

**Funktionsanalyse der Zink-Metalloprotease ADAM10
in der Epidermis und im
hämatopoetischen System der Maus**

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

vorgelegt von
Silvio Weber

Kiel, Juli 2010

Referent/in:

Prof. Dr. P. Saftig

Korreferent/in:

Prof. Dr. T. Roeder

Tag der mündlichen Prüfung:

15.09.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel:

15.09.2010

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum vom 20. Juli 2007 bis zum Juli 2010 am Lehrstuhl von Prof. Dr. P. Saftig (Biochemisches Institut) an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation – abgesehen von der Beratung durch die Betreuerin oder den Betreuer - selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Weiterhin erkläre ich, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist und die Arbeit weder ganz noch in Teilen schon an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht wurde. Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ellen Jorissen, Johannes Prox, Christian Bernreuther, **Silvio Weber**, Ralf Schwanbeck, Lutgarde Serneels, An Snellinx, Katleen Craessaerts, Amantha Thathiah, Ina Tesseur, Udo Bartsch, Gisela Weskamp, Carl P. Blobel Markus Glatzel, Bart De Strooper, and Paul Saftig, *The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex*. J Neurosci, 2010. 30(14): p. 4833-44.

Weitere Teile der Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht. Die Bestimmungen der Promotionsprüfungsordnung sind mir bekannt.

Kiel, den 15.07.2010

Silvio Weber

Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Paul Saftig, der mit der Bereitstellung der „gefloxten“ ADAM10 Maus, sowie seiner im Weiteren großzügigen wissenschaftlichen Unterstützung den Grundstein für den Erfolg meiner Promotion gelegt hat. Seine ständige Diskussionsbereitschaft aber auch die immerwährende Möglichkeit meine eigenen Ideen und Gedanken in ausgiebiger Weise zu testen und umzusetzen, haben sehr zu meiner persönlichen wie auch beruflichen Entwicklung beigetragen.

Prof. Dr. T. Roeder danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. R. Lüllmann-Rauch und Prof. Dr. C. Niessen danke ich für ihre exzellente wissenschaftliche Unterstützung, sowie die Weitergabe ihrer Erfahrungen im Bezug auf das Verständnis von Anatomie und Biochemie der murinen Haut.

Dagmar Niemeier, Annika Schmitz, Charlotte Botz-von Drahten und im Besonderen Tobias Lehmann danke ich für die hervorragende technische Unterstützung und Hilfestellung bei meinen Projekten.

Desweiteren möchte ich mich bei denjenigen Kolleginnen und Kollegen des Biochemischen Instituts Kiel bedanken, die mit ihrer wissenschaftlichen und persönlichen Unterstützung zum Gelingen meiner Promotion, sowie einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Besonders möchte ich mich hier bei Johannes Prox bedanken, der sich mit mir bis in die Tiefen der „ADAMs Familie“ begab und dessen wissenschaftliche und moralische Unterstützung selbst die entmutigendsten Erlebnisse aus meinen Gedanken reißen konnte, um sie mit vielfältigen anderen Gedanken zu füllen, die auch mein Leben außerhalb des „Uni-Alltags“ sehr bereichert haben.

Meiner Familie gehört ein ganz besonders herzliches Dankeschön – denn ohne ihre Unterstützung und die frühzeitige Förderung meiner naturwissenschaftlichen Interessen wäre mir das Schreiben dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Ganz im speziellen möchte ich jedoch meiner Freundin Sabrina Schröder danken. Trotz der geografischen Entfernung habe ich mich, auch dank ihrer bedingungslosen Unterstützung, stets ganz nah bei ihr gefühlt und nie meine persönlichen Ziele aus den Augen verloren. Ihr möchte ich daher diese Arbeit widmen.

Curriculum vitae

Name: Weber

Vorname: Silvio

Wohnort: Kappelner Straße 1
24106 Kiel

Geburtsdatum: 07. Februar 1982

Geburtsort: Bielefeld

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

01. 08. 1988 – 31. 07. 1992 Grundschule Heeperholz in Bielefeld

01. 08. 1992 – Juni 2001 Gymnasium Heepen in Bielefeld mit bilingualem Abitur
(Englisch-Deutsch)

01. 07. 2001 – 31. 07. 2002 Zivildienst im Ev. Jugendpfarramt, Bielefeld

01. 10. 2002 – 12. 04. 2007 Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld,
Fakultät für Chemie, mit Abschluss Dipl. Biochem..
Diplomarbeit in der AG von Prof. J. Frey, Immunologie
(August 2006-April 2007)

seit d. 20. 07. 2007 Doktorand in der AG von Prof. P. Saftig (Biochemisches
Institut, Kiel)

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Abkürzungen	7
1	EINLEITUNG	14
1.1	Konditionale Knockout Mausmodelle	15
1.2	Induzierbare konditionale Knockout Mausmodelle	16
1.2.1	Interferon induzierbare Systeme	17
1.2.2	Posttranslationale Kontrolle durch Cre-Hormonrezeptor Fusionsproteine	18
1.2.3	Tet-on/off System	18
1.3	Familie der ADAM Metalloproteasen	19
1.3.1	Funktionelle Domänen der Metalloprotease ADAM10	21
1.3.2	Molekulare Regulation von ADAM10	23
1.3.3	Physiologische Bedeutung von ADAM10	25
1.3.3.1	Substratanalyse durch <i>Gain-of-function</i> Studien von ADAM10	26
1.3.3.2	Substratanalyse durch <i>loss-of-function</i> Studien von ADAM10	33
1.3.4	Pathophysiologische Rolle von ADAM10	34
1.4	Die murine Epidermis	35
1.4.1	Anatomie	35
1.4.2	Morphogenese	37
1.4.3	Homöostase	41
1.5	Die murine Hämatopoese	44
1.5.1	Differenzierung und Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs)	45
1.5.2	Das Konzept der leukämischen Stammzellen (LSCs)	47
1.5.3	Die Funktion von ADAM10 im hämatopoetischen System	48
2	PROBLEMSTELLUNG	53
3	MATERIAL&METHODEN	53
3.1	Material und Geräte	53
3.1.1	Antikörper	53
3.1.2	Chemikalien	56

I Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Computersoftware	58
3.1.4	Enzyme	59
3.1.5	Geräte	59
3.1.6	Mauslinien&Genotypisierung	61
3.1.7	Oligonukleotide	64
3.1.8	Puffer, Medien und andere Lösungen	66
3.1.9	Reagenziensätze und Kits	70
3.1.10	Verbrauchsmittel	70
3.2	Methoden	71
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	71
3.2.1.1	Agarosegelelektrophorese (McDonell et al., 1977)	71
3.2.1.2	Isolierung von mRNA aus murinen Geweben	71
3.2.1.3	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	72
3.2.1.4	Microarray Analyse von muriner Epidermis	72
3.2.1.5	Polymerase-Kettenreaktion PCR (Mullis et al., 1986)	72
3.2.1.6	„Real Time“ PCR	75
3.2.1.7	Reverse Transkription von mRNA (Foley et al., 1993)	76
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	76
3.2.2.1	Proteinbestimmung (BCA-Assay)	76
3.2.2.2	Proteinisolierung aus epidermalen Splits, Keratinozyten und hämatopoetischen Organen	76
3.2.3	Transgene Mauszucht und Präparation von murinen Geweben	77
3.2.3.1	Blutentnahme, Serum- und Plasmagewinnung	77
3.2.3.2	Doxyzyklin-Gabe/Entzug	78
3.2.3.3	Epidermaler Split	78
3.2.3.4	Isolierung von primären Keratinozyten	78
3.2.3.5	Präparation von muriner (Rücken-)haut für die Immunfluoreszenz oder die Immunhistochemie	79
3.2.3.6	Markierung der Mäuse in der Zucht	80
3.2.3.7	Maushaltung	81
3.2.3.8	Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)	81
3.2.3.9	Farbstoff-Penetrationsversuch zur Analyse der Outside-In Barriere der Epidermis	82
3.2.3.10	Perfusion zur Fixierung von murinen Geweben für die Histologie	82
3.2.3.11	p.i. Injektion von Kalium poly-Inosid poly-Cytosid (pI-pC)	83
3.2.3.12	Schwanzbiopsie und Präparation genomischer DNA	83
3.2.3.13	Verpaarungs-Schemata und Nomenklatur	83
3.2.4	Zell- und Immunbiologische Methoden	85
3.2.4.1	Kultivierung von primären Keratinozyten	85

I Inhaltsverzeichnis

3.2.4.2	Kultivierung von murinen Fibroblasten (J23T3)	86
3.2.4.3	Isolierung und Kultivierung von primären Makrophagenvorläuferzellen aus dem Knochenmark	87
3.2.4.4	Durchflusszytometrie von primären murinen Zellen	88
3.2.4.5	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	89
3.2.4.6	Western Blot und Immundetektion	89
3.2.4.7	Dot Blot Analyse mit Proteome Profiler Array (RnD Systems)	90
3.2.4.8	Quantifizierung von murinem Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), Granulozyte-Colony Stimulation Factor (G-CSF) und Tissue Inhibitor of Metalloproteases 1 (TIMP-1) mit Hilfe des ELISA	90
3.2.4.9	Colony Forming Assay (CFA) von primären Keratinozyten	91
3.2.4.10	Aufnahme einer Wachstumskurve von murinen Keratinozyten	91
3.2.4.11	Histologie	91
3.2.4.12	Elektronenmikroskopie von muriner Rückenhaut	92
3.2.4.13	Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten	92
3.2.4.14	Immunhistochemie von Gewebeschnitten	93
3.2.4.15	Serologie	94
4	ERGEBNISSE	96
4.1	Konditionaler Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis	96
4.1.1	Genotypisierung	96
4.1.2	Verifizierung des epidermalen Knockouts von ADAM10	99
4.1.2.1	Genomische Deletion	99
4.1.2.2	Generation und Charakterisierung eines polyklonalen Serums gegen murines ADAM10	100
4.1.2.3	Proteinexpressionsanalyse	102
4.1.3	Beschreibung des epidermalen Phänotyps	103
4.1.3.1	Vitalität	103
4.1.3.2	Allgemeine Morphologie	104
4.1.3.3	Untersuchung der Hautbarriere	107
4.1.3.4	Histologie	110
4.1.3.5	Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie von Rückenhautproben	117
4.1.3.6	Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten	123
4.1.3.7	Microarray Analyse von epidermalen Splits	125
4.1.4	Analyse zur Ursache des Phänotyps	129
4.1.4.1	Einfluss von ADAM10 auf die Prozessierung des Notch1-Rezeptors	130
4.1.4.2	Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Serums gegen murines ADAM17	131

I Inhaltsverzeichnis

4.1.4.3	Expression von Notch1 Zielgenen	133
4.1.4.4	Untersuchung der Lipidverteilung in der Haut	134
4.1.4.5	Einfluss von ADAM10 auf die Proteolyse von E-Cadherin	135
4.2	Induzierbarer konditionaler Knockout von ADAM10 in der Epidermis	138
4.2.1	Genotypisierung	138
4.2.2	Verifizierung des epidermalen Knockouts von ADAM10	139
4.2.3	Beschreibung des Phänotyps	140
4.2.3.1	Allgemeine Morphologie und Viabilität	140
4.2.3.2	Histologie der Rückenhaut	142
4.2.3.3	Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie von Rückenhautproben	144
4.3	Induzierbarer konditionaler Knockout von ADAM10 in Interferon-sensitiven Zellen des Hämatoopoetischen Systems	148
4.3.1	Genotypisierung	148
4.3.2	Verifizierung des Knockouts von ADAM10 in Geweben des Hämatoopoetischen Systems	148
4.3.3	Induktion des Knockout von ADAM10	149
4.3.3.1	Genomische Deletion	149
4.3.3.2	Genexpressionsanalyse	150
4.3.3.3	Proteinexpressionsanalyse	151
4.3.3.4	Substratanalyse – Shedding des niedrig-affinen IgE-Rezeptors CD23 in vivo	152
4.3.3.5	Kultivierung von primären Makrophagen des Knochenmarks	153
4.3.4	Beschreibung des Phänotyps der ADAM10 „leaky“ Mäuse	155
4.3.4.1	Analyse des Knochenmarks	156
4.3.4.2	Analyse des Thymus	160
4.3.4.3	Analyse der Milz und Lymphknoten	160
4.3.4.4	Analyse der Leber	168
4.3.4.5	Analyse der Haut	172
4.3.4.6	Analyse des Blutes	176
4.4	Induzierbarer konditionaler Knockout von ADAM10 in Zellen mit aktivem hCMV Promotor	181
4.4.1	Genotypisierung	181
4.4.2	Verifizierung des Knockouts	181
5	DISKUSSION	183
5.1	Die Funktion von ADAM10 in der Morphogenese der murinen Epidermis	183
5.1.1	Der Verlust von ADAM10 in der murinen Epidermis führt vorwiegend zum perinatalen Tod der Mäuse	184

I Inhaltsverzeichnis

5.1.2	Neugeborene Mäuse mit einer ADAM10 defizienten Epidermis zeigen eine Barriestörung	185
5.1.3	Die ADAM10 defiziente Epidermis von neugeborenen Mäusen zeigt einen Defekt im terminalen Differenzierungsprogramm der Epidermis	187
5.2	Die Funktion von ADAM10 in der Homöostase der murinen Epidermis	189
5.2.1	Der andauernde Verlust von ADAM10 in der murinen Epidermis führt neben zellautonomen Defekten in der Epidermis auch zur stromalen und systemischen Beeinträchtigung anderer Gewebe	190
5.2.1.1	Betrachtung der Interfollikulären Epidermis (IFE) und der epidermalen Appendizes	191
5.2.1.2	Betrachtung von Dermis und (Sub-)Kutis	194
5.2.1.3	Betrachtung der peripheren lymphatischen Organe und des Blutes	196
5.2.2	Der induzierte Verlust von ADAM10 in der murinen Epidermis führt zu irreversibler Alopezie, Hyperproliferation des <i>stratum basale</i> und Hyperkeratinisierung	197
5.2.3	Molekulare Aspekte der postnatalen Deletion von ADAM10 in der murinen Epidermis	198
5.3	Die Funktion von ADAM10 in der Homöostase des hämatopoetischen Systems der Maus	199
5.3.1	Die induzierte Deletion von ADAM10 in Zellen des hämatopoetischen Systems	199
5.3.2	Der andauernde Verlust von ADAM10 in hämatopoetischen Zellen der Maus führt zu einer (chronisch) myeloproliferativen Erkrankung (CMPE)	202
5.3.2.1	Die Bedeutung der Deletion von ADAM10 im Knochenmark für die Entwicklung der CMPE	204
5.3.2.2	Analyse des Thymus	207
5.3.2.3	Analyse der sekundären lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten	208
5.3.2.4	Analyse der Leber	210
5.3.2.5	Analyse der Haut	211
5.3.2.6	Analyse des Blutes	212
5.4	Medizinische Aspekte der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von ADAM10	214
5.4.1	ADAM10 als Kandidatengen für humane (Krebs-)erkrankungen der Haut?	214
5.4.2	ADAM10 als Kandidatengen für humane (Krebs-)erkrankungen des hämatopoetischen Systems	216
5.4.3	Ist ADAM10 (weiterhin) ein potentielles therapeutisches Target?	218
6	AUSBLICK	220
7	ZUSAMMENFASSUNG	220

I Inhaltsverzeichnis

8	SUMMARY	220
9	LITERATURVERZEICHNIS	226
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	263
11	TABELLENVERZEICHNIS	268

II. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
aa.	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AICD	<i>activation induced cell death</i>
AML	akute myeloide Leukämie
APC	Allophycocyanin
APP	<i>amyloides Precursor protein</i>
Bas	<i>stratum basale</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BCC	<i>basal cell carcinoma</i>
bmp	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caspase	“cysteine associated proteinase”
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD	“cluster of differentiation”
cDNA	Komplementäre DNA
CE	<i>cornified envelope</i>
CFA	<i>Colony forming assay</i>
CLL	chronisch leukozytärer Leukämie
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CML	chronische myeloide Leukämie
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
CMPE	Chronisch myeloproliferative Erkrankung
CMV	Cytomegalievirus
Cor	<i>stratum corneum</i>

CR	Komplementrezeptor
C-Terminus	Carboxyterminus
CTF	C-terminales Fragment
CTLs	Cytotoxischen T-Zellen
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
Der	Dermis
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Dexoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtrisphosphat
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
DZ	Durchflusszytometrie
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Dinatriumsalz der Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Epi	Epidermis
ER	endoplasmatisches Retikulum
ET	Essentielle Thrombozythämie
FACS	„fluorescent activated cell sorter“
Fc	Kristallisierbares Fragment von Antikörpern („fragment crystalline“)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
FELASA	<i>The Federation of European laboratory animal Science Association</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
flox	flankierendes Lox-Element
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>

GMP	Granulocyte Myeloid Progenitor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Gran	<i>stratum granulosum</i>
GTP	Guanidintriphosphat
h	Human oder Stunden
H&E	Hämatoxylin&Eosin
HDAC	Histondeacytelase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
Hes	<i>Hairy enhancer of split</i>
HF	Haarfollikel
HIV	“human immunodeficiency virus”
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
HSP	Hitzeschockprotein
i.p.	intraperitoneal
ICD	<i>intracellular cytoplasmatic domain</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFE	Interfollikuläre Epidermis
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Il	Interleukin
induz	induzierbar
IVC	<i>isolated ventilated cage</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
Konz.	Konzentration
Ktr	Kontrolle

L	Ligand des dazugehörigen Proteins
Lc	<i>Luciferase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSC	<i>Leukemic stem cell</i>
Lsg.	Lösung
LT-HSC	Long-Term repopulating HSC
m	murin
M	molar
MACS	<i>magnetic associated cell sorting</i>
MEF	murine embryonic fibroblast
MEP	<i>Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor</i>
Met	Methionin
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMLV	„Moloney Murine Leukemia Virus“
MMP	„matrix metalloprotease“
MoAb	„monoclonal antibody“
MPP	<i>Multilineage Progenitor Population</i>
mRNA	„messenger-RNA“
MT-MMP	„membrane-type matrix metalloproteinase“
MZB	Marignalzonen B-Zellen
NEXT	<i>Notch extracellular truncation</i>
NFκB	„nuclear factor for κ-gene in b-cells“
NGS	<i>normal goat serum</i>
NICD	Notch intracellular domain
NK-Zellen	„Natürliche Killer“-Zellen
NTMIC	<i>Notch transmembrane and intracellular domain</i>
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
OMF	Osteomyelofibrose
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PAS	<i>perodic schiff acid staining</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pI-pC	poly-Inosid-poly-Cytosid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbolmyristolacetat
PS	Presenilin
PV	Polycythaemia Vera
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBK	Rote Blutkörperchen
RIP	<i>regulated intramembrane proteolysis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROCK	„rho-effector kinase“
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
rtTA	reverses tetrazyklinabhängiges Transaktivatorprotein
s	Sekunden
SCA	<i>subcutaneous adipose fat tissue</i>
sCD23	lösliches CD23 („soluble,“)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	“src-homology”
SIR	<i>systemic inflammatory reponse</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMRT	<i>Silencing mediator of retinoid and thyroid metabolism</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
Spin	<i>stratum spinsoum</i>

src	Rous sarcoma oncogene
STAT	„signal transducers of transcription“
ST-HSC	Short-Term repopulating HSC
SV	Simian Virus
Tab.	Tabelle
TACE	„TNF- α converting enzyme“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
Tet-On/Off	Tet-reguliertes Expressionssystem der Firma Clontech
TEWL	<i>transepidermal water loss</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>“tissue inhibitor of metalloproteinase”</i>
TM	Transmembransegment
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Rezeptor des tumor necrosis factor- α
TRE	<i>tetracycline response element</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Thrombospondin
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopietin</i>
tTA	Tetracyclintransaktivator
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaureat
U	Einheit der Enzymaktivität (“Unit”)
UK-SH	Uniklinikum Schleswig-Holstein
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
VL	Volllängenprotein
Vol.	Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen
Wb	Western Blot
WBK	Weißer Blutkörperchen

wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
β -Gal	β -Galaktosidase
Δ	Deletion
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

1 Einleitung

Die Generation transgener Mäuse (*mus musculus*) zur Funktionsanalyse von Proteinen stellt heutzutage eines der wichtigsten Instrumente der Evaluierung potenziell therapeutischer Zielmoleküle und der biomedizinischen Grundlagenforschung dar. Basierend auf einer hohen genetischen Homologie zum Menschen, sehr kurzen Generationszeiten, einfachen Haltungsbedingungen, guter Handhabbarkeit und der Möglichkeit zur vielfältigen genetischen Manipulation, prädestinieren die Maus zu dem bevorzugten Versuchstier in Deutschland und auch weltweit (Green et al., 2007). Heutzutage können Gene in Mäusen in nahezu allen Geweben spezifisch an- (transgene und Knockin Mäuse) und abgeschaltet (Knockout Mäuse) werden. Hinzu kommt die Möglichkeit diese gewebespezifischen Knockin und Knockout Vorgänge auch zeitlich zu kontrollieren, so dass neben der Bedeutung von Proteinen bei der embryonalen Entwicklung von Geweben, auch Funktionen wie Homöostase und Selbsterneuerung untersucht werden können. Hierzu gehören auch Modelle, die eine Auswirkung somatischer Mutationen auf physiologische Prozesse, z.B. bei der Wundheilung oder der Haarerneuerung, oder pathophysiologischer Prozesse, z.B. der Karzinogenese oder der Entwicklung von chronischen Entzündungs- oder Autoimmunerkrankungen analysieren können.

