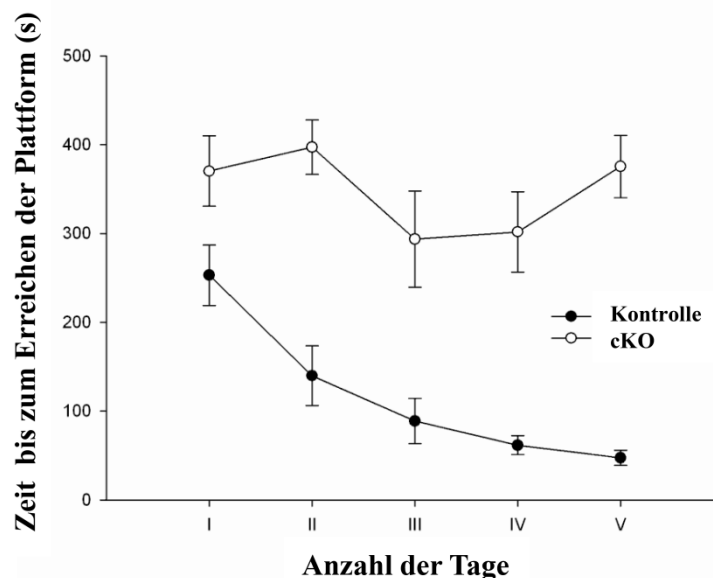
**Abb. 37:** *Passive-avoidance*-Test der ADAM10-cKO-Mäuse.

4-8 Wochen alte konditionale ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäuse und geeignete Geschwisterkontrollen wurden für den Test verwendet. Der Test wurde in einem Käfig bestehend aus einem hellen und einem abgedunkelten Bereich mit Bodengitter durchgeführt. Nach 30 min Gewöhnung an die Dunkelheit wurden die Mäuse in den hellen Bereich des Käfigs gesetzt und nach 5 Sekunden eine Tür zum dunklen Bereich geöffnet. Nach Kontakt mit allen vier Läufen im dunklen Bereich des Käfigs wurde den Mäusen ein milder elektrischer Schock versetzt. In den Trainings- und in den Testphasen wurde jeweils nach 24 h die Zeit bis zum Eintritt in die dunkle Kammer gemessen und die Messung nach 300 Sekunden beendet (IV. 14. 7). Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Sekunden (s).

In den Trainingsphasen des *Passive-avoidance*-Tests konnten keine Unterschiede zwischen cKO- und WT-Mäusen detektiert werden (s. Abb. 37). Die Zeit bis zum Eintritt in den abgedunkelten Käfigbereich betrug ca. 25-40 Sekunden. In den darauffolgenden Tests war zu erkennen, dass die cKO-Mäuse im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen eine reduzierte Zeit im lichtdurchfluteten Käfigbereich verblieben. Hierbei zeigte sich, dass die Kontrollmäuse das komplette, analysierte Zeitintervall von 300 Sekunden nach der Trainingsphase im hellen Bereich des Käfigs verblieben, während sich die cKOs schon nach ca. 100 Sekunden in

den abgedunkelten Bereich des Käfigs bewegten (s. Abb. 37). Die Analysen zeigten, dass die Deletion von ADAM10 in hippocampalen Bereichen bei konditionierten Lerntest einen Einfluss auf das angstassoziierte Erinnerungsvermögen der Mäuse hatte. Zusätzlich konnte durch den *Passive-Avoidance*-Test nachgewiesen werden, dass es zu keiner Beeinträchtigung des Sehvermögens der cKOs kam, da sie dunkle Bereiche im Testareal auffinden konnten.

Zur Untersuchung des räumlichen Langzeitgedächtnisses, sowie an visuelle Reize gekoppeltes Lernen im Hippokampus wurde ein *Morris-water-maze-assay* durchgeführt. Hierzu wurden die ADAM10-cKO-Mäuse und Kontrollen in einen zirkulären Bereich, der mit eingetrübten Wasser gefüllt war, gesetzt und die Zeit bis zum Erreichen einer unter Wasser befindlichen Plattform gemessen. Dieser Bereich war an vier verschiedenen Seiten für die Mäuse sichtbar markiert und die Lokalisation der Plattform wurde während der mehrere Tage dauernden Testphase nicht verändert.



**Abb. 38: *Morris-water-maze*-Analyse mit ADAM10-cKO-Mäusen und Geschwisterkontrollen.**

4-8 Wochen alte konditionale ADAM10-(CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäuse und geeignete Geschwisterkontrollen wurden für die Analyse verwendet. Zum Test wurden die Mäuse in einen zirkulären Bereich (150 cm Durchmesser, 30 cm Höhe) gesetzt, der mit eingetrübtem Wasser (26°C) gefüllt war und die Zeit bis zum Erreichen einer Plattform (15 cm Durchmesser, 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche) gemessen. Der zirkuläre Bereich wurde in vier Quadranten unterteilt, wobei jeder Quadrant mit einer für die Mäuse sichtbaren Markierung versehen war. An einem Tag wurden jeweils vier Tests mit 15 Minuten Pause zwischen den einzelnen Tests durchgeführt. Konnte eine Maus die Plattform innerhalb von 120 Sekunden nicht auffinden, wurde der Test abgebrochen, das Tier auf die Plattform gesetzt und dort 10 Sekunden belassen (IV. 14. 7). Zur Analyse der Daten wurden die Zeiten (s) bis zum Erreichen der Plattform der Einzeltests eines Analysentages aufsummiert und als Totalwerte dargestellt. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Sekunden (s).

Aus der Summe der Einzelmessungen an Testtag I der *Morris-water-maze*-Analyse ergab sich, dass die WT-Mäuse im Vergleich zu den cKO-Mäusen die versteckte Plattform schneller

erreichten (s. Abb. 38). Hier könnte auch eine Korrelation zwischen der besseren Motorkoordination der WT-Mäuse im Rotarod bestehen, da für das Schwimmen komplexe feinabgestimmte Bewegungen erfolgen mussten. Im Verlaufe der mehrere Tage andauernden Testphase (I-V) war zu erkennen, dass die WT-Mäuse an jedem weiteren Testtag eine deutliche Reduktion des Zeitintervalls bis zum Auffinden der Plattform zeigten (s. Abb. 38). Zu Beginn der Testphase lag die Summe der einzelnen Tests bei ca. 250 Sekunden, nach fünf Tagen bei ca. 50 Sekunden. Die Analyse der cKOs ergab, dass diese auf das Gesamtexperiment bezogen keine Fortschritte bzw. Lerneffekte für das schnellere Auffinden der versteckten Plattform im Vergleich zu den Kontrollen zeigten. Zusätzlich zu keinen Fortschritten im Auffinden der Plattform verbrachten die cKOs im Vergleich zu Kontrollen eine signifikant verringerte Zeit im Zielquadranten mit der Plattform. Zudem wiesen sie während den Analysen einen signifikant, größeren Abstand zur Plattform auf (Daten nicht gezeigt). Die *Morris-water-maze*-Analyse zeigte, dass die Deletion von ADAM10 in Bereichen des Kortex und des Hippokampus einen deutlichen Effekt auf die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses und an visuelle Reize gekoppeltes Lernen hatte.

#### **V. 2. 9. ADAM10-cKO-Mäuse zeigen eine reduzierte Ausbildung von LTP**

In den Verhaltensanalysen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von ADAM10 primär in kortikalen und hippokampalen Bereichen zu Beeinträchtigungen der Motorkoordination und des Gedächtnisses der Mäuse führte. Jedoch zeigten sich bei der histologischen Analyse keinerlei grob-morphologische Auffälligkeiten (Aufbau des ZNS, Neuronenverlust), jedoch eine reaktive Astroglie und eine Akkumulation des zellulären Prionproteins. Synaptische Plastizität und auch die synaptische Reizweiterleitung spielen eine essentielle Rolle bei der Gedächtnisausbildung. Aufgrund dessen sollte durch LTP-Analysen bei der Vermessung der Schaffer-Kollaterale (CA3-CA1-Region des Hippokampus) als Modell in den ADAM10-cKO-Mäusen untersucht werden, ob die Deletion von ADAM10, die reaktive Astroglie und die erhöhte Expression des Prionproteins Einflüsse auf synaptische Funktionen haben könnten.

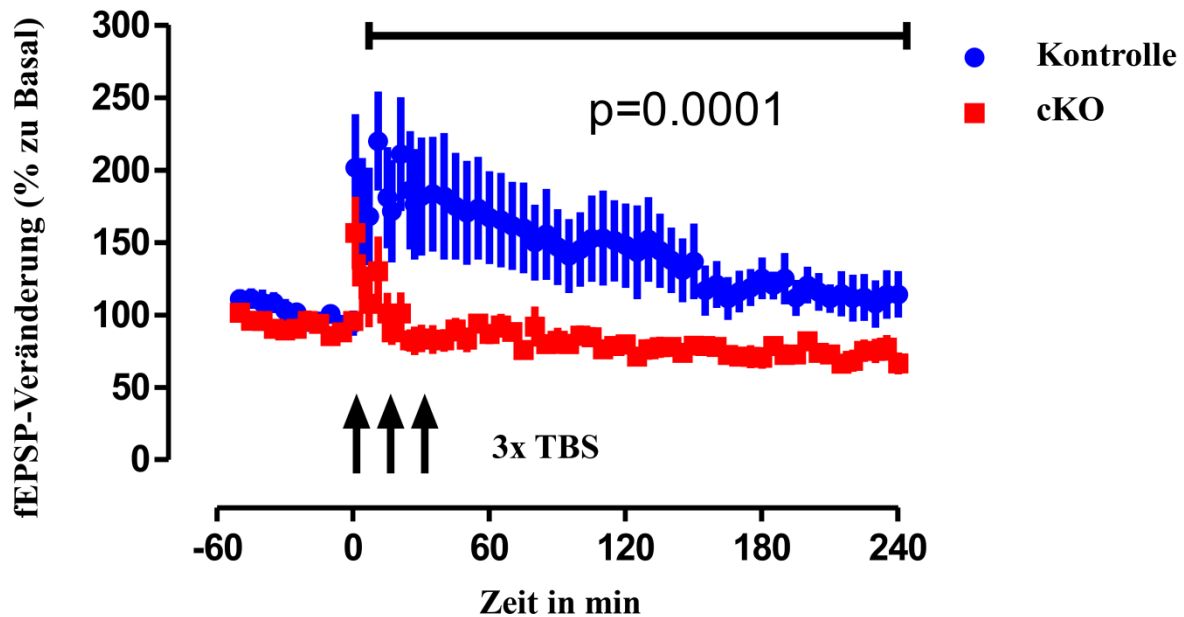


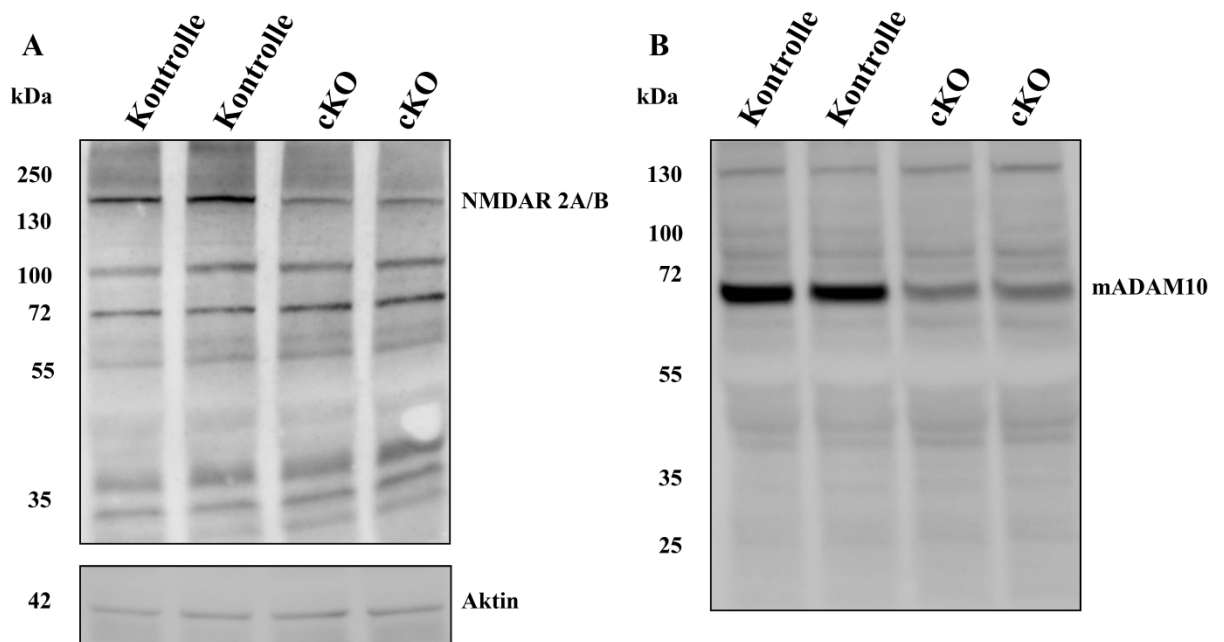
Abb. 39: LTP-Analysen der Schaffer-Kollaterale der ADAM10-cKO-Mäuse.

Schnittkulturen von cKOs und geeigneten Geschwisterkontrollen wurden angelegt und die LTP-Analysen nach etablierten Protokollen durchgeführt. Elektroden wurden in axonale Bereiche der CA3-Region des Hippokampus eingebracht und die postsynaptischen Potentiale in der CA1-Region gemessen. Nach Aufnahme der Basislinie (-60-0 min) wurden drei hochfrequente *Tetanus-Burst-Stimulationen* (Tetanus: 10 hochfrequente Stimuli von 4x 100 Hz Pulsen im Abstand von 200 ms) wobei zwischen der jeweiligen *Tetanus-Burst-Stimulation* 10 min Zeitintervalle lagen. Dargestellt ist die Veränderung der *excitatory-postsynaptic-potentials* (EPSP) im Vergleich zur Basislinie im Verlaufe eines gemessenen Zeitraums von 240 min (IV. 14. 7). Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), *excitatory-postsynaptic-potentials* (EPSP), *tetanus-burst-stimulation* (TBS), Minuten (min), milli Sekunden (ms).

Die Basislinien (-60-0 min) der postsynaptischen Potential zeigten keinerlei Unterschiede zwischen den cKOs und den Kontrollen. Nach der ersten hochfrequenten Stimulierung der CA3-Axone (*Tetanus-Burst*, TBS) war zu erkennen, dass die Synapsen sowohl in den cKOs als auch in den Kontrollen zur synaptischen Übertragung befähigt waren, da eine Veränderung der exzitatorischen, postsynaptischen Potentiale (EPSPs) im Vergleich zur Basislinie bei beiden Genotypen in der CA1-Region des Hippokampus gemessen werden konnte (s. Abb. 39). Jedoch war nach der ersten Stimulation zu erkennen, dass die Amplitude der postsynaptischen Potentiale zur Basislinie bei den Kontrollen größer war als die der cKOs. Zusätzlich zeigte sich, dass eine Reihe von *Tetanus-Burst-Stimulationen* in den Kontrollschnitten bzw. Synapsen eine Steigerung der Amplitude der EPSPs zur Folge hatte und es zur Ausbildung früher Formen der Langzeitpotenzierung (LTP) (2-3 h) kam. Jedoch wurde das Experiment nach 240 min abgebrochen, so dass Aussagen über späte LTP-Formen nicht getroffen werden konnten. Die EPSPs der cKO-Messung zeigten, dass die Amplitude der EPSPs mit jedem weiteren *Tetanus-Burst* kleiner wurde und es zu keiner Ausbildung von LTP kam.

## V. 2. 10. Proteinbiochemische Charakterisierung der ADAM10-cKO- Mäuse

Speziell bei der Ausbildung von LTP in Bereichen der Schaffer-Kollaterale des Hippokampus spielen glutamatabhängige NMDA-Rezeptoren (NMDAR) eine essentielle Rolle, da nach Glutamatbindung und Entfernung des  $Mg^{2+}$ -Block durch Depolarisation, einströmendes Calcium in das postsynaptische Neuron durch die NMDARs für die Initiation der resultierenden intrazellulären Signalkaskaden verantwortlich ist (Lau and Zukin, 2007). Zusätzlich zeigte die konditionale Deletion der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im Vorderhirn von Mäusen, dass die NR2B-Untereinheit in diesen Bereichen für die Ausbildung des räumlichen Erinnerungsvermögens (*Morris-water-maze-Test*) benötigt wird (Engelhardt et al., 2008). Deshalb sollte in kortikalen Präparationen und anschließender Western-Blot-Analyse überprüft werden, ob eine Deletion des ADAM10-Proteins in diesen Bereichen eine Änderung der Expression der NMDAR 2A/B-Untereinheiten zur Folge hatte.



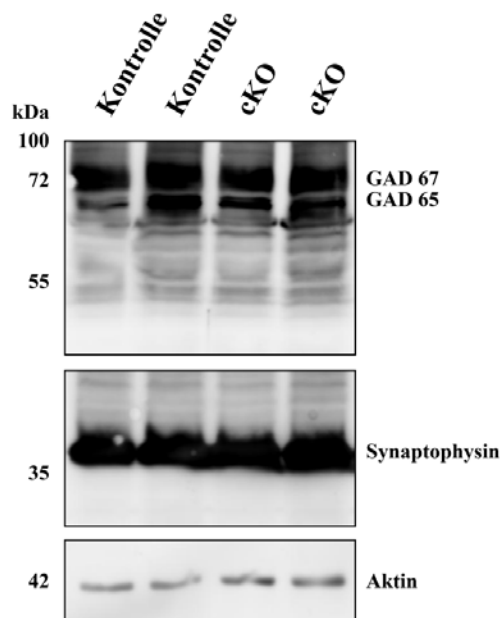
**Abb. 40: Expressionsanalyse der Untereinheiten 2A/B des NMDAR-Rezeptors in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse.**

**A:** Das Gehirn von cKOs und Kontrollen an P20 wurde nach den Angaben in Abschnitt IV. 14. 5 präpariert, kortikale Bereiche isoliert und Lysate hergestellt (IV. 16. 1). Für die Expressionsanalyse der NMDAR 2A/B-Untereinheiten wurde ein 7,5%ige SDS-PAGE verwendet und ein Western-Blot bei 20 V konstanter Spannung ü. N. durchgeführt (IV. 16. 2, IV. 16. 3, IV. 16. 4). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit einem polyklonalen anti-NMDAR 2A/B Rezeptor Antikörper 1 h bei RT, 1 h mit einem geeigneten Zweitantikörper inkubiert und die Membran in einem Chemilumineszenzdetektor (LAS4000) entwickelt. **B:** Als Kontrolle der Deletion von ADAM10 in kortikalen Bereichen wurde ein Western-Blot mit einem polyklonalen Serum (B42.1) durchgeführt. Zur Kontrolle der Beladung der SDS-PAGE wurde die Nitrozellulosemembran auf Aktin gefärbt. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), kilo Dalton (kDa), matures (m).

Bei der Western-Blot-Analyse der Expression der 2A/B-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors war zu erkennen, dass bei einem erwartetem Molekulargewicht von ca. 170 kDa

die Intensität des Bandensignals für beide Untereinheiten in den kortikalen Lysaten der cKOs im Vergleich zu Kontrollen reduziert war (s. Abb. 40 A). Die Aktinkontrolle zeigte eine gleichmäßige Beladung der SDS-PAGE (s. Abb. 40 A). Die Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der ADAM10-Deletion zeigte eine deutliche Reduktion der muren Form von ADAM10 (mADAM10, ca. 65 kDa). Die Proform von ADAM10 konnte auf diesem Western-Blot nicht detektiert werden (erwartetes Molekulargewicht, ca. 95 kDa) (s. Abb. 40 B).

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist einer der bedeutendsten inhibitorischen Neurotransmitter im Säugerhirn und wird durch die Glutamatdecarboxylase (GAD) synthetisiert. Bei spezifischer Deletion einer Isoform der GAD (65) in Mäusen konnte festgestellt werden, dass die Deletion unter milden Stressbedingungen zu myoklonischen epileptischen Anfällen der Mäuse führte und die Mäuse eine erhöhte Mortalität zeigten (Kash et al., 1997). Zur weiteren proteinbiochemischen Charakterisierung des Epilepsie-Phänotyps der ADAM10-cKO-Mäuse wurde die Expression der Isoformen der Glutamatdecarboxylase (GAD 65 und 67) in kortikalen/hippokampalen Lysaten überprüft. Zusätzlich sollte durch Western-Blot-Analyse von Synaptophysin (unter anderem ein Markerprotein zur Synapsenquantifizierung) überprüft werden, ob eventuell die Anzahl an Synapsen im Kortex der cKOs verändert war.



**Abb. 41: Western-Blot-Analyse der GAD 67/65 und Synaptophysin Expression in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse.**

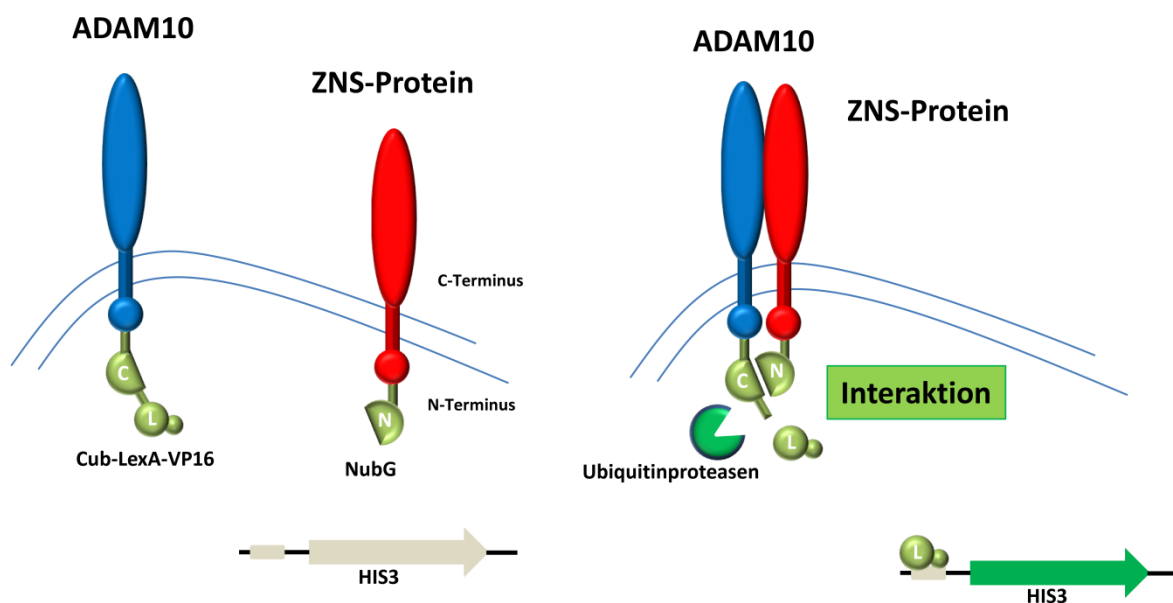
Das Gehirn von cKOs und Kontrollen wurde nach Angaben in Abschnitt IV. 14. 5 präpariert, kortikale Regionen präpariert und Lysate (IV. 16. 1, IV. 16. 2) hergestellt. Die Proben wurden auf ein 10%ige SDS-PAGE geladen und Western-Blots bei 800 mA konstanter Stromstärke für 2 h durchgeführt (IV. 16. 3, IV. 16. 4). Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen mit 5% Milchpulver in TBS-T blockiert und Färbungen mit spezifischen Erstantikörpern (GAD 67/65, Synaptophysin) durchgeführt. Eine Aktinfärbung diente als Proteinladekontrolle der SDS-PAGE. Abkürzungen: konditionaler Knockout (cKO), Glutamatdecarboxylase (GAD), kilo Dalton (kDa).

Die Analyse der Expression der beiden Isoformen der Glutamatdecarboxylase zeigte, dass in Kontroll- und cKO-Lysaten des Kortex beide Formen der GAD (67/65, 67 kDa und 65 kDa) exprimiert waren. Zusätzlich konnten auch keine Änderungen in der Expressionsstärke der beiden Isoformen zwischen den verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden (s. Abb. 41). Die Expression des präsynaptischen Proteins Synaptophysin (37 kDa) war beim Vergleich der cKO-Lysate und den Kontrollen nicht verändert, woraus geschlossen werden konnte, dass die Anzahl an Synapsen in kortikalen Regionen bei neuronaler ADAM10-Defizienz zu diesem Zeitpunkt unverändert war (s. Abb. 41).

Zusammenfassend konnte durch die konditionale Deletion von ADAM10 in Neuronen des adulten ZNS gezeigt werden, dass ADAM10 für die Funktionalität des ZNS essentiell ist. ADAM10-Defizienz löste in Bereichen des Kortex und Hippokampus Störungen der motorischen Kontrolle, der Gedächtnisausbildung und bei schwerer Ausprägung des ZNS-Phänotyps Epilepsie aus. Bei der Analyse der Synapsenfunktion mittels LTP-Analyse konnte gezeigt werden, dass auch die synaptische Plastizität in den cKOs gestört war. Weiterhin zeigten die cKO-Mäuse eine moderate reaktive Astroglie und eine Veränderung der NMDA-Rezeptorexpression, jedoch keine Änderung in Bezug auf die Expression, der hier untersuchten synaptischen Marker. Zusätzlich zeigte sich, dass die Spaltung einiger Substrate von ADAM10 (APP, Prion) verändert waren, die Einflüsse auf synaptische Übertragung haben könnten.

### V. 3. Interaktionsscreen mit ADAM10 zur Identifikation neuer modulatorischer bzw. regulatorischer Proteine.

Durch die Analyse der konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre und CamKIIalpha-Cre)-Knockout-Mäuse konnten einige der zuvor *in vitro* charakterisierten Substrate als Substrate *in vivo* verifiziert und deren Bedeutung für die Entwicklung und Funktionalität des murinen ZNS teilweise beschrieben werden. Jedoch konnten weitere wichtige Fragen zu ADAM10 durch diese Modelle nicht beantwortet werden. Spaltet ADAM10 alle Substrate auf der Zelloberfläche sobald die Prodomäne abgetrennt wurde? Gibt es zelltypspezifische und zeitpunktabhängige Regulationsmechanismen der ADAM10-Aktivität? Zur Beantwortung dieser Fragen wurde während dieser Arbeit ein *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz durchgeführt, der erlaubt, spezifisch Interaktionen zwischen Membranproteinen untersucht zu identifizieren (s. Abb. 42).



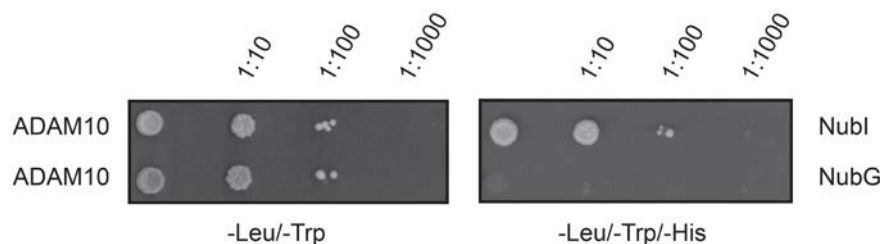
**Abb. 42: Modell zur Interaktionsanalyse von murinem ADAM10 mit einem *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz.**

ADAM10 (*Bait*) wird als c-terminales Fusionsprotein mit dem c-terminalen Teil von Ubiquitin (Cub) und einem artifiziellen Transkriptionsfaktor (LexA (DNA-Bindung)-VP16 (Transkriptionsaktivator)) exprimiert. Zur Interaktionsanalyse wird eine n-terminal mit dem n-terminalen Teil von Ubiquitin (NubG, an Position 13 Isoleuzin zu Glyzin Mutation) fusionierte cDNA-Bibliothek (*Preys*) aus Maus-Gehirn verwendet. Die räumliche Nähe von ADAM10 mit einem potentiellen Interaktionspartner führt zur Bildung eines vollständigen Ubiquitinmoleküls, welches von intrazellulären Ubiquitinproteasen erkannt wird und ein proteolytischer Schritt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors führt. Der Transkriptionsfaktor erkennt in einem speziell modifizierten Hefestamm (NMY51) die Promotorregion des *HIS3*-Gens, das zur Synthese von Histidin benötigt wird und dessen Expression den Hefen ein Wachstum auf histidinfreien Mangelmedium-Platten ermöglicht. Abkürzungen: c-terminaler Teil von Ubiquitin (Cub), n-terminaler Teil von Ubiquitin (NubG), zentrales Nervensystem (ZNS), Imidazolglyzerol-Phosphat-Dehydratase (*HIS3*) (Abb. modifiziert nach Suter et al., 2009).



### V. 3. 1. Überprüfung des ADAM10-Cub-LexA-VP16-Fusionsproteins im Hefesystem

Zum Test der Expression und Funktion des klonierten ADAM10-Cub-LexA-VP16-Fusionskonstrukts (*Bait*) wurde dieses mit geeigneten positiv und negativ Kontrollen im Hefesystem exprimiert. Hierbei kamen modifizierte Versionen des transmembranen Hefe-ER-Proteins Alg5 zum Einsatz (Bestandteile des verwendeten Kits von MoBiTec, Göttingen, D). Als positiv Kontrolle (NubI) für die Interaktion wurde ein Konstrukt pAl-Alg5 als Fusionsprotein mit der n-terminalen Domäne von Ubiquitin (Nub) verwendet. Als negativ Kontrolle (NubG) kam ein Konstrukt (pDL2-Alg5), das mit einem an Position 13 mutierten Nub (Isoleuzin zu Glyzin, NubG) fusioniert wurde, zum Einsatz. Hierbei verhindert die Mutation eine Bildung des vollständigen Ubiquitinmoleküls, das sich im darauffolgenden Screen nur durch räumliche Nähe der Interaktionspartner bilden und von zellulären Ubiquitinproteasen erkannt werden sollte.



**Abb. 43: Testexpression des ADAM10-Fusionskonstrukts (*Bait*) in Hefen**

NMY51-Hefen wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 15 mit dem ADAM10-Cub-LexA-VP16-Fusionskonstrukt und geeigneter positiver (NubI) und negativer Kontrolle (NubG) transformiert. Anschließend wurden die Zellen auf -Leu/-Trp- bzw. -Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) ausgesät und die Hefen für drei Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Kultivierung der Hefen auf -Leu/-Trp-Selektionsplatten diente der Kontrolle der Transformation beider Plasmide. Abkürzungen: pAl-Alg5 (NubI), pDL2-Alg5 (NubG), Leuzin (Leu), Tryptophan (Trp), Histidin (His).

Die Interaktionsanalyse im Hefesystem (IV. 13. 16) zeigte, dass das ADAM10-Fusionsprotein (*Bait*) und die Kontrollproteine für die Interaktion in Hefen exprimiert wurden (Wachstum auf -Leu/-Trp-Selektionsplatten, s. Abb. 43). Das ADAM10-Fusionsprotein setzte außerdem nicht ohne Interaktionspartner den artifiziellen Transkriptionsfaktor ins Cytosol frei (keine Autoaktivierung). Das konnte auf -Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten beobachtet werden, da hier kein Wachstum der Hefen mit transformierter negativer Kontrolle (NubG) zu verzeichnen und somit das *Bait*-Konstrukt für den *Screen* geeignet war. Die Durchführung des Interaktions-Screens erfolgte nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 17 unter Verwendung einer n-terminal NubG-fusionierten Maushirn-cDNA-Bibliothek. Zur Ermittlung der Interaktionspartner wurden daraufhin Plasmide nach den Angaben in

Abschnitt IV. 13. 18 aus den Hefen isoliert, in *E.Coli* XL1 Blue zur Vermehrung transformiert (IV. 13. 7., IV. 13. 8) und anschließend präpariert (IV. 13. 9, IV. 13. 9. 2). Danach erfolgte die Sequenzierung der cDNAs durch die Firma GATC (Konstanz, D).

### V. 3. 2. Sequenzanalyse der potentiellen neuen Interaktionspartner von ADAM10

Aus 115 Hefeklonen wurde nach Vermehrung der Einzelklone auf -Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten Plasmid-DNA präpariert. Klon 1-65 wurden an Tag 2 und Klon 66-115 an Tag 3 nach der *Large-Scale*-Transformation gepickt und Sequenzanalysen durchgeführt. Von den 115 Klonen enthielten ca. 50 cDNA-Sequenzen putativer Interaktoren von ADAM10 (siehe Anhang). Auffällig war bei der Analyse der cDNA-Sequenzen, dass häufig Familienmitglieder der ITM2-Familie identifiziert werden konnten, wobei Itm2b (Bri2) bereits als ADAM10-Substrat und Interaktionspartner beschrieben wurde (Martin et al., 2008), jedoch eine gute Kontrolle für die Stringenz des Interaktionssystems darstellte. Weiterhin wurden auch zwei bis zu diesem Zeitpunkt nur wenig charakterisierte Tetraspanine (Tetraspanin-15 und Tetraspanin-3) gefunden. Andere Tetraspanine wurden bereits beschriebene Interaktoren von ADAM10 zu sein und ansatzweise auch regulative Funktionen hinsichtlich der ADAM10-Aktivität diskutiert (Arduise et al., 2008; Xu et al., 2009). Aufgrund dessen wurde Tetraspanin-15 (TSPAN15) als Kandidat für eine weitere detailliertere Analyse hinsichtlich der ADAM10-Interaktion/Regulation ausgewählt, da TSPAN15 in zwei Klonen (#15 und #19) nach der *Large-Scale*-Transformation identifiziert werden konnte.