Die zinkbindende Metalloprotease ADAM10 (A Disintegrin And Metallprotease) könnte in allen hier beschriebenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Funktion ausüben und stellt damit seit längerer Zeit ein intensiv erforschtes Protein, sowohl in der zellbiologischen Grundlagenforschung, als auch als potenzielles Target in der biomedizinischen und pharmakologischen Anwendungsforschung dar (Seals und Courtneidge, 2003; Murphy, 2008). Die klassische ADAM10 Knockout Maus zeigt, dass die vollständige Deletion von ADAM10 in allen Organen und Geweben, schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt (E9.5) der Embryonalentwicklung letal ist (Hartmann et al., 2002). Somit war es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich die Funktion von ADAM10 in Geweben, die sich erst nach E9.5 entwickeln, zu untersuchen. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde durch eine Reihe von zellbasierten Experimenten innerhalb der Ag Saftig und auch in anderen Laboratorien eine Rolle für ADAM10 bei der Prozessierung von epidermalen Transmembranproteinen, wie z.B. E-

Cadherin, Pro-EGF, Desmoglein 2, CD44 und dem Notch-Ligand *delta-like 1* (Dll1) (Maretzky et al., 2005; Dittmer et al., 2009; Schirmeister et al., 2009; Sahin et al., 2004; Klessner et al., 2009; Bech-Serra et al., 2006; Nagano et al., 2004; Murai et al., 2006; Anderegg et al., 2009; Six et al., 2003; Dyczynska et al., 2007) gezeigt. Weiterhin konnten auch in Patientenproben humaner Hauterkrankungen, u.a. dem basalen Zellkarzinom, akuten Ekzemen oder Psoriasis eine deregulierte ADAM10 Expression nachgewiesen werden (Oh et al., 2007; Oh et al., 2008; Maretzky et al., 2008).

Dies führte zu der Überlegung, dass der konditionale und der induzierbar konditionale Knockout von ADAM10 in der Epidermis zu wichtigen Erkenntnissen über die molekulare Bedeutung von ADAM10 in der epidermalen Entwicklung, sowie der Eignung als therapeutisches Target führen könnten. Ähnliches gilt für die Generation einer induzierbaren ADAM10 Knockout Maus in Interferon-sensitiven Zellen des hämatopoetischen Systems. Auch hier konnten sowohl zellbasierte Experimente die Prozessierung von Transmembranproteinen des hämatopoetischen Systems, wie z.B. den Fas-Liganden (FasL) (Kirkin et al., 2007; Schulte et al., 2007), CD23 (Weskamp et al., 2006; Lemieux et al., 2007; Gibb et al., 2010), Fractalkine (Hundhausen et al., 2003) oder TRANCE (Hikita et al., 2006) durch ADAM10 als auch die Anwesenheit somatischer Mutationen innerhalb der ADAM10 Gensequenz in verschiedenen Formen der lymphatischen Leukämien gezeigt werden (Wu et al., 1997; Mochizuki et al., 2007). In den folgenden Kapiteln, sollen zunächst die theoretische Grundlagen der verwendeten Mausmodelle, danach die bis jetzt bekannten Funktionen der ADAM10 Metalloprotease und abschließend die wichtigsten Grundlagen der Morphogenese und Homöostase der untersuchten Gewebe erläutert werden.

1.1 Konditionale Knockout Mausmodelle

Seit der Inaktivierung des ersten Gens in der Maus wurde über 5000 verschiedene Knockout Mäuse etabliert, von denen etwa 500 als Tiermodelle für menschliche Krankheiten dienen können (Goldstein, 2001). Trotz dieses Erfolges, ist die konventionelle Knockout Strategie in vieler Hinsicht limitiert. So kann die Deletion von Genen im kompletten Organismus zum frühzeitigen Tod der Tiere im Embryonalstadium oder kurz nach der Geburt führen, was eine umfassende phänotypische Analyse der

Funktionalität in differenzierten Geweben und Organen unmöglich macht (Peschon et al., 1998; Hartmann et al., 2002; Jackson et al., 2003). Weiterhin kann die Deletion des Gens in jeder Zelle der Maus zu einem komplexen Phänotyp führen, der eine Unterscheidung von primären und sekundären Effekten der Gendeletion erschwert. Zur Überwindung dieser Grenzen wurden schon zu Beginn der 90er Jahre die ersten Mausmodelle generiert, die eine sequenzspezifische Rekombination von Genfragmenten ermöglichen (Orban und Math, 1992; Lakso et al., 1992). Hierdurch kann die Deletion eines Gens auf ein bestimmtes Gewebe beschränkt werden. Das am häufigsten genutzte System zur sequenzspezifischen Rekombination stammt aus dem Bakteriophagen P1 und besteht aus der loxP Signalsequenz und der Cre-Rekombinase (Sauer und Henderson, 1989). Die Cre-Rekombinase gehört zu der Familie der Integrasen und katalysiert die Rekombination einer Gensequenz zwischen zwei loxP Stellen. Für die Generation eines konditionalen Knockouts werden nun zunächst bei einer Mauslinie die loxP Stellen durch homologe Rekombination eingeführt, so dass sie dabei eines der essentiellen Exons des zu deletierenden Gens flankieren („flox“). In einer anderen Mauslinie wird die Cre-Rekombinase als Transgen unter einem gewebespezifischen Promotor exprimiert. Die alleinige Einführung der loxP Stellen in die intronischen Gensequenzen des Zielgenes führte, mit einer beschriebenen Ausnahme, bis zum heutigen Zeitpunkt zu keinerlei Veränderungen in der Expression des Zielgenes (Lewandoski, 2001). Wird nun eine „gefloxt“ Maus mit einer transgenen Cre-Rekombinase Maus gekreuzt, erfolgt die selektive Inaktivierung des Zielgenes in dem gewünschten Gewebe.

1.2 Induzierbare konditionale Knockout Mausmodelle

Neben der Möglichkeit ein bestimmtes Zielgen gewebespezifisch zu inaktivieren, ist auch die Kontrolle des Zeitpunktes der Deletion ein entscheidendes Kriterium bei der funktionalen Analyse. So kann es auch bei konditionalen Systemen leicht zur Ausbildung von Entwicklungsdefekten kommen, bei denen nicht mehr eindeutig zu klären ist, ob sie auf primären oder sekundären Effekten des Gen Knockouts beruhen. Diese Entwicklungsdefekte können es unmöglich machen, Funktionen des Gens bei Prozessen wie z.B. Selbsterneuerung, Wundheilung oder induzierter Karzinogenese zu analysie-

ren. Auch die sachgerechte Beurteilung von möglichen Nebenwirkungen einer verminderten Proteinaktivität durch pharmakologische Inhibition ist somit stark erschwert. Zur Lösung dieses Problems wurden eine Reihe verschiedener induzierbar konditionaler Mausmodelle entwickelt, von denen die wichtigsten im Folgenden vorgestellt werden.

1.2.1 Interferon induzierbare Systeme

Das erste konditional induzierbare System beruhte im Wesentlichen auf der Auswahl eines speziellen Promotors, der eine geringe basale Transkriptionsaktivität und eine exogene Aktivierbarkeit durch leicht applizierbare, nicht-toxische Substanzen aufweist. Hierfür wurde der Mx1-Promotor gewählt, welcher normalerweise die Expression eines GTP-bindenden Proteins (Mx1-Protein) zur Abwehr von Influenza-Viren reguliert (Staeli et al., 1986). Dieser Promotor ist durch Interferon- α induzierbar, da es sich hierbei um eines der ersten Zytokine zur Anzeige einer Virusinvasion handelt. Alternativ kann durch die Gabe von synthetischer doppelsträngiger RNA auch der Befall durch einen Virus simuliert werden, was zu einer spezifischeren Aktivierung des Promotors, als durch die Applikation des pleiotropen Zytokins Interferon- α , führt (Hug et al., 1988). Obwohl unter allen murinen Zelltypen die Zellen des hämatopoetischen Systems die meisten Interferonrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, können auch Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs aktiviert werden. Hierdurch zeigen eine große Bandbreite von Organen komplette oder teilweise, unerwünschte Deletionen des Zielgenes (Kuhn et al., 1995). Ein weiterer Nachteil dieses Systems ist die Notwendigkeit der Tierhaltung in SPF-Systemen, da schon geringste virale Kontaminationen zu einer ungewünschten Aktivierung des Promotors führen („leakiness“) und es dementsprechend zur vorzeitigen Deletion des Genes kommt (Kuhn et al., 1995; Tomita et al., 2000; Viatour et al., 2008). Trotz dieser Nachteile bietet dieses System nach wie vor eines der einfachsten und effektivsten Systeme zur induzierbaren, konditionalen Deletion von Genen.

1.2.2 Posttranslationale Kontrolle durch Cre-Hormonrezeptor

Fusionsproteine

Bei diesem System handelt es sich um eine direkte Weiterentwicklung des Cre/Lox Systems. Während die loxP Signalsequenzen und der Rekombinationsmechanismus unverändert bleiben, werden an die Cre-Rekombinase mutierte Bindedomänen des Östrogen- oder Progesteronrezeptors fusioniert (Kellendonk et al., 1996; Feil et al., 1996). Diese fusionierten Proteine liegen dann im Zytoplasma als Komplex mit den Hitzeschockproteinen 70 und 90 vor, welche eine vorzeitige Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern verhindern (Feil et al., 1996). Erst durch Bindung von synthetischen Steroid-Induktoren (z.B. Tamoxifen) an die hierfür speziell mutierten Hormonrezeptorbindedomänen (Feil et al., 1996), werden die Cre-Rekombinase-Fusionsproteine freigesetzt und können nach Translokation in den Zellkern zur Inaktivierung des Zielgenes führen. Obwohl die Hormonrezeptorbindedomänen im Laufe der Zeit mehrfach mutiert wurden, ist dieses System weiterhin anfällig gegenüber basaler Aktivierung, da es sich letztendlich auch um ein endogen genutztes System der Maus handelt.

1.2.3 Tet-on/off System

Das System mit der derzeit besten Transkriptionskontrolle bietet das aus *E.Coli* adaptierte Tetrazyklin-regulierbare (Tet-System) System (Gossen und Burjard, 1992; Hinrichs et al., 1994). Neben der Mauslinie mit dem geflochten Zielgen, werden hier noch zwei weitere transgene Mauslinien benötigt. Die erste hiervon exprimiert das sogenannte tetrazyklinabhängige Transaktivatorprotein (tTA) unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, die zweite exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *tetracycline response element* (TRE). Das tTA Protein bindet an jenes TRE und induziert die Expression der Cre-Rekombinase, welche wiederum zur Inaktivierung des geflochten Zielgenes führt. Durch die Gabe von Tetrazyklin oder einem Tetrazyklinderivat, wie Doxyzyklin, kann die Bindung an das TRE verhindert werden. Hierbei reichen schon sehr geringe Dosen des Doxyzyklin aus (Griffith et al., 1994; Urlinger et al., 2000). Für die Langzeitapplikation eignet sich in erster Linie die Gabe über Trinkwasser und Futter der Tiere (Kistner et al., 1996). Dieses System

gewährleistet eine extrem effiziente Transkriptionskontrolle der Cre-Rekombinase, da sowohl das Transaktivatorprotein als auch das TRE nicht in eukaryotischen Zellen vorkommen (Hillen und Berens, 1994). Ein Nachteil kann jedoch die relativ lange Halbwertszeit des Doxyzyklins in bestimmten Organen, wie Gehirn, Muskeln oder Knochen sein (Mansuy und Bujard, 2000; Le und Sauer, 2000), die eine Abschätzung des genauen Zeitpunktes der Gendeletion erschweren. Durch gezielte Mutation konnte jedoch auch ein reverses tetrazyklinabhängige Transaktivatorprotein (rtTA) generiert werden, welches die punktgenaue und zeitnahe Deletion von Zielgenen durch Gabe von hohen Dosen des Doxyzyklins über das Trinkwasser oder durch i.p. Injektionen ermöglicht (Gossen et al., 1995). Durch Konstruktion eines bidirektional ablesbaren TRE kann neben der Cre-Rekombinase z.B. noch ein weiterer leicht zu analysierender Marker wie β -Gal oder Luziferase in der transgenen Mauslinie exprimiert werden (Yamamoto et al., 2000; Hess et al., 2001; Schönig et al., 2002). Dies ermöglicht eine zusätzliche Kontrolle der Cre-Rekombinase Aktivität und kann durch leistungsstarke CCD-Kameras auch *in vivo* erfolgen (Contag et al., 1998).

1.3 Familie der ADAM Metalloproteasen

Zinkproteasen werden anhand der Primärstruktur ihrer katalytischen Zentren in die Gruppen Gluzincine und Metzincine unterteilt (Hooper, 1994). Die Enzyme dieser Superfamilie sind in so vielfältigen Prozessen wie Embryogenese, Knochenentwicklung, Reproduktion, Gestaltung der extrazellulären Matrix, Arthritis und der Entstehung von Krebs beteiligt (Hooper, 1994; Seals und Courtneidge 2003; Edwards et al., 2008; Murphy, 2008). Die Metzincine können wiederum in Serralysine, Astacine, Matrixine und Adamalysine unterteilt werden (Stocker et al., 1995). Sie zeichnen sich durch eine ähnliche Topologie, sowie ihren konservierten Sequenzen für die Bindung des katalytisch essentiellen Zinkions und eines benachbarten Methioninrestes, der zu dem übereinstimmenden Strukturmotiv des "Met-turn" führt, aus. Das Zinkion wird über die schon beschriebene Konsensussequenz HEXXH gebunden (McKerrow, 1987; Stocker et al., 1993), wobei die beiden Histidinreste an der Bindung des katalytischen aktiven Zinkions und die Carboxylatgruppe des Glutamins vermutlich für die Polarisierung von zinkgebundem Wasser für einen nucleophilen Angriff auf die zu spaltende

Peptidbindung verantwortlich ist (Matthews et al., 1972). Für die zwei Subfamilien der Matrixine (*Matrix Metallo Proteinases* - MMPs) und Adamalysine (*A Disintegrin And Metalloproteinase* - ADAMs) konnten auch in humanen Geweben essentielle biologische Funktionen gezeigt werden. Bisher konnten die Expression 19 verschiedener ADAMs in humanen Zellen nachgewiesen werden. Als Mitglied der Metzincine, besitzen sie ähnlich den MMPs ein *Met turn motif* und eine hochkonservierte Metalloproteasedomäne (Stocker et al., 1993). Nur 12 ADAMs (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28 und 33) zeigen jedoch die zinkbindende Konsensussequenz HEXXHXXGXXH (Seals und Courtneidge, 2003). Aufgrund dieser Strukturdaten wird eine proteolytische Aktivität vermutet, wobei bis zum heutigen Zeitpunkt erst für sechs von ihnen eine tatsächliche Proteaseaktivität belegt werden konnte (Jongeneel et al., 1989; Bode et al., 1993; Stöcker et al., 1993; Blundell, 1994).

Während die ADAMs 2, 7, 8, 18, 20, 21, 29 und 30) nur in Testis oder Keimdrüsen-assoziierten Geweben exprimiert werden, konnten für alle weiteren ADAMs eine somatische Expression nachgewiesen werden (Seals und Courtneidge, 2003). Zusätzlich enthalten die meisten der ADAMs auch eine einzigartige Integrinbindungsstelle (Blobel et al., 1992; Wolfsberg et al., 1993). Sie wird als Disintegrindomäne bezeichnet, enthält aber nur im Fall von ADAM15 eine der sonst typischen RGD-Integrinerkennungssequenzen (Zhang, 1998).

Entsprechend den MMPs werden auch die meisten der ADAMs als inaktive Proformen exprimiert. Entscheidend ist hierbei ein *cysteine switch*, bei dem ein Cysteinrest der Prodomäne einen intramolekularen Komplex mit dem Zinkatom bildet und so die katalytische Aktivität der Protease verhindert. (van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Becker et al., 1995).

Die nähere Charakterisierung der ADAM Familienmitglieder wird sich in den nun folgenden Kapiteln im Wesentlichen auf ADAM10 beschränken, da im Rahmen dieser Arbeit Knockout Mausmodelle für diese Metalloprotease generiert und analysiert wurden. Lediglich der Vergleich mit ADAM17, als Familienmitglied mit der stärksten Ähnlichkeit im Bezug auf Sequenz und Substratspektrum, wird an gegebener Stelle vorgenommen.

1.3.1 Funktionelle Domänen der Metalloprotease ADAM10

Das murine ADAM10 ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einer Sequenz von 749 Aminosäuren und wird, wie alle übrigen ADAM Metalloproteasen, als inaktives Zymogen exprimiert (Rooke et al., 1996; Yamazaki et al., 1997; Hartmann et al., 2002). Neben der für diese Inaktivierung verantwortlichen Prodomäne, weist ADAM10 die familientypische Metalloprotease-, Disintegrin-, Cysteinreiche-, EGF-ähnliche-, Transmembran- und Zytoplasmatische Domäne auf. Die extrazelluläre Domäne besitzt vier putative N-Glykosylierungssequenzen, die in humanen Zelllinien auch alle genutzt werden (Escrovente et al., 2008). Für das murine ADAM10 ergibt sich für die inaktive Proform damit ein molekulares Gewicht von 85 kDa und für die mature Form ein Gewicht von etwa 60 kDa. Die Spaltung der Proform erfolgt durch eine intrazelluläre Protease aus der Familie der Pro-Protein Konvertasen, vermutlich Furin, und findet im sekretorischen Weg statt (Anders et al., 2001; Endres et al., 2003; Mayer et al., 2008). Neben der Aufgabe eine frühzeitige Aktivierung der Metalloproteasedomäne von ADAM10 vor Erreichen der Zellmembran zu verhindern, wurde für die Prodomäne auch eine chaperonartige Funktion gezeigt (Anders et al., 2001; Leonard et al., 2005). So zeigten überexprimierte ADAM10-Mutanten ohne Prodomäne eine ER-Retention, die durch gleichzeitige Expression der isolierten Prodomäne eine Trans-Reaktivierung und Wiederherstellung der Oberflächenexpression der ADAM10-Mutante ermöglicht (Anders et al., 2001).

Die Metalloproteasedomäne enthält die Konsensussequenz der zinkbindenden Domäne (HEVGHNFGSPH), welche sich ganz am Ende des katalytischen Spaltes befindet. Dieser wird aus den beiden, durch den met-turn verbundenen, Metzincintypischen Subdomänen gebildet (Gomis-Ruth, 2003) und enthält die reaktiven $S_3S_2S_1S'_1S'_2S'_3$ Tasche, die neben der Tiefe des katalytischen Spaltes auch durch die Interaktion mit den entsprechenden $P_3P_2P_1P'_1P'_2P'_3$ Aminosäuren von putativen Substraten, die enzymatische Spezifität maßgeblich beeinflussen.

Da für die S'_1 – Tasche die größte Abweichung zwischen ADAM10 und ADAM17 betreffend Hydrophobizität und Tiefe der Tasche gefunden wurden (Edwards et al., 2008), stellt dies auch den optimalen Ansatzpunkt für die Entwicklung von ADAM10-spezifischen Inhibitoren dar. Eine unzureichende Spezifität ist z.B. im Bereich der MMPs ein entscheidender Faktor für die Misserfolge entsprechender Medikamente in

der klinischen Erprobung gewesen (Coussens et al., 2002). Da die endogenen Inhibitoren in der Maus (Tissue inhibitors of Metalloproteinases - TIMPs) jedoch eine eindeutige Substratspezifität zwischen ADAM10 und ADAM17 zeigen (Amour et al., 1999, Amour et al., 2000), sollte dies theoretisch auch mit artifiziell produzierten Inhibitoren möglich sein.

Die unmittelbar der Metalloprotease-domäne folgende Sequenz enthält die Disintegrindomäne, welche jedoch mit Ausnahme von ADAM15, bei keinem der bekannten ADAM Familienmitgliedern ein tatsächliches Integrin-Bindungsmotiv enthält (Evans, 2001). Trotzdem konnte für nahezu alle ADAMs die Interaktion mit einem oder teilweise auch mehreren Integrinen, welche vorwiegend als Zelladhäsionsmoleküle fungieren, experimentell belegt werden (Arribas et al., 2006). Interessanterweise konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine Integrin-Interaktion für ADAM10 beobachtet werden (Eto et al., 2002).

Die darauf folgende Domäne wird als Cysteinreiche Domäne bezeichnet und häufig mit der EGF-ähnliche Domäne zusammengefasst, da es keine klaren Domänengrenzen gibt. Auch diese Domäne könnte entscheidend zur Substratspezifität und Aktivitätsregulation von ADAM10 beitragen. Sehr gut untersucht in dieser Hinsicht, ist die Interaktion von Ephrinen und der Cysteinreiche Domäne von ADAM10 (Janes et al., 2005; Manica und Shapiro, 2005). Durch die Präformierung eines Komplexes aus EphrinA3 und ADAM10 in *cis*, erfolgt eine zellübergreifende Interaktion mit EphrinA5, die hierdurch letztendlich zur Proteolyse von EphrinA5 in *trans* führt (Hattori et al., 2000; Janes et al., 2005). Die Bindung des EphrinA3 erfolgt dabei an eine saure Tasche des C-terminalen Bereichs der Cysteinreichen Domäne, welche auch als hypervariable Region bezeichnet wird (Takeda et al., 2006).

Im Übrigen konnte auch für die zytoplasmatische Domäne eine Vielzahl von regulatorischen Einflüssen auf die ADAM10 Aktivität gezeigt werden. So tragen z.B. eine SH3-, sowie eine prolinreiche Sequenz zur Rekrutierung essentieller Signalmoleküle, wie Lck, Eve-1, MAD-2, PACSIN3 und SAP97 bei (Poghosyan et al., 2002; Mori et al., 2003; Tanaka et al., 2004; Marcello et al., 2007). Für SAP97 konnte dabei eine wichtige Rolle bei der korrekten Lokalisierung von ADAM10 in polarisierten Zellen und synaptischen Membranen gezeigt werden (Wild-Bode et al., 2006; Marcello et al., 2007). Weiterhin konnte erst kürzlich die Funktion einer Argininsequenz

(⁷²³RRR) aufgeklärt werden, welche den Austritt von ADAM10 aus dem Endoplasmatischen Retikulum negativ reguliert (Marcello et al., 2010). Offenbar ist die Maskierung dieser Sequenz, z.B. durch eines der oben beschriebenen Adapterproteine für einen effektiven Transport von ADAM10 zur Plasmamembran erforderlich. Die Identität der möglichen Interaktionspartner ist z.Zt. noch ungeklärt und eröffnet ein zusätzliches Forschungsfeld zur Regulation der ADAM10 Aktivität.

Abschließend gibt es Erkenntnisse, dass ADAM10 unter bestimmten Umständen selbst Substrat anderer Metalloproteasen und Kandidat für eine *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) sein könnte (Tousseyn et al., 2009). Hierbei könnten ADAM9 und ADAM15, sowie die nachfolgende Proteolyse durch γ -Sekretasen, zur Entstehung eines intrazellulären zytoplasmatischen Fragments (ICD) führen. Dieses Fragment wurde auch im Zellkern gefunden und hat möglicherweise Einfluss auf weitere Transkriptionsfaktoren. Da jedoch weder ADAM9 noch ADAM15 defiziente Mäuse einen ADAM10-ähnlichen Phänotyp besitzen (Horiuchi et al., 2003; Sahin et al., 2004; Bohm et al., 2005), ist eine *in vivo* Relevanz dieser Beobachtungen fraglich. Möglicherweise handelt es sich um einen Feedback-Mechanismus bei andauernder oder ungewöhnlich starker ADAM10-Aktivität.

1.3.2 Molekulare Regulation von ADAM10

Seit der Entdeckung der Metalloprotease ADAM10 (Rooke et al., 1996) wurden mehr als 50 putative Substrate identifiziert und die Liste wächst fast jeden Monat um ein weiteres Zielmolekül. Dabei ist es immer noch völlig unverstanden, wie die Kontrolle der ADAM10 Aktivität in physiologischen Situationen, sowie die selektive Proteolyse spezifischer Substrate erfolgt. Neben der Untersuchung der *in vivo* Funktion von ADAM10 in geeigneten Tiermodellen und der Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung im Bereich der humanen Erkrankungen, stellt dieser Teilbereich die wichtigste Aufgabe zum allgemeinen Verständnis der Funktion von ADAM10 und ADAM Metalloproteasen im Allgemeinen dar. Die Regulation der ADAM10 Aktivität kann dabei auf allen zeitlichen Ebenen zwischen Initiation der Transkription bis zur posttranslationalen Modifikation oder durch die Wechselwirkungen mit benachbarten Proteinen geschehen. So ist bekannt, dass der Promotor von ADAM10 Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 und USF enthält, die neben einem zusätzlichen

Retinsäurebindungselement die Stärke der ADAM10 Genexpression beeinflussen können (Prinzen et al., 2005; Tippmann et al., 2009; Lammich et al., 2010). Dem gegenüber ist noch unbekannt, ob z.B. lösliche Spleißvarianten (Yavari et al., 2008) auch eine physiologische Rolle spielen.

Die Anreicherung von ADAM10 in Tetraspanin-reichen Membrankompartimenten, auch Tetraspanin-*Web* genannt, führt zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung von ADAM10 in Bezug auf die Proteolyse von *Tumor necrosis factor* (TNF)- α oder verschiedener *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Liganden (Arduise et al., 2008), welche bekannte Substrate von ADAM10 darstellen (Yan et al., 2002; Andre et al., 2006; Arduise et al., 2008; Xu et al., 2009).

Die ADAM10-vermittelte Proteolyse von EGFR-Liganden und die Transaktivierung von benachbarten EGF-Rezeptoren kann weiterhin durch die Bindung spezieller Liganden, wie Bombesin oder Thrombin an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) initiiert werden. Obwohl hier der genaue Signalweg innerhalb der Zellen noch nicht bekannt ist, konnte eine Bedeutung der Ca^{2+} vermittelten Aktivierung des Protein Kinase C (PKC) Signaltransduktionsweges unter Beteiligung von MEK/ERK nachgewiesen werden (Yan et al., 2002).

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, z.B. durch Ionophore wie Ionomycin, wird daher auch häufig zur Aktivierung von ADAM10 in zellbasierten Experimenten eingesetzt (Stoeck et al., 2006; Eichenauer et al., 2007; Hundhausen et al., 2007; Galichet et al., 2008). Im Vergleich zur Regulation von ADAM17 zeigen sich hierbei eine Reihe von Unterschieden, welche im Gegensatz zur der großen Homologie im Bezug auf Substratselektivität und Gewebeexpression einen möglicherweise einfacheren Ansatzpunkt zur Kontrolle der spezifischen ADAM Aktivitäten bieten könnte. Zu nennen sind hierbei die häufige Lokalisierung von ADAM17 in *lipid rafts* der Zellmembran, die Stimulierbarkeit durch Phorbolster wie PMA und die untergeordnete Rolle bei nicht-stimulierten, sogenannten konstitutiven Sheddingprozessen (Zheng et al., 2004; Horiuchi et al., 2007). Obwohl auch für ADAM10, wie eingangs beschrieben, Signal-aktivierte Sheddingprozesse beobachtet wurden, gilt sie im Gegensatz zu der signal-aktivierbaren ADAM17 Sheddase als hauptsächlich konstitutiv aktive Sheddase (Maretzky et al., 2005b).

1.3.3 Physiologische Bedeutung von ADAM10

Die Untersuchung der physiologischen Funktion von Proteinen unterteilt sich im Wesentlichen in zwei große Teilbereiche: *Gain-of-function* Studien beschreiben dabei die Technik eine erhöhte Menge des zu untersuchenden Proteins in eine immortalisierte Zelllinie oder auch primäre Zelle durch verschiedene Transfektionsmethoden einzubringen und hieraus resultierende Effekte zu messen. Im Fall von ADAM Metalloproteasen kann dies in erster Linie durch die Analyse der N- und C-terminalen Spaltprodukte von Oberflächenproteinen geschehen. Vorzugsweise werden hierfür Techniken wie die Quantifizierung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie, idealerweise kombiniert mit einer gleichzeitigen Quantifizierung, der durch den proteolytischen Schnitt entstandenen löslichen Fragmente im Zellkulturüberstand, mittels *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Weiterhin kann eine qualitative Betrachtung der entstandenen Spaltfragmente durch eine Western Blot Analyse stattfinden. In letzter Zeit haben sich auch vermehrt proteomische High-Throughput Verfahren, wie 2D-Page, LC MS/MS oder *isotope-coded affinity tag* (ICAT) als wertvolle Werkzeuge zur Identifikation neuer ADAM Substrate erwiesen (Bech-Serra et al., 2006; Esselens et al., 2008; Wollscheid et al., 2009).

Für alle genannten Techniken gilt jedoch die Gefahr der Identifikation nicht relevanter oder artifizieller Protease-Substrat Interaktionen aufgrund des extrem gesteigerten Enzym-Substrat Ratios. Daher haben sich *loss-of-function* Studien in primären Zellen oder ganzen Modellorganismen wie dem Fadenwurm (*C. elegans*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) oder der Maus (*mus musculus*) als Gold-Standard etabliert. Zum Beginn dieser Arbeit gab es klassische ADAM10 Knockout Mäuse, die an Embryonaltag 9.5 u.a. mit schweren Defekten in der ZNS-Anlage, der Somiten- und der Herzentwicklung *in utero* verstarben (Hartmann et al., 2002). Als primäre Zellen konnte hieraus ausschließlich murine embryonale Fibroblasten gewonnen werden (MEFs), die jedoch viele der gewebespezifischen Oberflächenproteine aus z.B. neuronalen, epidermalen, lymphatischen oder hepatischen Geweben noch nicht exprimieren. Die Notwendigkeit putative Substrate erneut in die MEFs durch Transfektion zu transferieren egalisiert die eigentlichen Vorteile des *loss-of-function* Herangehensweise zur Substratanalyse von ADAM10 *in vivo* weitgehend.

Alternativ bietet sich der Einsatz von inhibierenden RNAs (z.B. siRNA) in humanen oder murinen Zelllinien an, wobei hier sehr schwierig abzuschätzen ist, welche Stärke des Knockdowns von ADAM10 erreicht werden muss, um eine theoretisch signifikante Änderung des jeweiligen Enzym-Substrat Umsatzes erreichen zu können. Durch die Anwendung konditioneller Mausmodelle, wie schon unter 1.1 beschrieben, konnten erst kürzlich die Auswirkungen einer Deletion von ADAM10 auf die Entwicklung des ZNS (Jorrisen et al., 2010) und die Reifung von B-Lymphozyten (Gibb et al., 2010) gezeigt werden. Diese und weitere konditionale und induzierbar konditionale ADAM10-defiziente Mausmodelle, könnten die nun folgenden Ergebnisse zellbasierter Experimente aus *gain-of-function* Studien (1.3.3.1) verifizieren und zeigen, ob und in welcher Hinsicht ADAM10 auch weiterhin ein mögliches therapeutisches Ziel bleiben kann.

1.3.3.1 Substratanalyse durch *Gain-of-function* Studien von ADAM10

Im Gegensatz zu vielen anderen Proteasen scheinen die ADAMs, und auch ADAM10 im Speziellen, keine Konsensussequenz in der Aminosäureabfolge ihrer potenziellen Substrate zu nutzen, um die jeweilige Schnittstelle zu erkennen (Morrison et al., 2009; Butler et al., 2009). Zwar konnten Vorzüge für z.B. hydrophobe Aminosäuren an bestimmten Positionen des Substrates (vorwiegend in der P⁻¹ Position) durch Screening aller bekannten ADAM Substrate gefunden werden (Edwards et al., 2008), sie stellen allerdings keine Bedingung für eine erfolgreiche Proteolyse der bis jetzt identifizierten Substrate dar. Eine weitere wichtige Beobachtung war die Erkenntnis, dass das C-terminale Fragment eines großen Anteils der von ADAM Metalloproteasen geschnittenen Substrate durch γ -Sekretasen weiter prozessiert wird und zur Generation eines intrazellulären zytosolischen Fragmentes (ICD) führt. Dieser Prozess wird auch als *Regulated intramembrane proteolysis* (RIPping) bezeichnet und findet in der hydrophoben Umgebung der Plasmamembran statt (De Strooper et al., 1999; Annaert und De Strooper, 2002; Hass et al., 2009). Offenbar können die Preseniline, essentielle Komponenten des γ -Sekretase Komplexes, mit Hilfe einer ihrer Transmembrandomänen aktivierte Wassermoleküle für die Proteolyse in die Plasmamembran rekrutieren (Tolia et al., 2006).

Für manche Substrate, z.B. den Notch1-Rezeptor, konnte schon eine Bedeutung des ICDs als Transkriptionsfaktor oder Modulator von Transkriptionsfaktoren gezeigt

werden (De Strooper et al., 1999; Kopan und Ilagan, 2009). Aus der Vielzahl von putativen Substraten sollen im Folgenden vier Gruppen gesondert betrachtet werden, da sie als möglicherweise präferentielle und die am besten untersuchte Substrate von ADAM10 gelten. Generell lässt sich jedoch sagen, dass schon aus allen Bereichen zellbiologischer und zellbiochemischer Prozesse Substrate für ADAM10 beschrieben wurden.

Stammzell- und Differenzierungsmarker

Hierbei sind in erster Linie der Notch1-Rezeptor und einer seiner Liganden *delta-like 1* (Dll1) zu nennen (Wen et al., 1997; Hartmann et al., 2002; Six et al., 2003). Das Rezeptor-Liganden Paar Notch-Delta stellt einen zentralen Differenzierungssignalweg zur Zellschicksalentscheidung dar, welcher auch evolutionär hoch konserviert ist (Knust und Campos-Ortega, 1989; Muskavitch, 1994; Nye und Kopan, 1995; Rottinger et al., 2006; Takacs-Vallai et al., 2007). So können Komponenten des Notch-Delta Signalweges sowohl in *C. elegans*, als auch in *D. melanogaster* und höheren Vertebraten wie Mäusen und Menschen gefunden werden. In Mäusen finden sich dabei vier verschiedene Notch-Rezeptoren, von denen mindestens die ersten drei ubiquitär exprimiert werden, während der Notch4-Rezeptor überwiegend in Endothelien zu finden ist (Mumm und Kopan, 2007; Kopan und Ilagan, 2009; Miniati et al., 2010). Je nach Gewebe können sie dabei redundante aber auch nicht-redundante Funktionen erfüllen (Zeng et al., 1998; Kitamoto et al., 2005; Demehri et al., 2008; Koch et al., 2008). Bei allen handelt es sich um TypI-Transmembranproteine, dessen extrazelluläre Domänen aus 29-36 EGF *repeats* bestehen und die Bindemotive für die entsprechenden Notch-Liganden (*delta-like 1,3* und *4*, sowie *jagged-1* und *-2*) enthalten.

Die Notch-Rezeptoren werden nach einem initialen, vermutlich Furin-vermittelten, intrazellulären Schnitt (S1-Schnitt) als nicht-kovalent verknüpfte Heterodimere auf die Zelloberfläche transportiert (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998; Gordon et al., 2009). Dort können sie entweder in *cis* mit Notch-Liganden der gleichen Zelle oder in *trans* mit Notch-Liganden von benachbarten Zellen interagieren. Während die *cis* Bindung eine inhibitorische Wirkung auf die Differenzierung von Stamm- oder Progenitorzellen ausübt (Jacobson et al., 1998; Li et al., 2004; Becam et al., 2010; Sprinzak et al., 2010) kann die Bindung des Notch-Liganden in *trans* (Signalsenderzelle) eine Aktivierung der Notch-Rezeptor tragenden Zellen (Signalempfängerzelle)

auslösen und wird auch als kanonischer Signalweg bezeichnet (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Weinmaster, 1997; Ge et al., 2002; D'Souza et al., 2008; Kopan und Ilagan, 2009). Die Abbildung Bild 1.1 zeigt schematisch den kompletten kanonischen Notch Signalweg, der so für alle vier verschiedenen Notch-Rezeptoren gültig ist:

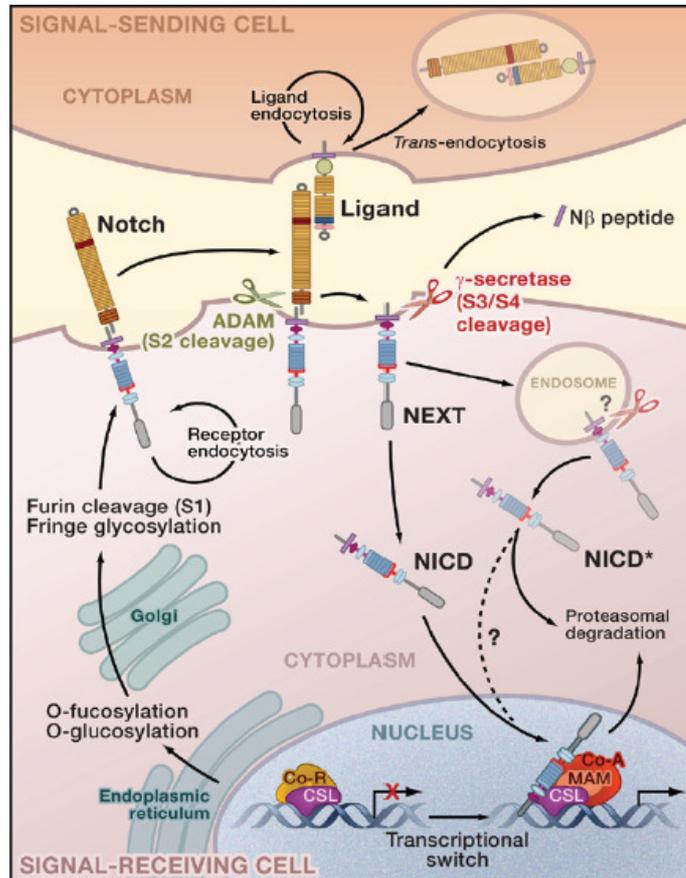


Bild 1.1: Der kanonische Notch Signalweg (entnommen aus Kopan und Ilagan 2009)

Der neu synthetisierte Notch Rezeptor wird glykosyliert und reift durch einen ersten proteolytischen Schnitt (S1) der Furin Konvertase zu einem oberflächenexprimierten Heterodimer. Durch Bindung eines Notch-Liganden auf benachbarten Zellen wird der kanonische Signalweg induziert, der mit einem initialen Schnitt kurz oberhalb der Plasmamembran (S2) beginnt. Der Schnitt erfolgt durch eine noch nicht identifizierte ADAM Metalloprotease und führt zur Bildung eines C-terminalen Fragmentes (*Notch extracellular truncation* – NEXT), das wiederum durch die γ -Sekretasen Presenilin 1 und 2 geschnitten werden. Durch diesen Schnitt entsteht neben einem extrazellulären (N β) auch ein zytoplasmatisches Fragment (*Notch intracellular domain* – NICD), das in den Nucleus transloziert und u.a. mit dem DNA-Bindeprotein CSL einen Transkriptionsaktivator-Komplex bildet. Dies führt zur Expression von Notch Zielgenen die für viele Zellschicksalsentscheidungen eine wichtige Funktion einnehmen.

Dabei wird die N-terminale Domäne des Notch-Rezeptor Heterodimers (NECD) durch den Liganden endozytiert und das verbleibende Fragment (*Notch transmembrane and intracellular domain* – NTMIC oder auch S1-Fragment) kann nun erneut geschnitten werden (S2-Schnitt). Während für *Drosophila* gezeigt werden konnte, dass Kuzbanian, welches das Ortholog von ADAM10 in *D. melanogaster* ist (Nye et al., 1997; Pan et al.,

1997), die Hauptshedase für den Notch1-Rezeptor und die Generation des S2 oder NEXT-Fragmentes ist, haben zellbasierte Experimente gezeigt, dass in der Maus hauptsächlich ADAM17 für den S2-Schnitt des Notch1-Rezeptors verantwortlich ist (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Übereinstimmend erfolgt aber in allen Organismen der S3-Schnitt durch die γ -Sekretasen Presenilin1/2, welcher dann zur Entlassung des zyttoplasmatischen Fragmentes (NICD) führt (Levitan et al., 1998; Struhl und Greenwald, 1999; Saxena et al., 2001). In Bild 1.1 kann gesehen werden, dass das NICD u.a. an den Transkriptionsfaktor CSL (CBF/RBP-j κ /Su(H)/Lag-1) bindet, welcher ohne die Bindung des NICD normalerweise mit ubiquitären Co-Repressorproteinen (z.B. SMRT, SKIP oder SHARP) und Histondeacetylasen (HDACs) einen Komplex bildet, der die aktive Transkription von CSL-abhängigen Genen unterdrückt (Martinez Arias et al., 2002; Lai et al., 2002; Kovall et al., 2008). Hierzu gehören z.B. die Transkriptionsfaktoren der Hes und Hey-Familie (Iso et al., 2003; Axelson, 2004; Fischer et al., 2007). Damit bildet der Notch-Signaltransduktionsweg einen Signalweg, der keinerlei *second messenger* benötigt und auch allein aufgrund des wechselnden Expressionprofils von Rezeptoren und Liganden reguliert werden kann. Auch die Notch-Liganden können möglicherweise Substrate für ADAM10 darstellen. Dies konnte in zellbasierten Experimenten und auch in primären Fibroblasten der Maus gezeigt werden (Six et al., 2003; LaVoie und Selko, 2004; Vooijs et al., 2004; Dyczynska et al., 2007).

EGFR/EGFR-Liganden Familie

In letzter Zeit akkumulieren die Hinweise, dass ADAM10 auch bei der Transaktivierung von EGF-Rezeptoren durch die initiale Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und die Metalloprotease-vermittelte Prozessierung von EGFR-Liganden (z.B. EGF und β -Cellulin) eine entscheidende Rolle spielt (Yan et al., 2002; Sahin et al., 2004). Dieser Prozess ist exemplarisch in Bild 1.2 dargestellt.