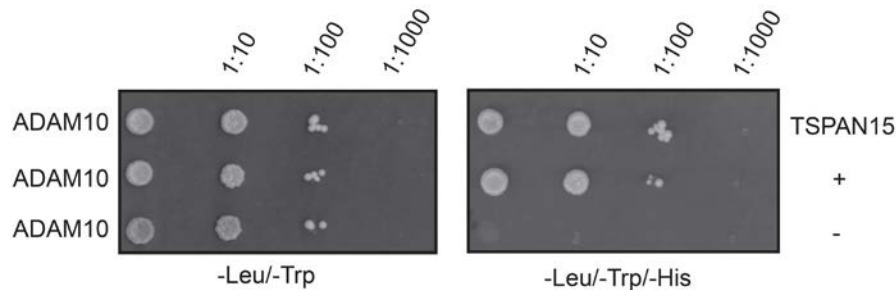
**Tab. 31: Auszug aus Liste der erhaltenen potentiellen Interaktionspartner**

Klon-Nummer	Genname	Besonderheiten	Funktion
#39, #78, #86, #88	Itm2b, BRI, BRI2	ITM2-Familie, BRICHOS-Domäne	ADAM10-Substrat (Martin et al., 2008)
#51	Itm2a, E25, itm2	ITM2-Familie, BRICHOS-Domäne	Involviert in Differenzierungsprozesse (Boeuf et al., 2009)
#53	Itm2c, BRI3, CT-Bri3	ITM2-Familie, BRICHOS-Domäne	unbekannt
#15, #19	Tspan15	Tetraspanin-LEL-Superfamilie	unbekannt
#46	Tspan3, Tm4sf8, TM4a	Tetraspanin-LEL-Superfamilie	Involviert in Myelinisierung (Tiwari-Woodruff et al., 2001; Tiwari-Woodruff et al., 2004)

### V. 3. 3. Verifizierung der TSPAN15/ADAM10-Interaktion im Hefesystem

Zur Verifizierung von TSPAN15 als Interaktionspartner von ADAM10 wurden NMY51-Hefen verwendet und das ADAM10 (*Bait*) und TSPAN15 (*Prey*) exprimiert. Zusätzlich

wurde ADAM10 mit geeigneter positiv bzw. negativ Kontrolle (NubI, NubG) für die Interaktion im Hefesystem transformiert und das Wachstum der Hefen auf –Leu/-Trp- bzw. –Leu/-Trp/His-Selektionsplatten analysiert.



**Abb. 44: Interaktionsanalyse von ADAM10 und TSPAN15 in NMY51-Hefen auf –Leu/-Trp- bzw. –Leu/-Trp/His-Selektionsplatten.**

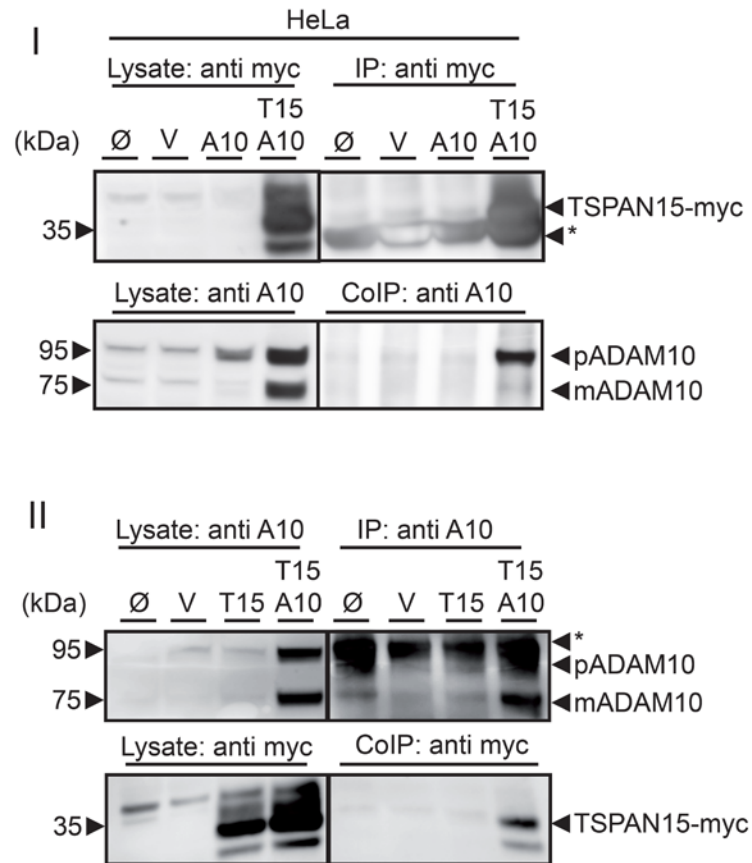
ADAM10 wurde als Fusionprotein mit dem c-terminalen Teil von Ubiquitin (Cub) und einem artifiziellen Transkriptionsfaktor in NMY51-Hefen exprimiert und TSPAN15 als Fusionsprotein mit einem modifizierten n-terminalen Ubiquitin (NubG) koexprimiert. Die Transformation der Plasmide erfolgt nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 15. Anschließend wurden die Hefen nach den Angaben in Abschnitt IV. 13. 16 kultiviert und eine Interaktionsanalyse auf –Leu/-Trp/His-Mangelmediumplatten durchgeführt. Zusätzlich wurden eine negativ Kontrolle und eine positiv Kontrolle für Interaktion mit ADAM10 transformiert und eine entsprechende Analyse auf Mangelmedienplatten durchgeführt. –Leu/-Trp-Mangelmediumplatten dienen zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation beider Plasmide. Abkürzungen: Leuzin (Leu), Tryptophan (Trp), Histidin (His), negativ Kontrolle (-, NubG), positiv Kontrolle (+, NubI).

Bei der Analyse der Interaktion von ADAM10 und TSPAN15 zeigte sich, dass in Kontrolltransformationen mit positiv (+) bzw. negativ Kontrolle (-) für Interaktion mit ADAM10 und der TSPAN15/ADAM10-Transformation jeweils beide Plasmide erfolgreich transformiert wurden. Es wurde Wachstum der Hefen auf –Leu/-Trp-Mangelmediumplatten beobachtet (s. Abb. 44). Bei einer Verdünnung der Vorkultur von 1:1000 wurde kein Wachstum beobachtet. Auf der –Leu/-Trp/His-Mangelmediumplatte war zur erkennen, dass bei Transformation der negativ Kontrolle für die Interaktion (-, NubG) und ADAM10 kein Wachstum der Hefen zu verzeichnen war. Sowohl mit der positiv Kontrolle (+, NubI) und mit TSPAN15 zeigte sich Interaktion mit ADAM10 in den Hefen, da die Freisetzung des Transkriptionsfaktors den Hefen das Wachstum auf –Leu/-Trp/His-Mangelmedienplatten ermöglichte.

#### V. 3. 4. Überprüfung der ADAM10/TSPAN15-Interaktion in eukaryotischen Zelllinien

Durch die Retransformation von TSPAN15 in ADAM10 exprimierende Hefen konnte gezeigt werden, dass TSPAN15 ein Interaktionspartner von ADAM10 im Hefesystem ist. Zur weiteren Analyse der Interaktion von ADAM10 mit TSPAN15 sollten beide Proteine in Zelllinien exprimiert werden und durch Koimmunpräzitationsstudien die Interaktion in

HeLa-Zellen bestätigt werden. Zur Identifikation und Präzipitation des TSPAN15-Proteins wurde das TSPAN15 als Fusionskonstrukt (hergestellt nach Angaben in den Abschnitten IV. 13. 1. 2, IV. 13. 3, IV. 13. 4, IV. 13. 5, IV. 13. 6) mit einem c-terminalen myc-Tag exprimiert.



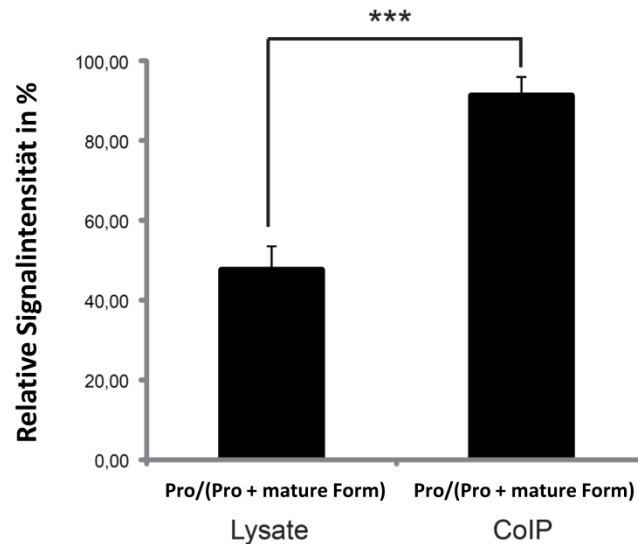
**Abb. 45: Koimmunpräzitationsstudien von TSPAN15-myc mit ADAM10.**

**I** und **II**: HeLa-Zellen wurden mit Vektor (V), ADAM10 (A10) und TSPAN15-myc (T15) nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 transfiziert, die Zellen nach 48 h geerntet (IV. 17. 5), lysiert (IV. 16. 1), 50 µl Probe als Lysatkontrolle abgenommen und eine Immunpräzipitation (IV. 16. 5) mit einem anti-myc Antikörper (**I**) und eine Immunpräzipitation mit einem anti-ADAM10 Antikörper (**II**) durchgeführt. Nach Inkubation ü. N. bei 4 °C wurden für 30 min Protein-G-Agarose-Beads zur Lysat-Antikörper-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Beads mehrfach mit Lysispuffer gewaschen und die Proteinlösung abschließend in 1x SDS-Auftragspuffer für 30 min bei 60°C denaturiert. Die Lysatkontrollen wurden mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 60°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden Lysate und Proben der Immunpräzipitationen auf 4-12%ige Bis-Tris-Gradientengele aufgetragen, eine Western-Blot-Analyse mit anti-ADAM10 und anti-myc Antikörpern durchgeführt und die Membranen an einem Chemilumineszenzdetektor (LAS4000) entwickelt (IV. 16. 3, IV. 16. 4). Abkürzungen: ADAM10 (A10), TSPAN15-myc (T15), Vektor (V), kilo Dalton (kDa), Co- bzw. Immunpräzipitation (CoIP, IP), untransfiziert (∅), Antikörpersignale (\*).

Die Western-Blot-Analyse der HeLa-Zelllysate nach Expression von TSPAN15-myc mit einem anti-myc Antikörper zeigte mehrere Banden bei ca. 33-35 kDa (s. Abb. 45 I). Die Präzipitation mit einem anti-myc Antikörper führte zu einer Anreicherung des Signals für myc-markierte Proteine, wobei nach Denaturierung der Proteine zusätzlich die leichten Ketten des Antikörpers (\*) bei ca. 25 kDa in allen Immunpräzipitationen nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 45 I, IP). Die Western-Blot-Analyse für die Expression von ADAM10 zeigte

Signale für die endogene Proform bzw. mature Form von ADAM10 auf Höhe von 95 kDa bzw. 75 kDa in den Kontrollexperimenten ( $\emptyset$ , V) und bei transienter Einzeltransfektion von ADAM10 eine klare Zunahme des Bandensignals der Proform auf Höhe von 95 kDa (s. Abb. 45 I). Auffällig war bei der Analyse der Lysate eine deutliche Zunahme der muren Form von ADAM10 bei ADAM10- und TSPAN15-myc-Transfektion im Vergleich zur ADAM10-Einzeltransfektion (s. Abb. 45 I). Die Präzipitation von TSPAN15-myc führte zur Ko-präzipitation beider Formen von ADAM10 (p- und mADAM10), wobei im Vergleich zur Lysatkontrolle signifikant mehr Proform im Vergleich zur muren Form kopräzipitiert wurde (s. Abb. 45 I, CoIP). Zusätzlich wurde eine Präzipitation des ADAM10-Proteins durchgeführt, wobei in den Kontrolllysaten bei der Transfektion von ADAM10 und TSPAN15-myc nach ADAM10-Färbung starke Signale für ADAM10 (pADAM10, 95 kDa, mADAM10, 75 kDa) detektiert werden konnten und endogenes ADAM10 kaum nachzuweisen war (s. Abb. 45 II). Die Präzipitation von ADAM10 war erfolgreich, da ein deutlicher Anstieg beider Formen von ADAM10, auch unter endogenen Bedingungen, auf der Membran detektiert werden konnte (s. Abb. 45 II, IP). Bei der Analyse der Lysate durch spezifische myc-Detektion zeigte sich, dass in der transienten Einzeltransfektion von TSPAN15-myc und bei Koexpression von ADAM10 starke Signale auf Höhe von 33-35 kDa auf der Membran auftraten. Die Präzipitation von ADAM10 führte demnach zur Kopräzipitation von TSPAN15-myc (s. Abb. 45 II, CoIP). Eine Einzeltransfektion des jeweiligen kopräzipitierten Proteins wurde als Spezifitätskontrolle für die in der Immunpräzipitation verwendeten Antikörper durchgeführt (s. Abb. 45 I und II).

Zur detaillierten Analyse der möglichen stärkeren Interaktion der Proform von ADAM10 mit TSPAN15-myc wurden weitere Koimmunpräzipitationsstudien von ADAM10 nach Präzipitation von TSPAN15-myc durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Verhältnisse von Proform zur muren Form von ADAM10 in Kontrolllysaten und Koimmunpräzipitation nach Entwicklung der Membranen durch die Analysesoftware *ImageJ* quantifiziert und verglichen.



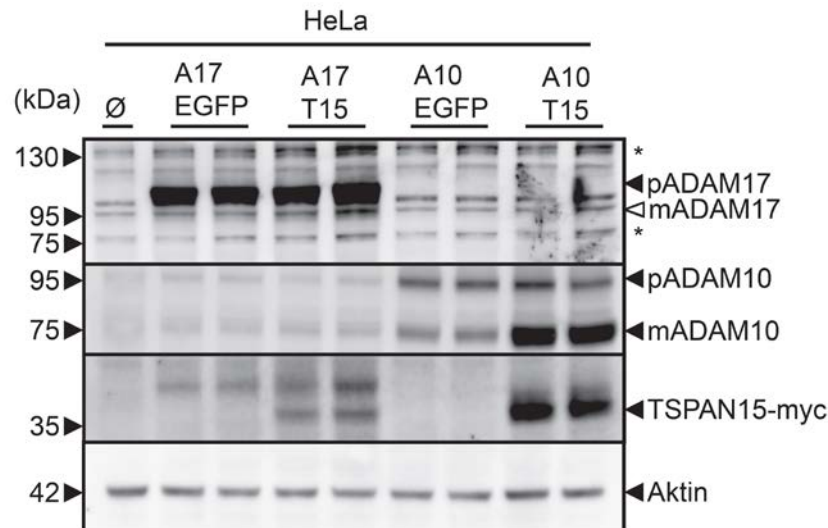
**Abb. 46: Vergleich der Bandenintensitäten der Signale für ADAM10 in Lysat- und CoIP-Fractionen.**

TSPAN15-myc und ADAM10 wurden in HeLa-Zellen exprimiert (IV. 17. 4), Lysate hergestellt (IV. 16. 1), eine Immunpräzipitation von TSPAN15-myc nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 5 durchgeführt und die Kopräzipitation von ADAM10 durch Western-Blot-Analysen untersucht (IV. 16. 3, IV. 16. 4). Die Intensität der Bandensignale wurde mit der *ImageJ*-Analysesoftware bestimmt. Im Diagramm ist der Quotient der Signalintensität der Proform geteilt durch die Summe der Signalintensität von Pro und maturaer Form von ADAM10 in Prozent dargestellt, wobei Lysat- und CoIP-Fractionen verglichen wurden. Abkürzungen: Ko- bzw. Immunpräzipitation (CoIP, IP), Statistik: \*\*\* $p < 0,001$ .

Der Quantifizierung der relativen Signalintensitäten war zu entnehmen, dass signifikant mehr Proform als mature Form von ADAM10 nach Präzipitation von TSPAN15-myc kopräzipitiert wurde (s. Abb. 46). In Lysatkontrollen lag der Quotient aus Pro/(Pro + mature Form) von ADAM10 bei ca. 50% und in den CoIP-Fractionen bei ca. 90%. Dieser Befund deutete daraufhin, dass eine stärkere Interaktion von ADAM10 und TSPAN15-myc zu frühen Zeitpunkten nach der Proteinsynthese im Endoplasmatischen Reticulum oder im Golgi-Kompartiment stattfinden könnte, da das ADAM10-Protein in diesen Bereichen als Proform vorliegt.

### V. 3. 5. Einfluss von TSPAN15-myc auf ADAM10-Maturierung

Zusätzlich wurde in den Lysatkontrollen detektiert, dass die Expression von ADAM10 mit TSPAN15-myc zu einem deutlichen Anstieg der maturaen Form von ADAM10 im Vergleich zur Einzeltransfektion führte. Dieser Befund sollte durch weitere Experimente verifiziert und außerdem untersucht werden, ob dieser beobachtete Effekt sich auch für die mit ADAM10 eng verwandte Protease ADAM17 zeigen würde. Zur Analyse wurde in Doppelansätzen TSPAN15-myc/ADAM10 und TSPAN15-myc/ADAM17 transient in HeLa-Zellen exprimiert und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.



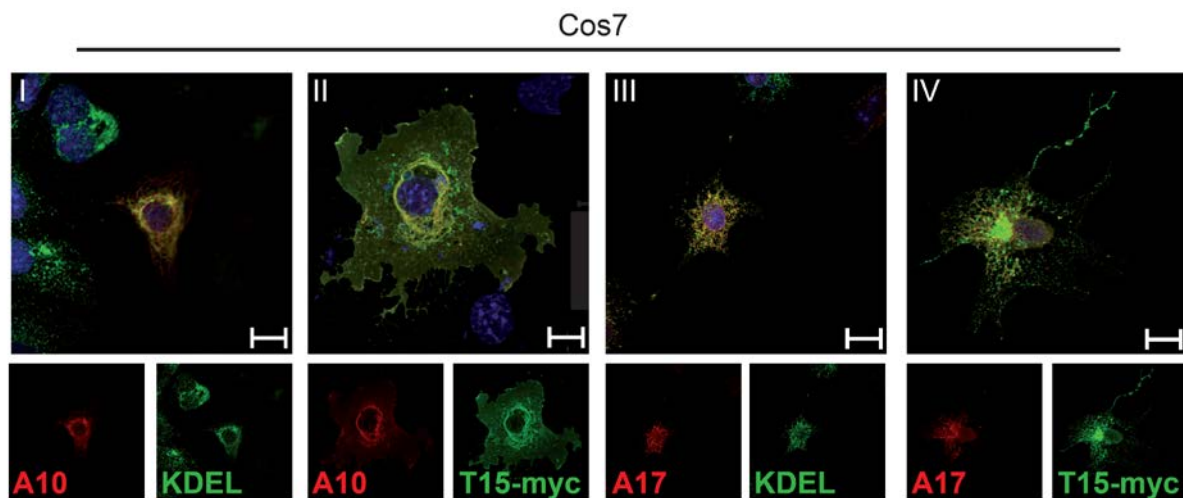
**Abb. 47: Analyse des Einflusses von TSPAN15-myc auf ADAM10 und ADAM17.**

ADAM10 und ADAM17 wurden jeweils im Doppelansatz transient mit EGFP oder TSPAN15-myc in HeLa-Zellen nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 transfiziert, nach 48 h geerntet (IV. 17. 5) und Zelllysate (IV. 16. 1, IV. 16. 2) hergestellt. Untransfizierte Zellen bzw. das anschließende Lysat dienten als Kontrolle. Nach SDS-PAGE (20 µg pro Spur) und Western-Blot (20 V konstante Spannung ü. N.) erfolgte die spezifische Detektion von ADAM10, ADAM17, TSPAN15-myc und Aktin durch geeignete Antikörper. Die Entwicklung der Membranen erfolgte an einem Chemilumineszenzdetektor (LAS4000) (IV. 16. 3, IV. 16. 4). Abkürzungen: kilo Dalton (kDa), pro (p), matures (m), ADAM17 (A17), ADAM10 (A10), TSPAN15-myc (T15), *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP), untransfiziert (Ø), unspezifische Antikörperbindung (\*).

Die Expression von ADAM10 mit TSPAN15-myc führte im Vergleich zur Einzeltransfektion zu einer deutlichen Verstärkung des Signals der muren Form von ADAM10 (mADAM10, 75 kDa) (s. Abb. 47). Die Expressionsstärke der Proform von ADAM10 (pADAM10, 95 kDa) änderte sich durch TSPAN15-myc-Expression nicht, was auf eine Stabilisierung der muren Form bzw. eine längere Halbwertszeit des muren ADAM10 hinweisen könnte. Bei der Expression von ADAM17 war sowohl bei der Einzeltransfektion und der Transfektion von ADAM17 und TSPAN15-myc ein starkes Signal für die Proform (pADAM17, 120 kDa) detektiert worden (s. Abb. 47). Jedoch änderte sich die Expressionsstärke der muren Form von ADAM17 (mADAM17) durch zusätzliche Expression von TSPAN15-myc nicht, wobei jedoch die Transfektionsrate von TSPAN15-myc im Vergleich zur Transfektion mit ADAM10 reduziert war. Zusammenfassend konnte durch diese Analyse gezeigt werden, dass TSPAN15-myc spezifisch die Bildung der muren Form von ADAM10 förderte und eventuell auch stabilisierte, jedoch die eng verwandte Protease ADAM17 durch TSPAN15-myc-Expression in diesem Versuch nicht beeinflusst wurde.

### V. 3. 6. Analyse der subzellulären Lokalisation von ADAM10 nach TSPAN15-myc-Expression

Die erhöhte Signalstärke der maturen Form von ADAM10 in Western-Blot-Analysen legte die Vermutung nahe, dass eventuell auch die subzelluläre Lokalisation von ADAM10 durch TSPAN15-myc beeinflusst sein könnte. Aufgrund dessen sollten in Cos7-Zellen ADAM10/TSPAN15-myc und zum Vergleich ADAM17/TSPAN15-myc transient überexprimiert und deren subzelluläre Lokalisation durch Immunfluoreszenzanalysen untersucht werden.



**Abb. 48: Immunfluoreszenzanalysen nach transienter ADAM10/TSPAN15-myc- und ADAM17/TSPAN15-myc-Überexpression.**

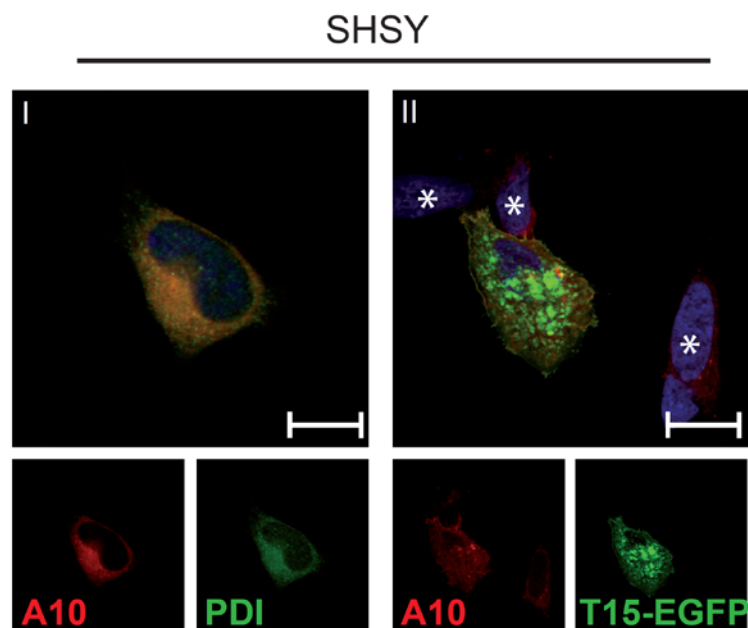
In Cos7-Zellen wurden nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 ADAM10, ADAM10/TSPAN15, ADAM17 und ADAM17/TSPAN15 transient überexprimiert und nach 48 h Inkubationszeit die Zellen mit 4% PFA in PBS fixiert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 7 mit spezifischen Antikörpern (c-terminaler ADAM10-, c-terminaler ADAM17-, monoklonaler myc-, monoklonaler KDEL-Antikörper) und entsprechenden fluorophorgekoppelten Zweitantikörpern. Die Zellkerne wurden spezifisch mit DAPI angefärbt. Anschließend wurden konfokale mikroskopische Aufnahmen an einem konfokalen *Laserscanning* Mikroskop FV1000 der Firma Olympus erstellt. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m. Abkürzungen: ADAM10 (A10), TSPAN15-myc (T15), ADAM17 (A17).

Durch die konfokale Immunfluoreszenzanalyse der Einzeltransfektion von ADAM10 in Cos7-Zellen konnte gezeigt werden, dass ADAM10 hauptsächlich mit Proteinen, die eine ER-spezifische KDEL-Sequenz enthalten, kolokalisierte (s. Abb. 48 I). Wurde TSPAN15-myc mit ADAM10 transient überexprimiert war zu erkennen, dass das ADAM10-Protein zusätzlich zu kernnahen Kompartimenten auch stark an der Plasmamembran zu detektieren war (s. Abb. 48 II). Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen der transienten ADAM17-Überexpression im Vergleich zur ADAM17/TSPAN15-myc-Überexpression konnte gezeigt werden, dass ADAM17 in ER-Kompartimenten lokalisiert war. ADAM17 kolokalisierte mit Proteinen, die eine spezifische ER-KDEL-Sequenz enthielten. Es wurde



keine Änderung der Lokalisation von ADAM17 bei zusätzlicher TSPAN15-myc-Expression detektiert (s. Abb. 48 III und IV). Stützend zur Western-Blot-Analyse konnte durch die Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, dass TSPAN15-myc spezifisch ADAM10 reguliert bzw. beeinflusst.

Bei den Immunpräzipitationsstudien, der Western-Blot-Analyse zur Beeinflussung von ADAM10 durch TSPAN15-myc und den Immunfluoreszenzanalysen wurde mit Überexpressionsmodellssystemen beider Proteine gearbeitet. Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob die transiente Einzeltransfektion von humanem TSPAN15-EGFP in SHSY-Zellen einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des endogen-exprimierten, humanen ADAM10-Proteins haben würde. Weiterhin sollte durch diese Untersuchungen geklärt werden, ob TSPAN15 speziesübergreifend einen Regulator für die ADAM10-Lokalisation darstellt. Das hier verwendete, humane TSPAN15-EGFP-Konstrukt (c-terminaler EGFP-Tag) wurde freundlicherweise während Kooperationsarbeiten durch *Prof. Dr. Eric Rubinstein* zur Verfügung gestellt.

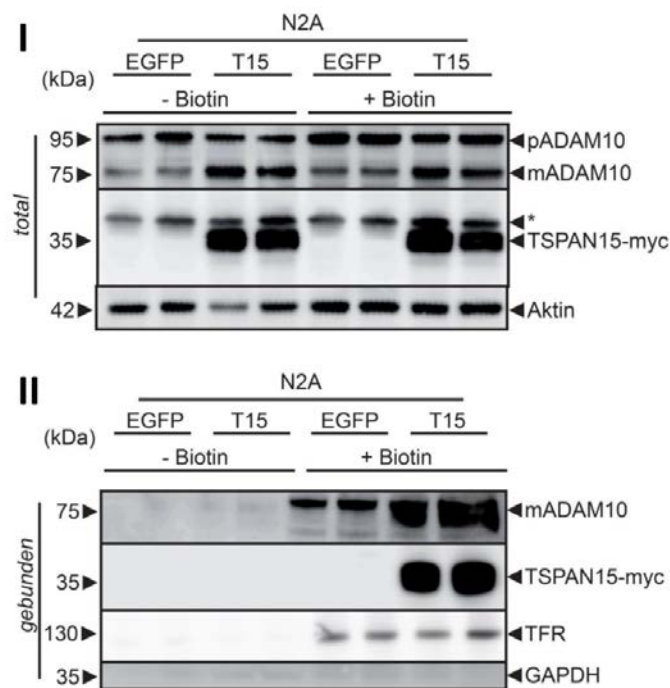


**Abb. 49: Lokalisationsanalyse von humanen, endogenen ADAM10 nach transienter TSPAN15-EGFP-Expression.**

SHSY-Zellen wurden mit humanem TSPAN15-EGFP nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 transfiziert, die Zellen nach 48 h Inkubationszeit mit 4% PFA in PBS fixiert und anschließend Immunfluoreszenzfärbungen (IV. 17. 7) durchgeführt. Zur spezifischen Detektion wurden als Erstantikörper ein gegen den extrazellulären Teil von ADAM10 gerichteter Antikörper (11G2), ein polyklonaler *protein-disulfide-isomerase* (PDI)-Antikörper und als Zweitantikörper entsprechende fluorophorgekoppelte Antikörper verwendet. Danach wurden mit einem konfokalen *Laserscanning* Mikroskop FV1000 der Firma Olympus mikroskopische Aufnahmen erstellt Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m. \* markieren untransfizierte Zellen. Abkürzungen: ADAM10 (A10), TSPAN15-EGFP (T15-EGFP), *protein-disulfide-isomerase* (PDI).

Bei der Auswertung der konfokalen Aufnahmen von untransfizierten SHSY-Zellen war zu erkennen, dass das endogene ADAM10 größtenteils mit dem ER-Marker *protein-disulfide-isomerase* (PDI) kolokalisierte und nur zu einem sehr geringen Anteil an der Plasmamembran lokalisiert vorlag (s. Abb. 49 I). Durch die Expression von humanem TSPAN15-EGFP wurde teilweise eine Lokalisationsänderung von ADAM10 an die Plasmamembran erreicht, da in der konfokalen mikroskopischen Aufnahme deutlich mehr ADAM10 an der Zelloberfläche im Vergleich zu untransfizierten Zellen (\*) zu detektieren war und deutlich mit TSPAN15-EGFP kolokalisierte (s. Abb. 49 II).

Die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzstudien sollten zur Reproduktion der Daten durch eine alternative Methode (Zelloberflächenbiotinylierung) bestätigt werden und die Biotinylierung gleichzeitig zeigen, ob die Expression des murinen TSPAN15-myc-Proteins zu einer Lokalisationsänderung des murinen, endogenen ADAM10 in Neuro2A-Zellen (N2A), vergleichbar zu den Überexpressionsstudien, führen würde.



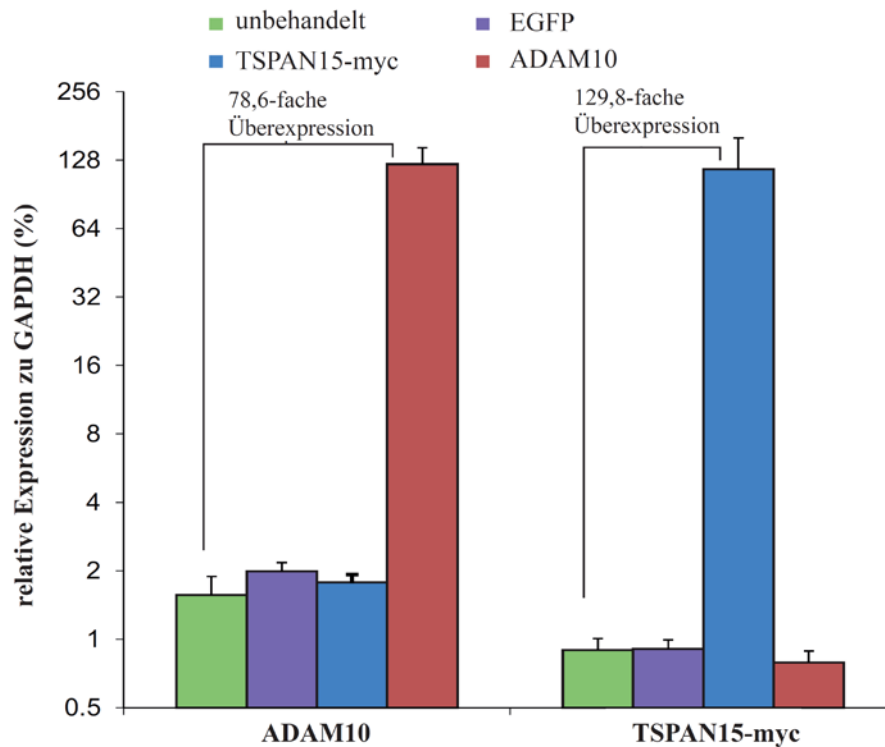
**Abb. 50: Zelloberflächenbiotinylierung nach Überexpression von TSPAN15-myc in N2A-Zellen.**

**I und II:** EGFP und TSPAN15-myc wurden in N2A-Zellen transient nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 transfiziert und anschließend eine Zelloberflächenbiotinylierung (IV. 16. 9) durchgeführt. Nach Lyse der Zellen wurden Proben für die Totallysate entnommen und Streptavidin-*Beads* zu den Rest-Zelllysaten gegeben. Anschließend wurden die Totallysate und die gebundenen Fraktionen auf 10%ige SDS-PAGES aufgetragen, Western-Blots bei 20 V konstanter Spannung ü. N. durchgeführt und die Nitrozellulosemembranen mit 5% Milchpulver in TBS-T blockiert. Danach erfolgte die Markierung spezifischer Proteine durch geeignete Primär- und Sekundärantikörper (c-terminaler ADAM10 (Pin-1)-, anti myc-, anti Aktin-, anti Transferrinrezeptor- und anti Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-Antikörper). Abkürzungen: *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP), TSPAN15-myc (T15), ADAM10 (A10), Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), Transferrinrezeptor (TFR), kilo Dalton (kDa), Neuro2A (N2A), unspezifische Antikörperbindung (\*).

Die Analyse der Totallysate der Zelloberflächenbiotinylierung durch Western-Blot-Analyse zeigte, dass in den TSPAN15-myc-transfizierten N2A-Zellen das Signal für die mature Form von ADAM10 (mADAM10, 75 kDa) stark erhöht, während das Signal für die Proform (pADAM10, 95 kDa) reduziert war (s. Abb. 50 I). Diese Ergebnisse zeigten, dass TSPAN15-myc das endogen-vorhandene ADAM10-Protein beeinflussen, dessen Maturierungsstatus während des sekretorischen Weges regulieren oder dessen Halbwertszeit erhöhen könnte. Diese Aussage stützte die Analyse der Fraktionen der Zelloberflächenbiotinylierung, da die Transfektion von TSPAN15-myc in den biotinylierten Fraktionen zu einer deutlichen Steigerung der Expression der maturen Form von ADAM10 auf der Zelloberfläche im Vergleich zu EGFP-transfizierten Kontroll-Fraktionen führte (s. Abb. 50 II). Zur Kontrolle der Beladung der SDS-PAGEs diente Aktin (42 kDa) und zur Kontrolle der Biotinylierungsreaktion der Nachweis des Transferrinrezeptors (TFR, 130 kDa) auf der Zelloberfläche (s. Abb. 50 I und II). Der Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH, 37 kDa) diente zur Kontrolle der zellulären Integrität während der Biotinylierungsreaktion (s. Abb. 50 II).

### **V. 3. 7. Untersuchung der ADAM10-Expression in Abhängigkeit von der TSPAN15-myc-Expression (qRT-PCR)**

War die beobachtete Expressionsteigerung des ADAM10-Proteins nach TSPAN15-myc-Transfektion auf transkriptionelle Regulation zurückzuführen, oder handelte es sich hierbei um posttranslationale Mechanismen der Änderung des Proteintransports oder Erhöhung der Halbwertszeit des ADAM10-Proteins? Zur Beantwortung der ersten Frage wurden qRT-PCR-Analysen nach Isolierung von mRNA bzw. anschließender cDNA-Synthese aus TSPAN15-myc transfizierten N2A-Zellen durchgeführt.



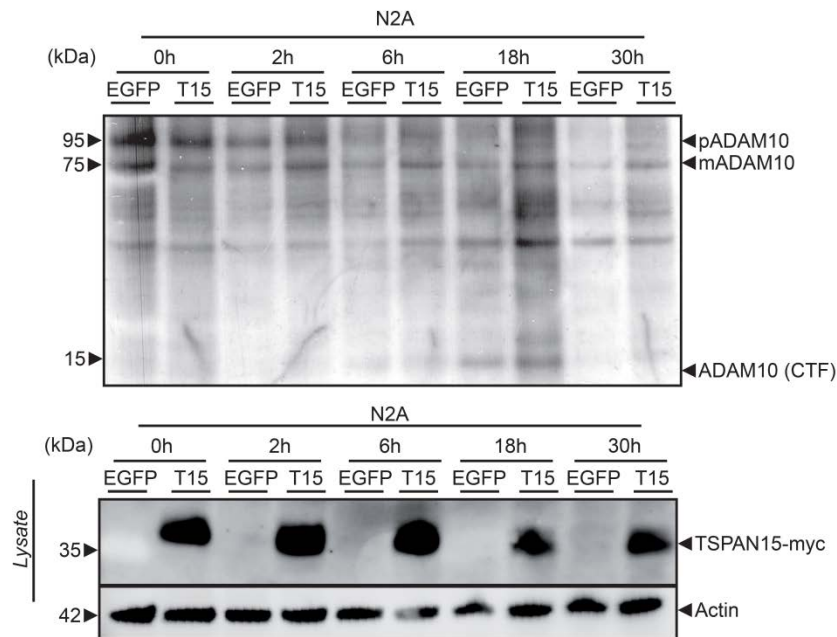
**Abb. 51: qRT-PCR zur Analyse der Expression von ADAM10 und TSPAN15 in Abhängigkeit von ADAM10- und TSPAN15-myc Überexpression.**

N2A-Zellen wurden mit EGFP, TSPAN15-myc bzw. ADAM10 transfiziert (IV. 17. 4) und nach 48 h Stunden die Zellen geerntet (IV. 17. 5). Gesamt-mRNA wurde mit dem *NucleoSpin® RNA II* Kit (Macherey Nagel) isoliert (IV. 13. 11) und aus 2 µg mRNA cDNA unter Verwendung des *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis* Kit synthetisiert (IV. 13. 12). qRT-PCR-Experimente wurden mit dem Taqman®-System von Applied Biosystems (A10: Mm00545742\_m1, T15: Mm01150417\_m1, GAPDH: Mm99999915\_g1) durchgeführt (IV. 13. 13). Die Expression von ADAM10 und TSPAN15 sind als relative Expression zu GAPDH in % dargestellt. Abkürzungen: *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP), ADAM10 (A10), TSPAN15 (T15), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH).

In unbehandelten und EGFP-transfizierten N2A-Zellen änderte sich die Expression von TSPAN15 bzw. ADAM10 nicht (s. Abb. 51). Bei transienter Überexpression von ADAM10 bzw. TSPAN15-myc war ein drastischer Anstieg beider mRNAs (78,6 fache Überexpression bei A10 und 129,8 fache Überexpression bei T15) zu verzeichnen, wobei sich die mRNA-Menge von TSPAN15 nach ADAM10-Überexpression und die mRNA-Menge von ADAM10 nach TSPAN15-myc Überexpression nicht änderte. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Zunahme des ADAM10-Proteins nach Überexpression von TSPAN15-myc nicht auf transkriptionelle Effekte zurückzuführen war, sondern posttranslationale Mechanismen zur Verstärkung des Signals der maturen Form in den vorangegangenen Western-Blot-Analysen führten.

### V. 3. 8. Analyse der posttranslationalen Mechanismen zur erhöhten ADAM10-Expression nach TSPAN15-myc-Expression

War die Erhöhung der maturen Form auf einen schnelleren ER- bzw. Golgi-Austritt des ADAM10-Proteins zurückzuführen? Dient TSPAN15 dem Transport von ADAM10 und eventuell dessen Stabilisierung? Um sich diesen Fragestellungen zu nähern wurden *Pulse-Chase*-Analysen zur radioaktiven Markierung und Verfolgung einer definierten, synthetisierten ADAM10-Proteinmenge in N2A-Zellen durchgeführt.



**Abb. 52: Pulse-Chase-Experiment zur Analyse von ADAM10 nach TSPAN15-myc-Expression**

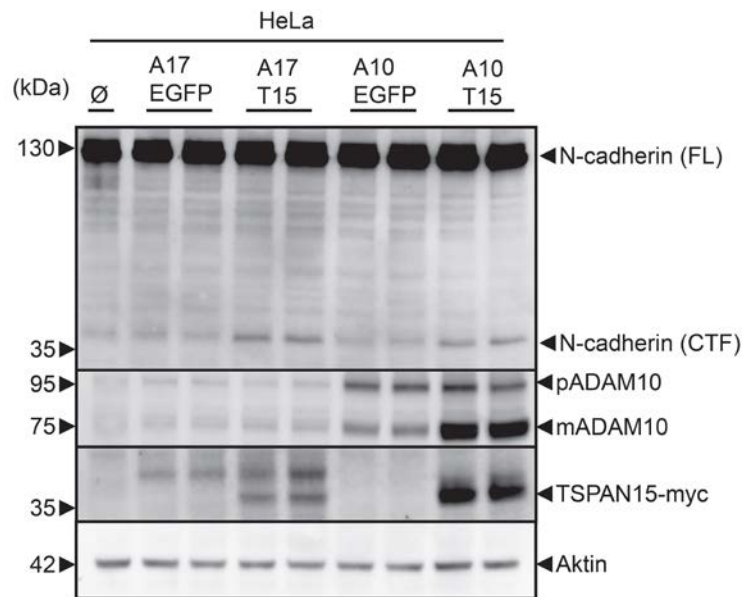
N2A-Zellen wurden mit EGFP bzw. TSPAN15-myc transfiziert (IV. 17. 4) und nach 24 h das Medium abgenommen und die Zellen für 3 h in DMEM ohne L-Methionin/L-Cystein gehungert. Danach wurde DMEM ohne L-Methionin/L-Cystein mit 200  $\mu$ Si/ml 35S-markiertem L-Methionin/L-Cystein auf die Zellen gegeben und ein radioaktiver *Pulse* für die Dauer von einer Stunde bei 37°C durchgeführt (IV. 16. 6). Anschließend wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 6, 18 und 30 h) geerntet (IV. 17. 5), lysiert (IV. 16. 1), nach BCA-Proteinbestimmung (IV. 16. 2) eine Lysatkontrolle abgenommen und eine IP des ADAM10 Proteins nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 5 durchgeführt. Danach wurden die IP-Fractionen durch SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel fixiert und ein CL-XPosure<sup>TM</sup>-Film für 7 Tage bei -80°C auf das Gel in einer Entwicklungskassette gelegt. Abschließend erfolgte die Entwicklung des Films nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 7. Für die Kontrolllysate wurde ein Western-Blot nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 3 und IV. 16. 4 durchgeführt und die Membranen mit einem Chemilumineszenzdetektor (LAS4000) entwickelt. Die Bandenintensität wurde mit der *ImageJ*-Analysesoftware bestimmt. Abkürzungen: kilo Dalton (kDa), pro (p), matures (m), c-terminales Fragment (CTF), *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP), TSPAN15 (T15), Neuro2A (N2A), Immunpräzipitation (IP).

Die *Pulse-Chase*-Analyse von endogen exprimiertem ADAM10 zeigte, dass zu frühen Zeitpunkten (2h) nach der radioaktiven Markierung bereits 32% des Gesamt-ADAM10-Proteins (pro + mature Form) in EGFP-transfizierten Zellen als mature Form vorlagen, während 67% des ADAM10-Proteins bei TSPAN15-myc-Expression bereits prozessiert worden waren (s. Abb. 52). Nach 6 h *Chase* war in TSPAN15-myc transfizierten N2A-Zellen

von 83% des Gesamt-ADAM10-Proteins die Prodomäne entfernt worden, während in Kontrollzellen der Anteil an maturer Form von ADAM10 bei 46% lag. Zusätzlich wird ADAM10 an der Zelloberfläche durch zwei weitere Familienmitglieder der ADAM-Proteasen (ADAM9 und ADAM15) gespalten, was zur Bildung eines c-terminalen ADAM10-Fragments führt (Tousseyn et al., 2009). Eine Steigerung der Bildung des c-terminalen Fragments an der Plasmamembran konnte nach TSPAN15-myc Expression und einer *Chase*-Periode von 18 h im Vergleich zu Kontrolltransfektionen detektiert werden (s. Abb. 52). Gleichzeitig erhöhte die TSPAN15-myc Expression die Halbwertszeit des muren ADAM10-Proteins, was zu späteren *Chase*-Zeitpunkten (18 und 30 h) beobachtet werden konnte. Zur Kontrolle der Transfektion von TSPAN15-myc wurde die Expression in den Totallysaten vor der Immunpräzipitation analysiert (s. Abb. 52). Zusammenfassend erhöhte die Expression von TSPAN15-myc den Austritt von ADAM10 aus ER- bzw. Golgi-Kompartimenten, steigerte dessen Transport zur Plasmamembran und verlängerte die Halbwertszeit der muren Form von ADAM10 an der Zelloberfläche.

### **V. 3. 9. Analyse der ADAM10-Aktivität nach TSPAN15-myc-Expression**

Hatte dieser gesteigerte Transport von ADAM10 zur Zelloberfläche und dessen verlängerte Halbwertszeit durch TSPAN15-myc ein erhöhtes *Shedding* von ADAM10-Substraten an der Plasmamembran zur Folge? N-Cadherin und APP sind charakterisierte ADAM10-Substrate (Reiss et al., 2005; Jorissen et al., 2010), deren Spaltung zur Analyse dieser Fragestellung durch Western-Blot-Analysen und ELISA-Studien in HEK293-, N2A- und HeLa-Zellen untersucht werden sollte.



**Abb. 53: N-Cadherin-Prozessierung nach ADAM10 bzw. ADAM17 und TSPAN15-myc-Transfektion.**

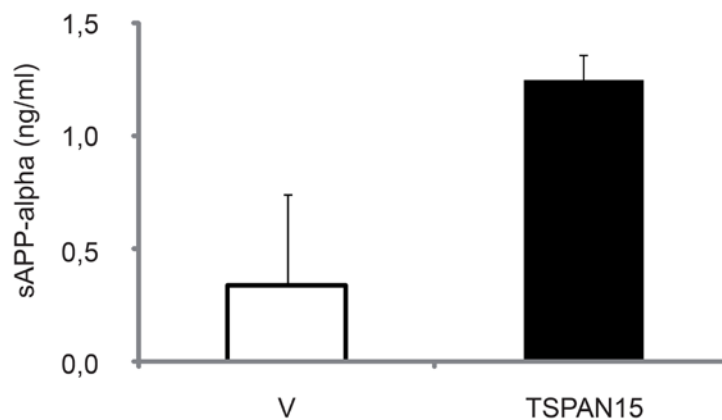
HeLa-Zellen wurden mit ADAM17/EGFP, ADAM17/TSPAN15-myc, ADAM10/EGFP und ADAM10/TSPAN15-myc nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 transfiziert, die Zellen lysiert (IV. 16. 1) und Western-Blot-Analysen nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 3 und IV. 16. 4 durchgeführt. N-Cadherin wurde unter Verwendung eines c-terminalen, monoklonalen Antikörpers gefärbt und die Membranen unter Verwendung eines Chemilumineszenzdetektors (LAS4000) entwickelt. Abkürzungen: *Full length* (FL), c-terminales Fragment (CTF), pro (p), matur (m), kilo Dalton (kDa), ADAM10 (A10), ADAM17 (A17), TSPAN15 (T15), *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP).

Die Expression von ADAM10/EGFP führte zu keiner gesteigerten Prozessierung des ADAM10-Substrats N-Cadherin in HeLa-Zellen, da die Signale für das N-Cadherin FL (130 kDa) und CTF (37 kDa) im Vergleich zu untransfizierten Zellen unverändert waren. Die Expression von ADAM10/TSPAN15-myc steigerte die Prozessierung von N-Cadherin durch ADAM10, da ein deutlich stärkeres Signal für das N-Cadherin-CTF detektiert werden konnte (s. Abb. 53). Erstaunlicherweise zeigte sich, dass ein stärkeres Signal für das N-Cadherin-CTF auch bei Expression von TSPAN15-myc und ADAM17 detektiert werden konnte, wobei die mature Form von ADAM17 unverändert blieb.

### V. 3. 10. Analyse der APP-Prozessierung nach TSPAN15-myc-Expression

Beeinflusst TSPAN15-myc spezifisch die Spaltung eines Substrats (N-Cadherin) durch ADAM10 oder führt die gesteigerte Maturierung bzw. der erhöhte Transport zur Plasmamembran zur Spaltung weiterer an der Zelloberfläche lokalisierter ADAM10-Substrate? Zusätzlich zur N-Cadherin-Prozessierung sollte das *Shedding* von APP im murinen Zellsystem (N2A) nach TSPAN15-myc-Überexpression untersucht werden. Hierzu wurden N2A-Zellen transient mit Kontrollvektor und TSPAN15-myc transfiziert und in

Zellkulturüberständen durch einen Sandwich-ELISA die Menge an löslichem APPalpha bestimmt.



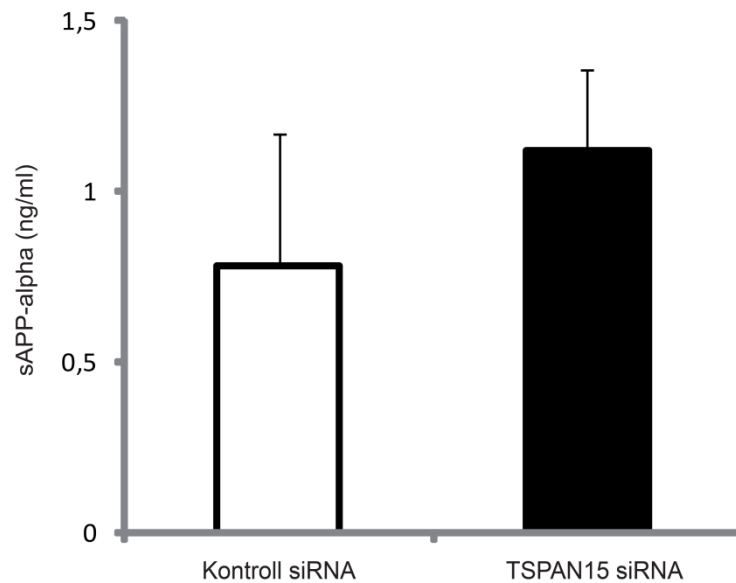
**Abb. 54: Analyse der löslichen APPalpha-Menge in Zellkulturüberständen TSPAN15-myc-Transfektion.** TSPAN15-myc und Kontrollvektor wurden transient nach Angaben in Abschnitt in N2A-Zellen transfiziert, Zellkulturüberstände entnommen und schockgefroren. Die Menge an löslichem APPalpha (sAPP-alpha) wurde durch einen *Sandwich-ELISA*-Kit von IBL (Hamburg, D) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dargestellt ist die Menge an löslichem APPalpha in ng/ml. Abkürzung: Vektor (V).

Die Analyse der Zellkulturüberstände nach Vektor- bzw. TSPAN15-myc-Transfektion zeigte, dass vermehrt APP an der Zelloberfläche nach TSPAN5-myc Expression gespalten wurde. (s. Abb. 54). Somit beeinflusste TSPAN15-myc nicht nur die Lokalisation und Maturierung von ADAM10 sondern auch dessen Aktivität im murinen Zellsystem.

### **V. 3. 11. Beeinflusst ein TSPAN15-Knockdown in N2A-Zellen die Prozessierung von APP durch ADAM10**

Zusätzlich sollte in N2A-Zellen untersucht werden, inwieweit sich eine reduzierte Expression von TSPAN15 auf ADAM10 und dessen Aktivität auswirken würde. Aufgrund dessen wurden TSPAN15-Knockdownexperimente durchgeführt, um den Einfluss einer Reduktion von TSPAN15 auf ADAM10 zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Im Zuge dieser Arbeiten wurden Zellkulturüberstände nach TSPAN15-Knockdown gewonnen, deren Menge an löslichem APPalpha Menge durch einen *Sandwich-ELISA* untersucht werden sollte.





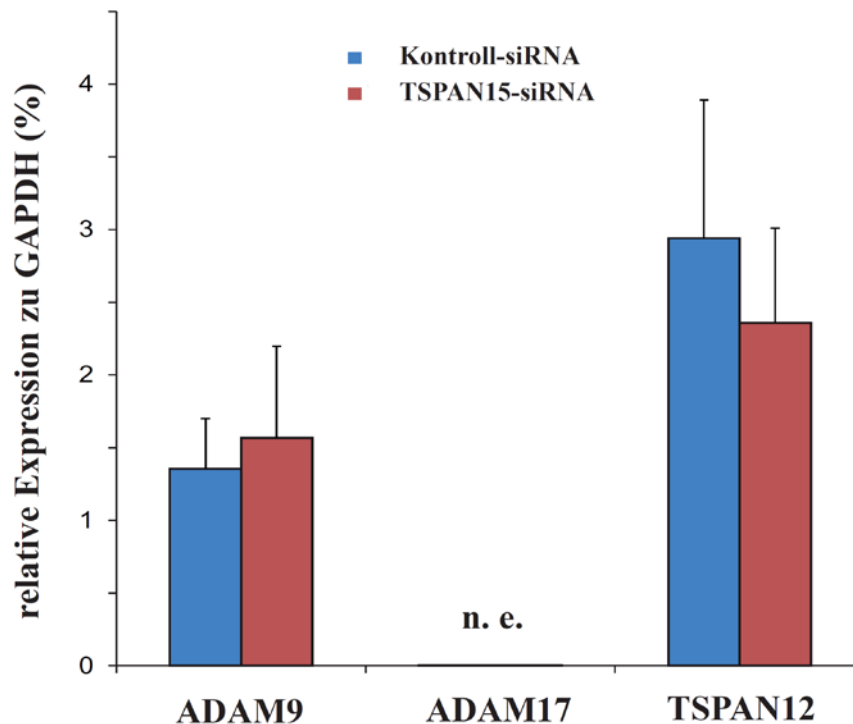
**Abb. 55: Bestimmung der Menge an löslichem APPalpha nach TSPAN15-Knockdown in Zellkulturüberständen von N2A-Zellen.**

In N2A-Zellen wurde durch siRNA ein Knockdown von TSPAN15 erreicht (Daten nicht gezeigt). Überstände von Zellkulturen wurden entnommen und der Anteil an löslichem APPalpha unter Verwendung eines spezifischen *Sandwich-ELISAs* (IBL, Hamburg, D) bestimmt. Dargestellt ist die Menge an löslichem APPalpha (ng/ml) in Zellkulturüberständen aus Kontroll-siRNA- und TSPAN15-siRNA-transfizierten N2A-Zellen.

Bei der Analyse der Zellkulturüberstände von Kontroll-siRNA- und TSPAN15-siRNA-transfizierten N2A-Zellen zeigte sich, dass der Knockdown von TSPAN15 (Daten nicht gezeigt) keine Reduktion der Menge an löslichem APPalpha zur Folge hatte (s. Abb. 55). Tendenziell war eher eine Erhöhung der Menge an löslichem APPalpha nach TSPAN15-Knockdown im Vergleich zu Kontrollüberständen zu detektieren.

### **V. 3. 12. Untersuchung der Expression weiterer Tetraspanine und ADAM-Proteasen nach TSPAN15-Knockdown**

*In vitro* wurden weitere ADAM-Proteasen publiziert, die APP an der  $\alpha$ -Sekretaseschnittstelle prozessieren können und zusätzlich wurde ein Tetraspanin (TSPAN12) beschrieben, die ADAM10-Aktivität hinsichtlich der APP-Prozessierung zu beeinflussen (siehe Einleitung). Aufgrund dessen sollte mit qRT-PCR-Experimenten überprüft werden, ob eventuell die Expression anderer ADAM-Proteasen bzw. TSPAN12 für die Bildung des löslichen APPalpha in der Zellkultur nach TSPAN15-Knockdown verantwortlich sein könnten.



**Abb. 56: qRT-PCR-Experimente zur Analyse der Expression von ADAM9, ADAM17 und TSPAN12 nach TSPAN15-Knockdown.**

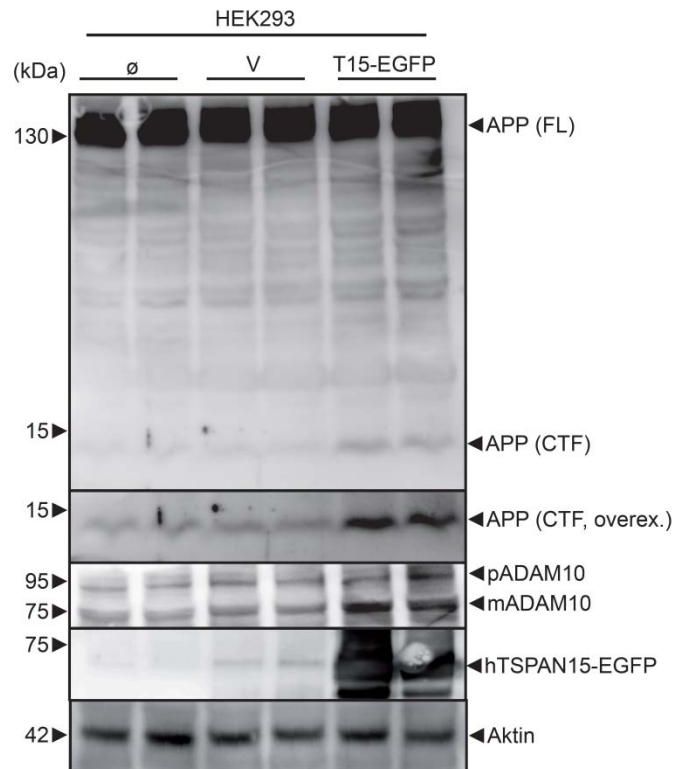
Komplett-mRNA wurde aus N2A-Zellen nach TSPAN15-Knockdown unter Verwendung des *NucleoSpin® RNA II* Kit (Macherey Nagel) isoliert (IV. 13. 11) und aus 2 µg mRNA cDNA durch das *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis*-Kit synthetisiert (IV. 13. 12). Die Expressionslevel von ADAM9, ADAM17, TSPAN12 und GAPDH wurden durch qRT-PCR-Analysen unter Verwendung des Universal Probe Library Systems (Roche, Mannheim, D) bestimmt (IV. 13. 13). Dargestellt ist die relative Expression von ADAM9, ADAM17 und TSPAN12 in Prozent zur GAPDH-Expression. Abkürzung: Nicht exprimiert (n. e.).

Die Analyse der Genexpression von ADAM9 und ADAM17 durch qRT-PCR-Experimente zeigte, dass in N2A-Zellen ADAM9 exprimiert und ADAM17 in dieser Zelllinie nicht exprimiert wurde (s. Abb. 56). Kontroll-siRNA und TSPAN15-siRNA behandelte Zellen zeigten beim Vergleich keine signifikanten Expressionsunterschiede, der in den qRT-PCR-Analysen untersuchten mRNAs bzw. cDNAs. Zusätzlich konnte die Expression von TSPAN12 als potentieller Modulator der ADAM10-Aktivität in N2A-Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend könnten die *Shedding*-Aktivität von ADAM9 und die Expression von TSPAN12 und die damit verbundene ADAM10-Regulation für die Bildung von löslichem APPalpha in der N2A-Zellkultur verantwortlich sein und den Effekt des TSPAN15-Knockdowns möglicherweise kompensieren.

### V. 3. 13. Analyse der Prozessierung von APP im humanen System

Die Prozessierung von APP innerhalb der Sequenz des amyloiden Peptids durch ADAM10 wird, wie in der Einleitung beschrieben, diskutiert einen präventiven Effekt auf die Entstehung von Morbus Alzheimer zu haben. Zur Nachstellung eines Modellsystems für die

APP-Prozessierung im humanen System und der Untersuchung inwieweit TSPAN15 die Prozessierung von APP durch ADAM10 als  $\alpha$ -Sekretase regulieren könnte, wurden HEK293-Zellen mit humanem TSPAN15-EGFP transfiziert und die Prozessierung von endogen-exprimiertem APP untersucht.



**Abb. 57: Untersuchung der APP-Prozessierung nach TSPAN15-EGFP-Überexpression.**

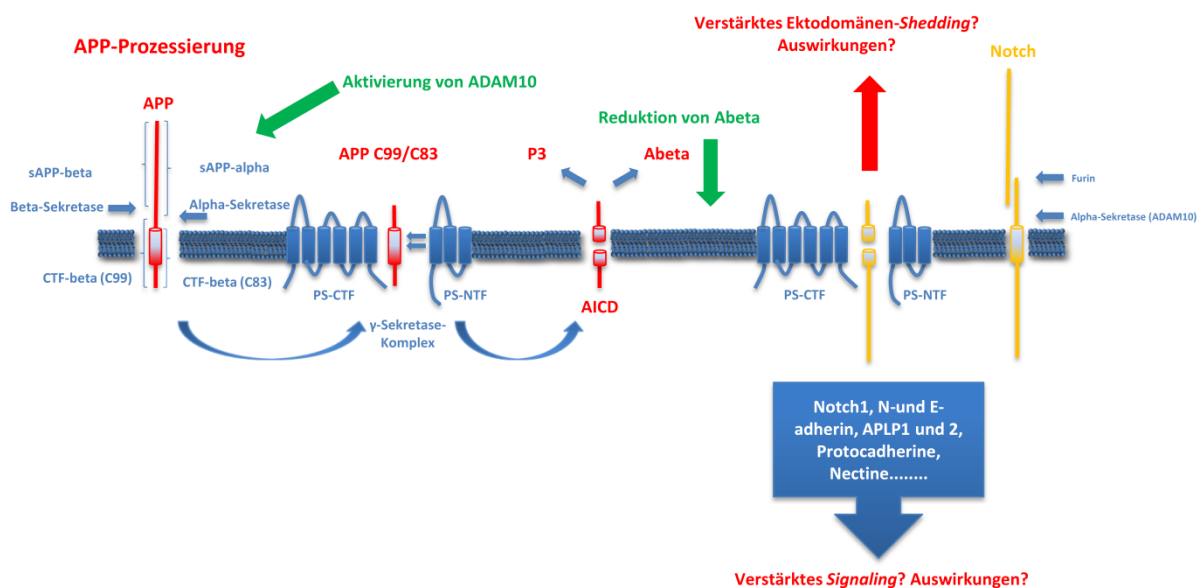
HEK293-Zellen wurden transient mit Vektor und TSPAN15-EGFP nach den Angaben in Abschnitt IV. 17. 4 transfiziert, die Zellen nach 48 h geerntet (IV. 17. 5), lysiert (IV. 16. 1, IV. 16. 2) und Western-Blot-Analysen nach den Angaben in Abschnitt IV. 16. 3 und IV. 16. 4 durchgeführt. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit Erstantikörpern (B63.3 (APP), Pin-1 (A10), GFP, Aktin) inkubiert, anschließend mit geeigneten Zweitantikörpern behandelt und die Membranen an einem Chemilumineszenzdetektor (LAS4000) entwickelt. Abkürzungen: *Full length* (FL), c-terminales Fragment (CTF), lange Entwicklungsdauer (*overexposed*, *overex.*), pro (p), matures (m), TSPAN15-EGFP (T15-EGFP), *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP), kilo Dalton (kDa), humanes (h).

Die Expression von TSPAN15-EGFP in HEK293-Zellen führte vergleichbar zu den Ergebnissen in N2A- und HeLa-Zellen zu einem stärkeren Signal der muren Form von ADAM10 (75 kDa, mADAM10) im Western-Blot im Vergleich zu untransfizierten und Vektor-transfizierten Zellen (s. Abb. 57). Dieses verstärkte Signal der proteolytisch-aktiven Form von ADAM10 korrelierte mit einer erhöhten Spaltung des endogenen APP-Moleküls (130 kDa) an der Plasmamembran und einer daraus resultierenden Akkumulation des c-terminalen Fragmentes (ca. 10 kDa). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass TSPAN15-EGFP nicht nur die Lokalisation von endogenem, humanem ADAM10 steuert, sondern auch dessen Aktivität im humanen Zellsystem reguliert.

## VI. Diskussion

Charakteristisch für viele neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer (A $\beta$ ), die Parkinson-Erkrankung ( $\alpha$ -Synuclein) und die Prionerkrankung (PrPsc), ist die Bildung von Oligomeren bzw. Aggregaten bestimmter Proteine oder deren Fragmente, die intrazellulär und extrazellulär in neuronalen Zellen bzw. in Bereichen des ZNS gefunden werden (Haass and Selkoe, 2007). Im Falle der Alzheimer-Demenz konnte, als eine mögliche Ursache der Erkrankung, die pathologische Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins (APP) und die daraus resultierende Bildung eines neurotoxischen Amyloidbeta-42-Peptids (A $\beta$ <sub>42</sub>) identifiziert werden, dessen Aggregation zu synaptischer Dysfunktion, inflammatorischen Prozessen, Einschränkungen der Gedächtnisleistung und neuronaler Degeneration im Menschen bzw. im Tiermodell führt (Lesne et al., 2006). Neben den in der Einleitung beschriebenen, therapeutischen Ansätzen zur Prävention oder Therapie der Alzheimer Erkrankung, rückte ADAM10 in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (s. Abb. 58).

### ADAM10-Aktivierung zur AD-Prävention/Therapie



**Abb. 58: Aktivierung von ADAM10 zur Therapie von Morbus Alzheimer und potentielle Nebeneffekte.**

APP wird durch verschiedene Sekretasen ( $\beta$ -Sekretase/ $\alpha$ -Sekretase/ $\gamma$ -Sekretase) prozessiert. Durch die Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase (lösliche APPbeta-Freisetzung) und  $\gamma$ -Sekretase (Abeta-Freisetzung) wird das neurotoxische Abeta-Peptid gebildet. Spaltung von APP durch ADAM10/ $\gamma$ -Sekretase führt zur Freisetzung von löslichem APPalpha und einem P3-Fragment. Die Aktivierung von ADAM10 könnte zur Reduktion von Abeta führen, jedoch gleichzeitig auch zu einem erhöhten Ektodomänen-Shedding anderer ADAM10-Substrate beitragen und die Freisetzung intrazellulärer Proteindomänen durch die  $\gamma$ -Sekretase beeinflussen, was in beiden Fällen zu veränderten parakrinen bzw. autokrinen Signalwegen führen könnte (modifiziert nach Prox et al., 2012).

Anhand der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse wird in den folgenden Abschnitten diskutiert, welche Prozesse im zentralen Nervensystem von ADAM10 *in vivo* gesteuert bzw. reguliert werden. Dabei stellen sich nachfolgende Fragen: Resultieren die publizierten ADAM10-Substrate möglicherweise aus artifiziellen Zellsystemen bzw. Überexpressions-effekten und ist deren Proteolyse tatsächlich physiologisch relevant? Ist ADAM10 ein geeignetes therapeutisches Ziel für die Prävention bzw. Therapie der Alzheimer Erkrankung? Wie kann bei der ubiquitären Expression und dem breiten Substratspektrum eine gezielte, substratspezifische Aktivierung erreicht werden, die zukünftig eventuell auch in Morbus Alzheimer-Patienten umgesetzt werden könnte? Welche potentiellen pathologischen Nebeneffekte sind bei übermäßiger ADAM10 Aktivierung bzw. Inaktivierung in Patienten zu erwarten? Welche zellulären oder organspezifischen Funktionen könnten dadurch beeinflusst werden?