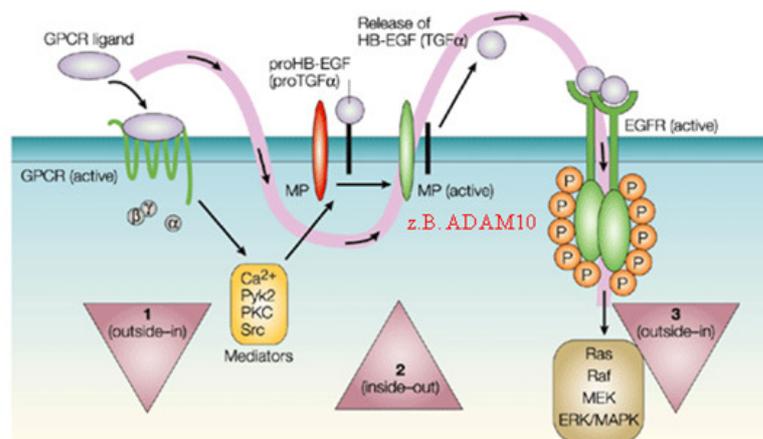


Bild 1.2: Transaktivierung von EGF-Rezeptoren (entnommen aus Prenzel et al., 1999)

Gezeigt ist der dreistufige Prozess der EGFR-Aktivierung. Im ersten Schritt wird ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) durch einen spezifischen Liganden aktiviert. Dies führt zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumflux, der u.a. auch Metalloprotease (MP), wie ADAM10 zum Shedding von EGFR-Liganden induziert. Die löslichen EGFR-Liganden können dann an ihre entsprechenden Rezeptoren binden und zur intrazellulären Phosphorylierung führen. Dies ist der Ausgangspunkt verschiedener Signalkaskaden (z.B. Ras) die eine wichtige Rolle bei Proliferation und Apoptose einnehmen.

Die Phosphorylierung der EGFRs spielt dabei eine entscheidende Rolle für Zellproliferation und Zellzykluskontrolle (Earp et al., 1995; Warren et al., 2006; Quesnelle et al., 2007). Eine andauernde Signalweiterleitung dieser Rezeptoren führt in vielen Fällen zu Tumorentstehung und Progression (Fischer et al., 2003; DeLuca et al., 2008; Sternlicht und Sunnarborg, 2008; Milanezi et al., 2008). Dies ist eines der wenigen Beispiele, bei denen eine Aktivierung der Metalloprotease ADAM10 spezifisch reguliert werden kann.

Zudem konnte bis jetzt nur für zwei, EGF und β -Cellulin, der mehr als zehn verschiedenen EGFR-Liganden eine spezifische Aktivierung durch ADAM10 nachgewiesen werden (Peschon et al., 1998; Reddy et al., 2000; Sahin et al., 2004; Schafer et al., 2004; Yokozeki et al., 2007). Neben ADAM10 ist in erster Line ADAM17 die hauptsächliche Sheddase für die meisten der EGFR-Liganden (Sahin et al., 2004), aber auch ADAM9, 12, 15 und 28 konnten schon als putative Sheddasen identifiziert werden (Izumi et al., 1998; Asakura et al., 2002; Hart et al., 2005; Peduto et al., 2005; Mitsui et al., 2006). Noch ist ungeklärt in welchem Fall und über welchen intrazellulären Signalweg die entsprechenden ADAM Metalloprotease für den proteolytischen Schnitt ausgewählt wird. Es ist naheliegend, dass die zytoplasmatischen Domänen der ADAMs dabei eine wichtige Rolle spielen, jedoch konnten

Untersuchungen zeigen, dass auch ADAMs mit weitreichenden Mutationen oder Deletionen in der zytoplasmatischen Domäne weiterhin eine proteolytische Aktivität gegenüber EGFR-Liganden aufweisen (Reddy et al., 2000; Doedens et al., 2003).

Eine zusätzliche Möglichkeit der Regulation könnte dabei in der spezifischen Lokalisation von Enzym und Substrat in *lipid rafts* der Plasmamembran liegen. So wurde, wie schon unter 1.3.2 angesprochen, eine Beteiligung von Tetraspaninen bei der Regulation von ADAM10 auch im Bezug auf das Shedding von EGFR-Liganden gefunden (Arduise et al., 2008).

APP und PrP^c

Eines der ersten identifizierten Substrate für ADAM10 ist das *Amyloide Precursor Protein* (APP) (Lammich et al., 1999; Kojro et al., 2001; Schroeder et al., 2009; Jorissen et al., 2010), welches neben einer noch ungeklärten physiologischen Rolle, vor allen Dingen ein wichtiger Auslöser für die Entstehung von Morbus Alzheimer ist. APP ist, ähnlich dem Notch1-Rezeptor, ebenfalls ein Transmembranprotein, das sequenziell durch eine α -Sekretase geschnitten und dann durch eine γ -Sekretase "geRIPt" wird. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden dabei ADAM9, 10 und 17 als mögliche α -Sekretasen diskutiert (Asai et al., 2003; Allinson et al., 2004). Dieser an sich physiologische Vorgang kann durch die vermehrte Aktivität, einer als β -Sekretase bezeichnete Aspartylprotease (BACE1) und ebenfalls anschließender RIPPING Aktivität, zur Generation eines adhäsiven Polypeptids (A β) führen (Marcinkiewicz et al., 2000; Nunan und Small, 2000). Das A β bezeichnet dabei das Fragment, welches zwischen β - und γ -Sekretaseschnitt liegt. Da der α -Sekretase Schnitt innerhalb dieses Fragmentes geschieht, bietet er dementsprechend Schutz vor der Generation des adhäsiven Polypeptids (Postina et al., 2004; Bandyopadhyay et al., 2006; Harris et al., 2009, Schroeder et al., 2009).

Die Identifikation der hauptsächlichen α -Sekretase stellt somit ein wichtiges Ziel der biomedizinischen Grundlagenforschung dar. Neben der Möglichkeit der Inhibition der β - oder γ -Sekretase, würde sich durch eine Steigerung der α -Sekretase Aktivität möglicherweise ein alternativer Ansatz zur Behandlung des Morbus Alzheimer ergeben. Zur Erforschung dieses therapeutischen Ansatzes wurde schon eine transgene ADAM10 Maus unter einem selektiven Promotor des Gehirns generiert (Postina et al., 2004; Schroeder et al., 2009). Diese und eine transgene Maus mit einer inaktiven Mutante der

Metalloprotease ADAM10 wurden in ein allgemein akzeptiertes Mausmodell für die beschleunigte Generation des Morbus Alzheimer (“*early-onset*“ durch die sogenannte Schweden-Mutation in der APP-Sequenz) eingekreuzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass lediglich die transgene Maus mit dem aktiven ADAM10 in der Lage war, die amyloiden Plaques im Gehirn der Alzheimer-Modellmäuse signifikant zu reduzieren, während die Überexpression der inaktiven Mutante keinerlei vergleichbaren Auswirkungen zeigte (Schroeder et al., 2009).

Zelladhäsionsmoleküle

Die ersten drei Beispiele haben gezeigt, dass ADAM10 ein weitreichendes Substratspektrum aufweist. Für die Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle konnten jedoch überraschend viele Kandidaten als mögliche ADAM10 Substrate identifiziert werden (Edwards et al., 2008). Hierunter fallen im Besonderen die Cadherine. Unabhängig von Expression und Gewebeverteilung, konnte dabei für E-, N-, Proto- und VE-Cadherin ähnliche Beobachtungen im Bezug auf Sheddingvorgang und *downstream signaling* beschrieben werden (Reiss et al., 2005; Maretzky et al., 2005; Maretzky et al., 2005b; Reiss et al., 2006; Schulz et al., 2008). Die Cadherine stellen eine ebenfalls hochkonservierte Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen dar, welche wichtige Funktionen bei der Ausbildung von Zell-Zell, sowie Zell-Matrix Kontakten, der Zellmigration und der Polarisierung von Zellen einnehmen (Takeichi, 1991; Gumbiner et al., 1996; Makrilia et al., 2009).

Eine deregulierte Oberflächenexpression dieser Cadherine konnte bei einer Vielzahl von Tumoren und Krebszellen entdeckt werden und verschlechtert häufig die Prognosen für eine Rekonvaleszenz durch ein erhöht invasives Verhalten der Krebszellen, sowie eine Steigerung der Vaskularisierung von soliden Tumoren (Birchmeier et al., 1994; Shiozaki et al., 1996; Behrens et al., 1999; Reynolds et al., 2004; Paschos et al., 2009). Da z.B. E- und N-Cadherin mögliche γ -Sekretase Substrate sind (Marambaud et al., 2002; Marambaud et al., 2003) liegt es nahe auch hier eine Beteiligung von ADAM10 als initial schneidende α -Sekretase zu erforschen (s. 1.3.3.2). Neben ADAM10 wurden jedoch eine Reihe weiterer Metalloproteasen, u.a. ADAM15, Meprin und MMP-7 als Kandidaten für die Spaltung von Cadherinen postuliert (Lee et al., 2007; Huguenin et al., 2008; Najy et al., 2008).

Auch hier lässt sich abschließend wieder sagen, dass es durchaus möglich scheint, dass

je nach zellulärem Kontext unterschiedliche (Metallo-)proteasen in der Lage sind ein bestimmtes Substrat zu prozessieren. Hierzu gehören vorrangig auch pathophysiologische Situationen, wie Hypoxie, Tumorgenese oder akute und chronische Entzündungskrankheiten (Webster et al., 2004; Edwards et al., 2008).

1.3.3.2 Substratanalyse durch *loss-of-function* Studien von ADAM10

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur ein einziges *loss-of-function* Modell, welches die Funktion von ADAM10 *in vivo* beschreiben konnte. Dies war der klassische Keimbahn-Knockout von ADAM10, welcher zu einer embryonalen Letalität der ADAM10 defizienten Tieren an E9.5 führt (Hartmann et al., 2002). Die ADAM10 defizienten Embryos zeigten dabei multiple Defekte bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems, des Kardiovaskulären Systems und der Somitenentwicklung welcher in ihrer Ausprägung in erster Linie dem Notch1-Rezeptor Knockout Mäusen entsprechen (Swiatek et al., 1994; Conlon et al., 1995).

Demgegenüber konnten zellbasierte Experimenten zeigen, dass auch ADAM17 als Hauptsheddase für den Notch1-Rezeptor in Betracht zu ziehen ist (Mumm et al., 2000; Brou et al., 2000). Der entsprechende klassische Knockout zeigte jedoch keinen Notch-ähnlichen Phänotyp. ADAM17 defiziente Mäuse sterben perinatal und weisen Phänotypen auf, die vergleichbar mit Phänotypen von klassischen EGFR-Liganden (z.B.: TGF- α) Knockout Mäusen sind. Im Verlaufe dieser Arbeit erschienen Publikationen über konditionale Knockout Mäuse von ADAM10 und ADAM17. Für ADAM10 wurde dabei ein konditionaler Knockout von ADAM10 in neuronalen Progenitor-Zellen des ZNS (unter der Kontrolle des Nestin-Promotors) (Jorrisen et al., 2010) und in B-Lymphozyten (unter der Kontrolle des CD19 Promotors) (Gibb et al., 2010) generiert. Für beide Mausmodelle konnte eine deutliche Beeinträchtigung des Notch-Signalweges gezeigt werden. Im ZNS führt dies zu einer frühzeitigen Maturierung und einhergehendem Verlust der neuronalen Progenitorzellen zu differenzierten Neuronen auf Kosten der Astrozyten, welche ebenfalls aus den neuronalen Progenitorzellen gebildet werden. ADAM10 defiziente B-Zellen zeigen ebenfalls einen Defekt bei der Notch-abhängigen Zellschicksalsentscheidung von unreifen B-Zellen (Gibb et al., 2010). So können in der Milz nahezu keine marginalen B-Zellen, dafür jedoch eine stark erhöhte Menge an folliculären B-Zellen gefunden werden. Beide Publikationen zeigen zudem, dass sowohl

APP (von neuronalen Progenitorzellen) als auch CD23 (auf B-Zellen der Milz) neben Proteinen des Notch Signalweges *in vivo* Substrate von ADAM10 sind. Ebenfalls identisch sind jedoch auch die Befunde, dass die Beeinträchtigung der Proteolyse dieser beiden zusätzlichen Substrate, entweder keine physiologische Relevanz aufweist oder durch die auftretenden Notch-Phänotypen vollständig maskiert wird.

Für ADAM17 wurde bis jetzt erst ein induzierbar konditionaler Knockout in Interferonsensitiven Zellen des hämatopoetischen Systems (unter der Kontrolle des Mx1-Promotors) durchgeführt (Horiuchi et al., 2007b). Interessanterweise waren die Mäuse nach dem postnatalen Verlust von ADAM17 in den entsprechenden Zellen phänotypisch unauffällig und zeigten im Gegensatz dazu eine verminderte Sterblichkeit bei einer LPS-induzierten Sepsis. Dies ließ sich in erster Linie auf eine verminderte Prozessierung des Zytokins TNF- α zurückführen, welches in seiner löslichen Form als Hauptursache für die Auslösung von sogenannten *systemic inflammatory responses* (SIRs) bei der Sepsis gilt (Bagby et al., 1991; Tracey und Cerami, 1993).

1.3.4 Pathophysiologische Rolle von ADAM10

Bis jetzt konnten in Tumoren des Darms (Gavert et al., 2005), des Magens (Yoshimura et al., 2002), der Prostata (McCulloch et al., 2004), der Epidermis (Ko et al., 2007) und den weiblichen Reproduktionsorganen (Fogel et al., 2003) eine erhöhte Expression von ADAM10 nachgewiesen werden, die in Mehrheit der Fälle auch mit einer signifikant verschlechterten Überlebensprognose korrelierten (Mochizuki und Okada, 2007; Murphy, 2009). Weiterhin wurden auch in einigen Leukämiepatienten erhöhte Immunreaktivitäten gegen ADAM10 entdeckt (Wu et al., 1997). Obwohl für verschiedene Tumorgewebe erhöhte löslichen Mengen von putativen ADAM10 Substraten gefunden wurden (DeWever et al., 2007; Urs et al., 2008; Amirghofran et al., 2008; Lee et al., 2010), ist derzeit noch nicht geklärt an welchen Prozessen der Tumorentwicklung ADAM10 auch funktional beteiligt ist. Weiterhin ist noch offen, ob eine erhöhte ADAM10 Expression letztendlich mehr schädliche oder mehr nützliche Effekte im Bezug auf die Tumorgenese ausübt.

Neben den Tumor- und Krebserkrankungen konnte eine erhöhte ADAM10 Expression zudem in verschiedenen chronischen und akuten Entzündungskrankheiten, u.a. der Psoriasis und akuten Ekzemen festgestellt werden (Maretzky et al., 2008; Oh et al.

2008; Bourd-Boittin et al., 2009; Crawford et al., 2010). Hierauf wird noch einmal im Besonderen in Kapitel 1.3.4 eingegangen.

1.4 Die murine Epidermis

Die murine Epidermis stellt die ultimative Barriere der Haut gegen eine Invasion von toxischen Substanzen oder mikrobiellen Pathogenen, sowie eines unkontrollierten Verlustes von Körperflüssigkeiten dar (Koster und Roop, 2007). Die Ausnahmestellung der Epidermis und der ihr zugeordneten Anlagen (Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen) zeigt sich durch die fortwährende Selbsterneuerung und die schnelle und vollständige Regeneration auch nach großflächigen Verletzungen. Dies wird durch die Varianz und die Intensität der äußeren Einflüsse, wie Temperatur, Druck, Strahlung und Feuchtigkeit erfordert und stellt eine besondere Anforderung an Morphogenese und Homöostase der Epidermis dar (Blanpain und Fuchs, 2009).

1.4.1 Anatomie

Obwohl es sich bei der Epidermis um eine Hautschicht mit klar definierten Grenzen und spezifisch exprimierten Wachstums- und Differenzierungsmarkern handelt, steht sie jedoch in wechselseitigem physikalischen und biochemischen Kontakt mit der ihr unterliegenden Dermis (Chuong und Noveen, 1998; McMillan et al., 2003). Dies wird besonders bei Betrachtung der Haaranlagen deutlich. Die Bild 1.3 zeigt den schematischen Aufbau der Haut:

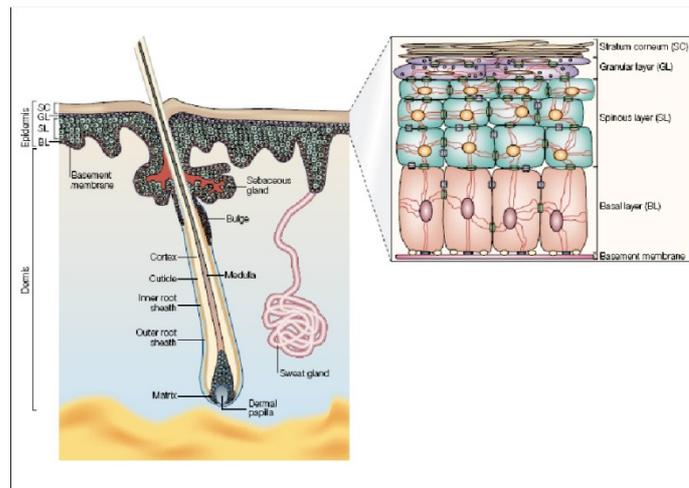


Bild 1.3: Schematischer Aufbau der Haut und der Epidermis (entnommen aus Fuchs und Raghavan, 2002)

Die murine Haut besteht aus Epidermis und Dermis, welche durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind. Die Epidermis ist ein stratifiziertes Plattenepithel, das aus den vier Zellschichten *stratum basale* (BL), *stratum spinosum* (SL), *stratum granulosum* (GL) und *stratum corneum* (SC). Das *stratum basale* ist dabei die einzige Schicht mit proliferativ aktiven Zellen, aus denen alle terminal differenzierten Zellen der Epidermis hervorgehen. Weiterhin ist ein Haarfollikel mit Talgdrüse gezeigt, der zusammenhängend mit der Interfollikuläre Epidermis (IFE) die Hautbarriere bildet. Am unteren Ende des Haarfollikels befindet sich die Dermale Papille mit den residenten Matrix-Stammzellen des Haarfollikels.

Neben den Keratinozyten der Epidermis und den Fibroblasten der Dermis befinden sich noch weitere Subpopulationen von Zellen in der Haut, die jedoch nicht epidermalen oder dermalen Ursprungs sind. So wandern pigmenttragende Melanozyten aus der Neuralleiste des ZNS in die Haarfollikel und andere Bereich der Interfollikulären Epidermis (IFE) ein (Breathnach, 1980; Vijayasaradhi und Houghton 1995; Ernfors, 2010). Neben der Produktion des Farbstoffs Melanin für die Fellfarbe der Mäuse und die Pigmentierung der IFE konnte bis zum heutigen Zeitpunkt keine weiteren eindeutig belegten Funktionen für diese Zellpopulation gezeigt werden.

Außerdem befinden sich noch eine Reihe verschiedener Entzündungszellen, wie Langerhans Zellen, γ/δ T-Zellen und Gewebsmakrophagen, in allen Schichten der Haut (Wolff, 1972; Cumberbatch et al., 2000; Loser et al., 2007; Jameson et al. 2007; Romani et al., 2010). Sie erfüllen in erster Linie die Aufgabe einer direkten Abwehr von Pathogenen, welche die epidermale Barriere durchbrechen konnten, sowie der Rekrutierung von weiteren Entzündungszellen bei einer größeren Invasion von Bakterien oder Parasiten (Metz und Maurer, 2009).

1.4.2 Morphogenese

Die embryonale Morphogenese der murinen Epidermis startet etwa an Embryonaltag 8.5 und durchläuft mehrere charakteristische Schritte, die im Wesentlichen durch die Assoziation wechselnder Expression von Keratinen, als Differenzierungsmarker der entstehenden epidermalen Schichten, beschrieben werden (Smart, 1970; M'Boneko und Merker, 1988; Hardman et al., 1998; Lechler und Fuchs, 2005). Dieser Vorgang wird als Epidermale Stratifizierung bezeichnet und bildet die Grundlage für die Integrität der epidermalen Barrierefunktion.

Entwicklung der basalen Schicht

Zwischen E8.5 und E12.5 bildet sich die erste, einlagige und hoch proliferative Schicht der Epidermis aus der mesenchymalen Dermis – das *stratum basale* (Lu et al., 2001; Yasue et al., 2001; Bakkers et al., 2002; Lee und Kimmelman, 2002; Koster et al., 2004). Der wichtigste Schritt für diesen Differenzierungsprozess ist die Induktion des Transkriptionsfaktors p63, welcher auch als erster, rein Epidermis-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben wurde (Green et al., 2003). Dabei gibt es zwei verschiedene Isoformen des p63 Gens, die sich in der Expression einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA-Domäne) unterscheiden (Yang et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Isoform mit dieser Domäne (TAp63) die alleinige Isoform für die Initiation der epidermalen Stratifizierung ist (Koster et al., 2004; Koster et al., 2006; Romano et al., 2007), während die Isoform ohne Transaktivierungsdomäne (Δ Np63) offenbar erst nach diesem Schritt exprimiert und vermutlich eher die Aufgabe der Aufrechterhaltung des *stratum basale* übernimmt (Candi et al., 2006; Romano et al., 2007). TAp63 kann als direkter Aktivator der Genexpression von AP-2 γ die Expression der beiden basalspezifischen Keratine K5 und K14 induzieren (Koster et al., 2006) und die Expression der dermalen Marker K8 und K18 reduzieren (Moll et al., 1982). Die Expression von Keratin 14 kann in Zellen mit schon erfolgter epidermaler Stratifizierung auch direkt über Δ Np63 induziert werden (Sinha et al., 2000; Romano et al., 2007). Dementsprechend zeigen p63 Knockout Mäuse eine fehlende epidermale Stratifizierung und den daraus folgenden perinatalen Tod durch einen stark gesteigerten epidermalen Wasserverlust (Mills et al., 1999).