Erste Erkenntnisse zur Funktion von ADAM10 in Säugern konnten in vorangegangenen Arbeiten bzw. Kooperationen der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Paul Saftig* durch ein klassisches Knockout-Mausmodell gewonnen werden. Diese Studien zeigten, dass eine systemische Deletion von ADAM10 zu schweren Defekten der ZNS-Entwicklung, der Somitenbildung und des kardiovaskulären Systems zu frühen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung führt, welches den frühen Tod der Embryonen an Embryonaltag 9.5 zur Folge hat. *In situ* Hybridisierungsexperimente zeigten eine Reduktion des Notch1-Zielgens *Hes5* und eine erhöhte Expression des Notch-Liganden *Dll-1* (Hartmann et al., 2002). Phänotypen mit ähnlichen Ausprägungen wurden bei der Deletion von essentiellen Komponenten des klassischen Notch-Signalweges (*PS1*, *Notch1* (Swiatek et al., 1994; Conlon et al., 1995), *RBPj* (Oka et al., 1995) in Mäusen gefunden. Häufig traten frühzeitig neuronale Differenzierung und Defekte der Somitogenese auf, die unter anderem zum frühen embryonalen Tod der Knockout-Mutanten führte. Vergleichbar zum klassischen ADAM10 Knockout konnte auch hier eine Dysregulation Notch1-abhängiger Gene (*Hes5*, *Mash1*) detektiert werden (de la Pompa et al., 1997). Daher wurde eine putative Rolle von ADAM10 bei der Kontrolle des klassischen Notch-Signalwegs vermutet. Weitere Analysen zur Funktion von ADAM10 bei der Entwicklung des ZNS waren jedoch aufgrund der frühen Letalität des klassischen Knockouts nicht möglich.

## VI. 1. ADAM10 ist essentiell für die Entwicklung des murinen zentralen Nervensystems

Konditionale Knockout-Mausmodelle bieten die Möglichkeit der spezifischeren Kontrolle der Deletion eines Zielproteins, da die Expression der dazu verwendeten Cre-Rekombinase der Kontrolle eines gewebe- bzw. zeitpunktabhängigen Promotors unterliegt (Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2007). Durch die Verwendung eines Nestin-Cre-*Deleter*-Mausstammes ist es in dieser Arbeit gelungen, die frühe embryonale Letalität des klassischen Knockouts zu umgehen. Die Deletion von ADAM10 unter Kontrolle des Nestin-Promotors führte jedoch zu einer spät-embryonalen bzw. früh-postnatalen Letalität der cKOs aufgrund einer Störung der Notch-Signalwege. Morphologisch konnten bei den Embryonen intrakranielle Blutungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung (E12.5, E15.5, E17.5 und P1) beobachtet werden. Durch spezifische, histologische Untersuchungen wurde gezeigt, dass es in Bereichen der ventrikulären Zone ab E15.5 zu einer verfrühten Differenzierung neuroepithelialer Stammzellen bzw. radialer Gliazellen in Richtung neuronaler Zellstadien kam. Dies führte zu späteren Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung zu einer starken Reduktion neuronaler Zellen und einer verkleinerten *Ganglionic Eminence* (GE). Die *Ganglionic Eminence* ist eine morphologische Übergangsstruktur zu Zeitpunkten der Entwicklung des ZNS, in der neuronale Vorläuferzellen proliferieren und verschiedenste Subtypen an neuronalen Zellen gebildet werden. Ein Hauptteil der späteren  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-abhängigen Neurone wird dort gebildet (Nery et al., 2002). Zusätzlich zeigten Western-Blot-Analysen eine veränderte Proteolyse des Notch1-Rezeptors durch ADAM10. Durch qRT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass es resultierend daraus zu einer Reduktion Notch1-abhängig regulierte Gene (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1* und *Hey2*) an P1 kam (Jorissen et al., 2010). Diese Daten zeigten eine hohe Vergleichbarkeit zur konditionalen Deletion von *Presenilin 1 und 2* unter Kontrolle des Nestin Promotors, da in diesen Mäusen Veränderungen der kortikalen Schichtung, eine verfrühte neuronale Differenzierung in Regionen des Ventrikels und der GE sowie der perinatale Tod der Knockouts detektiert wurde (Kim and Shen, 2008). Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der neuronalen Differenzierung führte die Analyse bei der Deletion von *Hes1* und *Hes5*, die zum embryonalen Tod der entsprechenden Mutanten an E12 führten (Kageyama and Ohtsuka, 1999).

### **VI. 1. 1. ADAM10 und nicht ADAM17 ist verantwortlich für die Initiation des klassischen Notch-Signalings im ZNS**

Studien in zellbasierten Assays hatten gezeigt, dass Notch1 ebenfalls durch die mit ADAM10 eng verwandte Metalloprotease ADAM17 gespalten wird und dadurch Notch-abhängige Signalkaskaden reguliert werden könnten (Brou et al., 2000; Mumm and Kopan, 2000). Die Studien der klassischen Knockout-Maus von ADAM10, die konditionale Deletion von ADAM10 unter Kontrolle des Nestin Promotors ergaben, dass zumindest während der Entwicklung des ZNS der Notch1-Rezeptor von ADAM10 *in vivo* gespalten wird (Brou et al., 2000; Mumm and Kopan, 2000). Die *in vivo* Funktion von ADAM17 wurde durch verschiedene transgene Mausmodelle untersucht. Eine Mutante, die eine Deletion in der Zinkbindedomäne von ADAM17 trägt ( $\Delta\text{Zn}/\Delta\text{Zn}$ -ADAM17-Maus), weist eine spätembryonale Letalität auf. Zusätzlich zeigen die Mäuse eine veränderte Entwicklung der Haarfollikel und des Augenslids (Peschon et al., 1998). Weiterhin zeigten Daten aus der Analyse einer hypomorphen ADAM17-Maus keine Phänotypen, die mit einem veränderten Notch-Signaling in Verbindung gebracht werden können. Bei diesem Mausmodell führt eine alternative, künstliche *Splice*-Stelle zu einer ca. 95%igen Reduktion der ADAM17-Expression *in vivo* (Chalaris et al., 2010). ADAM17-defiziente Mäuse weisen primär Phänotypen auf, denen eine Störung des EGFR-Signalings (verminderte TGF $\alpha$ -Prozessierung) zu Grunde liegt. Kontrovers diskutiert wird jedoch die Beteiligung von ADAM17 an der ligandenunabhängigen Prozessierung des Notch-Rezeptors in der adulten Haut bzw. ob ein gestörtes EGFR-Signaling für diese Phänotypen verantwortlich sein könnte (Franzke et al., 2012; Murthy et al., 2012). Zusätzlich konnte durch einen epidermalen, konditionalen Knockout zweifelsfrei festgestellt werden, dass die Differenzierung von basalen Keratinozyten der Kontrolle des klassischen Notch-Signalweges unterliegt und dieser Prozess durch ADAM10 reguliert wird (Weber et al., 2011). Eventuell könnten verschiedene Sheddasen (ADAM10 und ADAM17) für ligandenabhängiges bzw. unabhängiges Notch-Signaling in verschiedenen Organen zu bestimmten Zeitpunkten verantwortlich sein (Bozkulak and Weinmaster, 2009; Delwig and Rand, 2008).

### **VI. 1. 2. ADAM10 reguliert den Prozess der lateralen Inhibition im ZNS**

Der klassische Notch-Signalweg reguliert den Prozess der lateralen Inhibition, der durch Studien in *Drosophila* und *C. elegans* detaillierter charakterisiert wurde (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Der Prozess der lateralen Inhibition entscheidet während der Neurogenese zwischen neuronaler Differenzierung und dem Verbleiben im Stamm- bzw. Vorläuferzellstatus. Neuronale Vorläuferzellen weisen zu Beginn der Neurogenese identische

Charakteristika auf, da sie sowohl proneurale Gene (*Mash1*, *Ngn2*) und Notch-Liganden (Dll1) exprimieren. Aufgrund von stochastischen Variationen exprimieren einige Zellen (signalsendende Zellen) höhere Mengen an Dll1, die dadurch in benachbarten Zellen (signalempfangenden Zellen) den klassischen Notch-Signalweg induzieren. Dieses führt zur Expression von Hes1 und Hes5. Letztere inhibieren die Expression von proneuralen Genen, die auch die Notch-Liganden-Expression beeinflussen, sodass dadurch die signalempfangenden Zellen im neuronalen Vorläuferzellstatus verbleiben. Dadurch reduziert sich das klassische Notch-Signaling in den signalsendenden Zellen, die zu postmitotischen Neuronen differenzieren (Kageyama et al., 2008). In *Drosophila* und *Xaenopus laevis* wurde bereits eine Funktion des Orthologs von ADAM10 (*Drosophila*: Kuzbanian, *Xaenopus laevis*: *Kuzbanian-protein-homolog*) bei der Regulation der lateralen Inhibition beschrieben, jedoch konnte dieser Prozess während der Analyse der klassischen Knockout-Maus aufgrund der frühen Letalität nicht charakterisiert werden (Pan and Rubin, 1997; Rooke et al., 1996). ADAM10 bzw. Kuzbanian spaltet sowohl den Notch-Rezeptor (Klein, 2002; Sotillos et al., 1997) als auch den Notch-Liganden Delta bzw. Delta1 (Dll1) (Qi et al., 1999; Six et al., 2003). Insofern sind drei theoretische Ansätze denkbar, wie die Deletion von ADAM10 in neuronalen Vorläuferzellen den Prozess der lateralen Inhibition beeinflussen könnte. Zum einen zeigen die Daten aus den konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Mäusen eine Akkumulation des S1-Fragments des Notch-Rezeptors und eine Reduktion des S2-Fragments vermutlich in signalempfangenden Zellen. Die Bildung des S2-Fragments wird zur weiteren Proteolyse und Freisetzung des NICD durch die  $\gamma$ -Sekretase benötigt. Zum anderen könnte auch die Proteolyse von Dll1 und die Freisetzung der intrazellulären Domäne bei der Regulation der lateralen Inhibition eine Rolle spielen. Außerdem könnte sowohl die Liganden- als auch die Rezeptorprozessierung durch ADAM10 zur Steuerung der lateralen Inhibition beitragen.

### **VI. 1. 3. ADAM10-Defizienz beeinflusst die interkinetische nukleäre Migration**

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, das in der Synthese-Phase (S) in proliferativ aktiven Zellen von Embryonen eines bestimmten Entwicklungsstadiums nach intraperitonealer Injektion eines tragenden Muttertiers eingebaut werden kann. Unter Verwendung von BrdU kann eine Population an Zellen spezifisch markiert und das Signal des BrdU zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung detektiert werden, was Rückschlüsse auf potentielle Zellteilungen und Migrationsverhalten der Zellen ermöglicht (Takahashi et al., 1995; Takahashi et al., 1996). Aufgrund der verfrühten neuronalen Differenzierung wurden BrdU-Markierungsexperimente mit ADAM10-cKOs und Kontrollen an E13.5 durchgeführt.



An E17.5 wurden koronale Schnitte des ZNS spezifisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen BrdU gefärbt (Jorissen et al., 2010). Dabei zeigte sich, dass an E17.5 im Bereich proliferativ aktiver Zonen möglicherweise postmitotische Zellen detektiert wurden (hoher Anteil an BrdU). Das könnte seine Ursache darin haben, dass bei ADAM10-Defizienz neuroepitheliale bzw. radiale Gliazellen weniger proliferierten und deshalb das Signal des BrdU in postmitotischen Zellen verstärkt auftrat. Auch in PS1/2-doppeldefizienten Embryonen konnten vergleichbare Effekte nach BrdU-Markierung detektiert werden, wobei mehrere Zeitpunkte analysiert wurden. Zusätzlich zeigten detailliertere Analysen des ZNS durch BrdU an E14.5 Störungen der interkinetischen nukleären Migration radialer Gliazellen. Normalerweise befinden sich die Soma der radialen Gliazellen in der S-Phase an der basalen Oberfläche der ventrikulären Zone (siehe Einleitung). In den PS1/2-doppeldefizienten Embryonen traten BrdU-positive Zellen ungeordnet verstreut und an der apikalen Oberfläche der ventrikulären Zone lokalisiert auf, wo unter normalen Entwicklungsbedingungen die Mitose stattfindet (Kim and Shen, 2008). Auch in den konditionalen ADAM10-Knockouts wurden an E17.5 BrdU-positive Zellen im apikalen Bereich der VZ gefunden, was auf eine Störung der interkinetischen nukleären Migration durch ADAM10-Defizienz hinweisen könnte (Jorissen et al., 2010).

#### **VI. 1. 4. ADAM10 reguliert den Zellzyklus neuronaler Vorläuferzellen**

In den konditionalen ADAM10-Knockouts kommt es zu einer Abnahme proliferativ aktiver Zellen in Bereichen der ventrikulären Zone und der *Ganglionic Eminence*. Ist die Abnahme der KI67-Färbung (Zellzyklusprotein) nur auf die verfrühte, neuronale Differenzierung durch ein gestörtes Notch-Signaling zurückzuführen, oder könnten eventuell andere Substrate bzw. Mechanismen durch die ADAM10-Defizienz beeinflusst sein? In einer vorangegangenen Studie des Arbeitskreises wurde gezeigt, dass eine ADAM10-Defizienz zu einer veränderten Lokalisation von  $\beta$ -Catenin führt, da das ADAM10-Substrat N-Cadherin vermehrt an der Plasmamembran akkumuliert und  $\beta$ -Catenin an den c-terminalen Teil von N-Cadherin assoziiert vorliegt (Reiss et al., 2005). In den konditionalen Knockouts konnte, vergleichbar zu den ADAM10-defizienten MEFs, eine reduzierte Prozessierung von N-Cadherin festgestellt werden. Cytosolisches  $\beta$ -Catenin kontrolliert über spezifische Interaktion LEF/TCF-abhängige Transkription. Diese beeinflusst auch die Proliferation und Differenzierungsprozesse neuronaler Stamm- bzw. Vorläuferzellen (Chenn and Walsh, 2002; Kim et al., 2009). Bei der konditionalen Überexpression von  $\beta$ -Catenin unter Kontrolle des Brn4-Promotors zeigte sich eine deutliche Zunahme neuronaler Vorläuferzellen, während eine konditionale Deletion unter Kontrolle desselben Promotors zu einer Verringerung der Anzahl

neuronaler Vorläuferzellen zu frühen Zeitpunkten der ZNS-Entwicklung führt (Zechner et al., 2003). Eine weitere Studie untersuchte die zellautonome Rolle von  $\beta$ -Catenin auf die neuronale Differenzierung bzw. Migration von neuronalen Vorläuferzellen im Bereich der ventrikulären Zone. Dazu wurde in konditionale  $\beta$ -Catenin<sup>Flox/Flox</sup>-Embryonen ein Plasmid mit Cre-Rekombinase und GFP-Reporter durch eine spezielle *in utero* Elektroporationsmethode eingebracht. Die spätere Analyse der Embryonen zeigte, dass eine Reduktion der Expression von  $\beta$ -Catenin einen verfrühten Austritt von neuronalen Vorläuferzellen aus der ventrikulären Zone verursacht. Inhibitoren des  $\beta$ -Catenin-Signalweges dagegen führen zu einem verfrühten Zellzyklusaustritt und neuronaler Differenzierung (Woodhead et al., 2006). Zusätzlich zeigte eine andere Studie bei der konditionalen Deletion von  $\beta$ -Catenin unter Kontrolle des Nestin Promotors eine verfrühte Differenzierung radialer Gliazellen (Mutch et al., 2010). Neben dem klassischen Notch-Signalweg könnte somit auch ein gestörter  $\beta$ -Catenin-Signalweg über eine veränderte N-Cadherin-Proteolyse für die Differenzierungsphänotypen in den konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-defizienten Mäusen/Embryonen mitverantwortlich sein. Es existieren jedoch auch gegensätzliche Studien, die zeigen, dass die Expression von  $\beta$ -Catenin zur Transkription von *Ngn1* (proneurales Gen) führt und resultierend daraus in neuronalen Vorläuferzellen neuronale Differenzierung induziert (Hirabayashi et al., 2004). Wahrscheinlich ist neben der Expression auch die Menge an  $\beta$ -Catenin-Protein für die Regulation von Differenzierungsprozessen entscheidend. Zusammenfassend zeichnen diese Analysen ein komplexes Bild bei der Entscheidung zwischen Proliferation und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen. Diese werden offensichtlich über verschiedene Signalwege, unter anderem über Notch und  $\beta$ -Catenin, zeitpunkt- bzw. entwicklungsabhängig reguliert.

#### **VI. 1. 5. ADAM10-Defizienz in neuronalen Stammzellen führt zur Störung des vaskulären Systems bzw. der Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke wird durch kapillare Endothelzellen und deren Kontakte zu Astrozyten gebildet, die die zelluläre Verbindung zu den Neuronen herstellen (Abbott, 2002; Abbott and Romero, 1996; Risau and Wolburg, 1990). Die Blut-Hirn-Schranke reguliert die Versorgung neuronaler Zellen mit Nährstoffen, reguliert die Stabilität von Ionenkonzentration zur Synapsenfunktion und vermittelt den Austritt von Stoffwechselendprodukten bzw. Abfallprodukten (Begley and Brightman, 2003). Bei der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke kommt Astrozyten eine zentrale Rolle zu (Janzer and Raff, 1987; Rieckmann and Engelhardt, 2003). Die Analyse der ADAM10-cKOs ergab, dass zu verschiedenen, untersuchten Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung des ZNS intrakranielle Blutungen im Bereich des

Schädels und des ZNS beobachtet werden konnten. Ähnliche Effekte wurden bei der konditionalen Deletion von *Presenilin 1* und *2* (*PS1/2*) durch Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Nestin-Cre-Promotors beobachtet. Erstaunlich war bei der Deletion von ADAM10 und dem Doppelknockout von *PS1/2* das Auftreten intrakranialer Blutungen, die normalerweise mit Defekten in Endothelzellen von Blutgefäßen mesodermalen Ursprungs assoziiert sind. Beispielsweise führte die Deletion von *PS1* in Mäusen zu cerebralen Blutungen, die durch eine gestörte Vaskularisierung aufgrund apoptotischer bzw. nekrotischer Prozesse in Gefäßendothelzellen in Bereichen des Striatums und der Amygdala ausgelöst werden (Nakajima et al., 2003). Zusätzlich zeigten konditionale Knockout-Mäuse für *PS1* unter der Kontrolle des Nestin-Promotors keine intrakranialen Blutungen. Das spricht gegen eine eventuelle Expression der Cre-Rekombinase in Gefäßendothelzellen durch eine mögliche Aktivität des Nestin-Promotorsystems in diesem Zelltyp (Wines-Samuelson et al., 2005). In den ADAM10-cKOs könnte der frühe Verlust neuronaler Vorläuferzellen mit einem späteren Verlust von Astrozyten zusammenhängen und mit einer damit verbundenen Störung der Blut-Hirn-Schranke assoziiert sein.

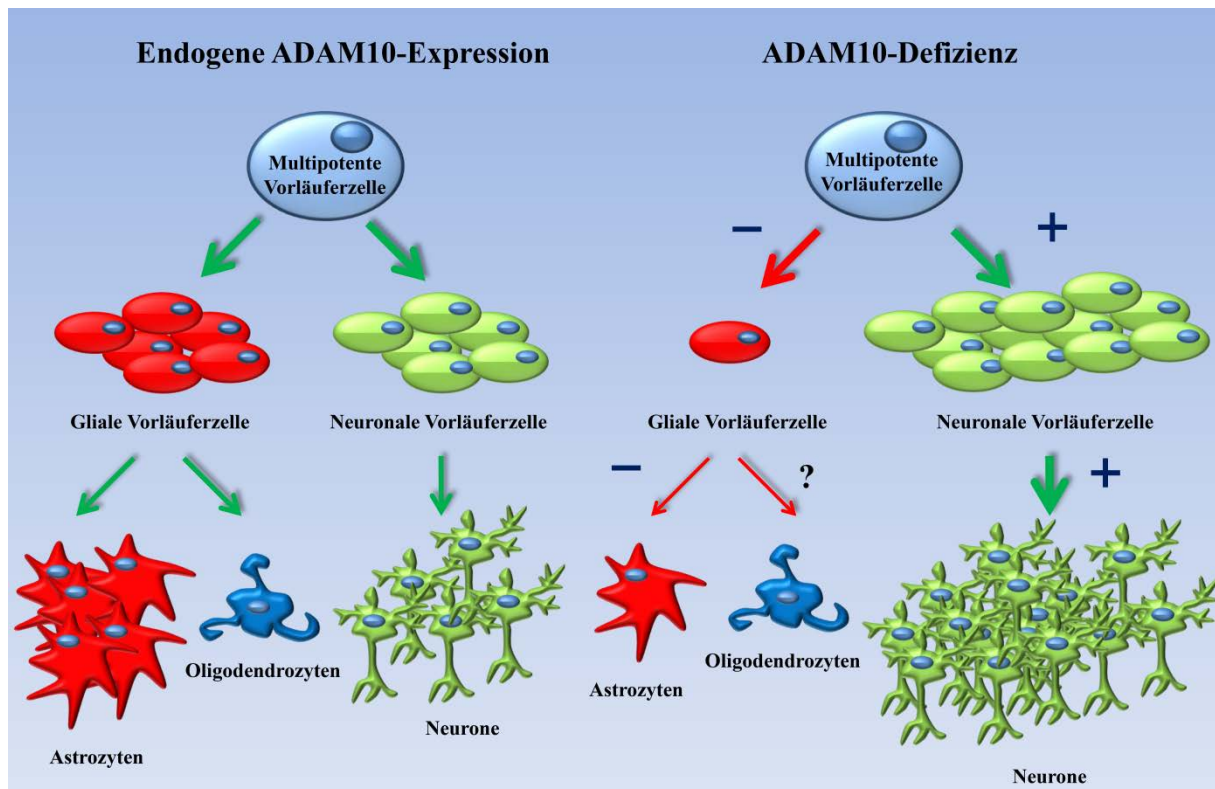
### **VI. 1. 6. ADAM10 reguliert den Prozess der Gliogenese**

Die Bildung aller Zellen des sich entwickelnden Kortex läuft zeitlich getrennt, jedoch in teilweise überlappenden Phasen ab. Neuronen stellen die Zellpopulation dar, die während der ZNS-Entwicklung als erste gebildet wird, wobei ein Maximum der Bildung an E14 auftritt und die Entwicklung perinatal abgeschlossen ist. Astrozyten entwickeln sich ab ca. E13. Ihre Bildung ist am postnatalen Tag 10 abgeschlossen. Oligodendrozyten werden zu spätembryonalen Zeitpunkten bis zum Erwachsenenalter gebildet (Sauvageot and Stiles, 2002). In dieser Publikation wurde die Entwicklung von neuronalen Zellen im Rattenhirn diskutiert, die jedoch mechanistisch und zeitlich auch auf das Maushirn übertragen werden kann. Verschiedene Studien zeigten, dass bei der Entwicklung von Astrozyten der klassische Notch-Signalweg eine zentrale Rolle einnimmt. Jedoch bewirkt hier ein aktiviertes Notch-Signal die terminale Differenzierung zu Astrozyten. Dieses konnte erstmals in Zellkulturen (P19-Zellen, multipotente embryonale Karzinomzelllinie) gezeigt werden, in denen eine dominant aktive Form des murinen Notch-Rezeptors überexprimiert wurde. Dabei wurde die Bildung von neuronalen Zellen durch Notch-Aktivität inhibiert, während die Bildung von Astrozyten gefördert wurde (Nye et al., 1994). Zusätzlich konnten auch Notch-abhängig regulierte Gene als Faktoren der Astrozytendifferenzierung identifiziert werden, da die Überexpression beispielsweise von *Hes1* in glialen Vorläuferzellen die Differenzierung zu Astrozyten fördert. *Hes1* kommt dabei während der ZNS-Entwicklung eine duale Rolle zu, da

zu Beginn der ZNS-Entwicklung die Expression von Hes1 inhibitorisch auf die Neurogenese wirkt, während zu späteren Zeitpunkten die Gliogenese von der Hes1-Funktion abhängig ist (Wu et al., 2003). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die retrovirale Expression der intrazellulären Domäne von Notch im murinen Forderhirn zu frühen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung die Bildung radialer Gliazellen fördert, wobei die retroviral infizierten Zellen häufig postnatal Astrozyten bildeten (Gaiano et al., 2000). Ähnliche Effekte konnten bei Differenzierungsexperimenten mit multipotenten Vorläuferzellen des Hippokampus detektiert werden und zusätzlich gezeigt werden, dass auch Notch3 bei der Bildung von Astrozyten eine Rolle spielt (Tanigaki et al., 2001).

Die Kulturen der Neurosphären und die anschließende Differenzierung in den ADAM10-cKO zeigt eine Reduktion an GFAP-positiven Zellen (Astrozyten). Weiterhin konnte in den histologischen Schnitten zu späten Zeitpunkten der Embryonalentwicklung (E17.5) ein Verlust neuronaler Zellen beobachtet werden, der eventuell mit einer verminderten Entwicklung von Astrozyten zusammenhängen könnte.

Somit kann aus den Ergebnissen der Studie zur konditionalen Deletion von ADAM10 unter der Kontrolle des Nestin-Promotors geschlossen werden, dass ADAM10 ein zentrales *upstream*-Element des klassischen Notch-Signalweges darstellt und zeitpunktabhängig verschiedene Prozesse der Neurogenese bzw. Gliogenese reguliert. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Ektodomänen-*Shedding* weiterer ADAM10-Substrate, die in dieser Studie nicht betrachtet wurden, diese Prozesse zusätzlich beeinflusst (s. Abb. 59).



**Abb. 59: ADAM10 reguliert den Prozess der Neurogenese und Gliogenese.**

Endogenes ADAM10 kontrolliert über die Initiation des klassischen Notch-Signalweges die Differenzierung multipotenter Vorläuferzellen in gliale bzw. neuronale Vorläuferzellstadien. Über die Aktivität von ADAM10 wird die Bildung neuronaler Vorläuferzellen zu frühen Zeitpunkten inhibiert/kontrolliert, während zu späteren Entwicklungsstadien die Gliogenese induziert wird. Bei ADAM10-Defizienz werden vermehrt neuronale Vorläuferzellen und daraus resultierend postmitotische Neurone gebildet. Die reduzierte ADAM10-Aktivität führt zu einer verringerten glialen Differenzierung und in Folge dessen zu stark reduzierten Anzahlen an Astrozyten und eventuell auch Oligodendrozyten (modifiziert nach (Jorissen et al., 2010)).

### VI. 1. 7. ADAM10 ist die relevante APP- $\alpha$ -Sekretase in primären neuronalen Zellen

Untersuchungen in primären Fibroblasten zeigten, dass eine ADAM10-Defizienz zu einer veränderten Prozessierung des APP-Moleküls führt. Die Ergebnisse zwischen den verschiedenen, generierten MEF-Zelllinien waren jedoch in Bezug auf die APP-Prozessierung sehr heterogen. Aufgrund dessen ließ sich keine klare Aussage zur *in vivo* Relevanz von ADAM10 als neuronale  $\alpha$ -Sekretase treffen (Hartmann et al., 2002). Auch ADAM9 und ADAM17 wurden beschrieben in zellbasierten Systemen an der Prozessierung von APP beteiligt zu sein (Buxbaum et al., 1998; Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999). Klassische Knockouts von ADAM9 zeigten jedoch keinerlei Anzeichen hinsichtlich der veränderten Prozessierung von APP (Weskamp et al., 2002). Phorbolsterstimulation (PMA) von Fibroblasten in Zellkultur zeigte, dass ADAM17 eine Rolle bei der Prozessierung von APP spielen könnte (Buxbaum et al., 1998). Durch Knockdown-Experimente in primärer neuronaler Zellkultur konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ADAM17 zumindest in Neuronen für das Spalten von APP physiologisch nicht relevant ist (Kuhn et al., 2010).

Zusätzlich konnte durch *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass ADAM17 kaum in neuronalen Bereichen des murinen ZNS exprimiert wird (Karkkainen et al., 2000). Unter Verwendung des Nestin-Cre-*Deleter*-Stammes wurde in primärer, neuronaler Kultur durch Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Bart de Strooper gefunden, dass die Produktion der löslichen Ektodomäne von APP (sAPP $\alpha$ ) durch ADAM10-Defizienz deutlich reduziert ist (Jorissen et al., 2010). Stützend zu diesen Daten zeigte eine Studie durch Knockdownexperimente in primären Neuronen vergleichbare Einflüsse der ADAM10-Reduktion auf die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität (Kuhn et al., 2010). Die Deletion von ADAM10 (Nestin-Cre) führte erstaunlicherweise auch zu einer Reduktion des löslichen APP $\beta$ -Fragments und der entstehenden c-terminalen Fragmente (Jorissen et al., 2010). Einer anderen Studie zufolge zeigten sich diese Effekte bei einem Knockdown von ADAM10 in neuronalen Zellkulturen nicht (Kuhn et al., 2010), was eventuell auf einen komplexeren, zeitpunktabhängigen Regulationsmechanismus der APP-Prozessierung hinweisen könnte.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen konkurrieren demnach nicht automatisch unter allen Bedingungen um das Substrat APP. Das sollte folgerichtig auch bei der Entwicklung einer wirksamen präventiven Therapie von Morbus Alzheimer berücksichtigt werden.

## VI. 2. Funktionen von ADAM10 im adulten ZNS

Zur spezifischen Deletion von ADAM10 in Neuronen des postnatalen ZNS wurden ADAM10<sup>Flox/Flox</sup> mit transgenen Mäusen gekreuzt, deren Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors steht. Eine Deletion konnte in Bereichen des Kortex und des Hippokampus detektiert werden, wobei eine Restexpression von ADAM10 zu detektieren war, die vermutlich aus den Populationen anderer Zellen ohne Cre-Rekombinaseexpression resultierte. Die Deletion von ADAM10 im Kortex und Hippokampus führte zu einem teilweise letalen postnatalen Phänotyp, der in vielen Fällen mit Episoden myoklonischer Epilepsie assoziiert war. Histologisch wurden keine grob-morphologischen Veränderungen in den cKO-Hirnen in Bereichen des Kortex und Hippokampus festgestellt. Jedoch zeigten sich erste Anzeichen neuronaler Degeneration in Bereichen des medialen Gyrus dentatus. Außerdem konnte durch Western-Blot-Analysen und histologische Untersuchungen festgestellt werden, dass eine reaktive Astroglie und eine erhöhte Expression des zellulären Prionproteins *in vivo* auftrat. Die Analyse des Verhaltens der cKO-Mäuse (Alter: 4-8 Wochen) zeigte Störungen des räumlichen Lern- und Erinnerungsvermögens sowie Einschränkungen in angstassoziierten Konditionierungsexperimenten. Zusätzlich konnten Störungen der Langzeitpotenzierung (LTP) in Bereichen der Schaffer-Kollaterale und Veränderungen der NMDA-Rezeptorexpression festgestellt werden. In den folgenden Abschnitten wird diskutiert, ob bereits bekannte *in vivo* Substrate (Beispielsweise: Notch1, APP und N-Cadherin) von ADAM10 und deren reduzierte Proteolyse in Neuronen des adulten ZNS zur Ausprägung dieser Phänotypen der cKOs beitragen.

### VI. 2. 1. Ist der Notch1-Rezeptor bzw. dessen veränderte Proteolyse für die Phänotypen der ADAM10-(CamKIIalpha)-cKOs verantwortlich?

Die Phänotypen der klassischen Knockout-Maus und der konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Maus zeigten, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die verminderte Proteolyse der Notch-Rezeptoren für die perinatale Letalität der Knockouts verantwortlich ist. Nimmt daher die Proteolyse der Notch-Rezeptoren durch ADAM10 auch im adulten ZNS eine dominante, regulative Rolle ein? Die Proteolyse des Notch1-Rezeptors wurde durch Western-Blot-Analysen mit einem gegen das NICD gerichteten Antikörper und einen gegen den C-Terminus des Notch1-Rezeptors gerichteten Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten in kortikalen Lysaten (P5, P10, P17) überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse waren jedoch sehr heterogen und es konnten keine Effekte der S1-Fragmentakkumulation (membrangebundenes Furinschnittprodukt nach Ablösen der nichtkovalent, gebundenen

Ektodomäne des Notch1-Rezeptors) bzw. der NICD-Reduktion (lösliches intrazelluläres Fragment nach  $\gamma$ -Sekretaseprozessierung) beobachtet werden, die bei den Analysen der konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout-Mäuse im embryonalen bzw. früh postnatalen Hirn auftraten. *In vivo* konnte in einer Studie die Expression des Notch1-Rezeptors durch histologische Untersuchungen des adulten ZNS in Regionen des Hippokampus und des Kortex nachgewiesen werden (Redmond et al., 2000). Erste Effekte auf die Regulation der dendritischen Morphologie konnten in Zellkultur gezeigt werden, da eine Inhibition des Notch-Signalweges zu einer Reduktion der dendritischen Fortsätze und der *dendritic branch points* führte (Redmond et al., 2000). Diese Ergebnisse konnten durch die konditionale Deletion bzw. Expression von essentiellen Komponenten der Notch1-Signalkaskade verifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass der konditional induzierbare Knockout von Notch1 (GFAP-Promotor) zu einer Reduktion der Verzweigungen von Neuriten und der Anzahl an dendritischen Dornfortsätzen in neu gebildeten Neuronen führte (Breunig et al., 2007). Einflüsse auf die synaptische Plastizität und das Verhalten konnten in adulten Mäusen gezeigt werden, die eine Deletion des Notch1-Rezeptors auf nur einem Allel aufwiesen. Diese Tiere zeigten Defizite in räumlichen Lern- und Erinnerungsvermögen. Weiterhin wies eine heterozygote Mutante für RBPj (Bindungspartner des NICD für die Initiation der Notch-abhängigen Transkription) ähnliche allerdings stärkere Störungen des Erinnerungsvermögen der Mutanten bei Verhaltensstudien auf (Costa et al., 2003). Die Unterschiede in den Verhaltensanalysen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass RBPj einen zentralen Bestandteil des Signalweges aller Notch-Rezeptoren darstellt und Notch2-4 ebenfalls Funktionen im adulten ZNS steuern. Bei den bisher diskutierten Mausmodellen könnte jedoch auch eine veränderte Myelinisierung und Neuronenzahl zusätzlich zu diesen Phänotypen beitragen, da bei diesen Mäusen entwicklungsbedingte Phänotypen (klassische Knockouts) nicht ausgeschlossen werden können (Givogri et al., 2002). Zur Vermeidung entwicklungsbedingter Phänotypen wurde die Deletion von Notch1 und Notch2 konditional unter Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors im adulten ZNS durchgeführt. Unerwarteterweise zeigten sich keinerlei neurologische Auffälligkeiten oder neurodegenerativen Effekte. Zweifellos ist diese Studie kritisch zu sehen, da keine signifikante Reduktion der Notch-mRNAs oder Proteine detektiert werden konnte, was die Ergebnisse und Rückschlüsse aus dieser Studie in Frage stellt (Zheng et al., 2012). Zusammenfassend könnte ein verändertes Notch-Signal in den ADAM10-cKOs zu strukturellen Änderungen der dendritischen Morphologie der Neurone führen. Jedoch werden die Phänotypen der ADAM10-cKO-Mäuse vermutlich nicht durch ein defektes Notch-Signal



ausgelöst, da die phänotypische Vergleichbarkeit zu Notch-Mutanten wie bei der ZNS-Entwicklung nicht eindeutig gegeben ist.

Im Maus- und im humanen, adulten ZNS konnte gezeigt werden, dass Notch1 im adulten Hippokampus und Cerebellum exprimiert wird. Bei Patienten mit sporadischer Alzheimer Erkrankung konnte eine verstärkte Expression von Notch1, Notch2 und eines Notch-Liganden (Jagged 1) im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (Berezovska et al., 1998). Eventuell könnte in Patienten mit Morbus Alzheimer zusätzlich zu einer erhöhten A $\beta$ 42-Produktion die Fehlregulation von Notch1 und 2 zu einer Beeinträchtigung der ZNS-Funktion führen. Kontrovers wird die Rolle des klassischen Notch-Signalweges bei Neurotraumata-Modellen (Ischämie und Schlaganfall) diskutiert, da sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die Proliferation und das Überleben neuronaler Vorläuferzellen im adulten ZNS beschrieben wurden (Alberi et al., 2010; Oya et al., 2009; Wang et al., 2009b). Außer Acht gelassen darf jedoch nicht, dass bei Regenerationsprozessen des adulten, murinen ZNS der klassische Notch-Signalweg eine zentrale, regulative Rolle bei Proliferations- bzw. Differenzierungsmechanismen einnimmt. In den ADAM10-cKOs wäre interessant zu untersuchen, ob eine durch ADAM10-Defizienz induzierte, erhöhte Notch-Liganden Expression auf Neuronen, Einflüsse auf die postnatale Neurogenese bzw. Regenerationsprozesse im adulten ZNS nach Schäden im Bereich des Hippokampus und des Kortex hat. Dieses könnte die adulte Neurogenese signifikant stören, wie schon in einigen zellbasierten Assays für den Notch-Signalweg und Maus-Modellen für Notch-Rezeptoren beschrieben wurde (Ables et al., 2010; Imayoshi et al., 2010; Xiao et al., 2009).

### **VI. 2. 2. Presenilin 1 und 2 doppeldefiziente Mäuse zeigen vergleichbare Phänotypen zu den ADAM10-cKOs**

In der Literatur wird diskutiert, dass der durch Presenilin 1 und 2 (PS1/2) vermittelte Prozess der Intramembranproteolyse von Typ-I-Transmembranproteinen durch die vorherige Prozessierung des Substrats durch eine ADAM-Protease oder zumindest eines proteolytischen Schnitts initiiert wird (Murphy, 2008; Selkoe and Wolfe, 2007). Somit unterliegen die Signalwege, die durch Preseniline reguliert werden, häufig der Kontrolle einer ADAM-Metalloprotease (Schulte et al., 2007). Aufgrund dessen könnten phänotypische Übereinstimmung zwischen ADAM10- bzw. Presenilin 1 und 2 cKOs bestehen.

Die Analyse von konditional PS1/2-doppeldefizienten Mäusen unter der Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors ergab, dass vergleichbar zu den histologischen Analysen der ADAM10-cKOs zu frühen Zeitpunkten (drei Wochen bis zwei Monate nach Geburt) keinerlei

grob-morphologischen Änderungen im Bereich des ZNS beobachtet wurden. Jedoch zeigte sich bei Knockout der Preseniline im Alter von neun bzw. sechs Monaten ein Verlust neuronaler Zellen, die zu einer signifikanten Reduktion der Gehirngröße der Mäuse führte (Saura et al., 2004). Aufgrund der frühen, häufig-auftretenden Letalität der ADAM10-cKOs konnten bisher Untersuchungen älterer Mäuse nicht durchgeführt werden. Die PS1/2-Doppelknockouts zeigten weiterhin im Alter vergleichbar zu den ADAM10-cKOs bei Verhaltens-Tests (*Morris-water-maze-Assay*) Störungen des räumlichen Lern- bzw. Erinnerungsvermögens. Die phänotypische Ausprägung war jedoch bei den ADAM10-cKOs deutlicher, da kein Lerneffekt beim Auffinden der Plattform beobachtet werden konnte. Bei der Verhaltensanalyse der ADAM10-cKOs konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass die Tiere aufgrund der ADAM10-Deletion erblindeten, da sie zumindest im *Passive-avoidance*-Test dazu im Stande waren helle und dunkle Areale des Testbereiches zu unterscheiden. Zusätzlich zeigte die Studie der PS1/2-Doppelknockouts bei LTP-Analysen reduzierte exzitatorische, postsynaptische Potentiale in Bereichen der Schaffer-Kollaterale und eine reduzierte NMDA-Rezeptorexpression (2A-Untereinheit) in Synaptosomenpräparationen kortikaler Bereiche. Saura et al. begründeten diesen Effekt der reduzierten Expression des NMDA-Rezeptors in synaptischen Bereichen mit der fehlenden Assoziation an die Preseniline, da durch Koimmunpräzipitationsexperimente nachgewiesen werden konnte, dass die Preseniline und NMDA-Rezeptor-Untereinheiten direkt aneinander binden und die Preseniline eventuell für den postsynaptischen Transport verantwortlich sein könnten (Saura et al., 2004). Bei der Analyse der NMDA-Rezeptorexpression in den ADAM10-cKOs konnte eine deutliche Reduktion der Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten (2A/B) in Western-Blot-Analysen beobachtet werden. Vergleichbar zu den PS1/2-Doppelknockouts ist vermutlich nur die 2A-Untereinheit reduziert, da in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKOs bisher keine Veränderung der Expression der 2B-Untereinheit detektiert wurde (unpublizierte Daten). Demnach könnte die veränderte Expression der 2A-Untereinheit in den Synaptoneurosomenfraktionen der PS1/2-Doppelknockouts eventuell nicht nur auf eine fehlende Interaktion mit PS1/2 zurückzuführen sein, sondern auch transkriptionelle Effekte die Menge der 2A-Untereinheit beeinflussen. Ergänzend zu den diskutierten Daten führte die konditionale Inaktivierung von Nicastrin, eines essentiellen Bestandteils der  $\gamma$ -Sekretase, in Bereichen des murinen Vorderhirns zu einer teilweisen Phänokopie des ADAM10- bzw. PS1/2-cKOs (Tabuchi et al., 2009). Analysen zu frühen Zeitpunkten der PS1/2-Doppelknockouts (4-6 Wochen alte Mäuse) zeigten, dass die Defizienz im murinen Vorderhirn zu einer Reduktion von LTP (Schaffer-Kollaterale), zusätzlich noch Auswirkung

auf Neurotransmitterausschüttung und präsynaptische Funktionen hatte (Zhang et al., 2010). Aufgrund der phänotypischen Übereinstimmungen sind Untersuchungen der präsynaptischen Bereiche und deren Funktion in den ADAM10-cKOs nötig, um die Funktion von ADAM10 im ZNS präziser zu charakterisieren.

Neben den bereits diskutierten Gemeinsamkeiten der Phänotypen der PS1/2- und der ADAM10-cKOs gibt es jedoch auch deutliche Unterschiede. Beispielsweise zeigen die ADAM10-cKOs zu frühen Zeitpunkten (3-Wochen) eine reaktive Astroglie, die bei den PS1/2-cKOs erst nach (6-Monaten) auftritt. Zusätzlich weisen die ADAM10-cKOs Epilepsie und eine häufig zwischen P19-P27 auftretende Letalität auf. Bleibt die Frage welche Prozesse durch ADAM10 zusätzlich zur darauffolgenden Intramembranproteolyse durch die  $\gamma$ -Sekretase reguliert werden?

ADAM10 spaltet die Ektodomänen vieler Zelloberflächenproteine (Beispielsweise: EGF, HB-EGF), sodass nicht nur autokrine Signalwege beeinflusst werden, sondern das lösliche Fragment/Ektodomäne auch parakrine Signalwege beeinflussen kann (Sahin et al., 2004, Yan et al., 2002). Als Beispiel für ein ADAM10-Substrat kann der *Heparin-Binding-Epidermal-Growth-Factor* (HB-EGF) genannt werden, dessen Ektodomänen-*Shedding* primär parakrine Signalwege beeinflusst. In einer Studie zur Untersuchung der Funktion von HB-EGF im ZNS wurde HB-EGF konditional im murinen Vorderhirn deletiert, indem die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Six-Promotors exprimiert wurde. Die Mäuse zeigten eine hohe Vergleichbarkeit im Verhalten mit Mäusen, die mit NMDA-Rezeptorantagonisten behandelt wurden und zusätzlich morphologisch eine reduzierte Anzahl an dendritischen Dornfortsätzen (Oyagi et al., 2009). Bei einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass sich die HB-EGF-cKOs im *Passive-avoidance*-Test ähnlich verhielten wie Mäuse, die mit KB-R7785, einem ADAM-Inhibitor, behandelt wurden. HB-EGF-cKOs bzw. KB-R7785 behandelte Mäuse zeigten ein gestörtes, angstassoziiertes Erinnerungsvermögen, da sie sich nach einer Testphase früher als die WT-Kontrollen in dunkle Bereiche des Testareals begaben. Zusätzlich zeigten die HB-EGF-cKOs ein drastisch reduziertes Kurzzeit-LTP in Bereichen der Schaffer-Kollaterale, was sich auch in den ADAM10-cKOs beobachten ließ (Oyagi et al., 2011a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HB-EGF-Defizienz im Vorderhirn einen Einfluss auf Regenerationsprozesse im Bereich des ZNS nach Ischämie-Modellen *in vivo* hatte (Oyagi et al., 2011b). Somit könnte durch ADAM10-freigesetzter HB-EGF bei Regenerationsprozessen des adulten ZNS eine funktionelle Rolle spielen. Zusätzlich kann bei der Analyse des Phänotyps der ADAM10-cKOs nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur

die Proteolyse von Typ-I-Transmembranproteinen durch ADAM10-Defizienz beeinträchtigt ist, sondern auch Typ-II-Transmembranproteine und deren reduzierte Proteolyse zur Ausprägung des Phänotyps der ADAM10-cKO's beitragen. Beispielsweise wird das neuronal exprimierte Bri2-Molekül (*Integral-Membrane-Protein 2B*, (ITM2B)) durch ADAM10 prozessiert. Mutationen im Bri2-Gen resultieren in der Bildung amyloider Peptide nach Furin-Spaltung, wobei zwischen *Familial-British-Dementia* (FBD) und *Familial-Danish-Dementia* (FDD) unterschieden wird (Vidal et al., 1999; Vidal et al., 2000). Bei beiden Formen der Erkrankung wird ein 34 Aminosäuren langes amyloides Peptid (ABri bzw. ADan) gebildet, das im ZNS aggregiert. Bei der nicht-pathologischen Spaltung von Bri2 durch Furin wird ein 23 Aminosäuren langes Peptid gebildet, welches diskutiert wird die Aggregation von A $\beta$ 42 *in vitro* (Fotinou et al., 2005) und *in vivo* (Kim et al., 2008) zu inhibieren. Im Hinblick auf die Prozessierung von Bri2 durch ADAM10 ist bis zum heutigen Tage nicht eindeutig geklärt, ob das intrazelluläre Fragment (Intramembranproteolyse durch SPPL2B) oder die lösliche Ektodomäne funktionell im Organismus aktiv sind (Fluhrer et al., 2012; Martin et al., 2008).

### **VI. 2. 3. Das zelluläre Prionprotein (PrP<sup>c</sup>) ist ein ADAM10-Substrat im adulten ZNS**

PrP<sup>c</sup> ist ein glykosylphosphatidyl (GPI)-verankertes Protein, das eine duale Rolle in der Biologie des ZNS erfüllt. Zum einen ist es Substrat für die pathologische Isoform (PrP<sup>Sc</sup>) und zum anderen beeinflusst es Prozesse wie die Neurogenese und auch Myelinisierung (Bremer et al., 2010; Prusiner, 1998; Steele et al., 2006). Das zelluläre Prionprotein wurde von uns als ADAM10-Substrat unter Verwendung der konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout-Maus identifiziert (Altmeyen et al., 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von ADAM10 in neuronalen Vorläuferzellen zu einer Akkumulation des Prionproteins zu frühen Zeitpunkten des sekretorischen Weges führte. Gleichzeitig konnte bewiesen werden, dass ADAM10 das PrP<sup>c</sup> nicht an der „ $\alpha$ -Schnittstelle“ prozessiert, sondern plasmamembrannahes *Shedding* reguliert. Welche funktionelle Bedeutung die Akkumulation von PrP<sup>c</sup> auf die neuronale Aktivität hat, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden. Bei der Analyse der konditionalen ADAM10-(CamKII $\alpha$ -Cre)-Knockout-Maus konnte eine erhöhte Expression des zellulären Prionproteins in Bereichen des Hippokampus und des Kortex in WB-Analysen und der Histologie detektiert werden. Eine erhöhte Prionexpression wurde in zellulären Modellen beschrieben eine p53-abhängige Apoptose zu induzieren (Paitel et al., 2003). Hinsichtlich der p53-Induktion und der damit verbundenen Signalkaskaden ergab die Analyse der konditionalen ADAM10-(Nestin-Cre)-Knockout-Maus keinerlei Unterschiede zwischen WT- und cKO-Mäusen (E14 und P1) in qRT-PCR- und Western-Blot-

Analysen (Altmeppen et al., 2011). Aufgrund dessen ist eher auszuschließen, dass p53-abhängige Signalkaskaden in den ADAM10-cKOs (CamKIIalpha) fehlreguliert sind. Im Gegensatz dazu führte in einer anderen Studie die konditional induzierbare Expression einer cytosolischen Variante des zellulären Prionproteins (cyPrP) zu Neurotoxizität und einer reaktiven Astroglie in hippokampalen und kortikalen Bereichen. Die Mäuse zeigten außerdem ein deutlich reduziertes Körpergewicht und Störungen der Koordination der Hinterläufe (Wang et al., 2009a), ähnlich zu den Phänotypen der ADAM10-cKOs. Jedoch ist bei den ADAM10-cKOs nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei der erhöhten Prion-Expression um lösliche Formen des PrPcs im Zytosol handelt, die durch retrograden Transport das Cytosol erreichen (Ma and Lindquist, 2001; Yedidia et al., 2001) oder ob membrangebundenes Prion akkumuliert.

#### **VI. 2. 4. N-Cadherin-Prozessierung durch ADAM10 im adulten ZNS**

Aufgrund der Identifikation von N-Cadherin als *in vivo* Substrat von ADAM10 in kultivierten Neuronen aus ADAM10-cKO-Embryonen, sollte auch im adulten ZNS dessen Proteolyse untersucht werden. Klassische Cadherine sind calciumabhängige Adhäsionsmoleküle, die über homophile Interaktion Funktionen bei der Erkennung/Adhäsion von Neuriten steuern und die Formierung von Synapsen beeinflussen (Fannon and Colman, 1996; Uchida et al., 1996). N-Cadherin wird im adulten ZNS in Bereichen des Cerebellums, des Neokortex und des Hippokampus exprimiert (Fannon and Colman, 1996; Shapiro and Colman, 1998; Shapiro and Colman, 1999). In postsynaptischen Bereichen reguliert N-Cadherin die Oberflächenexpression von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazol-propionsäure (AMPA)-Rezeptoren und moduliert somit die synaptische Plastizität (Bozdagi et al., 2010; Lisman and Raghavachari, 2006; Malinow and Malenka, 2002). Demnach stellt sich die Frage, ob ein Verlust von ADAM10 in postsynaptischen Bereichen die N-Cadherin-Proteolyse und damit auch die Adhäsion und AMPA-Rezeptorexpression bzw. -funktion beeinflusst? In Kortexlysaten und anschließender Western-Blot-Analyse der ADAM10-cKOs wurde keine Veränderung der N-Cadherin-Prozessierung detektiert. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass der Block des postsynaptischen Transports von ADAM10, durch Inhibition der Interaktion zwischen SAP97 und ADAM10, zu veränderten morphologischen Strukturen der dendritischen Dornfortsätze und veränderter AMPA-Rezeptorlevel in Abhängigkeit von der N-Cadherin-Proteolyse in postsynaptischen Bereichen führte (Malinverno et al., 2010). Jedoch wurden die Unterschiede in der N-Cadherin-Proteolyse nicht in Kortexlysaten sondern in Triton-unlöslichen-Fraktionen (TIFs) detektiert. Detaillierte Analysen der synaptischen Proteinkomplexe sollten zukünftig bei der Analyse der ADAM10-

cKOs in TIF-Präparationen, Synaptoneurosomenfraktionen bzw. eventuell in Präparationen postsynaptischer Regionen (*postsynaptic densities*, PSDs) durchgeführt werden, um im cKO-Modell die Rolle von ADAM10 bei der Ektodomänenspaltung von N-Cadherin zu charakterisieren.

### VI. 2. 5. NMDA-Rezeptoren im adulten ZNS

Der NMDA-Rezeptor (NMDAR) ist ein glutamat-abhängiger Ionenkanal, der essentiell für die synaptische Plastizität und somit eine molekulare Grundlage für das Lernen und die Gedächtnisausbildung ist (Bliss and Collingridge, 1993; Morris et al., 1986). NMDA-Rezeptoren sind nach Ligandenbindung und Entfernung des spannungsabhängigen Magnesiumblocks permeabel für Calcium und Natrium. Calciumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren ist eine Voraussetzung für die Synaptogenese, erfahrungsbedingte synaptische Modulation und längerfristige Veränderungen im Bereich von Synapsen (Langezeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD)) (Collingridge et al., 2004). NMDARs bilden eine heteromere Gruppe aus den NMDA-Rezeptor (NR)-Untereinheiten NR1, NR2 (NR2A-NR2D) und NR3, die sich kotranslational im ER zu funktionellen Kanälen zusammenlagern und sich in pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden, wobei die meisten NMDARs aus NR1/NR2 Heteromeren bestehen (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Mott et al., 1998). Bei der Ausbildung von LTP im adulten Hippokampus im Bereich der Schaffer-Kollaterale spielt der Transport von NMDARs mit NR2A-Untereinheiten zu postsynaptischen Oberflächen eine wesentliche Rolle. An diesen Synapsen wird nach Calciumeinstrom durch NMDARs die Proteinkinase C (PKC) und die Tyrosinkinase Src aktiviert, die den Einbau weiterer NMDARs in synaptische Bereiche regulieren (Grosshans et al., 2002; Lan et al., 2001). Die Expression von NR2A, NR2B und NR2C variieren während der embryonalen und postnatalen Entwicklung des ZNS. Zum Zeitpunkt embryonaler Stadien wird die NR2B-Untereinheit in Bereichen des ZNS exprimiert, während NR2A-Expression postnatal startet und eine maximale Expression an P21 in Bereichen des Hippocampus, des Kortex, des Striatums, des Thalamus und des Bulbus Olfactorius auftritt. NR2C wird primär postnatal in cerebellaren Bereichen exprimiert (Wenzel et al., 1997).

In den ADAM10-cKOs konnte eine Reduktion der Expression der NMDAR 2A-Untereinheit an P18 in kortikal/hippokampalen Lysaten detektiert werden, die vermutlich teilweise für die Reduktion der hippocampalen LTP (Schaffer-Kollaterale) mitverantwortlich ist. Stützend zu dieser Hypothese konnte eine reduzierte hippocampale LTP und Störungen des räumlichen

Gedächtnisses (*Morris- water- maze-assay*) bei Mäusen mit NR2A-Defizienz gezeigt werden (Sakimura et al., 1995). Jedoch konnte in den ADAM10-cKOs noch nicht gezeigt werden, ob die reduzierte Expression ursächlich auf transkriptionelle Effekte oder auf postrtranslationale Mechanismen der NMDAR 2A-Untereinheit-Regulation durch ADAM10-Defizienz zurückzuführen ist. Interessant wäre die Untersuchung, ob der Umbau von primären NR1/NR2B- zu NR1/NR2A-Rezeptoren durch eine frühe postnatale Deletion von ADAM10 bzw. durch gestörte Proteolyse eines neuronalen ADAM10-Substrats ausgelöst wird, oder ob ADAM10 sogar direkt mit den NR2A-Untereinheiten assoziiert vorliegt und es bei ADAM10-Defizienz zu einem möglichen Transport-Defekt kommt.

### **VI. 2. 6. APP-Prozessierung durch ADAM10 in Tiermodellen für Morbus Alzheimer**

Mutationen in *APP*, *PRESENILIN 1* und *PRESENILIN 2* sind dafür bekannt, frühe Formen von *Early-Onset Alzheimer's Disease* (EOAD) auszulösen (Goate et al., 1991; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). In Mäusen führt die Expression und Proteolyse von APP unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen nicht zur Ablagerung von A $\beta$ <sub>42</sub>, was auf strukturelle Unterschiede zwischen humanem und murinem APP oder auf die geringe Lebenserwartung der Mäuse zurückzuführen sein kann (Citron et al., 1997). ADAM10-Defizienz in postmitotischen Neuronen induziert auch keine für Morbus Alzheimer charakteristischen Phänotypen in Mäusen. Durch histologische Untersuchungen während dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es an P19 zu keiner Bildung von amyloiden Fibrillen (Kongo-Rot-Färbung, Daten nicht gezeigt) und keiner Hyperphosphorylierung von Tau (neurofibrillären Aggregate, Daten nicht gezeigt) kam. Jedoch konnte eine leicht reduzierte Proteolyse von APP in Western-Blot-Analysen von Kortices der ADAM10-cKOs detektiert werden, die durch Detektion einer Reduktion von löslichem APP $\alpha$  in Kortexlysaten (Daten nicht gezeigt) ergänzt wurden. Im Mausmodell führt erst die Überexpression von humanen APP-Mutanten, humanen PS1-Mutanten bzw. tau-Mutanten, im Alter von 9-12 Monaten bzw. bei einem triple-transgenen Mausmodell (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub>, tau<sub>P301</sub>) schon nach ca. 3-4 Monaten, zu erhöhter Abeta-Produktion bzw. -Aggregation, Lern- und Gedächtnisdefekten, tau-Akkumulation und synaptischer Dysfunktion (Citron et al., 1997; Duff et al., 1996; Holcomb et al., 1998; Oddo et al., 2003a; Oddo et al., 2003b). Diese transgenen Mausmodelle eignen sich zur Simulierung pathologischer Zustände von Patienten mit Morbus Alzheimer und zur genaueren Charakterisierung des Krankheitsverlaufs bzw. der zugrundeliegenden molekularen Ursachen. Ein Tiermodell zur Untersuchung von frühen Stadien der sporadischen Alzheimer Erkrankung wurde von *Epis et al.* beschrieben. Hierbei

führt die Reduktion von postsynaptischem ADAM10 zu einer verstärkten A $\beta$ <sub>42</sub>-Aggregation, Hyperphosphorylierung von tau, einer Veränderung der NMDA-Rezeptorzusammensetzung und elektrophysiologischen Auffälligkeiten im Tiermodell. Diese „spezifische“ ADAM10-Reduktion an der Postsynapse wurde durch eine zweiwöchige Behandlung der Mäuse mit einem Peptid zur Unterbrechung der SAP97/ADAM10-Interaktion erreicht (Epis et al., 2010). Fragwürdig an dieser Studie sind das frühe Auftreten der Phänotypen und die Aggregation des murinen A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptids, was im Gegensatz zu den bereits publizierten Studien steht (Citron et al., 1997). Zukünftig könnte die Kreuzung der ADAM10-cKOs in ein Alzheimer Modell sinnvoll sein, die Rolle von ADAM10 bei der Alzheimer Erkrankung zu untersuchen. Eine erste mögliche, präventive Rolle von ADAM10 bei der Entstehung von Morbus Alzheimer konnte durch die transgene Überexpression von bovinem Ha-getagtem ADAM10 unter Kontrolle des Thy1-Promotors in postmitotischen Neuronen in einem AD-Tiermodell gezeigt werden. Die Überexpression von ADAM10 führte zu einer reduzierten Plaquebildung, erhöhter löslicher APPalpha-Sekretion, verbesserten kognitiven Leistungen und abgemilderten Störungen der LTP der Mäuse (Postina et al., 2004). Bei der Übertragung der Daten auf den humanen Organismus muss jedoch bedacht werden, dass die gleichzeitige Verwendung von humanem APP<sub>V717I</sub>, bovinem ADAM10 und des murinen Organismus nicht das optimale, physiologische System zur Nachstellung einer humanen Erkrankung bzw. eines möglichen therapeutischen Ansatzes darstellt. Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Morbus Alzheimer-Prävention im Tiermodell durch ADAM10 kommen die Analysen von *Domnez et al.* durch die transkriptionelle Expressionssteigerung von ADAM10 nach Aktivierung des Retinsäurerezeptors beta im ZNS (Domnez et al., 2010).

### **VI. 2. 7. Konsequenzen der löslichen APPalpha-Reduktion in ADAM10-cKOs**

Wie in der Einleitung beschrieben wird APP durch verschiedene Sekretasen prozessiert. Der nicht-amyloidogene Weg der Prozessierung, der zur Entstehung von löslichem APPalpha durch ADAM10 führt, wird diskutiert neuroprotektive Funktionen zu haben (Chasseigneaux and Allinquant, 2012). In Zellkultur wurde die Funktion von löslichem APPalpha genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass lösliches APPalpha das Neuritenwachstum in Hühner- und Mausneuronen stimuliert (Clarris et al., 1997; Small et al., 1994). Zusätzlich beeinflusst es Zelladhäsion, die Anzahl an Dendriten und das Axonwachstum embryonaler, kortikaler Neurone (Chasseigneaux et al., 2011). *In vivo* führte der klassische Knockout von APP in Bereichen des Kortex, des Cerebellums und des Hippokampus zu keinen zellulären bzw. morphologischen Auffälligkeiten (zelluläre Atrophie, Apoptose und Vakuolisierung) (Zheng et al., 1995). Interessanterweise führen familiäre Mutationen im APP-Gen (Ala<sub>692</sub> zu

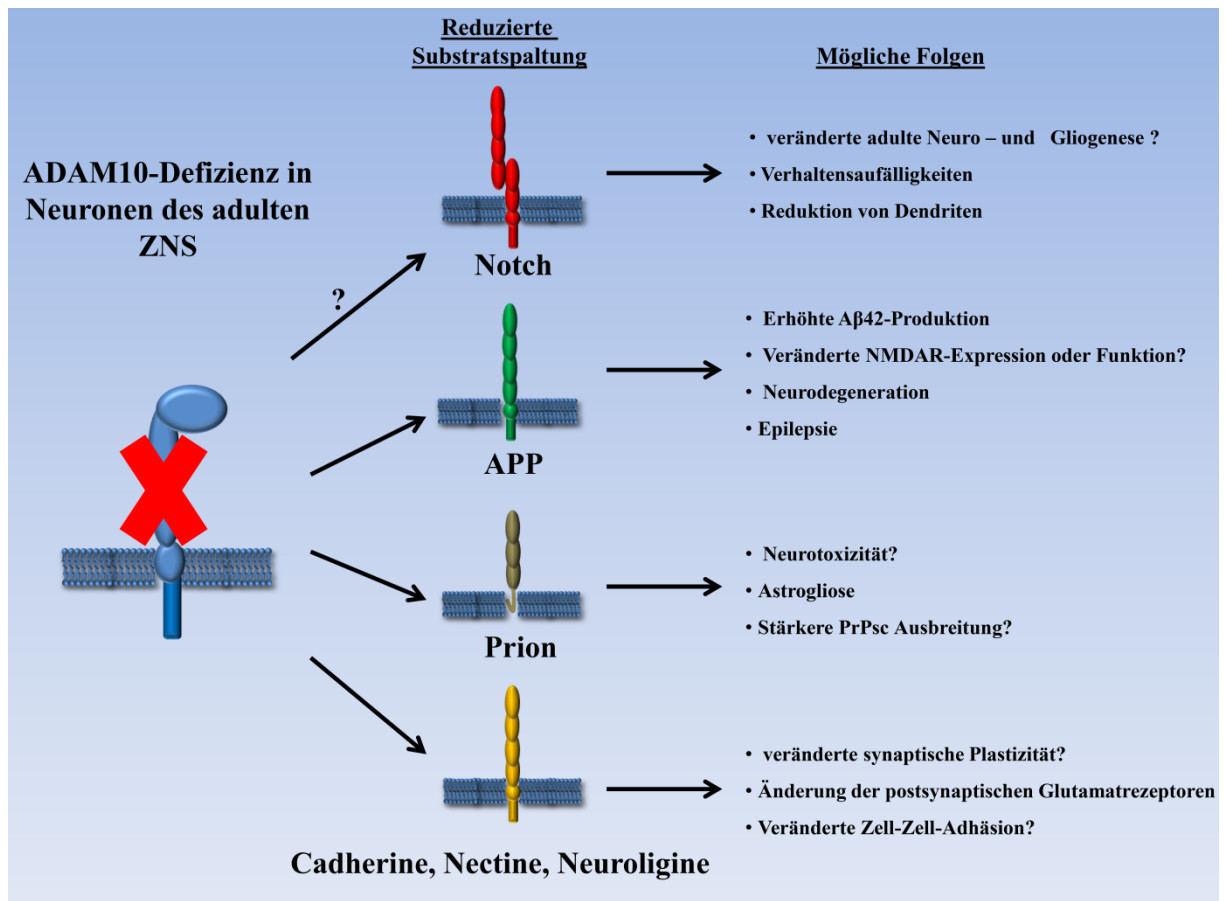


Glycin, Glu<sub>693</sub> zu Glutamin), die in der Nähe der  $\alpha$ -Sekretaseschnittstelle lokalisiert sind zu schweren Krankheitsverläufen von Morbus Alzheimer, die mit vererbbarer, zerebraler Angiopathie assoziiert sind (Hendriks et al., 1992; Levy et al., 1990). Diese Mutationen führen nicht nur zu einer erhöhten A $\beta$ <sub>42</sub>-Freisetzung, sondern auch zu einer reduzierten Freisetzung des P3-Fragments, welches durch vorherige  $\alpha$ -Sekretase-Proteolyse und nachfolgender  $\gamma$ -Sekretaseprozessierung entsteht (Haass et al., 1994). Zur genaueren Charakterisierung der  $\alpha$ -Sekretasefunktion *in vitro* bzw. *in vivo* wurden im APP-Gen in der Nähe der  $\alpha$ -Sekretaseschnittstelle zwei basische Aminosäuren gegen zwei saure Aminosäuren (Arg<sub>609</sub> zu Aspartat, Lysin<sub>612</sub> zu Glutamat, (De Strooper et al., 1993)) ausgetauscht und ein transgenes Mausmodell etabliert. Dieses APP-Transgen wurde anschließend unter der Kontrolle des Thy1-Promotors neuronal exprimiert. Die transgenen APP-Mäuse zeigten eine hintergrundabhängige erhöhte Mortalität, leichte Krämpfe mit variierender Stärke und bei älteren Mäusen (6 Monate) starke Krämpfe der Vorder- und Hinterläufe, die bis zu 30-60 Sekunden dauern konnten. Die Charakteristika dieser Krampfanfälle gleichen denen der ADAM10-cKOs. Zusätzlich zeigten die transgenen APP-Mäuse unterschiedliche Reaktionen bezüglich der Stimulierung von glutamatabhängigen Rezeptoren durch verschiedene Glutamatanaloga (Kainat, NMDA). Bei intraperitonealer Kainatinjektion wiesen die transgenen Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zu Kontrollmäusen auf, die anhand einer dosisabhängigen, phänotypischen Charakterisierung der Krämpfe beurteilt wurde (Racine et al., 1972). Die Stimulierung mit letalen Dosen an NMDA (100 mg/kg, 100% letal bei WT, nach (Leander et al., 1988)) überlebten die transgenen APP-Mäuse, was auf eine veränderte Expression bzw. Funktion von NMDARs in Bereichen des ZNS hinweisen könnte. Eine veränderte NMDAR-Expression konnte in den ADAM10-cKOs beobachtet werden, die funktionell mit einer reduzierten Langzeitpotenzierung in Bereichen der Schaffer-Kollaterale korrelierte. Zusätzlich zeigten sich durch histologische Untersuchungen der transgenen APP-Mäuse nach 2,5-9 Monaten schwere Anzeichen von Neurodegeneration in Bereichen des Gyrus Dentatus und der Amygdala (Apoptose), begleitet von einer reaktiven Astroglie (Moechars et al., 1996; Moechars et al., 1999). Die ADAM10-cKOs wurden zu späteren Zeitpunkten noch nicht näher charakterisiert, jedoch kann das Auftreten von Neurodegeneration vermutet werden. Gerade im Mausmodell zeigt sich, dass die Bildung von löslichem APP $\alpha$  essentielle Funktionen im adulten ZNS reguliert, da in den diskutierten, transgenen APP-Mutanten der C-Terminus des löslichen APP $\alpha$  verändert und in der ADAM10-cKO-Maus die Menge an löslichem APP $\alpha$  reduziert ist. Generell ist eher auszuschließen, dass die Phänotypen im Mausmodell durch

neurotoxische A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptide ausgelöst werden. Eine Änderung der Synapsenanzahl bzw. der glutamatabhängigen Synapsen ist in den ADAM10-cKOs aufgrund der unveränderten Expression der Markerproteine Synaptophysin bzw. GAD65/67 eher unwahrscheinlich. Im Falle der transgenen APP-Maus könnten die strukturellen Veränderungen des gebildeten, löslichen APPalpha und dessen hohe Expression zur Verdrängung des endogenen, löslichen APPalpha führen, während im ADAM10-cKO allein die reduzierte Menge zur Entstehung des Phänotyps beitragen könnte. Das Einkreuzen einer transgenen Knockin-Maus, die lösliches APPalpha überexprimiert, könnte zur Klärung der funktionellen Bedeutung von löslichem APPalpha im murinen ZNS bei neuronaler ADAM10-Defizienz beitragen (Ring et al., 2007).