Neben dem Wechsel in der Expression der basalen Differenzierungsmarker, zeigen

basale Keratinozyten auch eine starke Steigerung der Expression von extrazellulären Matrixproteinen und Zelladhäsionsmolekülen, die bei der Entstehung von desmosomalen und hemidesmosomalen Zell-Zellkontakten eine wichtige Funktion einnehmen (Borradori et al., 1999; Stokes, 2007; Niessen, 2007; Proksch et al., 2008). Hierdurch erfolgt die Generation einer physikalischen Grenze zwischen Dermis und Epidermis, die auch als Basalmembran oder Basallamina bezeichnet wird (McMillan et al., 2003). Für die Ausbildung von Haarfollikeln und Talgdrüsen konnten in erster Linie der Wnt/ β -Catenin, der *bone morphogenetic protein* (BMP) und der *sonic hedgehog* (Shh) Signalweg als essentiell notwendige Signalwege identifiziert werden (Hawley et al., 1995; Wilson et al., 2001; Pearton et al., 2005; Mukhopadhyay et al., 2006). So wurde für Mäuse mit einer konstitutiv aktiven Form des β -Catenin eine drastische Verstärkung des Haarwuchses durch eine *de novo* Entwicklung von Haarfollikeln gezeigt werden (Gat et al., 1998), während die entsprechenden β -Catenin oder LEF - ein *downstream* Regulator des β -Catenin Signalweges – Knockout Mäuse eine deutliche Verringerung der Haarfollikel und damit des Haarwuchses aufweisen.

Aufrechterhaltung der basalen Schicht

Neben den basalen Keratinozyten, die das terminale Differenzierungsprogramm durchlaufen, müssen in allen Phasen der Morphogenese und auch der postnatalen Homöostase stets genügend proliferierende Zellen im *stratum basale* vorhanden sein, um die ständige Selbsterneuerung der Epidermis zu gewährleisten. Hierbei scheint auch Δ Np63 eine wichtige Rolle zu spielen. So werden wie schon im vorherigen Kapitel auf der einen Seite die Expression der basalen Differenzierungsmarker Keratin 5 und 14 induziert, auf der anderen Seite wird zugleich die Aktivierung des Notch Signalweges und damit die Expression der beiden Gene p21 und 14-3-3 σ verhindert, welche essentiell für die Einleitung der terminalen Differenzierung von basalen Keratinozyten sind (Dellambra et al., 1995; Missero et al., 1995; Pellegrini et al., 2001; Westfall et al., 2003; Nguyen et al., 2006). Noch ungeklärt ist die Frage warum jedoch auch für die Expression des Keratin 1 und damit der Übergang von basalen zu suprabasalen Keratinozyten eine Synergie von Δ Np63 und Notch notwendig ist (Nguyen et al., 2006, Koster et al., 2007b). Dies steht im ersten Hinblick in einem deutlichen Widerspruch zu den bis jetzt erläuterten Funktionen von Δ Np63. Eine mögliche Erklärung wäre die Regulation durch einen weiteren, noch unbekanntem Faktor, welcher letztendlich

entscheidet, ob die basalen Keratinozyten eine terminale Differenzierung durchlaufen oder im *stratum basale* verbleiben.

Entwicklung der Intermediären Schicht und des *stratum spinosum*

Zwischen E12.5 und E14.5 bildet sich durch asymmetrische Zellteilung, perpendicular zur Basalmembran, eine intermediäre Schicht oberhalb des *stratum basale*, die noch mitotische Eigenschaften, jedoch schon die Differenzierungsmarker Keratin 1 und 10 des *stratum spinosum* aufweist (Smart, 1970; Lechler und Fuchs; 2005, Koster 2007b). Diese intermediäre Schicht wird ausschließlich während der embryonalen Morphogenese gebildet und es ist noch nicht detailliert untersucht worden, warum die Zellen nicht sofort alle Charakteristika des *stratum spinosum* annehmen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression der Gene *IKK α* , *IRF6*, *14-3-3 σ* und *Ovol1* eine kritische Rolle bei der Reifung der proliferierenden Zellen zu postmitotischen suprabasalen Keratinozyten einnehmen (Koster und Roop, 2007). Da im *stratum spinosum* die Zellen in einem vielschichtigen Prozess auf ihre finale Aufgabe als Barriere bildende Keratinozyten vorbereitet werden, könnte auf diese Weise eine vorschnelle Differenzierung ohne abgeschlossene Maturierung verhindert werden. Hierbei ist ebenfalls die Aktivität des Notch Signalweges essentiell. So konnten verschiedene Knockout Mäuse des Notch Signalweges (*Notch1/Notch2* Rezeptor, *RBP-jk* und *Hes-1*) zeigen, dass die verminderte Notch Aktivität zu einer vorzeitigen terminalen Differenzierung der suprabasalen Keratinozyten auf Kosten des *stratum spinosum* führt (Rangarajan et al., 2001; Okuyama et al., 2004; Blanpain et al., 2006; Vooijs et al., 2007).

Übergang vom *stratum spinosum* zum *stratum granulosum*

Durch den Anstieg der extrazellulären Kalziumkonzentration wird der Übergang vom *stratum spinosum* zum *stratum granulosum* induziert. Der Aufbau eines Kalziumgradienten - ausgehend von der Basalmembran - wird möglicherweise durch die erhöhte Expression einer Reihe von Kalziumbindenden Proteinen (z.B. *Sppr* und *S100A* Proteinen) erreicht. Weiterhin werden von den spinalen Keratinozyten nun elektronendichte Keratohyalin granula produziert, die in erster Linie mit dem Protein Profilaggrin beladen sind (Turksen und Troy, 2003). Die nachfolgende Spaltung des Profilaggrins bündelt die intermediären Keratinfilamente und führt zur Ausbildung von großen makrofibrillären Filamenten im *stratum granulosum* (Morasso et al., 1996; Turksen und Troy, 2003; Radoja et al., 2007). Obwohl noch nicht vollständig geklärt ist, wie es zu

der erhöhten Expression kommt, konnte eine wichtige Beteiligung des Notch- und des Retinoid-Rezeptor Signalweges, und des damit verbundenen Retinolmetabolismus, in dieser Hinsicht gezeigt werden (Roos et al., 1998; Nicolas et al., 2003; Vauclair et al., 2005; Blanpain et al., 2006). Die terminale Differenzierung kann nur durch eine Repression der Aktivität beider Signalwege erreicht werden. Erste Berichte zeigen, dass es möglicherweise auch eine direkte Beeinflussung dieser beiden Signalwege untereinander gibt (Vauclair et al., 2007).

Übergang von *stratum granulosum* zum *stratum corneum* (Entwicklung der epidermalen Barriere)

Der abschließende Schritt der epidermalen Stratifizierung beinhaltet die Formierung der epidermalen Barriere durch die Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten und der damit verbundenen Einlagerung von hydrophoben Lipiden aus lamellaren Körpern, sowie der Spaltung und Modifizierung von extrazellulären Matrixproteinen (Roop, 1995; Segre, 2003; Jackson et al., 2005). Kurz zuvor werden vermehrt *cornified envelope* Proteine synthetisiert, die reich an Glutamin und Lysinresten sind und in Assoziation mit der Plasmamembran innerhalb der Zellen des *stratum granulosum* gespeichert werden (Fuchs, 2007). Beim Übergang zum *stratum corneum* werden die Zellen permeabel für das in hoher Konzentration vorliegende extrazelluläre Kalzium, was zur Aktivierung der Transglutaminase führt. Dieses Enzym kann γ -Glutamyl- ϵ -Lysin Vernetzungen ausführen, um eine extrem stabile Bindung mit den Keratin-Makrofibrillen einzugehen, die in diesem Komplex eine undurchdringliche Proteinmatrix bilden (Fuchs, 2007). Zusammen mit der Ausbildung von *Tight-* und *Adherence junctions*, durch die erhöhte Expression von E- und P-Cadherin, sowie Claudinen und *cell adhesion molecules* (CAMs), sorgen sie für die Integrität der epidermalen Barriere (Tunggal et al., 2005, Yuki et al., 2007; Lopardo et al., 2008). Die Regulation der Expression dieser Proteine erfolgte zum Teil durch eine Reihe von erst kürzlich in diesem Zusammenhang beschriebene Transkriptionsfaktoren, wie der *Krüppel-like factor 4* (Klf4) oder *Grhl3* (Garrett-Sinha et al., 1996; Segre et al., 1999; Jaubert et al., 2003; Ting et al., 2005; Yu et al., 2006). Die murine epidermale Barriere erreicht ihre volle Effizienz etwa ab E18.5 und dies stellt somit auch den Endpunkt der epidermalen Morphogenese dar.

1.4.3 Homöostase

Wie schon einleitend erwähnt, erfährt die murine Epidermis auch postnatal eine ständige Selbsterneuerung. Die ständige Proliferation von epidermalen Stammzellen und die notwendige terminale Differenzierung in Keratinozyten der Interfollikulären Epidermis (IFE), der Haarfollikel und der Talgdrüsen erfordern ähnlich der embryonalen Morphogenese ein strikt reguliertes Programm von Zellteilung und Maturierung (Fuchs, 2007; Blanpain und Fuchs, 2009). Hierzu gehören die Entwicklung verschiedener Stammzellpopulationen, Signale die zur initialen Differenzierung von Stammzellen führen, die Entscheidung zwischen symmetrischen und asymmetrischen Zellteilungen und Signalwege die den terminalen Differenzierungsprozess regulieren (Blanpain und Fuchs, 2009).

Interfollikuläre Epidermis (IFE)

Das Wachstum und die Proliferation der IFE erfordert eine strikte Balance, denn während eine zu geringe Proliferationsrate zum Ausdünnen der Haut und einem hierdurch verminderten Schutz führt, entspricht eine gesteigerte Rate oft der Charakteristik von hyperproliferativen Hautkrankheiten, zu denen u.a. Psoriasis oder basale Zellkarzinome gehören (Blanpain und Fuchs, 2009). Da nur die basalen Keratinozyten proliferative Eigenschaften besitzen, ist vor allen die ihnen unterliegende Basallamina reich an Wachstumsfaktoren aber auch an spezifischen Zelladhäsionsmolekülen, im Besonderen Integrinen, Kollagenen und Desmogleinen (Watt, 2002; McMillan et al., 2003; Wilhelmsen et al., 2006; Blanpain und Fuchs, 2009; Fuchs, 2007). Sie können auf der einen Seite die Differenzierung und Migration der basalen Keratinozyten in Richtung des *stratum corneums* ermöglichen und auf der anderen Seite, durch Ausbildung von Hemidesmosomen und fokalen Adhäsionspunkten, eine vorzeitige Ablösung verhindern (Roop und Koster, 2007). Mutationen oder Beeinträchtigungen dieser Zelladhäsionsproteine führen z.B. zur Ausbildung von teilweise sehr schmerzhaften Blasen durch die unzureichende Verbindung von Dermis und Epidermis und sind Ursachen einer Reihe von Hautkrankheiten, wie *Epidermolysis bullosa* oder *pemphigus vulgaris* (Nazarro et al., 1990; Vidal et al., 1995; McGrath et al., 1995; Muller et al., 2008; Alexandroff et al., 2009).

Neben der autokrinen Stimulation durch Wachstumsfaktoren ist auch die Regulation der

epidermalen Stammzellen durch unterschiedliche Arten der Zellteilung von großer Bedeutung für die Homöostase der IFE. So können, wie auch bei der Embryogenese, symmetrische Zellteilungen auftreten, die für eine schnelle Vermehrung von epidermalen Stammzellen sorgen. Dieser Prozess spielt in der adulten Epidermis vor allen Dingen bei Verletzungen eine wichtige Rolle (Blanpain und Fuchs, 2009), ansonsten ist die asymmetrische Zellteilung der bevorzugte Zellteilungsweg. Hierbei entstehen eine Zelle mit konstanten Stammzeleigenschaften und eine Tochterzelle, die durch eine leichte Veränderung des Proteinpools eine Art Programmierung für das Schicksal der terminalen Differenzierung erhält (Smart, 1970; Lechler und Fuchs, 2005). Im Gegensatz zur embryonalen Morphogenese richtet sich dabei die mitotische Spindel jedoch parallel zur Basalmembran aus, wodurch die entstehende Tochterzelle zunächst weiterhin Kontakt zur Basalmembran besitzt. Diese Progenitorzellen, werden auch als *Transit-Amplifying cells* bezeichnet und stellen eine Art Zwischenstation auf dem Weg von der Stammzelle zum differenzierten Keratinozyten dar (Mackenzie, 1997; Kolodka et al., 1998; Ghazizadeh und Taichman, 2001; Ro und Rannala, 2005;). Die Ansammlung dieser *Transit-Amplifying cells* könnte eine mögliche Erklärung für die schnelle Regenerationsfähigkeit der Epidermis bei Verletzungen sein (Blanpain und Fuchs, 2009; Fuchs 2007) und eine Art Puffer zur Vereinfachung der Gewährleistung der proliferativen Kapazität der Epidermis darstellen (Blanpain et al., 2004). Alternativ könnten in bestimmte Situationen auch der Zustand der *Transit-Amplifying cells* übersprungen und die Tochterzellen sofort das terminale Differenzierungsprogramm der epidermalen Keratinozyten durchlaufen (Clayton et al., 2007). Es ist jedoch noch ungeklärt in welchen Situationen dies der Fall ist und welche Signale erforderlich sind um einen der beiden Differenzierungswege zu beschreiten. Ähnlich wie bei der embryonalen Morphogenese, scheint auch hier der Notch Signalweg eine essentielle Funktion einzunehmen (Nicolas et al., 2003; Vauclair et al., 2005; Demehri et al., 2008; Demehri et al., 2009). So führt eine Abnahme der Notch Aktivität in der postnatalen Epidermis zu einer Verdickung der Epidermis durch Hyperproliferation der basalen Keratinozyten. Als Folge kommt es zu einer erhöhten Formation von spontanen Papillomen und auch zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber chemisch induzierten Tumoren (Nicolas et al., 2003).

Haare und Talgdrüsen

Vergleichbar mit der IFE durchlebt der Haarfollikel zyklische Phasen von Degeneration und Regeneration während des gesamten Lebens der Maus (Blanpain und Fuchs, 2009; Fuchs, 2007). Dieser Zyklus zeichnet sich durch eine lange Wachstumsphase (Anagen), einer kurzen Degenerationsphase (Katagen) und einer je nach Alter der Maus wechselnden Zwischen- oder Ruhephase (Telogen) aus. Bild 1.4 verdeutlicht diesen Prozess und bezieht auch die Entstehung des Haarfollikels, sowie der in der Nähe des Haarschaftes liegenden Talgdrüsen mit ein.

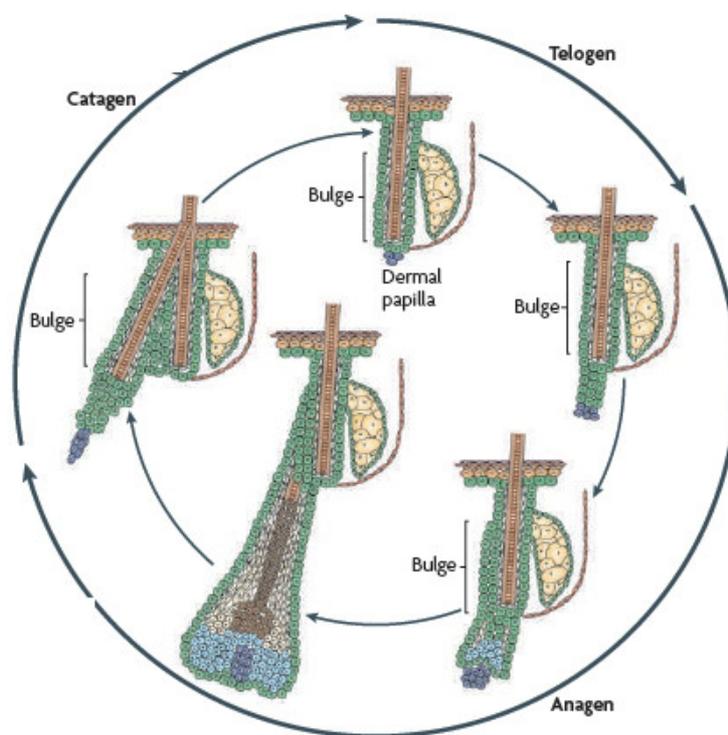


Bild 1.4: Haarzyklus in adulten Mäusen (entnommen aus Blanpain und Fuchs, 2009)

Gezeigt sind die verschiedenen Haarwachstumsphasen Anagen, Katagen und Telogen. Die Haarfollikel bestehen aus verschiedenen konzentrischen Zellschichten. Am unteren Ende des Haarfollikels erfolgt eine transiente Proliferation der Matrix Zellen (hellblaue Zellen), welche dann nachfolgend eines der sieben verschiedenen terminalen Differenzierungsprogramme zur Bildung des Haarschafts unterlaufen. Eine weitere Population von Stammzellen residiert in einer als *hair bulge* bezeichneten Zone am Haarschaft in der Nähe der Talgdrüsen (gekennzeichnet durch gelbe Färbung der Zellen). Sie tragen zur Entwicklung der Talgdrüsen bei und können möglicherweise bei Wundheilungsprozessen das Schicksal von Interfollikulären epidermalen Keratinozyten annehmen.

Verschiedene Publikationen konnten zeigen, dass sowohl die Haarfollikel, als auch die Talgdrüsen einen eigenen Pool an Stammzellen besitzen, die abweichende Eigenschaften von denen der IFE Stammzellen aufweisen (Cotsarelis et al., 1990; Wilson et al., 1994; Braun et al., 2003; Tumber et al., 2004; Horsley et al., 2006). So können

Stammzellen der Haarfollikel z.B. durch die beiden Marker RUNX1 und LHX2 (Rhee et al., 2006; Osorio et al., 2008), Stammzellen der Talgdrüsen z.B. durch den erst kürzlich entdeckten Marker Blimp1 identifiziert werden (Horsley et al., 2006). Nicht allein die Komplexität der Haarfollikelstruktur, sondern auch die Vielfalt der essentiellen Signalwege, die für den Erhalt des Haares und der Talgdrüsen verantwortlich sind, haben bis jetzt zu einem eher rudimentären Verständnis der Homöostase von Haaren und zugeordneten Talgdrüsen geführt. Postnatale Deletion der Funktion oder Expression von z.B. β -Catenin, *c-myc*, *bmp* und Komponenten des Notch Signalweges führen alle durch unterschiedliche Mechanismen zu Beeinträchtigungen des Haarzyklus und nachfolgender, dauerhafter Alopezie durch Degeneration der Haarfollikel (Gat et al., 1998; Waikel et al., 2001; Huelsken et al., 2001; Pan et al., 2004; Vauclair et al., 2005; Lee et al., 2007b;).

1.5 Die murine Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt den Prozess der Bildung aller Zellen des Blutes aus den sogenannten Hämatopoetischen Stammzellen (HSC). HSCs wurden erstmalig 1961 von Till und McCulloch beschrieben (Till und McCulloch, 1961) und erklären die ständige Selbsterneuerung der meisten Blutzellen. Bild 1.5 zeigt ein vereinfachtes Schema der Hämatopoese des Knochenmarkes. B- und T-Lymphozyten unterlaufen in der Milz bzw. dem Thymus weiterer Reifungsschritte, die zur vollen Funktionalität dieser beiden Zellpopulationen notwendig sind (Rajewsky, 1992; Heinonen et al., 2008). Neben dem Knochenmark gibt es während der Embryogenese und in pathologischen Situationen noch weitere Orte der Hämatopoese (Rivella et al., 2009). Dies sind im Wesentlichen die Leber, die Milz und der Thymus (Wong et al., 1999; Bodey et al., 1998; Hsieh et al., 2007; Lenox et al., 2009).

1.5.1 Differenzierung und Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs)

Die einzelnen Stadien der Hämatopoese lassen sich durch zwei einfache Kriterien beschreiben: das Potenzial zur Selbsterneuerung und die Expression von linienspezifischen Zelloberflächenmarkern, welche den Differenzierungsgrad der Zellen bestimmen.