Neben den hier diskutierten ADAM10-Substraten konnten neue, neuronale Substrate (Neurologin (NL1), Nectin-3) identifiziert werden, deren verändertes *Shedding* den Phänotyp der ADAM10-cKOs zusätzlich beeinflussen könnte. Beispielsweise führt die durch ADAM10-vermittelte Ektodomänenprozessierung von NL1 zu einer gesteigerten Bildung von dendritischen Dornfortsätzen in hippokampaler Neuronenkultur. Zusätzlich wird das durch *Shedding* entstehende CTF1, wie viele andere ADAM10-Substrate, durch die  $\gamma$ -Sekretase in Transmembranbereichen prozessiert, was zur Freisetzung einer potentiell, funktionell-aktiven, intrazellulären Domäne führt. NL1 interagiert außerdem mit seinem präsynaptischen Ligand Neurexin, wodurch bei ADAM10-Defizienz die Adhäsion und die synaptische Plastizität in Neuronen beeinflusst werden könnten (Tomita et al., unpublizierte Daten). Weiterhin analysiert derzeit eine Arbeitsgruppe die Prozessierung eines weiteren Moleküls aus der Nectin-Familie (Nectin-3). Hier konnte in neuronaler Zellkultur gezeigt werden, dass durch Zugabe von Glutamat ein c-terminales Fragment durch ADAM-Proteolyse entsteht. Jedoch konnte die Identität der verantwortlichen ADAM-Protease bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden (Kaczmarek et al., unpublizierte Daten). Erste Western-Blot-Analysen kortikaler Lysate der ADAM10-cKOs deuteten eine Beteiligung von ADAM10 an, jedoch wurde ein c-terminales Fragment detektiert, dessen Molekulargewicht 10 kDa größer war, als das nach Zellkulturexperimenten detektierte Fragment (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend werden die starken Phänotypen der ADAM10-cKOs durch eine Vielzahl dysregulierter Prozesse ausgelöst. Hierbei spielen vermutlich sowohl veränderte Mengen funktioneller, löslicher Ektodomänen als auch die intrazellulär freigesetzten Fragmente von ADAM10-Substraten eine Rolle. Auf diese Weise werden unterschiedliche Signalwege und Mechanismen verschiedenster Zellen des adulten ZNS beeinflusst (s. Abb. 60).

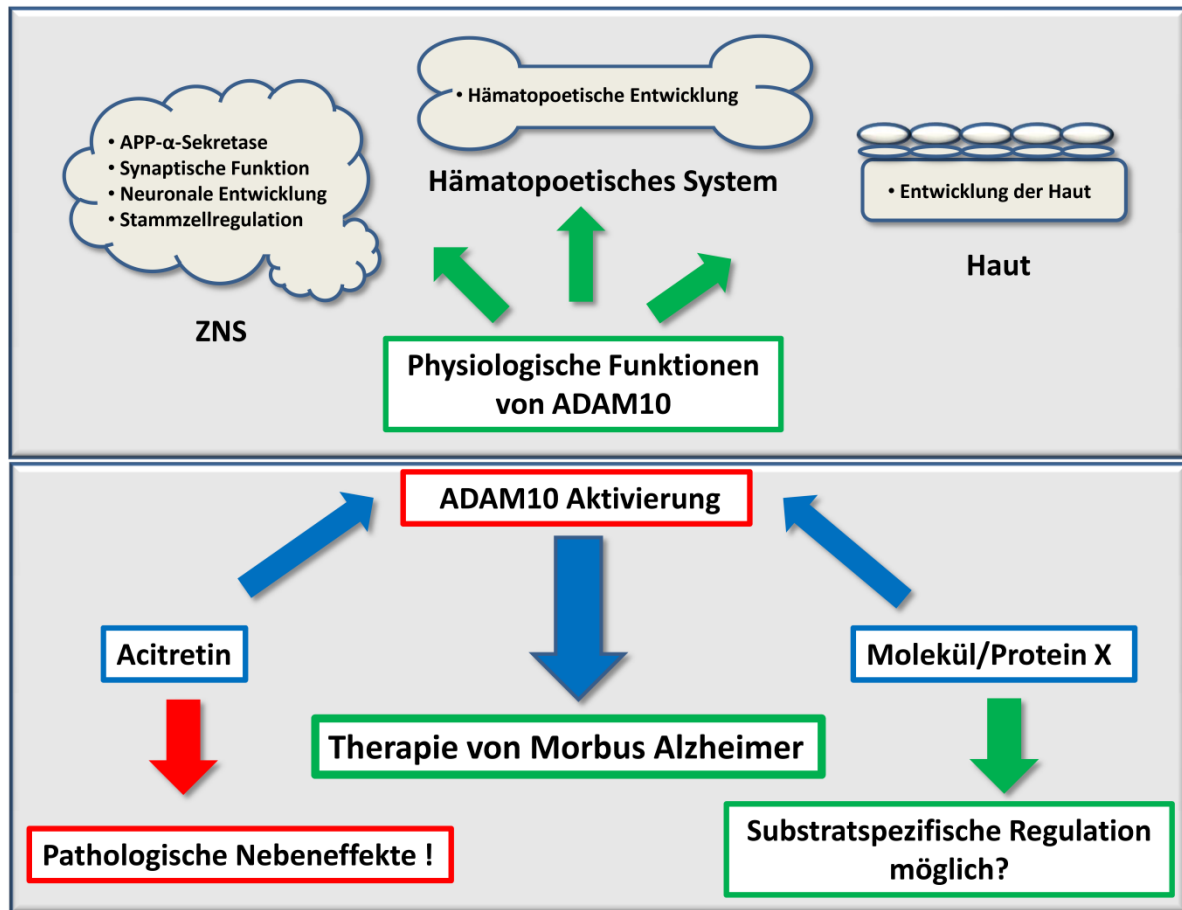


**Abb. 60: Mögliche Folgen einer ADAM10-Defizienz in Neuronen des adulten ZNS.**

Eine Defizienz von ADAM10 in Neuronen des adulten ZNS hat Auswirkungen auf die Proteolyse vieler Substrate (beispielsweise: Notch, APP, Prion, Cadherine, Nectine und Neuroligine). Unter anderem könnte durch die Spaltung der Substrate durch ADAM10 eine Vielzahl von physiologischen Prozessen reguliert sein. Dargestellt sind Auszüge der möglichen physiologischen und pathophysiologischen Auswirkungen einer neuronalen ADAM10-Defizienz.

### **VI. 3. Identifikation neuer Interaktionspartner bzw. Regulatoren von ADAM10**

Die Ergebnisse der Studien in dieser Arbeit zur ADAM10-Defizienz während der ZNS-Entwicklung und der Funktion des adulten ZNS wiesen daraufhin, dass eine generelle Aktivierung von ADAM10 zur Prävention bzw. Therapie von Morbus Alzheimer als kritisch betrachtet werden kann. Die herausragende Bedeutung von ADAM10 für die feinregulierte Kontrolle einer Vielzahl von zellulären Mechanismen bzw. Prozessen des gesunden Organismus wird zusätzlich durch Studien zur ADAM10-Defizienz in der Haut und des hämatopoetischen Systems unterstrichen ((Weber et al., 2011), Weber et al., unpublizierte Daten). Allerdings kann zumindest angenommen werden, dass bei spezifischer Aktivierung von ADAM10 in postmitotischen neuronalen Zellen, die potentiell möglichen Nebeneffekte minimiert werden könnten (Postina et al., 2004, Endres et al., 2010). Neben den bereits diskutierten und in der Einleitung beschriebenen Möglichkeiten der ADAM10-Regulation, bildet eventuell die Steuerung des intrazellulären Transports der Protease eine Alternative, um dadurch selektiv die Spaltung bestimmter Substrate zu erreichen (s. Abb. 61).



**Abb. 61: ADAM10-Funktion im Organismus und ADAM10-Aktivierung als therapeutischer Ansatz.**

ADAM10 spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung verschiedenster Organe (ZNS, Haut, Knochenmark) und deren Funktion im Organismus. Die Aktivierung von ADAM10, beispielsweise über Acitretin, könnte für Patienten mit Morbus Alzheimer einen therapeutischen Nutzen haben. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte eine Aktivierung von ADAM10 zu unerwünschten Nebeneffekten während der Therapie der Alzheimer Erkrankung führen. Eine der zentralen Fragen, die sich im Zusammenhang mit ADAM10 als therapeutisches Ziel stellt ist, ob sich durch ein bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes Molekül bzw. Protein eine substratspezifische bzw. organspezifische Aktivierung mit minimalen unerwünschten Nebeneffekten erreichen lässt (modifiziert nach Prox et al., 2012).

### VI. 3. 1. *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Screen* mit ADAM10

Zur Identifikation putativer neuer Substrate und Interaktoren von ADAM10 wurde ein *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-System* angewendet. Dieses System ermöglicht die spezifische Untersuchung der Interaktion von Membranproteinen. Mittlerweile konnten mehrere Studien zeigen, dass sich dieses System zur spezifischen Detektion von Interaktionen zwischen verschiedenen integralen Membranproteinen eignet (Obrdlik et al., 2004; Yan et al., 2005). Zusätzlich konnten auch neue Interaktionspartner durch cDNA-Bibliotheken-Screens identifiziert werden (Thaminy et al., 2003; Wang et al., 2004). Nach Auswertung der Daten des durchgeführten Screens wurde Tetraspanin-15 (TSPAN15) ausgewählt, da in der Literatur erste Studien zeigen konnten, dass die Interaktion zwischen ADAM-Proteasen und

Tetraspaninen deren Aktivität reguliert (Arduise et al., 2008; Gutierrez-Lopez et al., 2011; Xu et al., 2009).

### VI. 3. 2. Tetraspanine und die ADAM-Proteasen 10 und 17

Viele aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die Interaktion und die funktionelle Wechselwirkung zwischen Tetraspaninen und Membranproteasen in *Tetraspanin-Enriched-Microdomains* (TEMs) wichtige regulative Plattformen bilden, die „*Shedding*“, „*RIPing*“ und Matrixdegradation regulieren (Yanez-Mo et al., 2011). Die große Variabilität der Substrate der ADAM-Proteasen 10 und 17 und deren potentielle physiologische und pathophysiologische Relevanz zeigen, dass es Mechanismen der molekularen Kontrolle geben muss, die die Aktivität der Proteasen spezifisch regulieren. Eine der ersten Studien, die eine funktionelle Assoziation zwischen Tetraspaninen und ADAM-Metalloproteasen vermutete, wurde von Yan et al., im Jahre 2002 publiziert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass bei Überexpression ADAM10 mit CD9 interagiert. Zusätzlich korrelierte die Proliferation von Zellen durch HB-EGF-Stimulation mit der Interaktion von HB-EGF zu CD9. Daraus wurde geschlossen, dass ADAM10, CD9 und HB-EGF einen funktionellen Komplex bilden, der parakrin und autokrin durch ADAM10-vermitteltes Shedding die Transaktivierung des EGF-Rezeptors reguliert (Yan et al., 2002). ADAM10 scheint ein Bestandteil der TEMs zu sein, da gezeigt werden konnte, dass ADAM10 mit CD9, CD81 und CD82 interagiert. Die Zugabe von Antikörpern gegen diese Tetraspanine in Zellkultur führte zur erhöhten Freisetzung von löslichem TNFalpha und EGF, die vermutlich durch ADAM10-vermitteltes *Shedding* ausgelöst wurde. Außerdem konnte eine Lokalisationsänderung von ADAM10 nach CD82-Antikörperzugabe in Raji-Zellen durch Immunfluoreszenzstudien beobachtet werden, da sich spezifische Bereiche in der Plasmamembran bildeten, in denen CD82 und ADAM10 vermehrt kolokalisierten. Diese Analysen zeigten, dass Tetraspanine durch die Bildung von Tetraspaninnetzwerken über die Organisation spezifischer Plasmamembranbereiche die Lokalisation von ADAM10 kontrollieren und dadurch dessen *Shedding*-Aktivität bezüglich charakterisierter Substrate regulieren (Arduise et al., 2008). Jedoch scheint durch CD9 nicht nur ADAM10-vermitteltes Shedding reguliert zu sein, da bewiesen werden konnte, dass die Expression bzw. der Knockdown von CD9 zu Veränderungen von ADAM17 vermitteltem Shedding von TNFalpha führt (Gutierrez-Lopez et al., 2011). An diesem Punkt stellt sich die Frage nach der Spezifität der Tetraspanine. Reguliert CD9 gleichzeitig ADAM10 und ADAM17? Sind diese Interaktionen direkt, oder vermitteln eventuell weitere über das Tetraspaninnetzwerk assoziierte Tetraspanine die funktionelle Regulation der ADAM-Proteasen? Aufgrund der 33 humanen Familienmitglieder der Tetraspanine und der

unterschiedliche Expressionsmuster sind vielfältige Tetraspanin-Tetraspanin-Kombinationen denkbar, die unterschiedlichste funktionelle Komplexe bilden können (Hemler, 2008).

### **VI. 3. 3. TSPAN15 ein vielversprechender Kandidat zur spezifischen Regulation der Lokalisation von ADAM10**

Einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Regulation von ADAM10 bildet das in dieser Arbeit als Interaktionspartner identifizierte TSPAN15. Es konnte durch verschiedene experimentelle Herangehensweisen (Interaktion im Hefesystem und Koimmunpräzipitation) bewiesen werden, dass eine physikalische Interaktion zwischen beiden Molekülen besteht. Zusätzlich kolokalisierten TSPAN15 und ADAM10 in ER-Bereichen und an der Plasmamembran, wobei außerdem durch TSPAN15-Überexpression eine erhöhte Maturierung von ADAM10 und gleichzeitig eine erhöhte Plasmamembranlokalisation nachgewiesen werden konnte. Dabei interagiert Tetraspanin-15 vermutlich direkt mit ADAM10, da für die spezifische Selektion, über die Bildung eines vollständigen Ubiquitinmoleküls, während des Hefescreens die räumliche Nähe der Interaktionspartner gegeben sein musste (Suter et al., 2006). Stützend zu dieser Hypothese wurden Koimmunpräzipitationsexperimente unter Einsatz eines starken Detergenz (Triton-X-100) durchgeführt, das Tetraspanin-Tetraspanininteraktionen aufbricht und eine Assoziation beider Moleküle detektiert (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte unter milderer Koimmunpräzipitations-Bedingungen auch eine Interaktion von TSPAN15 mit ADAM17 nachgewiesen werden. Ob zwischen diesen beiden Proteinen eine direkte, funktionelle Interaktion besteht, bleibt zu überprüfen (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zur Analyse des Maturierungsstatus und die Daten der Immunfluoreszenzstudien deuten aber keine Beteiligung von TSPAN15 an der Regulation von ADAM17 an.

### **VI. 3. 4. TSPAN15 reguliert die ADAM10-Aktivität und auch dessen Halbwertszeit**

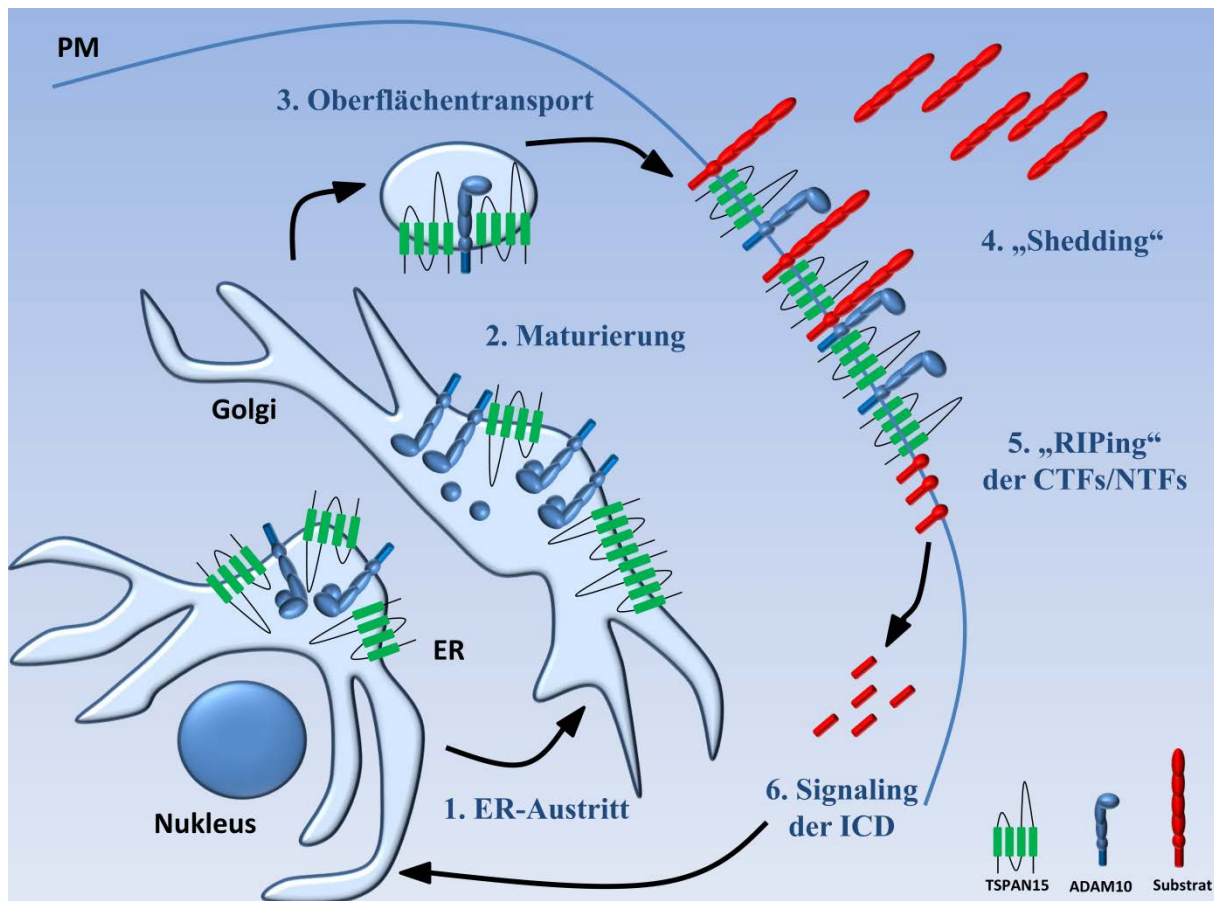
Zusätzlich zur erhöhten Plasmamembranlokalisation der maturen Form von ADAM10 durch TSPAN15, konnte bei TSPAN15-Überexpression gezeigt werden, dass die Proteolyse der „neuronalen“ Substrate APP und N-Cadherin gesteigert war. Es konnte eine vermehrte Bildung der c-terminalen Fragmente von N-Cadherin und APP durch Western-Blot-Analyse und eine erhöhte Menge an löslichem APP $\alpha$  in Zellkulturüberständen durch ELISA-Experimente detektiert werden. Ähnliche Effekte auf die ADAM10-Aktivität konnten bei der Untersuchung der Interaktion von SAP97 und ADAM10 *in vitro* und *in vivo* detektiert werden (Epis et al., 2010; Malinverno et al., 2010; Marcello et al., 2010). Die erhöhte Substrat-Proteolyse in Abhängigkeit von der TSPAN15-Expression korrelierte mit einer

erhöhten Halbwertszeit der maturen, aktiven Form von ADAM10 zu späten Analysezeitpunkten in *Pulse-Chase*-Experimenten. Somit erhöht TSPAN15 die Halbwertszeit der aktiven Form von ADAM10. Die Betrachtung des *Steady-State* durch Western-Blot-Analyse 48 h nach TSPAN15-Transfektion stützt diese Hypothese. Unabhängig von transkriptionellen Mechanismen konnte ein verstärktes ADAM10-Signal detektiert werden. Mechanistisch könnte die Interaktion zwischen TSPAN15 und ADAM10 zur Maskierung des im Bereich des c-Terminus von ADAM10 befindlichen Dreifach-Arginin-Motivs (Marcello et al., 2010) führen, wodurch ein erhöhter ER-Austritt und eine anschließende Aktivierung von ADAM10 durch Furin ermöglicht werden könnte. Ähnliche Mechanismen der Kontrolle des intrazellulären Transports bzw. der Qualitätskontrolle wurden für den hochaffinen IgE-Rezeptor, *Splice*-Varianten des NMDA-Rezeptors und Ionenkanäle beschrieben (Letourneur et al., 1995; Standley et al., 2000; Zarei et al., 2004; Zerangue et al., 1999).

### **VI. 3. 5. TSPAN15 ein neuer Regulator für ADAM10**

Zusammenfassend konnte bei der Analyse im Hefesystem und durch Koimmunpräzipitationsstudien die Interaktion von ADAM10 und TSPAN15 verifiziert werden. Weitere zellkulturbasierte Experimente zeigten, dass die Interaktion zwischen TSPAN15 und ADAM10 den ER/Golgi-Austritt von ADAM10 reguliert, und dadurch dessen Maturierung und Transport zur Plasmamembran beeinflusst. Das hatte Auswirkungen auf die Spaltung bereits charakterisierter ADAM10-Substrate (N-Cadherin und APP). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass TSPAN15 ADAM10 sowohl im murinen als auch im humanen Zellsystem reguliert und somit TSPAN15 als spezieübergreifender Regulator von ADAM10 bezeichnet werden kann (s. Abb. 62).





**Abb. 62: Modellvorstellung der ADAM10-Regulation durch TSPAN15.**

1), 2) und 3) ADAM10 und TSPAN15 interagieren im ER. Der gesteigert ER- bzw. Golgi-Austritt führt zur Maturierung von ADAM10 und zu einem verstärkten Transport zur Zelloberfläche und danach zur Integration von ADAM10 in das Tetraspaninnetzwerk. 4) Die Stabilisierung von ADAM10 an der Zelloberfläche führt zu einer erhöhten ADAM10-Aktivität und damit verbundenem *Shedding* von ADAM10-Substraten. 5) und 6) Die darauf folgende Intramembran-Prozessierung der CTF1- bzw. NTF1-Fragmente führt zur Freisetzung von CTF2- bzw. NTF2- Fragmenten, die möglicherweise Signalfunktion haben bzw. durch die Translokation in den Nukleus Genregulation beeinflussen könnten. Abkürzungen: c-terminales bzw. n-terminales Fragment (CTF/NTF), intrazelluläre Domäne (ICD), Plasmamembran (PM), (modifiziert nach (Prox et al., 2012b)).

### VI. 3. 6. TSPAN15 als therapeutisches Zielmolekül

Eignet sich TSPAN15 als therapeutisches Zielmolekül für eine pharmakologische Modulation, um eventuell die ADAM10-Aktivität „spezifisch“ zu regulieren? Welche Effekte wären eventuell bei erhöhter Expression von TSPAN15 im Organismus zu erwarten? In dieser Arbeit wurde nur die Proteolyse von zwei ADAM10-Substraten (APP und N-Cadherin) betrachtet. Proteomanalysen von Zellkulturüberständen nach TSPAN15-Überexpression wären sinnvoll, um das gesamte „Sheddom“ von ADAM10 durch TSPAN15-Regulation zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob beispielsweise die Notch-Rezeptoren und deren Proteolyse durch TSPAN15 beeinflusst werden. In *Caenorhabditis elegans* beeinflusst beispielsweise das Tetraspanin TSP-12 den Notch Signalweg. Die Orthologe zu TSP-12 im humanen System TSPAN5 und 33 regulieren in Zellkultur den

klassischen Notch-Signalweg. Hier konnte gezeigt werden, dass eventuell der Schritt der Prozessierung des Notch-Rezeptors durch die  $\gamma$ -Sekretase beeinflusst wird, da ligandenunabhängig aktive Notch-Rezeptorkonstrukte verwendet wurden. Zusätzlich hatte der Knockdown von TSPAN33 in Zellkultur keinen Einfluss auf das Notch-Signal, welches durch die Überexpression einer cytosolischen Variante des Notch-Rezeptors ausgelöst wird (Dunn et al., 2010). Ausgeschlossen werden kann jedoch nicht, dass bei der ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges durch TSPAN5 und TSPAN33 eine Regulation von ADAM10 *upstream* zur  $\gamma$ -Sekretase-Prozessierung stattfindet. Analysen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eric Rubinstein weisen auf einen Mechanismus der Kontrolle des klassischen Notch-Signalweges durch ADAM10 über die Familie der 8-Cystein-Tetraspanine (8 Cysteine im *large extracellular loop* (LEL)) hin (Dornier et al., unpublizierte Daten). In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe konnten TSPAN15 und ADAM10 nach Isolierung von Tetraspaninkomplexen durch Immunpräzipitation von CD9 aus Colonkarzinomzelllinien identifiziert werden (Le Naour et al., 2006a; Le Naour et al., 2006b). Eventuell besteht hier eine funktionelle Verbindung zwischen TSPAN15 und ADAM10 über die Trans-Aktivierung des EGF-Rezeptorweges, die auch bei einer möglichen, therapeutischen Aktivierung von ADAM10 durch TSPAN15 berücksichtigt werden sollte. Im Moment lässt sich anhand des bisherigen Kenntnisstands zur Regulation von ADAM-Proteasen durch Tetraspanine nur schwer eine Aussage zur Nutzung von Tetraspaninen als therapeutische Zielmoleküle machen. Weitere Forschungen, beispielsweise an konditionalen Knockout-Mausmodellen, sind nötig, um die Funktion verschiedener Tetraspanine zeitpunkt- und organspezifisch aufzuklären.

## VII. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zunächst durch eine konditionale Deletion der Metalloprotease ADAM10 in neuronalen Vorläuferzellen (Nestin-Promotor) die Rolle dieser bei der molekularen Pathogenese des Morbus Alzheimer beteiligten Protease während Entwicklungsprozessen des murinen, zentralen Nervensystems untersucht. Die Deletion von ADAM10 in diesen Zellen führte zu einer perinatalen Letalität der Mausmutanten. Histologische, zellbasierte und biochemische Experimente zeigten, dass ADAM10 als Protease an der Initiation des klassischen Notch-Signalwegs beteiligt ist. Über den Prozess der lateralen Inhibition kontrolliert ADAM10 die damit verbundene Neurogenese und die spätere Gliogenese *in vivo*. Neben einer veränderten Proteolyse im membrannahen Bereich des Notch1-Rezeptors wurde festgestellt, dass auch die Oberflächenspaltung (*Shedding*) weiterer ADAM10-Substrate (Amyloides Vorläufer Protein (APP) und N-Cadherin) bei einer ADAM10-Defizienz beeinträchtigt war.

In einem Folgeprojekt wurde ADAM10 in Neuronen des adulten ZNS unter Kontrolle des CamKIIalpha-Promotors deletiert, um die Bedeutung von ADAM10 als Protease für die Integrität und Funktionalität des adulten, zentralen Nervensystems zu charakterisieren. Die histologische Analyse in Regionen des Hippokampus und des Kortex der Mausmutanten zeigte keine ausgeprägten, morphologischen Auffälligkeiten. Jedoch konnten erste Anzeichen von Neurodegeneration in Bereichen des medialen Gyrus dentatus beobachtet werden. Phänotypisch zeichneten sich die Mausmutanten durch eine gehäuft auftretende Letalität während der Entwöhnung vom Muttertier aus, die teilweise mit epileptischen Episoden assoziiert war. Zusätzlich zeigten sich bei 4-8 Wochen alten Mutanten eine Reduktion der Langzeitpotenzierung (LTP, Schaffer-Kollaterale), eine Störung des angstassoziierten Erinnerungsvermögens (*Passive-avoidance-Test*) und Störungen des visuell, räumlichen Gedächtnisses (*Morris-water-maze-Test*). Histologisch und biochemisch konnte eine reaktive Astroglie und eine erhöhte Expression des zellulären Prionproteins nachgewiesen werden. Außerdem wurde in Western-Blot-Analysen eine reduzierte Spaltung von APP und eine verringerte Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheit (2A) festgestellt. Diese Daten weisen daraufhin, dass die Metalloprotease ADAM10 eine wichtige Rolle bei der Funktionalität von Synapsen im zentralen Nervensystem einnimmt.

Zusätzlich zur Charakterisierung der *in vivo* Funktion von ADAM10 während der Entwicklung des zentralen Nervensystems und seiner Beteiligung bei der Synapsenfunktion,

wurde ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf die Identifikation von neuen, putativen Interaktoren bzw. Regulatoren der Protease gelegt, da bis zum heutigen Tage noch wenig über die Aktivitäts- und Spezifitätskontrolle von ADAM10 bekannt ist. Die Durchführung eines *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid*-Verfahrens führte zur Identifikation von Tetraspanin-15 (TSPAN15) als neuen Interaktionspartner von ADAM10. Zellbasierte, biochemische und immunzytometrische Analysen zeigten, dass TSPAN15 früh innerhalb des Endoplasmatischen Reticulums (ER) mit ADAM10 assoziiert und über diese Interaktion die Lokalisation, Maturierung und Halbwertszeit an der Zelloberfläche sowie daraus resultierend die Aktivität von ADAM10 (Spaltung von APP und N-Cadherin) kontrolliert. Somit konnte TSPAN15 als neuer, spezifischer Regulator für die Membranprotease ADAM10 identifiziert werden.

## VIII. Summary

In this study the metalloprotease ADAM10 was conditionally deleted during early periods of murine neuronal development using a Nestin-Cre-Deleter-strain thereby limiting the Cre-Recombinase-expression to neuronal progenitor cells. The deletion resulted in a perinatal lethality of the mutants, with disrupted cortex organisation, premature differentiation of neuronal progenitors into neurons accompanied by a loss of glial cells at later stages of development. This phenotype mimics other classical and conditional mouse models of disrupted classical Notch-Signaling in the brain. Through cell-based, biochemical and histological analyses it was demonstrated that ADAM10 controls neurogenesis and later gliogenesis by regulating the mechanism of lateral inhibition in neuronal progenitors. Furthermore it was shown that ADAM10-deficiency led to an impaired proteolysis of other ADAM10-substrates such as the Amyloid Precursor Protein (APP) and N-Cadherin.

To analyse the function of ADAM10 in the adult central nervous system ADAM10 was conditionally deleted in postmitotic neurons using a CamKIIalpha-Cre-deleter strain. The deletion resulted in an increased lethality during the weaning period, often accompanied by episodes of epileptic seizures. Histological analysis revealed no gross morphological changes in regions of the cortex and the hippocampus. However first signs of neurodegeneration were detected in areas of the medial Dentate Gyrus. A pronounced reactive astrogliosis was revealed in the cortex and the hippocampus of the mutant-mice. In behavioural tests mutants showed deficits in fear-associated conditioning tasks (Passive-avoidance-test) and spatial memory tasks (Morris-water-maze-test). Electrophysiological studies showed a significant reduction of long-term-potential (LTP, Schaffer-Collateral). At the ADAM10-substrate-level an increased expression of the prion-protein and a decreased processing of APP could be detected. Furthermore the expression of the NMDAR-Subunit (2A) was reduced. These data strongly indicate that the metalloprotease ADAM10 plays an important role for the function of synapses in the adult central nervous system.

Since little is known about the regulation and the substrate-specificity of the metalloprotease ADAM10, in parallel to the characterisation of the *in vivo* function of ADAM10 in the brain, a *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Assay* was performed to identify novel interactors and regulators of ADAM10. Tetraspanin-15 (TSPAN15) was found as a novel interaction partner of ADAM10. Cell-based, biochemical and immunocytochemical analysis showed that ADAM10 and TSPAN15 interact shortly after synthesis as early as in the endoplasmic

reticulum (ER). This specific interaction controls the exit of ADAM10 of ER- and Golgi-compartments, influences its maturation state, surface localisation and activity towards well characterized substrates (APP and N-Cadherin). TSPAN15 can be designated as novel, specific interactor and regulator of the metalloprotease ADAM10.

## IX. Anhang

**Tab. 32: Vollständige Liste der erhaltenen potentiellen Interaktionspartner**

<b>Klon-Nummer</b>	<b>Genname</b>	<b>Besonderheiten</b>	<b>Funktion</b>
#39, #78, #86, #88	Itm2b, BRI, BRI2	ITM2-Familie, BRICHOS-Domäne	ADAM10-Substrat (Martin et al., 2008)
#51	Itm2a, E25, itm2	ITM2-Familie, BRICHOS-Domäne	Involviert in Differenzierungsprozesse (Boeuf et al., 2009)
#53	Itm2c, BRI3, CT-Bri3	ITM2-Familie, BRICHOS-Domäne	unbekannt
#15, #19	Tspan15	Tetraspanin-LEL-Superfamilie	unbekannt
#46	Tspan3, Tm4sf8, TM4a	Tetraspanin-LEL-Superfamilie	Involviert in Myelinisierung (Tiwari-Woodruff et al., 2001)
#8	Laptm4a	Mtb-Superfamilie	unbekannt
#113	Laptm4b	Mtb-Superfamilie	Nukleosidtransport
#23	Syng3	Synaptogyrin-Familie	Beeinflusst synaptische Plastizität
#25	Gjc2, Connexin-47, Gap junction alpha 12 protein	Connexin-Superfamilie	Rolle bei der Myelinisierung
#30	Golm1	CASC4-Familie	Zelluläre Antwort bei Virusinfektionen
#10	Lca	-	unbekannt
#45	<i>Myelin basic protein</i>	-	Myelinisierung
#70	Vamp3	Synaptobrevin-Familie	<i>Protein-Trafficking</i>
#90	TMEM33	-	unbekannt
#91	Fcgrt	MHC Klasse I Familie	Antigenpräsentation
#92	Calm2	-	Enzym-Regulation
#94	Ptdss2	Phosphatidyl-Synthase-Familie	Funktion in Mitochondrien
#103	Atp6ap2	-	Interaktion mit Renin
#105	Sar1a	Ras-like GTPase-Superfamilie	Golgi-ER-Transport
#107	Ggt7	Gamma-Glutamyl-Transferase-Familie	-
#112	Atp2b4	Kation-Transport-ATPase-Familie	-
#6, #20	Atb2b2	Kation-Transport-ATPase-Familie	Calcium-Transport
#12	Stmn1	Stathmin-Familie	Axonformation während der Neurogenese

Klon-Nummer	Genname	Besonderheiten	Funktion
#14	Camk1	Proteinkinase-Familie	Calcium-Signaling
#37	Atp2b	ATPase-Familie	Calcium-Transport
#22	Sys1	Sys-Familie	Protein-Trafficking
#41	Lhfp13	LHFP-Familie	-
#43	Slc3a2	SLC3-Transporter-Familie	Kolokalisiert mit Cadherinen
#44	Atp6v0b	V-ATPase-Untereinheit-Familie	-
#49, #59	Fkbp8	FKBP-Familie	Chaperon für Bcl2
#60, #74	Cox4i1	Cytochrom-c-Oxidase-Familie	Elektronentransport
#72	Rabac1	PRA1-Familie	Vesikel-Fusion
#83	Rtn1	Reticulon-Familie	Neuronen-Trafficking

Die Informationen zur Funktion der möglichen Interaktionspartner sind der Datenbank [www. Expasy.org](http://www.Expasy.org) entnommen

### IX. 1. 1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur und Sequenzmotive von murinem ADAM10.....	II-12
Abb. 2: Prozessierung von APP durch verschiedene Sekretasen und Preseniline.....	II-14
Abb. 3: Mechanismen/Ansätze zur Verringerung der A $\beta$ -Produktion. ....	II-16
Abb. 4: Allgemeine Struktur der Tetraspanine.....	II-21
Abb. 5: Entwicklung neuronaler Zellen aus radialen Gliazellen in der VZ des sich entwickelnden Kortex....	II-25
Abb. 6: Migration und Entwicklung verschiedener Subtypen von Neuronen. ....	II-27
Abb. 7: Der klassische Notch-Signalweg.....	II-29
Abb. 8: Der Wechsel zwischen Neurogenese und Gliogenese des sich entwickelnden Neokortex. ....	II-32
Abb. 9: Beschreibung des WT- und Floxed ( <i>Adam10</i> )-Allels. ....	IV-53
Abb. 10: Verpaarungsschema zur konditionalen Deletion von ADAM10 in neuronalen Stammzellen. ....	IV-66
Abb. 11: Verpaarungsschema zur konditionalen Deletion von ADAM10 im adulten ZNS. ....	IV-67
Abb. 12: Agarosegele der LoxP-PCR und PCR zum Nachweis des Nestin-Cre-Transgens. ....	V-82
Abb. 13: Western-Blot-Analyse von Kompletthirnlysaten von Embryonen an E12.5.....	V-84
Abb. 14: Grob-morphologische Charakterisierung der ADAM10-cKO-Embryonen. ....	V-85
Abb. 15: HE-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen. ....	V-86
Abb. 16: NeuN-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen. ....	V-88
Abb. 17: Ki67-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS der ADAM10-cKO-Embryonen. ....	V-90
Abb. 18: Differenzierung von ADAM10-defizienten-, Kontroll-Neurosphären und Einzelzellkulturen.....	V-92
Abb. 19: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Neurosphären/Kulturen. ....	V-93
Abb. 20: Western-Blot-Analyse der Notch1-Proteolyse. ....	V-94
Abb. 21: Quantitative RT-PCR-Analyse Notch1-abhängig regulierter Gene. ....	V-95
Abb. 22: N-Cadherin-Proteolyse in primären ADAM10-defizienten Neuronen.....	V-97
Abb. 23: Western-Blot-Analyse der Nectin-1-Proteolyse in Gesamthirnlysaten an P1. ....	V-98
Abb. 24: Western-Blot-Analyse der ADAM10-Expression in Kortexlysaten von ADAM10-cKO-Mäusen. ....	V-102



Abb. 25: Grob-morphologische Charakterisierung der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-103
Abb. 26: Aufnahmen der Zuckungen und Spastiken der Vorder- und Hinterläufe einer ADAM10-cKO-Maus. ....	V-104
Abb. 27: Gewichtsverlauf der cKOs im Vergleich zu Kontrollen nach Weichfutterzugabe. ....	V-105
Abb. 28: Kaplan-Meier-Überlebensstatistik der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-106
Abb. 29: HE-Färbung koronaler Schnitte des ZNS der cKOs im Vergleich zu Kontrollen. ....	V-108
Abb. 30: Detailaufnahmen von hippokampalen Bereichen der cKOs und geeigneten Kontrollen (P24). ....	V-109
Abb. 31: NeuN-Färbung von Paraffinschnitten des ZNS von ADAM10-cKO-Mäusen. ....	V-110
Abb. 32: GFAP-Färbung koronaler Schnitte des ZNS der ADAM10-cKO-Mäuse und geeigneter Kontrollen und Western-Blot-Analyse der GFAP-Expression in kortikalen Regionen. ....	V-112
Abb. 33: Färbung des zellulären Prionproteins im Bereich des ZNS von ADAM10-cKO-Mäusen. ....	V-114
Abb. 34: Western-Blot-Analyse des zellulären Prionproteins in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-115
Abb. 35: Western-Blot-Analyse der Prozessierung von N-Cadherin und APP in kortikalen und cerebellaren Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-116
Abb. 36: Rotarod-Motorkoordinationstests der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-118
Abb. 37: <i>Passive-avoidance</i> -Test der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-119
Abb. 38: <i>Morris-water-maze</i> -Analyse mit ADAM10-cKO-Mäusen und Geschwisterkontrollen. ....	V-120
Abb. 39: LTP-Analysen der Schaffer-Kollaterale der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-122
Abb. 40: Expressionsanalyse der Untereinheiten 2A/B des NMDAR-Rezeptors in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-123
Abb. 41: Western-Blot-Analyse der GAD 67/65 und Synaptophysin Expression in kortikalen Lysaten der ADAM10-cKO-Mäuse. ....	V-124
Abb. 42: Modell zur Interaktionsanalyse von murinem ADAM10 mit einem <i>Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid</i> -Ansatz. ....	V-126
Abb. 43: Testexpression des ADAM10-Fusionskonstrukts ( <i>Bait</i> ) in Hefen. ....	V-127
Abb. 44: Interaktionsanalyse von ADAM10 und TSPAN15 in NMY51-Hefen auf -Leu/-Trp- bzw. -Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten. ....	V-129
Abb. 45: Koimmunpräzipitationsstudien von TSPAN15-myc mit ADAM10. ....	V-130
Abb. 46: Vergleich der Bandenintensitäten der Signale für ADAM10 in Lysat- und CoIP-Fractionen. ....	V-132
Abb. 47: Analyse des Einflusses von TSPAN15-myc auf ADAM10 und ADAM17. ....	V-133
Abb. 48: Immunfluoreszenzanalysen nach transienter ADAM10/TSPAN15-myc- und ADAM17/TSPAN15-myc-Überexpression. ....	V-134
Abb. 49: Lokalisationsanalyse von humanen, endogenen ADAM10 nach transienter TSPAN15-EGFP-Expression. ....	V-135
Abb. 50: Zelloberflächenbiotinylierung nach Überexpression von TSPAN15-myc in N2A-Zellen. ....	V-136
Abb. 51: qRT-PCR zur Analyse der Expression von ADAM10 und TSPAN15 in Abhängigkeit von ADAM10- und TSPAN15-myc Überexpression. ....	V-138
Abb. 52: <i>Pulse-Chase</i> -Experiment zur Analyse von ADAM10 nach TSPAN15-myc-Expression. ....	V-139
Abb. 53: N-Cadherin-Prozessierung nach ADAM10 bzw. ADAM17 und TSPAN15-myc-Transfektion. ....	V-141
Abb. 54: Analyse der löslichen APPalpha-Menge in Zellkulturüberständen TSPAN15-myc-Transfektion. ....	V-142

Abb. 55: Bestimmung der Menge an löslichem APPalpha nach TSPAN15-Knockdown in Zellkultur- überständen von N2A-Zellen. ....	V-143
Abb. 56: qRT-PCR-Experimente zur Analyse der Expression von ADAM9, ADAM17 und TSPAN12 nach TSPAN15-Knockdown. ....	V-144
Abb. 57: Untersuchung der APP-Prozessierung nach TSPAN15-EGFP-Überexpression. ....	V-145
Abb. 58: Aktivierung von ADAM10 zur Therapie von Morbus Alzheimer und potentielle Nebeneffekte. .	VI-146
Abb. 59: ADAM10 reguliert den Prozess der Neurogenese und Gliogenese. ....	VI-155
Abb. 60: Mögliche Folgen einer ADAM10-Defizienz in Neuronen des adulten ZNS. ....	VI-169
Abb. 61: ADAM10-Funktion im Organismus und ADAM10-Aktivierung als therapeutischer Ansatz. ....	VI-171
Abb. 62: Modellvorstellung der ADAM10-Regulation durch TSPAN15. ....	VI-175

## IX. 1. 2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auswahl einiger ZNS-Substrate von ADAM10 und ihrer potentiellen Funktion .....	II-18
Tab. 2: Liste der verwendeten Geräte .....	IV-36
Tab. 3: Liste der verwendeten Labor- und Verbrauchsmaterialien .....	IV-37
Tab. 4: Liste der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme .....	IV-40
Tab. 5: Liste der verwendeten Kits .....	IV-42
Tab. 6: Liste der verwendeten Oligonukleotide/Primer .....	IV-43
Tab. 7: Liste der verwendeten Antikörper.....	IV-44
Tab. 8: Liste der verwendeten sekundären Antikörper .....	IV-45
Tab. 9: Liste der verwendeten Zelllinien, Hefe- und Bakterienstämme .....	IV-46
Tab. 10: Liste der verwendeten Software.....	IV-48
Tab. 11: Liste der verwendeten Plasmide .....	IV-48
Tab. 12: Liste der verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	IV-49
Tab. 13: Klassischer Ansatz einer Genotypisierungs-PCR .....	IV-53
Tab. 14: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von ADAM10 <sup>Flox</sup> -Mäusen (Flox-PCR) .....	IV-53
Tab. 15: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von Nestin-Cre transgenen Mäusen.....	IV-54
Tab. 16: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von CamKII-Cre transgenen Mäusen .....	IV-54
Tab. 17: Klassischer Ansatz einer Klonierungs-PCR.....	IV-54
Tab. 18: PCR-Protokoll für Klonierungs-PCR.....	IV-55
Tab. 19: Größentrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration.....	IV-55
Tab. 20: Exemplarischer Ansatz eines Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII.....	IV-57
Tab. 21: Exemplarische Darstellung einer Ligationsreaktion .....	IV-57
Tab. 22: Exemplarischer Ansatz der cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA .....	IV-61
Tab. 23: Exemplarischer Ansatz einer qRT-PCR (TaqMan-System) .....	IV-61
Tab. 24: Exemplarischer Ansatz einer qRT-PCR (UPL-System) .....	IV-61
Tab. 25: Protokoll zur Durchführung von qRT-PCRs.....	IV-62
Tab. 26: Strategie zur Ohrlochmarkierung bei Mauszuchten.....	IV-65
Tab. 27: Herstellung von SDS-Gelen.....	IV-71
Tab. 28: Zusammensetzung der Medien und Lösungen für primäre neuronale Kulturen .....	IV-78

---

Tab. 29: Übersicht über die erhaltenen Genotypen der untersuchten Embryonen/Mäuse. ....	V-83
Tab. 30: Zusammenstellung der Tierzahlen und der erhaltenen Genotypen .....	V-101
Tab. 31: Auszug aus Liste der erhaltenen potentiellen Interaktionspartner .....	V-128
Tab. 32: Vollständige Liste der erhaltenen potentiellen Interaktionspartner.....	IX-181

## X. Literaturverzeichnis

- Abbenante, G., and D.P. Fairlie. 2005. Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem.* 1:71-104.
- Abbott, N.J. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 200:629-638.
- Abbott, N.J., and I.A. Romero. 1996. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today.* 2:106-113.
- Ables, J.L., N.A. Decarolis, M.A. Johnson, P.D. Rivera, Z. Gao, D.C. Cooper, F. Radtke, J. Hsieh, and A.J. Eisch. 2010. Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci.* 30:10484-10492.
- Alberi, L., Z. Chi, S.D. Kadam, J.D. Mulholland, V.L. Dawson, N. Gaiano, and A.M. Comi. 2010. Neonatal stroke in mice causes long-term changes in neuronal Notch-2 expression that may contribute to prolonged injury. *Stroke.* 41:S64-71.
- Altmeppen, H.C., J. Prox, B. Puig, M.A. Kluth, C. Bernreuther, D. Thurm, E. Jorissen, B. Petrowitz, U. Bartsch, B. De Strooper, P. Saftig, and M. Glatzel. 2011. Lack of a-disintegrin- and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener.* 6:36.
- Anders, A., S. Gilbert, W. Garten, R. Postina, and F. Fahrenholz. 2001. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 15:1837-1839.
- Angevine, J.B., Jr., and R.L. Sidman. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* 192:766-768.
- Anovadiya, A.P., J.J. Sanmukhani, and C.B. Tripathi. 2012. Epilepsy: Novel therapeutic targets. *J Pharmacol Pharmacother.* 3:112-117.
- Araque, A., and M. Navarrete. 2010. Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365:2375-2381.
- Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein, and F. Le Naour. 2008. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol.* 181:7002-7013.

Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M.E. Fortini. 1995. Notch signaling. *Science*. 268:225-232.

Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284:770-776.

Ayala, R., T. Shu, and L.H. Tsai. 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*. 128:29-43.

Bao, J., and M.N. Sack. 2010. Protein deacetylation by sirtuins: delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors. *Cell Mol Life Sci*. 67:3073-3087.

Bayer, S.A., and J. Altman. 1991. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience*. 45:391-412.

Begley, D.J., and M.W. Brightman. 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*. 61:39-78.

Berezovska, O., M.Q. Xia, and B.T. Hyman. 1998. Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 57:738-745.

Blanz, J., S. Stroobants, R. Lullmann-Rauch, W. Morelle, M. Ludemann, R. D'Hooge, H. Reuterwall, J.C. Michalski, J. Fogh, C. Andersson, and P. Saftig. 2008. Reversal of peripheral and central neural storage and ataxia after recombinant enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice. *Hum Mol Genet*. 17:3437-3445.

Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*. 90:281-291.

Bliss, T.V., and G.L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361:31-39.

Blobel, C.P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:32-43.

Bode, W., F.X. Gomis-Ruth, and W. Stockler. 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH

and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 331:134-140.

Boeuf, S., M. Borger, T. Hennig, A. Winter, P. Kasten, and W. Richter. 2009. Enhanced ITM2A expression inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 78:108-115.

Bozdagi, O., X.B. Wang, J.S. Nikitczuk, T.R. Anderson, E.B. Bloss, G.L. Radice, Q. Zhou, D.L. Benson, and G.W. Huntley. 2010. Persistence of coordinated long-term potentiation and dendritic spine enlargement at mature hippocampal CA1 synapses requires N-cadherin. *J Neurosci.* 30:9984-9989.

Bozkulak, E.C., and G. Weinmaster. 2009. Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol.* 29:5679-5695.

Bremer, J., F. Baumann, C. Tiberi, C. Wessig, H. Fischer, P. Schwarz, A.D. Steele, K.V. Toyka, K.A. Nave, J. Weis, and A. Aguzzi. 2010. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci.* 13:310-318.

Breunig, J.J., J. Silbereis, F.M. Vaccarino, N. Sestan, and P. Rakic. 2007. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:20558-20563.

Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J.R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R.A. Black, and A. Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell.* 5:207-216.

Brown, M.S., J. Ye, R.B. Rawson, and J.L. Goldstein. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 100:391-398.

Buxbaum, J.D., 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. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 273:27765-27767.

Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D.R. Borchelt, D.L. Price, and P.C. Wong. 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 4:233-234.

- Campos, L.S., A.J. Duarte, T. Branco, and D. Henrique. 2001. mDII1 and mDII3 expression in the developing mouse brain: role in the establishment of the early cortex. *J Neurosci Res.* 64:590-598.
- Casanova, E., S. Fehsenfeld, T. Mantamadiotis, T. Lemberger, E. Greiner, A.F. Stewart, and G. Schutz. 2001. A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis.* 31:37-42.
- Chalaris, A., N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Hasler, C. Becker, M.F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller, and S. Rose-John. 2010. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med.* 207:1617-1624.
- Chantry, A., N. Gregson, and P. Glynn. 1992. Degradation of myelin basic protein by a membrane-associated metalloprotease: neural distribution of the enzyme. *Neurochem Res.* 17:861-867.
- Chantry, A., N.A. Gregson, and P. Glynn. 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 264:21603-21607.
- Chasseigneaux, S., and B. Allinquant. 2012. Functions of Abeta, sAPPalpha and sAPPbeta : similarities and differences. *J Neurochem.* 120 Suppl 1:99-108.
- Chasseigneaux, S., L. Dinc, C. Rose, C. Chabret, F. Couplier, P. Topilko, G. Mauger, and B. Allinquant. 2011. Secreted amyloid precursor protein beta and secreted amyloid precursor protein alpha induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One.* 6:e16301.
- Chenn, A., and C.A. Walsh. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science.* 297:365-369.
- Chojnacki, A., and S. Weiss. 2008. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc.* 3:935-940.
- Chow, V.W., M.P. Mattson, P.C. Wong, and M. Gleichmann. 2010. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* 12:1-12.
- Citron, M. 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov.* 9:387-398.

- Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop, and D.J. Selkoe. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* 3:67-72.
- Clarris, H.J., R. Cappai, D. Heffernan, K. Beyreuther, C.L. Masters, and D.H. Small. 1997. Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J Neurochem.* 68:1164-1172.
- Collingridge, G.L., J.T. Isaac, and Y.T. Wang. 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 5:952-962.
- Conlon, R.A., A.G. Reaume, and J. Rossant. 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development.* 121:1533-1545.
- Corbin, J.G., N. Gaiano, S.L. Juliano, S. Poluch, E. Stancik, and T.F. Haydar. 2008. Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem.* 106:2272-2287.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261:921-923.
- Costa, R.M., T. Honjo, and A.J. Silva. 2003. Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol.* 13:1348-1354.
- Cull-Candy, S.G., and D.N. Leszkiewicz. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE.* 2004:re16.
- Dalva, M.B., A.C. McClelland, and M.S. Kayser. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 8:206-220.
- de la Pompa, J.L., A. Wakeham, K.M. Correia, E. Samper, S. Brown, R.J. Aguilera, T. Nakano, T. Honjo, T.W. Mak, J. Rossant, and R.A. Conlon. 1997. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development.* 124:1139-1148.
- De Strooper, B., and G. Konig. 1999. Alzheimer's disease. A firm base for drug development. *Nature.* 402:471-472.



- De Strooper, B., L. Umans, F. Van Leuven, and H. Van Den Berghe. 1993. Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J Cell Biol.* 121:295-304.
- Delwig, A., and M.D. Rand. 2008. Kuz and TACE can activate Notch independent of ligand. *Cell Mol Life Sci.* 65:2232-2243.
- Deuss, M., K. Reiss, and D. Hartmann. 2008. Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res.* 5:187-201.
- Dominguez, D., J. Tournoy, D. Hartmann, T. Huth, K. Cryns, S. Deforce, L. Serneels, I.E. Camacho, E. Marjaux, K. Craessaerts, A.J. Roebroek, M. Schwake, R. D'Hooze, P. Bach, U. Kalinke, D. Moechars, C. Alzheimer, K. Reiss, P. Saftig, and B. De Strooper. 2005. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem.* 280:30797-30806.
- Donmez, G., D. Wang, D.E. Cohen, and L. Guarente. 2010. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell.* 142:320-332.
- Duff, K., C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C.M. Prada, J. Perez-tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, D. Morgan, M.N. Gordon, L. Holcomb, L. Refolo, B. Zenk, J. Hardy, and S. Younkin. 1996. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 383:710-713.
- Dunn, C.D., M.L. Sulis, A.A. Ferrando, and I. Greenwald. 2010. A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in *Caenorhabditis elegans* and in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:5907-5912.
- Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz, and R. Postina. 2003. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem.* 270:2386-2393.
- Endres, K., and F. Fahrenholz. 2010. Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope? *FEBS J.* 277:1585-1596.
- Epis, R., E. Marcello, F. Gardoni, C. Vastagh, M. Malinverno, C. Balducci, A. Colombo, B. Borroni, H. Vara, M. Dell'Agli, F. Cattabeni, M. Giustetto, T. Borsello, G. Forloni, A.

- Padovani, and M. Di Luca. 2010. Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain*. 133:3323-3335.
- Esch, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 248:1122-1124.
- Escrevente, C., V.A. Morais, S. Keller, C.M. Soares, P. Altevogt, and J. Costa. 2008. Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1780:905-913.
- Fambrough, D., D. Pan, G.M. Rubin, and C.S. Goodman. 1996. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13233-13238.
- Fannon, A.M., and D.R. Colman. 1996. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron*. 17:423-434.
- Fishell, G., and A.R. Kriegstein. 2003. Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol*. 13:34-41.
- Fluhrer, R., L. Martin, B. Klier, M. Haug-Kroper, G. Grammer, B. Nuscher, and C. Haass. 2012. The alpha-helical content of the transmembrane domain of the British dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b). *J Biol Chem*. 287:5156-5163.
- Forni, P.E., C. Scuoppo, I. Imayoshi, R. Taulli, W. Dastru, V. Sala, U.A. Betz, P. Muzzi, D. Martinuzzi, A.E. Vercelli, R. Kageyama, and C. Ponzetto. 2006. High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly. *J Neurosci*. 26:9593-9602.
- Fotinoupolou, A., M. Tsachaki, M. Vlavaki, A. Pouloupoulos, A. Rostagno, B. Frangione, J. Ghiso, and S. Efthimiopoulos. 2005. BRI2 interacts with amyloid precursor protein (APP) and regulates amyloid beta (A $\beta$ ) production. *J Biol Chem*. 280:30768-30772.
- Franzke, C.W., C. Cobzaru, A. Triantafyllopoulou, S. Loffek, K. Horiuchi, D.W. Threadgill, T. Kurz, N. van Rooijen, L. Bruckner-Tuderman, and C.P. Blobel. 2012. Epidermal ADAM17

maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *J Exp Med.* 209:1105-1119.

Gaiano, N., J.S. Nye, and G. Fishell. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron.* 26:395-404.

Gardoni, F., D. Mauceri, C. Fiorentini, C. Bellone, C. Missale, F. Cattabeni, and M. Di Luca. 2003. CaMKII-dependent phosphorylation regulates SAP97/NR2A interaction. *J Biol Chem.* 278:44745-44752.

Gaveriaux-Ruff, C., and B.L. Kieffer. 2007. Conditional gene targeting in the mouse nervous system: Insights into brain function and diseases. *Pharmacol Ther.* 113:619-634.

Givogri, M.I., R.M. Costa, V. Schonmann, A.J. Silva, A.T. Campagnoni, and E.R. Bongarzone. 2002. Central nervous system myelination in mice with deficient expression of Notch1 receptor. *J Neurosci Res.* 67:309-320.

Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349:704-706.

Gomis-Ruth, F.X. 2009. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem.* 284:15353-15357.

Gonzales, P.E., A. Solomon, A.B. Miller, M.A. Leesnitzer, I. Sagi, and M.E. Milla. 2004. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem.* 279:31638-31645.

Gotz, M., and W.B. Huttner. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:777-788.

Gotz, M., and L. Sommer. 2005. Cortical development: the art of generating cell diversity. *Development.* 132:3327-3332.

Grandbarbe, L., J. Bouissac, M. Rand, M. Hrabe de Angelis, S. Artavanis-Tsakonas, and E. Mohier. 2003. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development.* 130:1391-1402.

- Grosshans, D.R., D.A. Clayton, S.J. Coultrap, and M.D. Browning. 2002. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat Neurosci.* 5:27-33.
- Gupta, A., L.H. Tsai, and A. Wynshaw-Boris. 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet.* 3:342-355.
- Gutierrez-Lopez, M.D., A. Gilsanz, M. Yanez-Mo, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Dominguez, P.N. Monk, I. Gonzalez-Alvaro, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2011. The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci.* 68:3275-3292.
- Gutwein, P., S. Mechttersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel, and D.P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17:292-294.
- Haass, C., A.Y. Hung, D.J. Selkoe, and D.B. Teplow. 1994. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem.* 269:17741-17748.
- Haass, C., and D.J. Selkoe. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:101-112.
- Halim, N.D., C.S. Weickert, B.W. McClintock, T.M. Hyde, D.R. Weinberger, J.E. Kleinman, and B.K. Lipska. 2003. Presynaptic proteins in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and rats with abnormal prefrontal development. *Mol Psychiatry.* 8:797-810.
- Harney, J.P., J. Madara, and H. I'Anson. 2002. Effects of acute inhibition of fatty acid oxidation on latency to seizure and concentrations of beta hydroxybutyrate in plasma of rats maintained on calorie restriction and/or the ketogenic diet. *Epilepsy Res.* 49:239-246.
- Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins, and M. Gotz. 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol.* 229:15-30.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 11:2615-2624.

- Haubensak, W., A. Attardo, W. Denk, and W.B. Huttner. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:3196-3201.
- Hemler, M.E. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:397-422.
- Hemler, M.E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:801-811.
- Hemler, M.E. 2008. Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov*. 7:747-758.
- Hendriks, L., C.M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M.G. McInnis, S.E. Antonarakis, J.J. Martin, and et al. 1992. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1:218-221.
- Hirabayashi, Y., Y. Itoh, H. Tabata, K. Nakajima, T. Akiyama, N. Masuyama, and Y. Gotoh. 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*. 131:2791-2801.
- Holback, S., L. Adlerz, and K. Iverfeldt. 2005. Increased processing of APLP2 and APP with concomitant formation of APP intracellular domains in BDNF and retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 95:1059-1068.
- Holcomb, L., M.N. Gordon, E. McGowan, X. Yu, S. Benkovic, P. Jantzen, K. Wright, I. Saad, R. Mueller, D. Morgan, S. Sanders, C. Zehr, K. O'Campo, J. Hardy, C.M. Prada, C. Eckman, S. Younkin, K. Hsiao, and K. Duff. 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*. 4:97-100.
- Howard, L., X. Lu, S. Mitchell, S. Griffiths, and P. Glynn. 1996. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J*. 317 ( Pt 1):45-50.
- Hrabe de Angelis, M., J. McIntyre, 2nd, and A. Gossler. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. *Nature*. 386:717-721.

- Huang, Y.H., and D.E. Bergles. 2004. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol.* 14:346-352.
- Huppert, S.S., A. Le, E.H. Schroeter, J.S. Mumm, M.T. Saxena, L.A. Milner, and R. Kopan. 2000. Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature.* 405:966-970.
- Hussain, I., D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14:419-427.
- Huttner, W.B., and M. Brand. 1997. Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol.* 7:29-39.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, M. Yamaguchi, K. Mori, and R. Kageyama. 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci.* 30:3489-3498.
- Janes, P.W., N. Saha, W.A. Barton, M.V. Kolev, S.H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C.P. Blobel, J.P. Himanen, M. Lackmann, and D.B. Nikolov. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell.* 123:291-304.
- Janzer, R.C., and M.C. Raff. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 325:253-257.
- Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr. 1993. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 695:144-148.
- Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E.H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. 1995. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature.* 377:355-358.
- Jordan, B.A., B.D. Fernholz, M. Boussac, C. Xu, G. Grigorean, E.B. Ziff, and T.A. Neubert. 2004. Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol Cell Proteomics.* 3:857-871.
- Jorissen, E., J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C.P. Blobel, M. Glatzel, B. De

- Strooper, and P. Saftig. 2010. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci.* 30:4833-4844.
- Jorundsson, E., J.H. Lumsden, and R.M. Jacobs. 1999. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Vet Clin Pathol.* 28:100-108.
- Kageyama, R., and T. Ohtsuka. 1999. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res.* 9:179-188.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, H. Shimojo, and I. Imayoshi. 2008. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci.* 11:1247-1251.
- Kamakura, S., K. Oishi, T. Yoshimatsu, M. Nakafuku, N. Masuyama, and Y. Gotoh. 2004. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol.* 6:547-554.
- Karkkainen, I., E. Rybnikova, M. Pelto-Huikko, and A.P. Huovila. 2000. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci.* 15:547-560.
- Kim, J., C. Lilliehook, A. Dudak, J. Prox, P. Saftig, H.J. Federoff, and S.T. Lim. 2010. Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem.* 285:22919-22926.
- Kim, J., V.M. Miller, Y. Levites, K.J. West, C.W. Zwizinski, B.D. Moore, F.J. Troendle, M. Bann, C. Verbeeck, R.W. Price, L. Smithson, L. Sonoda, K. Wagg, V. Rangachari, F. Zou, S.G. Younkin, N. Graff-Radford, D. Dickson, T. Rosenberry, and T.E. Golde. 2008. BRI2 (ITM2b) inhibits Abeta deposition in vivo. *J Neurosci.* 28:6030-6036.
- Kim, W.Y., and J. Shen. 2008. Presenilins are required for maintenance of neural stem cells in the developing brain. *Mol Neurodegener.* 3:2.
- Kim, W.Y., X. Wang, Y. Wu, B.W. Doble, S. Patel, J.R. Woodgett, and W.D. Snider. 2009. GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci.* 12:1390-1397.
- Kitadokoro, K., D. Bordo, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, S. Abrignani, G. Grandi, and M. Bolognesi. 2001. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.* 20:12-18.

- Klein, T. 2002. kuzbanian is required cell autonomously during Notch signalling in the *Drosophila* wing. *Dev Genes Evol.* 212:251-255.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T.C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki, and S. Ishiura. 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J.* 343 Pt 2:371-375.
- Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137:216-233.
- Kopan, R., and D.L. Turner. 1996. The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol.* 6:594-601.
- Kriegstein, A.R., and M. Gotz. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* 43:37-43.
- Kriegstein, A.R., and S.C. Noctor. 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27:392-399.
- Kuhn, P.H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J.W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, and S.F. Lichtenthaler. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29:3020-3032.
- Kukar, T., and T.E. Golde. 2008. Possible mechanisms of action of NSAIDs and related compounds that modulate gamma-secretase cleavage. *Curr Top Med Chem.* 8:47-53.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Jahn. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3922-3927.
- Lan, J.Y., V.A. Skeberdis, T. Jover, S.Y. Grooms, Y. Lin, R.C. Araneda, X. Zheng, M.V. Bennett, and R.S. Zukin. 2001. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci.* 4:382-390.
- Lau, C.G., and R.S. Zukin. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8:413-426.



- Le Naour, F., M. Andre, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006a. Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics*. 6:6447-6454.
- Le Naour, F., M. Andre, C. Greco, M. Billard, B. Sordat, J.F. Emile, F. Lanza, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006b. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics*. 5:845-857.
- Leander, J.D., R.R. Lawson, P.L. Ornstein, and D.M. Zimmerman. 1988. N-methyl-D-aspartic acid-induced lethality in mice: selective antagonism by phencyclidine-like drugs. *Brain Res*. 448:115-120.
- Lesne, S., M.T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C.G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, and K.H. Ashe. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 440:352-357.
- Letourneur, F., S. Hennecke, C. Demolliere, and P. Cosson. 1995. Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Cell Biol*. 129:971-978.
- Levy, E., M.D. Carman, I.J. Fernandez-Madrid, M.D. Power, I. Lieberburg, S.G. van Duinen, G.T. Bots, W. Luyendijk, and B. Frangione. 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 248:1124-1126.
- Li, Z., and M. Sheng. 2003. Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:833-841.
- Lichtenthaler, S.F. 2011. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem*. 116:10-21.
- Lisman, J., and S. Raghavachari. 2006. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Sci STKE*. 2006:re11.
- Litterst, C., A. Georgakopoulos, J. Shioi, E. Ghersi, T. Wisniewski, R. Wang, A. Ludwig, and N.K. Robakis. 2007. Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J Biol Chem*. 282:16155-16163.
- Lopez-Perez, E., N.G. Seidah, and F. Checler. 1999. Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human

cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J Neurochem.* 73:2056-2062.

Lopez-Perez, E., Y. Zhang, S.J. Frank, J. Creemers, N. Seidah, and F. Checler. 2001. Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem.* 76:1532-1539.

Luo, Y., B. Bolon, S. Kahn, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J.C. Louis, Q. Yan, W.G. Richards, M. Citron, and R. Vassar. 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci.* 4:231-232.

Lutolf, S., F. Radtke, M. Aguet, U. Suter, and V. Taylor. 2002. Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development.* 129:373-385.

Ma, J., and S. Lindquist. 2001. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14955-14960.

Malenka, R.C. 2003. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci.* 1003:1-11.

Malinow, R., and R.C. Malenka. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 25:103-126.

Malinverno, M., M. Carta, R. Epis, E. Marcello, C. Verpelli, F. Cattabeni, C. Sala, C. Mulle, M. Di Luca, and F. Gardoni. 2010. Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J Neurosci.* 30:16343-16355.

Marcello, E., F. Gardoni, M. Di Luca, and I. Perez-Otano. 2010. An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 285:10376-10384.