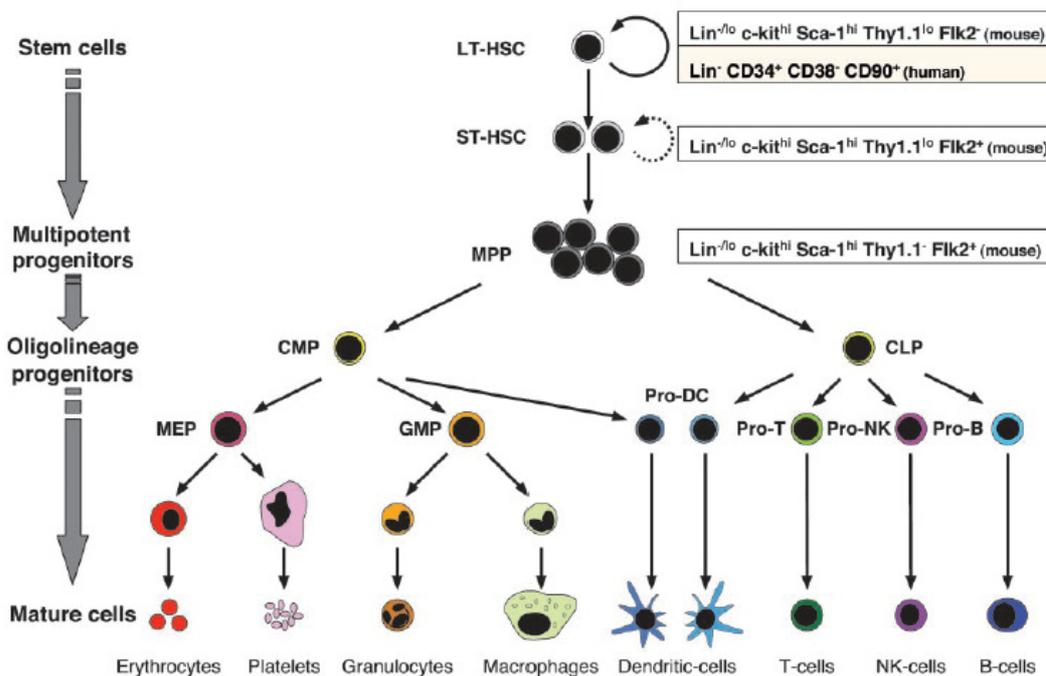


Bild 1.5: Die Hämatopoese des Knochenmarks (entnommen aus Passegue et al., 2003)

Gezeigt sind die verschiedenen Stammzellpopulationen (Lin^{-}) *Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells* (LT-HSC), *Short-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells* (ST-HSC) und *Multipotent Progenitors* (MPP) mit abnehmendem Selbsterneuerungs- und zunehmenden Differenzierungspotential. Sie können durch die Expressionsstärke der Stammzellmarker c-Kit, Sca-1, Thy1.1 und $Flk2^{+}$ unterschieden werden. Aus den MPPs gehen die Oligolinienspezifischen Progenitorzellen *Common Lymphoid Progenitor* (CLP) und *Common Myeloid Progenitor* (CMP) hervor, die wiederum in die *Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitors* (MEP) und die *Granulocyte Myeloid Progenitors* (GMP) differenzieren. Die dendritischen Zellen (DCs) können dabei sowohl aus den GMPs als auch aus den CLPs hervorgehen.

Dabei gilt das einfache Prinzip, dass mit einem reduzierten Potenzial zur Selbsterneuerung ein erhöhter Grad der Differenzierung einhergeht. Während die *Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells* (LT-HSCs) ein unbegrenztes Selbsterneuerungspotenzial besitzen, besitzen sie auch die Fähigkeit in alle möglichen Zellen des hämatopoetischen Systems differenzieren (Spangrude et al., 1988; Osawa et al.,

1996; Weissmann, 2000). Das Potenzial zur Selbsterneuerung ist nach dem Differenzierungsgrad der *Multipotent Progenitors* (MPP) verloren, da hier die erste Zellschicksalsentscheidung in Richtung der Lymphopoese oder Myelopoese bzw. Erythropoese getroffen wird (Akashi et al., 1999). Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die LT-HSCs nur einen sehr kleinen Anteil der gesamten hämatopoetischen Zellpopulation des Knochenmarks (1 von 5000 Zellen), während der Anteil der hämatopoetischen Zellen mit steigendem Differenzierungsgrad wächst - so konnte z.B. für *Short Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells* (ST-HSCs) ein Anteil von 1:1000 an den gesamten hämatopoetischen Zellen gezeigt werden (Morrison et al., 1995).

Die unterschiedliche Expression der Differenzierungsmarker hilft auch bei der Identifizierung und Analyse der einzelnen Zellpopulationen. So können z.B. LT-HSCs und ST-HSCs durch die Oberflächenexpression der Rezeptor Tyrosin Kinase Flk-2, welche nur auf ST-HSCs exprimiert werden, unterschieden werden (Christensen und Weissman, 2001). Beim Differenzierungsschritt von ST-HSCs zu den MPPs wird dann die Oberflächenexpression von Thyl.1 herab reguliert, bevor die erste Zellschicksalsentscheidung in die oligolinienspezifischen Progenitoren der *Common Lymphoid Progenitors* (CLP) und der *Common Myeloid Progenitors* (CMP) erfolgt (Morrison et al., 1995).

Aus diesen Progenitoren zweigen dann all die in Bild 1.5 gezeigten Vorläuferzellen ab, welche letztlich in die verschiedenen Zellpopulationen der erythroiden, myeloiden und lymphoiden Reihe differenzieren (Wagers et al., 2002). Neben dem Differenzierungspotential der Stammzellen und ihrer Progenitoren ist die Fähigkeit der ständigen Selbsterneuerung der HSCs das zweite wichtige Charakteristikum der Hämatopoese. Obwohl nur etwa 8-10% aller LT-HSCs pro Tag und statistisch gesehen jede einzelne HSC im Laufe von 1-3 Monaten jeweils einmal in den Zellzyklus eintritt, muss jede HSC diesen Zellzyklus viele Male fehlerfrei durchlaufen (Morrison und Weissman, 1994; Morrison et al., 1996; Bradford et al., 1997; Cheshier et al., 1999). Eine Bedingung für diese häufigen Zellteilungen ist die Fähigkeit das Verkürzen der Telomere durch die Aktivität des Telomerase-Komplex zu verhindern (Vaziri et al., 1994; Allsopp et al., 1995; Morrison et al., 1996b). LT-HSCs weisen dabei eine vergleichbare Telomerase-Aktivität zu Tumorzellen auf und zeigen zudem eine erhöhte

Expression von antiapoptotischen Faktoren, wie z.B. Bcl-2 (Muller-Sieburg und Riblet, 1996; de Haan und van Zant, 1997).

Während die Fähigkeit zur uneingeschränkten Selbsterneuerung von murinen embryonalen Stammzellen auch *in vitro* durch die Anwesenheit des *leukemia inhibitory factor* nachvollzogen werden kann, ist es für die HSCs noch nicht gelungen die richtige Kombination aus Wachstumsfaktoren zu finden, um eine vorzeitige Differenzierung oder Apoptose zu verhindern (Miller et al., 1997). Es wird daher spekuliert, dass Zytokine oder Oberflächenrezeptoren, die von Stromazellen des Knochenmarks exprimiert werden, für die unbegrenzte Teilungskapazität der HSCs verantwortlich sind (Whitlock et al., 1987). Auf der molekularen Ebene sind die Mechanismen die die Selbsterneuerung der HSCs steuern ebenfalls noch wenig verstanden. Bis jetzt konnte für die Hox Gene und für die Proteine des Notch, Shh und Wnt Signalweges eine wichtige Rolle für die Selbsterneuerung der HSCs gezeigt werden (Lawrence et al., 1996; Taipale et al., 2001; Reya et al., 2001; Spradling et al., 2001). Während eine Aktivierung des Notch Signalweges dabei die Rate der Selbsterneuerung steigert, konnte für die Aktivierung des wnt/ β -Catenin genau der gegenteilige Effekt beobachtet werden (Varnum-Finney et al., 2000; Karanu et al., 2000; Reya et al., 2003). Weiterhin konnte ein intensiver *Crosstalk* zwischen all diesen Signalwegen beschrieben werden, dessen Wirkung auf die Hämatopoese noch ungeklärt ist (Nakamura et al., 2007). Interessanterweise spielen viele dieser Signalwege auch eine entscheidende Rolle bei der Onkogenese hämatopoetischer Zellen (Shin et al., 2009) und werden daher im folgenden Kapitel besprochen.

1.5.2 Das Konzept der leukämischen Stammzellen (LSCs)

Obwohl schon 1971 das erste Mal die Entstehung von leukämischen Erkrankungen durch die Entartung und Hyperproliferation einer kleinen Untergruppe von hämatopoetischen Zellen postuliert wurde (Park et al., 1971; Reya et al., 2001), konnten erst 1997 die Existenz einer klonal identischen Gruppe von entarteten hämatopoetischen Stammzellen für die Entwicklung einer Akuten Myeloiden Leukämie (AML) gezeigt werden (Blair et al., 1997; Bonnet und Dick, 1997). Dabei wurde beobachtet, dass nur 1-4% der tumorigenen Zellen proliferativ aktiv waren und je nach Patient lediglich 0,2-1% der AML Zellen durch Transplantation in immunodefiziente NOD/SCID Mäuse zur

Ausbildung einer erneuten AML führten.

Auch wenn es theoretisch möglich ist, dass die Heterogenität der AML Zellen während der Manifestation der Leukämien durch verschiedene Mutationen oder abweichende epigenetische Veränderungen zustande kommt, ist sie sehr wahrscheinlich eher eine Folge der beeinträchtigten Differenzierung der tumorigenen Zellen. Dies konnte z.B. anhand einer Expressionsanalyse myeloider Marker von Myeloblasten unter Chronischen Myeloiden Leukämie (CML)-Patienten gezeigt werden (Passegue et al., 2003). Hier zeigten auch die in peripheren lymphatischen Organen sonst nicht vorkommenden Myeloblasten eine starke Heterogenität im Bezug auf die Expression ihrer Oberflächenmarker der myeloiden Reihe.

Weniger genau konnte bis jetzt die Frage geklärt werden, ob die Ursache der Entstehung von LSCs durch Transformation von HSCs, Progenitor- oder sogar differenzierten Zellen geschieht. Während für die Entstehung von AML und CML offenbar eine Mutation in den HSCs notwendig ist (Blair et al., 1997; Bonnet und Dick, 1997), wird die Akute Promyelozyten Leukämie (APL) durch einen Block der myeloiden Differenzierungsreihe ausgelöst (Turhan et al., 1995). Entscheidend ist auch hierbei eine genetische Mutation, die zur Translokation zweier chromosomaler Elemente und zur Ausbildung eines pathologisch wirkenden Fusionsproteins (PML-RAR α) führt (Turhan et al., 1995). Neben der Bildung von Fusionsproteinen kann auch die abweichenden Expression von anti- und proapoptotischen Proteinen die Tumorgenese unterstützen. Unabhängig von dem Ursprung des Transformationsereignisses steht jedoch in allen Fällen die Generation eines stark proliferierenden Zellklons, der genau wie die HSCs die Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung erworben hat. In welchen Fällen ADAM10 zu diesen Transformationsereignissen beiträgt ist in Kapitel 1.5.3 beschrieben.

1.5.3 Die Funktion von ADAM10 im hämatopoetischen System

Die derzeit wichtigste bekannte Funktion von ADAM10 im hämatopoetischen System besteht in der proteolytischen Prozessierung (Ektodomänen Shedding) von Zelloberflächenproteinen. Dies können Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Zytokine oder Zelladhäsionsmoleküle und Differenzierungsmarker sein (Maretzky et al., 2005; Dittmer et al., 2009; Schirmeister et al., 2009; Sahin et al., 2004; Klessner et al., 2009; Bech-

Serra et al., 2006; Nagano et al., 2004; Murai et al., 2006; Anderegg 2009 et al., 2009; Six et al., 2003; Dyczynska et al., 2007). Da auch die Zytokine und Wachstumsfaktoren selbst oft *geshededet* werden, könnte ADAM10 eine wichtige Rolle bei Differenzierungs- und Apoptoseprozessen einnehmen. Dies soll anhand zweier gut untersuchter Beispiele verdeutlicht werden.

ADAM10 und der Fas-Ligand (CD95L)

Der Fas-Ligand (FasL) ist ein Zelloberflächenmolekül das hauptsächlich auf T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert ist und eine wichtige Funktion bei der Regulation von Immunreaktionen einnimmt (Suda et al., 1993). Er kann durch Interaktion mit dem endogenen Fas-Rezeptor zur Auslösung des *activation-induced cell death* (AICD) führen, welcher vorrangig für die Beendigung von Immunantworten aktivierter zytotoxischer, CD4 (T_H1) T-Lymphozyten und NK-Zellen verantwortlich ist (Janssen et al., 2003; Adam-Klages et al., 2005). Weiterhin können anhand dieser Interaktion auch viral infizierte oder tumorigene Zellen spezifisch eliminiert werden (Lowin et al., 1994; Suda et al., 1995). Es konnte gezeigt werden dass ADAM10 und Sppl2a, ähnlich der unter 1.3.3.2 beschriebenen Proteolyse von Notch, die beiden wichtigsten Proteasen bei der sequenziellen Proteolyse des FasL darstellen (Schulte et al., 2007; Kirkin et al., 2007). Das auch die lösliche Form des FasL (sFasL) eine physiologische Funktion besitzen könnte, wurde anhand zellbasierter Experimente und durch die erhöhte Serumkonzentrationen in Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Ulcerativer Collitis und Osteoarthritis postuliert (Tanaka et al., 1996; Linkermann et al., 2005). Diese Beobachtungen konnten durch Untersuchung einer sFasL exprimierenden transgenen Maus jedoch nicht *in vivo* bestätigt werden (Liu et al., 2009). Dem gegenüber zeigte die Regulation des membrangebundenen FasL, unabhängig ob verstärkt oder nicht-exprimiert (Liu et al., 2009), einen deutlichen Einfluss auf die apoptotische Aktivität der Lymphozyten. Daher wäre es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob ADAM10 auch *in vivo* die Aktivität des Fas-FasL Komplexes beeinflussen kann.

ADAM10 und der niedrig-affine IgE-Rezeptor (CD23)

Der niedrig-affine IgE-Rezeptor (CD23) ist ein wichtiger Modulator von allergischen Erkrankungen, atopischer Dermatitis und der rheumatoiden Arthritis (Heyman et al., 2000). Die lösliche Form (sCD23) wurde in erhöhtem Maße in *synovial fluids* von Rheumapatienten (Huissoon et al., 2000; Ribbens et al., 2000;) und im Sputum von

Asthmatikern gefunden (Matsuno et al., 2008). Auch wenn noch nicht abschließend geklärt ist, ob sCD23 auch *in vivo* eine (patho-)physiologische Relevanz besitzt, haben verschiedene transgene Mausmodelle die essentielle Bedeutung von CD23 bei der IgE-vermittelten Immunität verdeutlicht (Yu et al., 1994; Payet et al., 1999). Zellbasierte *gain-of-function* Studien haben gezeigt, dass ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17 und 33 als potenzielle Sheddase für CD23 in Betracht kommen (Parkin et al., 2002; Fourie et al., 2003; Weskamp et al., 2006; Meng et al., 2007; Lemieux et al., 2007). Durch die Verwendung von ADAM-defizienten MEFs dieser Proteasen und die Analyse von konditionalen ADAM10 Knockout Mäusen (Gibb et al., 2010) konnte ADAM10 als hauptverantwortliche Sheddase für die Prozessierung von CD23 ermittelt werden (Weskamp et al., 2006). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte jedoch noch kein Mausmodell für die Analyse des CD23-Sheddings von aktivierten ADAM10 defizienten B-Lymphozyten etabliert werden.

2 Problemstellung

Zu Beginn dieser Arbeit stammten nahezu alle Informationen über die Funktionalität der Metalloprotease ADAM10 aus zellbasierten *gain-of-function* Experimenten. Dabei konnten eine Vielzahl von putativen Sheddingsubstraten mit den unterschiedlichsten zellbiologischen Funktionen identifiziert werden. Bei den meisten dieser Substrate soll der Sheddingvorgang zur Generierung eines extrazellulären, löslichen und eines membrangebundenen C-terminalen Fragmentes (CTF) führen. Das CTF kann dann sequenziell durch γ -Sekretasen prozessiert und zur Freisetzung eines signalgebenden, zytoplasmatischen Polypeptids führen (ICD). Für einige der untersuchten Substrate wurden physiologische und pathophysiologische Funktionen der löslichen extrazellulären und zytoplasmatischen Spaltfragmente postuliert, die aufgrund der frühen embryonalen Letalität der klassischen ADAM10 Knockout Maus jedoch noch nicht im physiologischen Kontext eines komplexen Organismus, wie der Maus, validiert werden konnten. Ein Beispiel hierfür ist das in diesem Labor identifizierte putative ADAM10-Substrate E-Cadherin, welches als Zelladhäsionsmolekül sowohl eine essentielle Funktion bei der embryonalen Morphogenese der murinen Epidermis besitzt, als auch bei deregulierter Expression im Zusammenhang mit einer erhöhten Invasivität und Migrationsverhalten von epidermalen Tumorzellen beschrieben wurde. Anhand dieser Ausgangslage ergaben sich für diese Arbeit folgende Zielsetzungen:

1. Funktionsanalyse von ADAM10 bei der Morphogenese und der Homöostase der murinen Epidermis:

Hierbei sollte neben einer umfassenden morphologischen, histologischen und zellbiologischen Analyse primär evaluiert werden, welche der aus *gain-of-function* Experimenten bekannten ADAM10 Substrate auch *in vivo* gesheddet werden. Durch die Kombination dieser Erkenntnisse sollte im Weiteren entschieden werden, welcher der durch die ADAM10 Defizienz beeinflussten Signalwege die höchste Relevanz für die etwaige Manifestation eines pathologischen Phänotyps besitzen.

2. Etablierung von induzierbar-konditionalen ADAM10 Knockout Mäusen:

Für die Funktionsanalyse von ADAM10 bei etablierten humanen Krankheitsmodellen in der Maus, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die ADAM10 defizienten Mäuse keinen signifikanten Entwicklungsphänotyp aufweisen. Da aufgrund der frühen

embryonalen Letalität der ADAM10 Knockout Maus in der Keimbahn, auch mit einer defizienten Entwicklung von Organen in den entsprechenden konditionalen ADAM10 Knockout Mäusen gerechnet werden musste, sollten für die Epidermis und für Zellen des Hämatopoetischen Systems induzierbar konditionale Knockout Mäuse etabliert werden. Neben der Expression von vielen potenziellen ADAM10 Sheddingsubstraten, wie den in diesem Labor identifizierten Transmembranproteinen CD23 und Fas Ligand, ist für beide Gewebe eine hohe Rate der Selbsterneuerung der Stammzellen, verbunden mit zahlreichen Zellschicksalsentscheidungen bei asymmetrischen Zellteilung und Differenzierung, beschrieben worden. Dies ermöglicht eine zeitnahe Analyse der betroffenen Gewebe nach ADAM10 Deletion und eine gute Abschätzung von potenziellen Nebenwirkungen bei einer therapeutischen Behandlung mit ADAM10 Inhibitoren.