Marcinkiewicz, M., and N.G. Seidah. 2000. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem.* 75:2133-2143.

Martin, L., R. Fluhner, K. Reiss, E. Kremmer, P. Saftig, and C. Haass. 2008. Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem.* 283:1644-1652.

- Mauceri, D., F. Cattabeni, M. Di Luca, and F. Gardoni. 2004. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation drives synapse-associated protein 97 into spines. *J Biol Chem.* 279:23813-23821.
- McConlogue, L., M. Buttini, J.P. Anderson, E.F. Brigham, K.S. Chen, S.B. Freedman, D. Games, K. Johnson-Wood, M. Lee, M. Zeller, W. Liu, R. Motter, and S. Sinha. 2007. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem.* 282:26326-26334.
- McConnell, S.K. 1995a. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron.* 15:761-768.
- McConnell, S.K. 1995b. Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *J Neurosci.* 15:6987-6998.
- McDonell, M.W., M.N. Simon, and F.W. Studier. 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol.* 110:119-146.
- McGeer, P.L., and E.G. McGeer. 2007. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging.* 28:639-647.
- Metaa, M.R., and E.A. Newman. 2006. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci.* 26:2862-2870.
- Milano, J., J. McKay, C. Dagenais, L. Foster-Brown, F. Pognan, R. Gadiant, R.T. Jacobs, A. Zacco, B. Greenberg, and P.J. Ciaccio. 2004. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci.* 82:341-358.
- Miller, F.D., and A.S. Gauthier. 2007. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron.* 54:357-369.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, K. Saito, M. Kawano, T. Muto, and M. Ogawa. 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development.* 131:3133-3145.
- Moechars, D., K. Lorent, B. De Strooper, I. Dewachter, and F. Van Leuven. 1996. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed

behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15:1265-1274.

Moechars, D., K. Lorent, and F. Van Leuven. 1999. Premature death in transgenic mice that overexpress a mutant amyloid precursor protein is preceded by severe neurodegeneration and apoptosis. *Neuroscience.* 91:819-830.

Morris, R.G., E. Anderson, G.S. Lynch, and M. Baudry. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319:774-776.

Moss, M.L., M. Bomar, Q. Liu, H. Sage, P. Dempsey, P.M. Lenhart, P.A. Gillispie, A. Stoeck, D. Wildeboer, J.W. Bartsch, R. Palmisano, and P. Zhou. 2007. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem.* 282:35712-35721.

Mott, D.D., J.J. Doherty, S. Zhang, M.S. Washburn, M.J. Fendley, P. Lyuboslavsky, S.F. Traynelis, and R. Dingledine. 1998. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci.* 1:659-667.

Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116:201-211.

Mumm, J.S., and R. Kopan. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol.* 228:151-165.

Murphy, G. 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 8:929-941.

Murthy, A., Y.W. Shao, S.R. Narala, S.D. Molyneux, J.C. Zuniga-Pflucker, and R. Khokha. 2012. Notch activation by the metalloproteinase ADAM17 regulates myeloproliferation and atopic barrier immunity by suppressing epithelial cytokine synthesis. *Immunity.* 36:105-119.

Mutch, C.A., J.D. Schulte, E. Olson, and A. Chenn. 2010. Beta-catenin signaling negatively regulates intermediate progenitor population numbers in the developing cortex. *PLoS One.* 5:e12376.

Nakajima, M., S. Yuasa, M. Ueno, N. Takakura, H. Koseki, and T. Shirasawa. 2003. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev.* 120:657-667.

- Namihira, M., J. Kohyama, K. Semi, T. Sanosaka, B. Deneen, T. Taga, and K. Nakashima. 2009. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell*. 16:245-255.
- Nery, S., G. Fishell, and J.G. Corbin. 2002. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci*. 5:1279-1287.
- Noctor, S.C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, and A.R. Kriegstein. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*. 7:136-144.
- Nye, J.S., R. Kopan, and R. Axel. 1994. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development*. 120:2421-2430.
- Obrdlik, P., M. El-Bakkoury, T. Hamacher, C. Cappellaro, C. Vilarino, C. Fleischer, H. Ellerbrok, R. Kamuzinzi, V. Ledent, D. Blaudez, D. Sanders, J.L. Revuelta, E. Boles, B. Andre, and W.B. Frommer. 2004. K<sup>+</sup> channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:12242-12247.
- Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B.P. Tseng, and F.M. LaFerla. 2003a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24:1063-1070.
- Oddo, S., A. Caccamo, J.D. Shepherd, M.P. Murphy, T.E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M.P. Mattson, Y. Akbari, and F.M. LaFerla. 2003b. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39:409-421.
- Oka, C., T. Nakano, A. Wakeham, J.L. de la Pompa, C. Mori, T. Sakai, S. Okazaki, M. Kawaichi, K. Shiota, T.W. Mak, and T. Honjo. 1995. Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development*. 121:3291-3301.
- Oya, S., G. Yoshikawa, K. Takai, J.I. Tanaka, S. Higashiyama, N. Saito, T. Kirino, and N. Kawahara. 2009. Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. *Neuroscience*. 158:683-692.

Oyagi, A., S. Moriguchi, A. Nitta, K. Murata, Y. Oida, K. Tsuruma, M. Shimazawa, K. Fukunaga, and H. Hara. 2011a. Heparin-binding EGF-like growth factor is required for synaptic plasticity and memory formation. *Brain Res.* 1419:97-104.

Oyagi, A., N. Morimoto, J. Hamanaka, M. Ishiguro, K. Tsuruma, M. Shimazawa, and H. Hara. 2011b. Forebrain specific heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor knockout mice show exacerbated ischemia and reperfusion injury. *Neuroscience.* 185:116-124.

Oyagi, A., Y. Oida, K. Kakefuda, M. Shimazawa, N. Shioda, S. Moriguchi, K. Kitaichi, D. Nanba, K. Yamaguchi, Y. Furuta, K. Fukunaga, S. Higashiyama, and H. Hara. 2009. Generation and characterization of conditional heparin-binding EGF-like growth factor knockout mice. *PLoS One.* 4:e7461.

Paitel, E., R. Fahraeus, and F. Checler. 2003. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J Biol Chem.* 278:10061-10066.

Pan, D., and G.M. Rubin. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell.* 90:271-280.

Park, H.C., and B. Appel. 2003. Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development.* 130:3747-3755.

Parkin, E., and B. Harris. 2009. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-mediated ectodomain shedding of ADAM10. *J Neurochem.* 108:1464-1479.

Peng, J., M.J. Kim, D. Cheng, D.M. Duong, S.P. Gygi, and M. Sheng. 2004. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem.* 279:21003-21011.

Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 282:1281-1284.

Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven, and F.

- Fahrenholz. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 113:1456-1464.
- Prinzen, C., U. Muller, K. Endres, F. Fahrenholz, and R. Postina. 2005. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 19:1522-1524.
- Prox, J., A. Rittger, and P. Saftig. 2012a. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and Presenilin. *Exp Brain Res.* 217:331-341.
- Prox, J., M. Willenbrock, S. Weber, T. Lehmann, D. Schmidt-Arras, R. Schwanbeck, P. Saftig, and M. Schwake. 2012b. Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci.*
- Prusiner, S.B. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:13363-13383.
- Puente, X.S., and C. Lopez-Otin. 2004. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *In Genome Res.* Vol. 14. 609-622.
- Puente, X.S., L.M. Sanchez, C.M. Overall, and C. Lopez-Otin. 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 4:544-558.
- Qi, H., M.D. Rand, X. Wu, N. Sestan, W. Wang, P. Rakic, T. Xu, and S. Artavanis-Tsakonas. 1999. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science.* 283:91-94.
- Racine, R.J., J.G. Gartner, and W.M. Burnham. 1972. Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain Res.* 47:262-268.
- Rakic, P. 1982. Early developmental events: cell lineages, acquisition of neuronal positions, and areal and laminar development. *Neurosci Res Program Bull.* 20:439-451.
- Rawlings, N.D., D.P. Tolle, and A.J. Barrett. 2004. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32:D160-164.
- Redmond, L., S.R. Oh, C. Hicks, G. Weinmaster, and A. Ghosh. 2000. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat Neurosci.* 3:30-40.
- Reiss, K., T. Maretzky, I.G. Haas, M. Schulte, A. Ludwig, M. Frank, and P. Saftig. 2006. Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 281:21735-21744.

- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24:742-752.
- Reiss, K., and P. Saftig. 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol.* 20:126-137.
- Reynolds, B.A., and S. Weiss. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* 175:1-13.
- Rieckmann, P., and B. Engelhardt. 2003. Building up the blood-brain barrier. *Nat Med.* 9:828-829.
- Ring, S., S.W. Weyer, S.B. Kilian, E. Waldron, C.U. Pietrzik, M.A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C.B. Eckman, M. Korte, D.P. Wolfer, and U.C. Muller. 2007. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* 27:7817-7826.
- Risau, W., and H. Wolburg. 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13:174-178.
- Roberds, S.L., J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D.G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappenman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.F. Nichols, M. Power, D.W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G.M. Shopp, M.E. Shuck, S. Sinha, K.A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, and L. McConlogue. 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet.* 10:1317-1324.
- Rogaev, E.I., R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, and et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376:775-778.
- Rooke, J., D. Pan, T. Xu, and G.M. Rubin. 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science.* 273:1227-1231.



- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerriere, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, and D. Campion. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* 38:24-26.
- Saftig, P., and K. Reiss. 2011. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol.* 90:527-535.
- Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 324:163-166.
- Sakimura, K., T. Kutsuwada, I. Ito, T. Manabe, C. Takayama, E. Kushiya, T. Yagi, S. Aizawa, Y. Inoue, H. Sugiyama, and et al. 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature.* 373:151-155.
- Samuels, S.C., and K.L. Davis. 1998. Experimental approaches to cognitive disturbance in Alzheimer's disease. *Harv Rev Psychiatry.* 6:11-22.
- Saura, C.A., S.Y. Choi, V. Beglopoulos, S. Malkani, D. Zhang, B.S. Shankaranarayana Rao, S. Chattarji, R.J. Kelleher, 3rd, E.R. Kandel, K. Duff, A. Kirkwood, and J. Shen. 2004. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron.* 42:23-36.
- Sauvageot, C.M., and C.D. Stiles. 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 12:244-249.
- Schipke, C.G., and H. Kettenmann. 2004. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia.* 47:226-232.
- Schlondorff, J., J.D. Becherer, and C.P. Blobel. 2000. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J.* 347 Pt 1:131-138.
- Schousboe, A. 2003. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res.* 28:347-352.
- Schulte, A., B. Schulz, M.G. Andrzejewski, C. Hundhausen, S. Mletzko, J. Achilles, K. Reiss, K. Paliga, C. Weber, S.R. John, and A. Ludwig. 2007. Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases. *Biochem Biophys Res Commun.* 358:233-240.

- Seifert, G., K. Schilling, and C. Steinhauser. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci.* 7:194-206.
- Seigneuret, M., A. Delaguillaumie, C. Lagaudriere-Gesbert, and H. Conjeaud. 2001. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem.* 276:40055-40064.
- Selkoe, D.J., and M.S. Wolfe. 2007. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell.* 131:215-221.
- Shapiro, L., and D.R. Colman. 1998. Structural biology of cadherins in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 8:593-599.
- Shapiro, L., and D.R. Colman. 1999. The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron.* 23:427-430.
- Shen, J., R.T. Bronson, D.F. Chen, W. Xia, D.J. Selkoe, and S. Tonegawa. 1997. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell.* 89:629-639.
- Sherrington, R., E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J.F. Foncin, A.C. Bruni, M.P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R.J. Polinsky, W. Wasco, H.A. Da Silva, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, R.E. Tanzi, A.D. Roses, P.E. Fraser, J.M. Rommens, and P.H. St George-Hyslop. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375:754-760.
- Simpson, P. 1990. Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development.* 109:509-519.
- Singer, O., R.A. Marr, E. Rockenstein, L. Crews, N.G. Coufal, F.H. Gage, I.M. Verma, and E. Masliah. 2005. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci.* 8:1343-1349.
- Sinha, S., J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, and V. John. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature.* 402:537-540.

- Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel, and F. Logeat. 2003. The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:7638-7643.
- Small, D.H., V. Nurcombe, G. Reed, H. Clarris, R. Moir, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*. 14:2117-2127.
- Sofroniew, M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 32:638-647.
- Sotillos, S., F. Roch, and S. Campuzano. 1997. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs. *Development*. 124:4769-4779.
- Standley, S., K.W. Roche, J. McCallum, N. Sans, and R.J. Wenthold. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron*. 28:887-898.
- Stanton, P.K., J. Winterer, X.L. Zhang, and W. Muller. 2005. Imaging LTP of presynaptic release of FM1-43 from the rapidly recycling vesicle pool of Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci*. 22:2451-2461.
- Steele, A.D., J.G. Emsley, P.H. Ozdinler, S. Lindquist, and J.D. Macklis. 2006. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:3416-3421.
- Suter, B., D. Auerbach, and I. Stagljar. 2006. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques*. 40:625-644.
- Sweatt, J.D. 1999. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem*. 6:399-416.
- Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F.F. del Amo, G. Weinmaster, and T. Gridley. 1994. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev*. 8:707-719.
- Sydow, A., A. Van der Jeugd, F. Zheng, T. Ahmed, D. Balschun, O. Petrova, D. Drexler, L. Zhou, G. Rune, E. Mandelkow, R. D'Hooge, C. Alzheimer, and E.M. Mandelkow. 2011. Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci*. 31:2511-2525.

- Tabuchi, K., G. Chen, T.C. Sudhof, and J. Shen. 2009. Conditional forebrain inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. *J Neurosci.* 29:7290-7301.
- Takahashi, T., R.S. Nowakowski, and V.S. Caviness, Jr. 1995. Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci.* 15:6058-6068.
- Takahashi, T., R.S. Nowakowski, and V.S. Caviness, Jr. 1996. Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci.* 16:5762-5776.
- Tanigaki, K., F. Nogaki, J. Takahashi, K. Tashiro, H. Kurooka, and T. Honjo. 2001. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron.* 29:45-55.
- Thaminy, S., D. Auerbach, A. Arnoldo, and I. Stajlar. 2003. Identification of novel ErbB3-interacting factors using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Genome Res.* 13:1744-1753.
- Tippmann, F., J. Hundt, A. Schneider, K. Endres, and F. Fahrenholz. 2009. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* 23:1643-1654.
- Tiwari-Woodruff, S.K., A.G. Buznikov, T.Q. Vu, P.E. Micevych, K. Chen, H.I. Kornblum, and J.M. Bronstein. 2001. OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 153:295-305.
- Tiwari-Woodruff, S.K., R. Kaplan, H.I. Kornblum, and J.M. Bronstein. 2004. Developmental expression of OAP-1/Tspan-3, a member of the tetraspanin superfamily. *J Neurosci Res.* 77:166-173.
- Tousseyn, T., E. Jorissen, K. Reiss, and D. Hartmann. 2006. (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 78:24-46.
- Tousseyn, T., A. Thathiah, E. Jorissen, T. Raemaekers, U. Konietzko, K. Reiss, E. Maes, A. Snellinx, L. Serneels, O. Nyabi, W. Annaert, P. Saftig, D. Hartmann, and B. De Strooper.

2009. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem.* 284:11738-11747.

Tronche, F., C. Kellendonk, O. Kretz, P. Gass, K. Anlag, P.C. Orban, R. Bock, R. Klein, and G. Schutz. 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 23:99-103.

Turk, B. 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 5:785-799.

Uchida, N., Y. Honjo, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and M. Takeichi. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol.* 135:767-779.

Uylings, H.B., and C.G. van Eden. 1990. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res.* 85:31-62.

Van der Jeugd, A., T. Ahmed, S. Burnouf, K. Belarbi, M. Hamdame, M.E. Grosjean, S. Humez, D. Balschun, D. Blum, L. Buee, and R. D'Hooge. 2011. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem.* 95:296-304.

Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286:735-741.

Vidal, R., B. Frangione, A. Rostagno, S. Mead, T. Revesz, G. Plant, and J. Ghiso. 1999. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature.* 399:776-781.

Vidal, R., T. Revesz, A. Rostagno, E. Kim, J.L. Holton, T. Bek, M. Bojsen-Moller, H. Braendgaard, G. Plant, J. Ghiso, and B. Frangione. 2000. A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4920-4925.

Waites, C.L., A.M. Craig, and C.C. Garner. 2005. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci.* 28:251-274.

Wallraff, A., R. Kohling, U. Heinemann, M. Theis, K. Willecke, and C. Steinhauser. 2006. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci.* 26:5438-5447.

Wang, B., J. Pelletier, M.J. Massaad, A. Herscovics, and G.C. Shore. 2004. The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol Cell Biol.* 24:2767-2778.

Wang, X., S.L. Bowers, F. Wang, X.A. Pu, R.J. Nelson, and J. Ma. 2009a. Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1792:555-563.

Wang, X., X. Mao, L. Xie, D.A. Greenberg, and K. Jin. 2009b. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29:1644-1654.

Weber, S., M.T. Niessen, J. Prox, R. Lullmann-Rauch, A. Schmitz, R. Schwanbeck, C.P. Blobel, E. Jorissen, B. de Strooper, C.M. Niessen, and P. Saftig. 2011. The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development.* 138:495-505.

Weggen, S., J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde, and E.H. Koo. 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature.* 414:212-216.

Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke. 1991. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development.* 113:199-205.

Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke. 1992. Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development.* 116:931-941.

Wen, C., M.M. Metzstein, and I. Greenwald. 1997. SUP-17, a Caenorhabditis elegans ADAM protein related to Drosophila KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development.* 124:4759-4767.

- Wenzel, A., J.M. Fritschy, H. Mohler, and D. Benke. 1997. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem.* 68:469-478.
- Weskamp, G., H. Cai, T.A. Brodie, S. Higashyama, K. Manova, T. Ludwig, and C.P. Blobel. 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol.* 22:1537-1544.
- Weyer, A., and K. Schilling. 2003. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res.* 73:400-409.
- Wines-Samuelson, M., M. Handler, and J. Shen. 2005. Role of presenilin-1 in cortical lamination and survival of Cajal-Retzius neurons. *Dev Biol.* 277:332-346.
- Wodarz, A., and W.B. Huttner. 2003. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev.* 120:1297-1309.
- Wolfsberg, T.G., P. Primakoff, D.G. Myles, and J.M. White. 1995a. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol.* 131:275-278.
- Wolfsberg, T.G., P.D. Straight, R.L. Gerena, A.P. Huovila, P. Primakoff, D.G. Myles, and J.M. White. 1995b. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol.* 169:378-383.
- Wong, G.T., D. Manfra, F.M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J.S. Fine, H.J. Lee, L. Zhang, G.A. Higgins, and E.M. Parker. 2004. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem.* 279:12876-12882.
- Wong, P.C., H. Zheng, H. Chen, M.W. Becher, D.J. Sirinathsinghji, M.E. Trumbauer, H.Y. Chen, D.L. Price, L.H. Van der Ploeg, and S.S. Sisodia. 1997. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature.* 387:288-292.
- Woodhead, G.J., C.A. Mutch, E.C. Olson, and A. Chenn. 2006. Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *J Neurosci.* 26:12620-12630.
- Wu, Y., Y. Liu, E.M. Levine, and M.S. Rao. 2003. Hes1 but not Hes5 regulates an astrocyte versus oligodendrocyte fate choice in glial restricted precursors. *Dev Dyn.* 226:675-689.

- Xiao, M.J., Z. Han, B. Shao, and K. Jin. 2009. Notch signaling and neurogenesis in normal and stroke brain. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 1:192-202.
- Xu, D., C. Sharma, and M.E. Hemler. 2009. Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB J.* 23:3674-3681.
- Yan, A., E. Wu, and W.J. Lennarz. 2005. Studies of yeast oligosaccharyl transferase subunits using the split-ubiquitin system: topological features and in vivo interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:7121-7126.
- Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature.* 402:533-537.
- Yan, Y., K. Shirakabe, and Z. Werb. 2002. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol.* 158:221-226.
- Yanez-Mo, M., M.D. Gutierrez-Lopez, and C. Cabanas. 2011. Functional interplay between tetraspanins and proteases. *Cell Mol Life Sci.* 68:3323-3335.
- Yang, X., R. Klein, X. Tian, H.T. Cheng, R. Kopan, and J. Shen. 2004. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol.* 269:81-94.
- Yedidia, Y., L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai, and A. Taraboulos. 2001. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J.* 20:5383-5391.
- Yong, V.W. 2005. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 6:931-944.
- Yoon, K., and N. Gaiano. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci.* 8:709-715.
- Yoon, K.J., B.K. Koo, S.K. Im, H.W. Jeong, J. Ghim, M.C. Kwon, J.S. Moon, T. Miyata, and Y.Y. Kong. 2008. Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron.* 58:519-531.



- Yoshimura, Y., Y. Yamauchi, T. Shinkawa, M. Taoka, H. Donai, N. Takahashi, T. Isobe, and T. Yamauchi. 2004. Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Neurochem.* 88:759-768.
- Zarei, M.M., M. Eghbali, A. Alioua, M. Song, H.G. Knaus, E. Stefani, and L. Toro. 2004. An endoplasmic reticulum trafficking signal prevents surface expression of a voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel splice variant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10072-10077.
- Zechner, D., Y. Fujita, J. Hulsken, T. Muller, I. Walther, M.M. Taketo, E.B. Crenshaw, 3rd, W. Birchmeier, and C. Birchmeier. 2003. beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol.* 258:406-418.
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron.* 22:537-548.
- Zhang, D., C. Zhang, A. Ho, A. Kirkwood, T.C. Sudhof, and J. Shen. 2010. Inactivation of presenilins causes pre-synaptic impairment prior to post-synaptic dysfunction. *J Neurochem.* 115:1215-1221.
- Zheng, H., M. Jiang, M.E. Trumbauer, D.J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D.W. Smith, R.P. Heavens, G.R. Dawson, S. Boyce, M.W. Conner, K.A. Stevens, H.H. Slunt, S.S. Sisoda, H.Y. Chen, and L.H. Van der Ploeg. 1995. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* 81:525-531.
- Zheng, J., H. Watanabe, M. Wines-Samuelson, H. Zhao, T. Gridley, R. Kopan, and J. Shen. 2012. Conditional Deletion of Notch1 and Notch2 Genes in Excitatory Neurons of Postnatal Forebrain Does Not Cause Neurodegeneration or Reduction of Notch mRNAs and Proteins. *J Biol Chem.* 287:20356-20368.

## XI. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampere
A10	ADAM10
A17	ADAM17
Abb.	Abbildung
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>
AICD	<i>APP-intracellular c-terminal domain</i>
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazol-propionsäure-
Aph1	<i>Anterior pharynx defective 1</i>
APOE	Apolipoprotein
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
AraC	Arabinosylcytosin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintrisphosphat
atRA	All-trans Retinsäure
BACE1	<i><math>\beta</math>-site-APP-cleaving-enzyme</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BP	<i>Basal Progenitor</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Centi
C-	Carboxy-
<i>C. Elegans</i>	<i>Caenorhabditis Elegans</i>
ca	Circa
CA	Cornus Ammonis
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CamK	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase
CD	<i>Cluster Differentiation</i>

Abkürzung	Begriff
cDNA	Komplementäre DNA
CGE	<i>Caudale Ganglionic Eminence</i>
cKO	Konditionaler Knockout
Cl	Chlorid
CM	Calcium Magnesium
CMV	Cytomegalievirus
CNPase	<i>3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
CP	Kortikale Platte
CR+	Calretinin-positiv
CRAPs	Cellular retinoic-binding proteins
CTF	c-terminales Fragment
Cu	Kupfer
Cx	Kortex
cyPrp	Cytosolisches Prionprotein
Cys	Cystein-reiche
D	Dorsal
D	Deutschland
DA	Dalton
DAB	3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DARPP32+	<i>Dopamin- and cAMP-phospho-protein</i>
dd	bidest
DG	Gyrus dendatus
Dis	Disintegrin
DMEM	<i>Dulbecco Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonkuleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
DVP	Dauerverpaarung
E	Embryonal
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EAOD	<i>Early-Onset-Alzheimer's Disease</i>
EC	<i>Extra cellular</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>

Abkürzung	Begriff
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EPSP	<i>Excitatory postsynaptic potential</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ER	Endoplasmatisches Reticulum
etc.	et cetera
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBD	<i>Familial-British-Dementia</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FDD	<i>Familial-Danish-Dementia</i>
FELASA	<i>Federation of Laboratory Animal Science Associations</i>
FL	Full length
Fl	Flox
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GE	<i>Ganglionic Eminence</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
Glu+	Glutamat-abhängige
GluR	<i>Glutamate Receptor</i>
GPI	Glykosyl
GrDG	<i>granular Gyrus dentatus</i>
GSMs	<i>Small-molecule <math>\gamma</math>-secretase modulators</i>
h	Stunden
HB-EGF	<i>Heparin-binding Epidermal Growth Factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balance Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin und Eosin
Hes	<i>Hairy enhancer of split</i>
HIP	Hippocampus
His	Histidin
HIS3	Imidazolglyzerol-Phosphat-Dehydratase
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
HS	<i>Horse Serum</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne
IF	Immunfluoreszenz
IP	<i>Intermediate Progenitor</i>
IP	Immunpräzipitation

Abkürzung	Begriff
IZ	Intermediäre Zone
JAK	Janus Kinase
K	Kalium
k	Kilo
Konz.	Konzentration
l	Liter
LEL	<i>Large extracellular loop</i>
Leu	Leuzin
LGE	<i>Lateral Ganglionic Eminence</i>
Li	Lithium
LMol	Stratum-lacunosum moleculare
LOAD	<i>Late-Onset-Alzheimer's Disease</i>
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar
M.	Monate
MAML	<i>Mastermind</i>
MAP2	<i>Microtubule associated protein</i>
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
Mg	Magnesium
mg	Milli Gramm
MGE	<i>Medial Ganglionic Eminence</i>
Min	Minuten
MMP	Matrixmetalloprotease
Mol	<i>molecular layer</i>
MP	Metalloprotease
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MS	Microsoft
MZ	Marginalzone
N	Neuronal
n	nano
n	<i>number</i>
N-	Amino-

Abkürzung	Begriff
N2A	Neuro2A
Na	Natrium
NAD	Nitkotin Adenin Dinukleotid
Nct	Nicastrin
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
NEXT	<i>Notch extracellular truncation</i>
NIC	Notch intrazelluläre Domäne
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat-
NSAIDs	<i>Non-steroidal-antiinflammatory-drugs</i>
NTF	n-terminales Fragment
NubG	n-terminaler Teil von Ubiquitin mit Glycin
NubI	n-terminaler Teil von Ubiquitin mit Isoleuzin
OD	Optische Dichte
P	Postnatal
p	Pro
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDI	<i>Protein-Disulfid-Isomerase</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pen-2	<i>Preseulin enhancer 2</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbolmyristolacetat
PO <sub>4</sub>	Phosphat
poDG	<i>polymorph Gyrus dentatus</i>
PP	Präplatte
Prpc	Zelluläres Prionprotein
PS	Preseniline
PSD	<i>Post Synaptic Density</i>
PV+	Parvalbumin-positive
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT	Quantitative <i>Real Time</i>
Rad	Stratum Radiatum des Hippokampus

Abkürzung	Begriff
RAREs	<i>Retinoic acid responsive elements</i>
RARs	Retinsäurerezeptoren
RIP	<i>Regulated Intramembrane Proteolysis</i>
RNAi	<i>Interfering RNA</i>
RNase	Ribonuklease
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	<i>Soluble</i>
s	Sekunden
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP97	<i>Synapse-associated protein</i>
sc	scrapie
SDS	Sodiumdoceylsulfat
SEL	<i>Small extracellular loop</i>
SFV	Semliki Forest Virus
SH	<i>Src-Homology</i>
Si	Sievert
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOM+	Somatostatin-abhängig
SP	Subplatte
SVZ	Subventrikuläre Zone
Swe	<i>Swedish</i>
T	Tween
T15	TSPAN15
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	<i>Tetanusburst Stimulation</i>
TE	Transformationeffizienz
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIF	<i>Triton-Insoluble-Fraction</i>
TMIC	<i>Transmembrane and intracellular domain</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl-aminoethan
Trp	Tryptophan

Abkürzung	Begriff
TSPAN	Tetraspanin
TVP	Terminverpaarung
ü. N.	über Nacht
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
V	Ventral
VE	Vaskulär-Endothelial
VZ	Ventrikuläre Zone
w/o	<i>without</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel
Zn <sup>2+</sup>	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	Alpha



## XII. Lebenslauf

Name: Johannes Prox

Geburtsdatum: 16.08.1982

Geburtsort: Biberach an der Riss

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion:  
seit 04/2008 Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Saftig

Studium der Biochemie:  
10/2002-11/2007 Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, mit dem Abschluss Dipl. Biochem., Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie I von Prof. Dr. Thomas Dierks  
Thema: „Einfluss der 6-O-Endosulfatasen Sulf1 und Sulf2 auf Entzündungsprozesse“

Zivildienst:  
09/2001-06/2002 Sehbehinderten- und Blindenschule Baintdt

Schulbildung:  
08/1992-06/2001 Pestalozzi Gymnasium in Biberach an der Riss  
Abschluss: Abitur

### XIII. Publikationen

**Prox, J.**, A. Rittger, and P. Saftig. 2012a. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and Presenilin. *Exp Brain Res.* 217:331-341.

**Prox, J.**, M. Willenbrock, S. Weber, T. Lehmann, D. Schmidt-Arras, R. Schwanbeck, P. Saftig, and M. Schwake. 2012b. Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci.*

Altmeppen, H.C., **J. Prox**, B. Puig, M.A. Kluth, C. Bernreuther, D. Thurm, E. Jorissen, B. Petrowitz, U. Bartsch, B. De Strooper, P. Saftig, and M. Glatzel. 2011. Lack of  $\alpha$ -disintegrin- and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener.* 6:36.

Weber, S., M.T. Niessen, **J. Prox**, R. Lullmann-Rauch, A. Schmitz, R. Schwanbeck, C.P. Blobel, E. Jorissen, B. de Strooper, C.M. Niessen, and P. Saftig. 2011. The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development.* 138:495-505

Kim, J., C. Lilliehook, A. Dudak, **J. Prox**, P. Saftig, H.J. Federoff, and S.T. Lim. 2010. Activity-dependent  $\alpha$ -cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem.* 285:22919-22926.

Jorissen, E.\*, **J. Prox\***, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C.P. Blobel, M. Glatzel, B. De Strooper, and P. Saftig. 2010. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci.* 30:4833-4844.

## XIV. Danksagung

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei allen bedanken, die anteilig an dieser Arbeit mitgewirkt haben und mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

- Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Paul Saftig, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses interessante Projekt bearbeiten zu dürfen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Organisation und die durch ihn bereitgestellten materiellen und strukturellen Voraussetzungen haben den Grundstein für den Erfolg dieser Arbeit gelegt.
- Insbesondere PD Dr. Michael Schwake möchte ich danken, der mir immer für sehr gute und intensive, fachliche Gespräche und Beratungen zur Seite stand und mich durch seinen wissenschaftlichen Ehrgeiz und Enthusiasmus inspiriert hat.
- Außerdem danke ich meinem ersten Diplomanden Michael Willenbrock, der durch seinen Einsatz und seine Kompetenz wesentlich zum Erfolg des Tetraspaninprojekts beigetragen hat.
- Desweiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Matthias Leippe für das Koreferat dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Markus Glatzel und seinen exzellenten und hochmotivierten Mitarbeitern PD Dr. Christian Bernreuther und Hermann Altmeppen möchte ich danken, die mir die Welt der Prionen und der Neuropathologie näher gebracht haben.
- Bei PD. Dr. Udo Bartsch möchte ich mich bedanken für die Zusammenarbeit mit den neuronalen Stammzellen.
- Prof. Dr. Bart de Strooper und Dr. Ellen Jorissen danke ich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit während des Nestin-Projekts.
- Prof. Dr. Rudi d’Hooge und seinen Mitarbeitern danke ich für die Kooperation bezüglich der Verhaltensanalytik.
- Prof. Dr. Eric Rubinstein danke ich für die Zusammenarbeit während des Tetraspaninprojekts.
- Dr. Dirk Schmidt-Arras, Dr. Ralf Schwanbeck, Dr. Athena Chalaris und Detlef Schmiedlein danke ich für die sensationelle Zusammenarbeit innerhalb des Instituts.
- Natürlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern der AG Saftig und des Instituts, insbesondere Dr. Silvio Weber für die fachlichen und intensiven „Streitgespräche“, für die ausser-universitären Aktivitäten, für die gemeinsame Alpenüberquerung und natürlich für seine Unterstützung während schwieriger Phasen der Promotion.
- Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meiner Freundin Jessica, deren Unterstützung und Wärme mich in Stresssituationen immer wieder aufgebaut haben und auf die in jeder schwierigen Lebenssituation Verlass war.

## XV. Eidesstattliche Erklärung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum vom 04/2008-08/2012 am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel am Lehrstuhl von Prof. Dr. Paul Saftig.

Hiermit versichere ich an Eides statt:

- dass diese Arbeit, abgesehen von der beratenden Tätigkeit durch die Betreuerin oder den Betreuer, selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel verfasst worden ist,
- dass Hilfsmittel und Quellen mit entsprechenden Verweisen oder Zitaten in der Arbeit gekennzeichnet sind,
- dass diese Arbeit unter Einhaltung der Vorgaben der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt wurde,
- dass diese Arbeit noch nicht im Rahmen eines anderen Promotionsprüfungsverfahrens vorgelegt wurde,
- dass diese Arbeit in Teilen und in Koautorenschaft in wissenschaftlichen Fachmagazinen publiziert worden ist,
- dass mir die Bestimmungen der Promotionsprüfungsordnung bekannt sind

Kiel, den 07.08.2012

Johannes Prox