3 Material&Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und Antikörperkonjugate

Bezeichnung	Spezies	Spezifität	Hersteller	Anwendung
Pin 1	Kaninchen, monospezifische IgG Fraktion	mADAM10	Pineda	IB
B42.1	Kaninchen, polyklonales Serum	mADAM10	Ag De Strooper, eigene Produktion	WB
36/E-Cadherin	Maus, IgG2a	r,m,h E-Cadherin	BD Biosciences	WB
Aktivierter Notch1- Rezeptor (ab8925)	Kaninchen, polyklonales Serum	Geschnittenes, intrazelluläres Notch1 (NICD) Fragment	Abcam	WB
S2 Notch (5E9)	Ratte, monoklonal, Klon 5E9	S2 Fragment v. Notch 1	M. Takeda (Ja- pan)	WB
anti-ADAM17 (10/1)	Kaninchen, monospezifische IgG Fraktion	mADAM17	Pineda	WB, DZ
anti-ADAM17 (18/2)	Kaninchen, monospezifische IgG Fraktion	mADAM17	Pineda	WB
anti-Keratin 10	Kaninchen, polyklonales	m, h Keratin 10	Covance	WB, IF

	Serum				
anti-Keratin 14	Kaninchen, polyklonales Serum	m, h Keratin 14	Covance		WB, IF
anti-Loricrin	Kaninchen, polyklonales Serum	m, h Loricrin	Covance		WB,IF
anti-Keratin 15	Huhn, affinitäts- gereinigtes Serum	m, h Keratin 15	Covance		WB, IF
Schaf-anti- Maus-IgG-HRP	Schaf, polyklonales Serum	IgG Maus	Fraktion Santa Cruz		WB
anti-Maus CD23-FITC, Klon B3B4	Ratte, IgG2a, κ	m CD23	BioLegend		DZ
anti-Maus CD45R (B220)- APC, Klon RA3-6B2	Ratte, IgG2a, κ	m CD45R	BioLegend		DZ
anti-Maus CD21-Pe, Klon eBio8D9	Ratte, IgG2a, λ	m CD21	BioLegend		DZ
anti-Maus CD11b-Pe, Klon		m CD11b			DZ
anti-Maus F4/80-APC, Klon		m F4/80			DZ
anti-Maus Ly-		m Ly-6g			DZ

6g-FITC, Klon**anti-Maus**

CD3e-FITC, Klon145-2C11	Hamster, IgG	m CD3e	Immunotools	DZ
------------------------------------	--------------	--------	-------------	----

anti-Maus

CD4-APC, Klon PJP6	Ratte, IgG2b, κ	m CD4	Immunotools	DZ
-------------------------------	-----------------	-------	-------------	----

anti-Maus

CD8a-Pe, Klon YTS 169.4	Ratte, IgG2b, κ	IgG2b	Immunotools	DZ
------------------------------------	-----------------	-------	-------------	----

Rat IgG2b-

FITC, Klon TBE 15	Ratte, IgG2b, κ	Isotypkontrolle	Immunotools	DZ
------------------------------	-----------------	-----------------	-------------	----

Rat IgG2b-Pe,

Klon TBE 15	Ratte, IgG2b, κ	Isotypkontrolle	Immunotools	DZ
--------------------	-----------------	-----------------	-------------	----

Rat-IgG2b-

APC, Klon TBE 15	Ratte, IgG2b, κ	Isotypkontrolle	Immunotools	DZ
-----------------------------	-----------------	-----------------	-------------	----

Rat-IgG2a-

FITC, Klon RTK2758	Ratte, IgG2a, κ	Isotypkontrolle	BioLegend	DZ
-------------------------------	-----------------	-----------------	-----------	----

Rat-IgG2a-Pe,

Klon RTK2758	Ratte IgG2a, κ	Isotypkontrolle	BioLegend	DZ
---------------------	----------------	-----------------	-----------	----

Rat-IgG2a-Pe,

Klon RTK2758	Ratte, IgG2a, κ	Isotypkontrolle	BioLegend	DZ
---------------------	-----------------	-----------------	-----------	----

Rat-IgG2a-

APC, Klon RTK2758	Ratte, IgG2a, κ	Isotypkontrolle	BioLegend	DZ
------------------------------	-----------------	-----------------	-----------	----

anti-CD16/32;

Klon 2.4G2	Ratte, IgG2b, κ	m CD16/CD32	BD Biosciences	DZ
-------------------	-----------------	-------------	----------------	----

Esel-anti-Kaninchen-HRP	Esel, F(ab) ₂ - Fragmente aus polyklonalem Serum	gemischte Fraktionen dem Kaninchen	Ig- aus	Jackson Immunoresearch	WB
Ziege-anti-Ratten-IgG-HRP	Ziege, polyklonales Serum	Ratten Fraktion	IgG-	Santa Cruz	WB
Ziege-anti-Kaninchen-ALEXA488	Ziege, polyklonales Serum	Kaninchen Fraktion	IgG-	Molecular Probes, Invitrogen	IF, DZ
Ziege-anti-Huhn-ALEXA488	Ziege, polyklonales Serum	Kaninchen Fraktion	IgG-	Molecular Probes, Invitrogen	IF, DZ
Ziege-anti-Maus-ALEXA488	Ziege, polyklonales Serum	Kaninchen Fraktion	IgG-	Molecular Probes, Invitrogen	IF, DZ
Tec-3 anti-Ki67	Ratte, monoklonal	m Ki67		DAKO	IHC, IF

3.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben werden alle Chemikalien in der Qualität p.A. verwendet und bei RT gelagert. Ausnahmen werden nachfolgend deklariert:

Agarose	Lonza
Ammoniumthiocyanat	Sigma-Aldrich
APS	Roth; 20°C
BSA	Roth; 4°C
Complete Proteaseinhibitor mit EDTA	Roche; -20°C
DAB	DAKO
DABCO	EmdBioscience; -20°C

DAPI	Sigma Aldrich; -20°C
DMSO	Serva
6x DNA-Ladepuffer	Fermentas; -20°C
DNA ladder 1kb marker	Roche; -20°C
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich; 4°C
dNTPs 2mM	Fermentas; -20°C
EDTA	Roth
EGTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol 99,8%	Roth
Ethidiumbromid 1%ig	Roth
Fish Skin Gelatine	Sigma Aldrich; 4°C
Gelvatol	Sigma Aldrich
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Glycin	Roth
HEPES	PAA
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
L-Glutamin	PAA, 4°C
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Mitomycin C	Sigma-Aldrich; -20°C
Mowiol	EmdBioscience; -20°C
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumcarbonat	Riedel-de-Haën
Natriumchlord	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck

Nile Red	Invitrogen; -80°C
Normal Goat Serum	Sigma Aldrich; -20°C
NP-40	EmdBioscience
Paraformaldehyd	EmdBioscience
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
PMSF	Pharmacia, -20°C
Propidiumiodid	BD Biosciences; 4°C
SDS	Roth
TEMED	Roth
Tissue Freezing Medium	Jung
Tris	Roth
Triton-X	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, 4°C
Tween-20	Sigma Aldrich
Xylol	Roth

3.1.3 Computersoftware

Funktion	Produktbezeichnung	Hersteller
Analysesoftware für die Quantifizierung biologischer Assay	ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Auswertung Durchflusszytometrie	WinMDI 2.8	Flow Cytometry Core Facilities, Scripps, La Jolla
Bedienung Multifunktionsreader	Gen5™	BioTek
Bedienung Scanner	MP Navigator EX1.0	Canon
Betriebssystem	Windows XP, Vista, 7	Microsoft GmbH

Bildbearbeitungsprogramm	Adobe Photoshop CS4	Adobe Inc.
EDV	Microsoft Office 2003, 2007	Microsoft GmbH
Kamerasteuerung und Aufnahmesystem Binokular und Lichtmikroskop (Zellkultur)	CellA 3.2	Olympus
Kamerasteuerung und Aufnahmesystem Fluoreszenzmikroskop	AXIOVision40 V 4.7.0.0	Zeiss
Kamerasteuerung und Aufnahmesystem Lichtmikroskop (Histologie)	AnalySIS DOCU	Olympus
Kamerasteuerung und Aufnahmesystem Western Blot Detektionsgerät	Image Reader Las-3000	Fujifilm

3.1.4 Enzyme

DreamTaq DNA Polymerase Fermentas

3.1.5 Geräte

Funktion	Produktbezeichnung	Hersteller
Agarosegeldokumentationsgerät	Gel Jet Imager	Intas
Analysewaage	Kern 770	Kern&Sohn
Autoklav		Tecnorama
Begasungsbrutschrank (32°C)		Heraeus
Begasungsbrutschrank (37°C)	Biocenter 2001	Salvis
Binokular	SZ61	Olympus
Chemolumineszenzkamera	Las-3000	Fujifilm

DNA-Photometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab
	Synergy-HT	BioTek
Durchflusszytometer	FacsCanto™	BD Biosciences
Elektrophoresesystem für Agarosegele	MIDI 2	Roth
Feinwaage	L420P	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
	Eclipse 800	Nikon
Glasperlensterilisator	Steri250	Inotech
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Homogenisator Precellys	PreCellys	Peqlab
Horizontalschüttler	RM 5	Assistent
Kamera für Binokular und Lichtmikroskop (Zellkultur)	SC30	Olympus
Kamera für Lichtmikroskop (Histologie)	UC30	Olympus
Lichtmikroskop (Histologie)	BX50	Olympus
Lichtmikroskop (Zellkultur)	CKX41	Olympus
Magnetrührer	IKAMAG RCT	Janke&Kunkel
Mikropipetten	10, 100, 200, 1000µl	Eppendorf, Gilson
Mikrowellenherd	NN-E245W	Panasonic
Multifunktionsplattenreader	Synergy HT	BioTek
Multipette	100, 300µl	Eppendorf
Ohrlochzange		FST
PCR Cycler	GeneAmp 2400 und 9700	Perkin Elmer
pH-Meter		Krick
Real-Time PCR-Gerät	7900HT Fast Real-time PCR System	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage (MPW)	Milli-Q Plus	Millipore
Scanner	CanoScan 8800	Canon
Schneidevorrichtung für	Kryostat	Leica

kryopräservierte Gewebe		
Schneidevorrichtung für Paraffinblöcke	Mikrotom	Leica
SDS-PAGE Kammer	MiniProteanII™	BioRad
Spannungsquelle	PowerPac 200/300	BioRad
Sterilbank	VFR1806	Claus Damm A/S
Tank-Blot System	Criterion™	BioRad
TEWAmeter	TEWAmeter	Courage&Khazaka
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge (4°C)	Fresco21	Thermo Scientific
Tischzentrifuge (RT)	5415C	Eppendorf
Transmissionselektronenmikroskop	EM 900	Zeiss
Trockenschrank	B6120	Heraeus
Vortex	Vortex Genie	Bender&Hobein
Wasserbad	1083 37°C	GFL
Zellzählgerät	CASY	Innovatis
Zentrifuge für die Zellkultur	Multifuge 3SR+	Thermo Scientific

3.1.6 Mauslinien&Genotypisierung

ADAM10^{flox} (Jorrisen et al., 2010)

Ein muriner Cosmid Klon, welcher die 5' Region des Exon 2 des ADAM10 Gens beinhaltet, wurde aus einer 129/ola Cosmid Bibliothek (RZPD Klon ID F11344Q2) isoliert. Für die Konstruktion des Zielvektors wurde ein 8,2 Kb *KpnI-PstI* DNA Restriktionsfragment von ADAM10, welches sich über das Exon 2, eine 7,3 Kb 5' Sequenz und eine 5,8 Kb 3' Abwärtssequenz erstreckt, in den Plasmidvektor pUC-18 subkloniert. Die HygromycinB Antibiotikaresistenzkassette, unter Kontrolle des Phosphoglyceratkinase Promotors und flankiert von zwei *frt* Sequenzen, sowie die loxP Sequenz abwärts von der HygromycinB Antibiotikaresistenzkassette, wurden über die

NotI-ApaI Schnittstelle 5' aufwärts von Exon 2 in das Intron 1 eingefügt. Die zweite loxP Sequenz wurde über die *SphI-SpeI* Schnittstelle in das Intron 2 eingefügt. Der Zielvektor wurde mit *KpnI* linearisiert und in die ES Zelllinie E14 129 SvEv durch Elektroporation (ITL *ingenious targeting laboratory*, inc, NY) transfiziert. Hygromycin B-resistente (100 µg/ml) Kolonien wurden mit Hilfe des Southern Blots auf eine erfolgreiche Insertion geprüft. Hierfür wurde genomische DNA von ADAM10 ES Zellen durch *PstI*, *BanI* verdaut und mit einer externen 5' gDNA Sonde (*KpnI-BglII* 767 bp Fragment), einer internen Hygromycin B Sonde und einer externen 3' gDNA Sonde (5' TCT TGG CAG AGC TTG AGC A 3'- 5' ACA CAG GGG CTG GAA TAC TTC TA 3') hybridisiert. Mutierte ES Zelllinien wurden in Blastozysten von C57BL/6J Mäusen injiziert. Hieraus wurden chimäre männliche Tiere wiederum mit C57BL/6J Weibchen verpaart um eine Keimbahntransmission des modifizierten ADAM10 Allels zu erreichen.

Tg(KRT14-Cre)1Amc/J – K14-Cre

Diese Mauslinie wurde kommerziell von Jackson Laboratories bzw. Charles River erworben. Sie wurde im März 2006 von Andrew McMahon (Harvard University) zur Verfügung gestellt und durch Kreuzung mit der Reportermaus Gt(ROSA)26Sor^{tm1sor} eingehend charakterisiert (Dasule et al., 2000). Durch Kreuzung mit der ADAM10^{flox} Linie können bei Generation von ADAM10^{flox/flox} K14-Cre^{+/-} Mäusen konditionelle Knockouts von ADAM10 im Bezug auf die embryonale Epidermis erhalten werden.

TgN(Mx1-Cre)1Cgn – Mx-Cre

Ursprünglich stammt diese Mauslinie aus dem Labor von Klaus Rajewsky, Harvard University und wird seit Dezember 2004 auch kommerziell bei den Jackson Laboratories angeboten. Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden jedoch freundlicherweise von Sergej Nedospasov (DRFZ Berlin) auf C57/B6J Mäuse zurück gekreuzt und der Ag Saftig für wissenschaftliche Zwecke überlassen. Hierbei steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mx1-Promotors, dessen konstitutive transkriptionale Aktivität sehr gering ist, jedoch durch Induktion mit Interferon α/β stark gesteigert werden kann (Kuhn et al., 2005). Alternativ kann der Promotor auch durch Simulation eines Virus-Befalls mit Hilfe eines synthetischen Homopolymers aus RNA (z.B. Kalium Polyinosid-Polycytidid) aktiviert werden. Wird diese Mauslinie mit der

ADAM10^{flox} Linie so gekreuzt, dass ADAM10^{flox/flox} Mx-Cre^{+/-} Mäuse generiert werden, kann die Deletion von ADAM10 in allen Interferon α/β sensitiven Zellen induziert werden. Hierzu gehören vor allem, die Zellen des hämatopoetischen Systems einschließlich ihrer Progenitor- und Stammzellen (Kuhn et al., 1995).

K5-tTA

Die transgene Maus für die Expression des tetrazyklinabhängiges Transaktivatorproteins (tTA) unter der Kontrolle des epidermalen Keratin 5 (K5) Promotor stammt aus dem Labor von Adam Glick, Bethesda USA (Diamond et al., 2000) und wurde dieser Arbeitsgruppe durch das DKFZ in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Durch Kreuzung mit transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines “*Tetracycline responsive elements*“ (TRE) exprimieren (Tet-Cre, Lc1-Cre) sowie der ADAM10^{flox} Linie, können Mäuse mit einer kontrollierbaren induzierbaren Deletion von ADAM10 in der embryonalen und postnatalen Epidermis generiert werden. Die Mäuse werden dabei so lange auf doozyklinhaltigem Futter (ein Derivat des Tetrazyklins) gehalten, bis die Deletion erfolgen soll. Solange die Tiere genügend Doozyklin erhalten, erfolgt eine dauerhafte Bindung des Doozyklins an das Transaktivatorprotein, welches wiederum eine Bindung des Transaktivatorproteins an das TRE unmöglich macht. Durch Absatz des Doozyklins kann das Transaktivatorprotein an das TRE binden und die Expression der Cre-Rekombinase gewebespezifisch auslösen.

Tg (rtTAhCMV)4Bjd/J - hCMV-rtTA

Die hCMV-rtTA Mauslinie stammt von Hermann Bujard (DKFZ Heidelberg) und wurde 2006 den Jackson Laboratories zur kommerziellen Vermarktung zur Verfügung stellte. Die Mauslinie exprimiert das reverse Transaktivatorprotein unter des Kontrolle des humanen Cytomegalievirus-Promotors. Durch Kreuzung mit einer Reporter-Maus (Lc1-Cre) konnte gezeigt werden, dass dieser Promotor in einer Vielzahl von Organen aktiv ist (Schonig et al., 2002), u.a. im Pankreas, Muskel, Thymus, in der Niere und der Lunge. Da es sich um ein Tet-on System handelt, wird erst in Anwesenheit von Doozyklin die Cre-Rekombinase exprimiert.

C.Cg-Tg(tetO-Cre)1Jaw/J - Tet-Cre

Diese transgene Mauslinie ermöglicht die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des “*Tetracycline responsive elements*“ (TRE). Durch die Kreuzung mit Stämmen die transgen für das Transaktivatorprotein sind (tTA oder rtTA-exprimierend), erfolgt die gewebespezifische Expression der Cre-Rekombinase (Perl et al., 2002). Die Mauslinie wurde kommerziell von den Jackson Laboratories erworben.

Lc1-Cre

Die Lc1-Cre Mauslinie vereint die Eigenschaften der Tet-Cre Linie mit der zusätzlichen Expression der Luziferase, da das TRE bidirektional abgelesen werden kann (Schonig et al., 2002). Sie dient somit als Reporterlinie für die Gewebespezifität des jeweilig eingesetzten transgenen, Transaktivatorprotein-exprimierenden Stammes. Diese Mauslinie wurde vom ZMNH Hamburg zur Verfügung gestellt und stammt ursprünglich von Klaus Rajewsky (Harvard University).

3.1.7 Oligonukleotide

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
SW17	ATGGATTGCCCTTTTATGTATTTA	Genotypisierung der ADAM10 ^{flox} Mäuse: erkennt die LoxP-Insertion (vorwärts)
SW18	GCCGATGTGCCAGATGAGTG	Genotypisierung der ADAM10 ^{flox} Mäuse: erkennt die LoxP-Insertion (rückwärts)
SW31	CGCTGTGGGGCATTCTTAG	Genotypisierung der transgenen Mäuse für das Transaktivatorprotein

		fTA/rtTA (vorwärts)
SW32	CATGTCCAGATCGAAATCGTC	Genotypisierung der transgenen Mäuse für das Transaktivatorprotein fTA/rtTA (rückwärts)
SW33	GGAAGATGGTGTGCGGACAGTGTTAT	RT-PCR auf murines ADAM10 (vorwärts)
SW34	GTAGGCACTAGGAAAGAACCAAGCA	RT-PCR auf murines ADAM10 (rückwärts)
SW37	TACAACCATGCCAGCTTTTGTAGT	Deletions-PCR für konditionelle Mäuse auf ADAM10 aus genomischer DNA (vorwärts)
SW38	GCCGATGTGCCAGATGAGTG	Deletions-PCR für konditionelle Mäuse auf ADAM10 aus genomischer DNA (rückwärts)
SW53	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	Genotypisierung der transgenen Mäuse für die Cre-Rekombinase (vorwärts)
SW54	GTGAAACAGCATTGCTGTCACCT	Genotypisierung der transgenen Mäuse für die Cre-Rekombinase (rückwärts)
SW55	ATTACACCAAAAACACCAGCG	Real-Time PCR auf das Exon 2 von murinem ADAM10 (vorwärts)
SW56	GTCCCTCTTCATTCGTAGGTTG	Real-Time PCR auf das

		Exon 2 von murinem ADAM10 (rückwärts)
Hes5-Taq forward	Mm00439311_g1	Real-Time PCR
Hes5-Taq reverse	Mm00439311_g1	Real-Time PCR
Hey1-Taq-forward	Mm00468865_m1	Real-Time PCR
Hey1-Taq reverse	Mm00468865_m1	Real-Time PCR
Hey2-Taq forward	Mm00469280_m1	Real-Time PCR
Hey2-Taq reverse	Mm00469280_m1	Real-Time PCR

3.1.8 Puffer, Medien und andere Lösungen

Alle Puffer und Medien werden, soweit nicht anders angegeben, in wässriger Lösung angesetzt und bei 4°C gelagert. Für die zum Teil erforderliche Einstellung des pH-Wertes wurden die Lösungen auf die jeweils angegebene Temperatur gebracht. Die Basalmedien für die Zellkultur wurden von PAA (DMEM, Makrophagenmedium) und Biochrom (Keratinocyten-Kulturmedium) bezogen. Weitere in der Zellkultur benötigte Lösungen wurden 30 min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert. Das FCS für die Keratinocytenkultur wurde mit Chelex 100 (BioRad) von Kalzium befreit und stammt von PAA (FCS Gold). Das FCS für alle übrigen Zellkulturmedien wurde unbehandelt aliquotiert und stammt ebenfalls von PAA.

Blockierungspuffer für Paraffinschnitte	10% NGS in PBS
DAPI-Stammlösung	5mg/ml DAPI in Dimethylformamid
DMEM	DMEM Basalmedium mit L-Glutamin; 10% FKS; 50 µg/ml Pen/Strep

Epidermaler Split Puffer	0,5 M NH ₄ SCN in 0,1 M NH ₂ HPO ₄ , 0,1 M KH ₂ PO ₄ pH 6,8 (4°C)
Fixierungspuffer (Perfusion, Stückfixierung Gewebe für die Histologie)	PBS; 4% PFA (w/v)
Fixierungspuffer (Elektronenmikroskopie)	3-6% Glutaraldehyd (v/v) in PBS
Keratinocyten Kulturmedium	2/3 (v/v) DMEM Basalmedium 1/3 (v/v) HAM's F12 Basalmedium 50 µg/ml Pen/Strep 2 mM L-Glutamin 0,025 g (w/v) Sodium L-Ascorbat 10 ng/ml <i>Epidermal growth factor</i> 5 µg/ml Insulin 0,5 µg/ml Hydrocortison 10 ⁻¹⁰ M Cholera Toxin 1,8x10 ⁻⁴ M Adenin
Makrophagenmedium	1/2 Makrophagenmedium 1/2 DMEM 50 µg/ml Gentamycin 100 µg/ml Vankomycin 2,5 µg/ml Amphotericin
Nile Red Stammlösung	0,5 mg/ml Nile Red in 100% Aceton
Nile Red Färbelösung	0,1% Nile Red Stammlösung in 75:25 Glycerol-Wasser Mischung
NP-40 Lysispuffer	1% (v/v) NP-40 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,8 mM EGTA 10 mM Tris-HCl pH 7,4 (4°C)

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (4°C oder RT)
PBS(ABC)	PBS 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂
PBST	PBS; 0,05% (v/v) Tween 20
Primärantikörperlösung für Kryoschnitte	5% (w/v) NGS; 0,2% (v/v) Tween-20 in PBS(ABC)
Primärantikörperlösung für Paraffinschnitte	5% NGS (w/v), 0,2% (v/v) Fish Skin Gelatine in PBS
Propidium-Iodid Stammlösung	50 µg/ml in PBS pH 7,4
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris base 0,4% (w/v) SDS pH 6,8 (RT)
SDS-Elektrophoresepuffer	1,5% (w/v) Glycin 25 mM Tris base 0,1% (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer	2,5% (v/v) 1M Tris-HCl-Lsg pH 6,8 5% (v/v) Glycerol 1% (v/v) 20% (w/v) SDS-Lösung 100 µM DTT Bromphenolblau
Sekundärantikörperlösung für Kryoschnitte	0,2% (v/v) Tween-20 in PBS(ABC) + 1:1000 DAPI Nuclei stain

Sekundärantikörperlösung für Paraffinschnitte	0,2% (v/v) Fish Skin Gelatine in PBS + 1:1000 DAPI Nuclei stain
Stripping-Buffer	100 mM β -Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 62,3 mM Tris-HCl pH 6,7 (RT)
TAE-Agarosegelelektrophoresepuffer	40 mM Tris/Essigsäure 10 mM NaOAc 1 mM Na-EDTA pH 7,8 (RT)
Tank-Blot Transferpuffer	25 mM Tris base 200 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,3 (4°C)
TBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM Tris Base pH 7,4 (RT)
TBST	TBS; 1% (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris base 0,4% (w/v) SDS pH 8,8 (RT)
Waschpuffer für Kryoschnitte	0,2% (v/v) Tween-20 in PBS(ABC)
Waschpuffer (Durchflusszytometrie)	PBS; 1% (v/v) BSA 0,01% (w/v) NaN ₃

3.1.9 Reagenziensätze und Kits

CellTiter 96 [®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)	Promega
DeadEnd Colorimetric TUNEL System	Promega
DuoSet murines G-CSF	RnD Systems
DuoSet murines TIMP-1	RnD Systems
DuoSet murines TSLP	RnD Systems
InnuPrep Kit zur Isolation genomischer DNA	Analytik Jena
Peroxidase Block	DAKO
Proteome Profiler Array (ARY006)	RnD Systems
Revert Aid [™] First Strand cDNA Kit	Fermentas
TMB Substrate Reagent Set	BD OptEIA [™]
Western Blotting Detektionskit ECL Advanced	GE Healthcare
Western Blotting Detektionskit ECL Plus	GE Healthcare

3.1.10 Verbrauchsmittel

4-12% Bis/TRIS Gradientengele	Invitrogen
96- <i>well</i> -Elisa Platte	Nunc
Collagen-beschichtete Zellkulturwaren für die Deckgläser	Menzel-Gläser
Einmalkanülen (Microlance)	BD Biosciences
Einmalspritzen	BD Biosciences
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Keratinocytenzellkultur (BD Biocoat)	BD Biosciences
Na-Heparin Hämatokritkapillare	Brand
Nylon Zellsieb	BD Bioscience
Objektträger für Paraffinschnitte	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Plastikwaren für die Zellkultur	Sarstedt, Nunc
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore

Reaktionsgefäße	Eppendorf
Skalpell (rund)	Braun
Sterilfilter (0,22µM)	Millipore, Roth
Western Blot Filterpapiere	Schleicher & Schuell
Zellschaber	Sarstedt

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese (McDonell et al., 1977)

Für die Herstellung eines Gels wird Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht, kurz abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach vollständiger Polymerisation des Agarosegels wurden 5µl Probe mit 1µl 6x DNA-Probenpuffer gemischt und vollständig auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im TAE-Puffer und einer Feldstärke von 5V/cm Elektrodenabstand. Damit die Auftrennung der DNA-Fragmente im entsprechenden Größenbereich optimal ist, wurden für DNA-Fragmentgrößen zwischen 100 und 500 Bp 2% (w/v), für DNA-Fragmentgrößen >500 Bp 1% (w/v) konzentrierte Agarosegele verwendet.

3.2.1.2 Isolierung von mRNA aus murinen Geweben

Es werden maximal 30 mg Gewebe mit 350 µl RA1 Puffer des RNAPII Kits von Macherey und Nagel versetzt und je nach Gewebe mit einem entsprechenden Programm des Precellys von Peqlab lysiert. Die weitere Behandlung erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Die langfristige Lagerung der mRNA erfolgt nach Aliquotierung bei -70°C.

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurden die verwendeten Proben gevortext, kurz zentrifugiert und dann unverdünnt im Nanodrop (Peqlab) vermessen. Neben der Konzentration wurde dabei die Ratio der Absorption der Wellenlängen 260 nm/280 nm sowie 260/230 nm bestimmt, sowie eine Absorptionskurve im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 350 nm ermittelt, um die Reinheit der Probe abzuschätzen. Als Referenz diente der jeweilig verwendete Elutionspuffer.

3.2.1.4 Microarray Analyse von muriner Epidermis

Gesamt-RNA aus epidermalen Splits von P0-Mäusen wurde, wie unter 3.2.1.2 beschrieben isoliert und mit einem Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST array gemäß den Herstellerangaben hybridisiert. Die anschließende Datenauswertung wurde von R. Haesler (UK-SH Kiel, Ag Schreiber) vorgenommen und ist in Hasler et al., 2009 beschrieben.

3.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion PCR (Mullis et al., 1986)

Alle PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 50µl angesetzt. Die eingesetzten Templates für die nachfolgenden Genotypisierungsreaktionen stammen aus den unter 3.2.3.12 beschriebenen Schwanzbiopsien, sowie revers transkribierter cDNA aus murinen Geweben (s. 3.2.1.7).

Standard PCR-Ansatz für Genotypisierungen

500 ng	genomische DNA aus der Schwanzbiopsie
5 µl	10x DreamTaq™ Puffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
0,25 µl	DreamTaq™-Polymerase (5 u/µl)
1,0 µl	5'-Primer (10 µM)
1,0 µl	3'-Primer (10 µM)
auf 50 µl	DNase freies Wasser

PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der ADAM10^{flox} Mäuse

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	30
Anlagerung der Primer	56	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	600	1
Kühlen	10	∞	1

PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der Cre-Rekombinase-exprimierenden Mausstämmen (K14-Cre, Tet-Cre, LC1-Cre)

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	35
Anlagerung der Primer	51	30	
Elongation	72	15	
Finale Elongation	72	420	1
Kühlen	10	∞	1

PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der Transaktivatorprotein-exprimierenden Mauslinien (hCMV-rtTA, K5-tTA)

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	35
Anlagerung der Primer	57	60	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	420	1
Kühlen	10	∞	1

PCR-Ansatz für die ADAM10-Exon PCR aus genomischer DNA und cDNA

500 ng	genomische DNA oder cDNA aus murinen Geweben
5 µl	10x DreamTaq™ Puffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
0,5 µl	DreamTaq™-Polymerase (5 u/µl)
1,0 µl	5'-Primer (10 µM)
1,0 µl	3'-Primer (10 µM)
auf 50 µl	DNase freies Wasser

PCR-Bedingungen für ADAM10-Exon PCR aus genomischer DNA

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	60	35
Anlagerung der Primer	61	60	
Elongation	72	180	
Finale Elongation	72	600	1
Kühlen	10	∞	1

PCR-Bedingungen für ADAM10 RT-PCR (Exon 2) aus cDNA

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	25-40
Anlagerung der Primer	58	30	
Elongation	72	15	
Finale Elongation	72	420	1
Kühlen	10	∞	1

PCR-Bedingungen für ADAM10 RT-PCR (Exon 1 – Exon 16) aus cDNA

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	25-40
Anlagerung der Primer	58	30	
Elongation	72	180	
Finale Elongation	72	420	1
Kühlen	10	∞	1

3.2.1.6 „Real Time“ PCR

Gesamt-RNA wurde aus epidermalen Splits von P0-Mäusen, wie unter 3.2.3.3 beschrieben isoliert. Hiervon wurden 2µg mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany) umgeschrieben und anschließend 100ng cDNA für die Real-Time PCR eingesetzt. Zur Hybridisierung wurden vorgefertigte Taqman-Primer der Firma Applied Biosystems eingesetzt, welche so gewählt wurden, dass alle untersuchten Gene (Hes5, Hey1 und Hey2) mit einem gemeinsamen Durchlauf im PCR-Cycler optimal amplifiziert werden konnten:

Real-Time PCR Ansatz

4,5 µl	qPCR-Mix (Applied Biosystems)
4,5 µl	DNase freies Wasser
0,5 µl	Taqman Probe
0,5 µl	cDNA

Die Real-Time PCR wurde entsprechend den Herstellerangaben in einem 7900HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt.

3.2.1.7 Reverse Transkription von mRNA (Foley et al., 1993)

Die reverse Transkription wurde in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgte die Anlagerung der Oligo(dT)₁₈Primer:

1 µl	100 µM Oligo(dT) ₁₈ Primer
2 µg	RNA

Der Ansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht, gut durchmischt, bei 70°C 5 min inkubiert und sofort in Eiswasser abgekühlt. Danach erfolgte die eigentliche reverse Transkription:

4 µl	5x Puffer für RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase
2 µl	10 mM dNTP Mix
1 µl	RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)
1 µl	RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)

Nach 60min Inkubation bei 42°C wurde das Enzym durch 5min Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zell- und Gewebelysaten wurde der BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific) benutzt. Dieser Versuch konnte mit allen in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien durchgeführt werden und wurde nach dem beiliegenden Protokoll für Mikrotiterplattenversuche durchgeführt.

3.2.2.2 Proteinisolierung aus epidermalen Splits, Keratinozyten und hämatopoetischen Organen

Die Epidermis wurde mit 300µL NP-40 Lysispuffer (ohne NP-40), einer Mischung von Proteinaseinhibitoren (Complete, Roche 1:25) versetzt und unter Zugabe von 4-5 PreCellys Keramikkügelchen mit folgenden Programmen des PreCellys (Peqlab) homogenisiert:

Gewebe	Epidermis	Milz/LK	Leber	Thymus
Umdrehungen [rpm]	6500	5900	5000	5900
Dauer [sec]	2x20	2x20	2x50	2x20
Pause [sec]	20	20	20	20

Alle weiteren Schritte erfolgten ausschließlich auf Eis. Zunächst erfolgte die Zugabe von 300µL NP-40 Lysispuffer (2% NP-40), sowie einer Mischung von Proteinaseinhibitoren (Complete, Roche 1:25) und die Proben wurden 1h bei 4°C im Roller inkubiert. Debris und Keramikkügelchen wurden durch einen Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge 5415C von Eppendorf, 10 min, 13000 rpm, 4°C) sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgt wie in 3.2.2.1 beschrieben. Zur Auftrennung der Proteine wurden die Lysate mit 2xLämmli-puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die denaturierten Proben konnten nun direkt für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt werden oder kurzfristig bei 4°C, längerfristig bei -80°C gelagert werden.

3.2.3 Transgene Mauszucht und Präparation von murinen Geweben

3.2.3.1 Blutentnahme, Serum- und Plasmagewinnung

Für die Blutabnahme ohne anschließende Tötung wurde das Blut entweder durch Punktion des retrobulbären Venenplexus oder durch Anritzen der Schwanzvene entnommen. Die finale Blutabnahme wurde mittels direkter Herzpunktion durchgeführt. Zur Gewinnung von Serum wurde ohne Gerinnungshemmer punktiert, das Vollblut ca. 15-30 min stehen gelassen, bis es vollständig geronnen ist und dann 10 min bei 1500x g zentrifugiert. Das Serum konnte dann mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofern es nicht direkt für weitere Experimente eingesetzt wurde bei -20 oder -80°C gelagert werden. Für die Gewinnung von Plasma wurde EDTA oder Heparin bei der Punktion verwendet, um eine Koagulation zu verhindern.

3.2.3.2 Doxyzyklin-Gabe/Entzug

Das Doxyzyklin wurde bei SSniff (Soest) dem Standard Zucht- bzw. Haltungsfutter beigemischt, zur besseren Erkennbarkeit mit Lebensmittelfarbe (grün: 50 mg/kg; rot 1 g/kg) eingefärbt und in reguläre Pellets gepresst. Da Doxyzyklin lichtempfindlich ist, erfolgte in der Tierhaltung ein zweimaliger Austausch des Futters pro Woche. Die ADAM10^{flox/flox} / K5-rtTA^{+/-} (Tet-off) Mäuse wurden mindestens zwei Wochen vor der Verpaarung mit ADAM10^{flox/flox} / Tet-Cre^{+/-} Mäusen ständig auf Doxyzyklin-haltigem Futter gehalten (grün). Sobald die Jungtiere abgesetzt wurden, konnte in ihnen durch Austausch des Doxyzyklin-haltigen Futters mit Standard Haltungsfutter die Expression der Cre-Rekombinase und somit die Deletion von ADAM10 gewebespezifisch induziert werden. Bei den ADAM10^{flox/flox} / hCMV-rtTA^{+/-} / Tet-Cre^{+/-} Mäusen (Tet-on) wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch Zugabe von Doxyzyklin-haltigem Futter (rot) zu einem gewünschten Zeitpunkt induziert.

3.2.3.3 Epidermaler Split

Mit dieser Methode ist es möglich, Dermis und Epidermis von Mäusen des Alters E17.5 bis P3 zu trennen und für weitere Analysen zu verwenden. Die Mäuse wurden hierfür dekapitiert, alle Extremitäten so nah wie möglich am Torso abgetrennt und die Haut als ganzes vom Körper getrennt. Die Haut wurde mit einem Skalpell vorsichtig von restlichem Muskel- und Fettgewebe entfernt, einmal mit PBS gespült und dann mit der Dermis nach unten auf einer Zellkulturschale (Ø 3 cm) aufgespannt. Unter die Dermis wurde 1 ml epidermaler Split Puffer pipettiert – dabei war darauf zu achten, dass die Epidermis nicht in den Puffer eintaucht. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden Dermis und Epidermis mit Hilfe von zwei Pinzetten getrennt und direkt für mRNA- oder Proteinisolierung gemäß 3.2.2.2 verwendet. Ansonsten wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3.4 Isolierung von primären Keratinozyten

Alle folgenden Schritte erfolgten unter der Sterilbank. Für die Isolierung primärer Keratinozyten wurden P0 Mäuse dekapitiert und für jeweils eine Minute nachfolgend in 70% EtOH, 50% beta Isodonna in 70% EtOH, 70%EtOH und PBS eingetaucht. Alle Extremitäten wurden so nah wie möglich am Körper abgeschnitten, bevor durch einen

kaudalen Schnitt vom oberen Rücken die Haut durchtrennt wird. Mit Pinzetten wird die Haut vorsichtig vom Torso getrennt und mit der Dermisseite nach unten auf eine Zellkulturschale (\varnothing 3cm) aufgespannt. Unter die Dermisseite wurde 1 ml Trypsin/EDTA pipettiert und die Haut über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Epidermis von der Dermis mit einer Pinzette abgezogen und auf eine neue Zellkulturschale überführt. Dort wurde sie mit zwei runden Skalpelln in möglichst kleine Teile zerschnitten und in ein 15 ml Polysteren Röhrchen mit Keratinozyten-Medium überführt. Es erfolgte ein 5 min Zentrifugationsschritt mit 210x g bei RT, danach wurde die Zellsuspension wie unter 3.2.4.1 beschrieben behandelt.

3.2.3.5 Präparation von muriner (Rücken-)haut für die Immunfluoreszenz oder die Immunhistochemie

Damit für eine anschließende Histologie, Immunfluoreszenzfärbung oder Immunhistochemie Haut immer aus einer vergleichbaren Körperregion und identischer Orientierung geschnitten werden kann, wurden die Proben nach folgender Methode standardisiert präpariert:

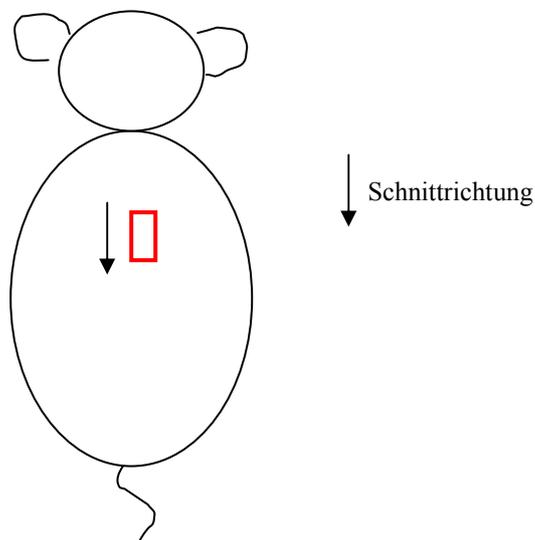


Bild 3.1: Standardisierte Präparation von muriner Rückenhaut

Das ausgeschnittene Stück Rückenhaut wurde auf einem Stück Zellulose Filter (Schleicher&Schuell) aufgespannt und für Kryoschnitte prozessiert:

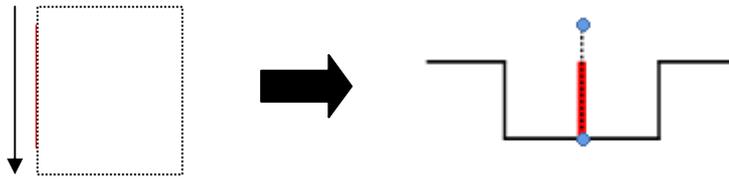


Bild 3.2: Präparation und Einbettung von murinen Rückenhautproben für Kryoschnitte

Dabei wurde eine Kryoform mit *Tissue Freezing Medium* gefüllt, auf Trockeneis gestellt und die Probe lotrecht, mit der Schnittfläche nach unten sofort in das *Tissue Freezing Medium* überführt. Für Paraffinschnitte wurden die Proben ebenfalls auf einem Zellulose Filter aufgespannt und wie unter Bild 3.3 prozessiert.

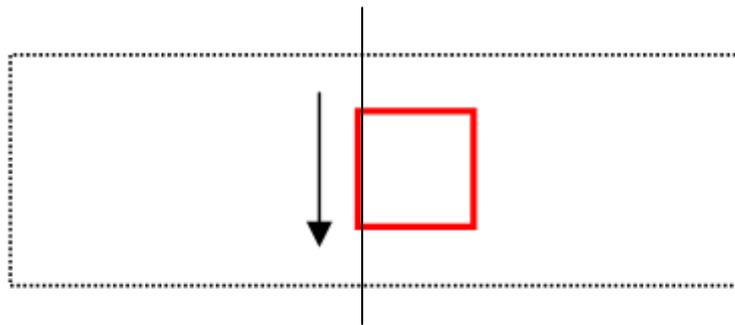


Bild 3.3: Präparation und Einbettung von murinen Rückenhautproben für Paraffinschnitte

Die Schnittfläche zeigt dabei zur Mitte und sie wurde durch Überklappen des Filters „eingepackt“. Die Proben wurden dann mindestens 1 h oder über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS fixiert, in eine Einbettkassette transferiert und beginnend mit einer 70%igen EtOH-Lösung schrittweise dehydriert.

3.2.3.6 Markierung der Mäuse in der Zucht

Damit die Mäuse zweifelsfrei identifiziert werden konnten, erfolgte nach dem Absetzen von weiblichen und männlichen Jungtieren neben der Schwanzbiopsie auch eine Ohrlochmarkierung mit einer Ohrlochzange. Jede Ohrlochmarkierung bekam eine durchgängige Zahl von 1-10, während die Mäuse eines Stammes eine fortlaufende Nummer erhielten. Sowohl auf der Zuchtkarte als auch im Zuchtbuch wurden das

Geschlecht, die fortlaufende Nummerierung sowie die entsprechende Ohrlochmarkierung eingetragen:

Nummer	Ohrloch
1	keins
2	1x links
3	1x rechts
4	1x links, 1x rechts
5	2x links
6	2x rechts
7	2x links, 1x rechts
8	1x links, 2x rechts
9	2x links, 2x rechts
10	3x links

3.2.3.7 Maushaltung

Die Tierhaltung aller in dieser Arbeit verwendeten Mäuse, erfolgte in der geschlossenen Barrierehaltung des Tierhauses Kiel. Die Mäuse wurden dabei in IVC (*isolated ventilated cages*) Racks gehalten und die mikrobielle Belastung in regelmäßigen Abständen nach den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) geprüft.

3.2.3.8 Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)

Die Messung des transepidermalen Wasserverlustes von neugeborenen Mäusen wurde anhand zwei verschiedener Methoden durchgeführt. Zum einen wurde der Wasserverlust am Bauch der neugeborenen Mäuse durch Messung mit einem TEWAmeter (Courage&Khazaka) bestimmt. Dabei wurde ein spezieller Aufsatz für neugeborene Mäuse verwendet. Weiterhin wurden die neugeborenen Mäuse ohne Nahrung über einen Zeitraum von 5 h bei 37°C gehalten und alle 60 min gewogen. Die

Differenz zwischen Ausgangsgewicht und dem Gewicht nach 5 h zeigte den transepidermalen Wasserverlust.

3.2.3.9 Farbstoff-Penetrationsversuch zur Analyse der Outside-In Barriere der Epidermis

Zur Bestimmung der Integrität der Outside-In Barriere wurden E14.5, E16.5 und E18.5 alte Mäuse präpariert und nach folgendem Protokoll gefärbt:

Reagenz	Dauer
25% MeOH/75% PBS	1 min
50% MeOH/50% PBS	1 min
75% MeOH/25% PBS	1 min
100% MeOH	1 min
75% MeOH/25% PBS	1 min
50% MeOH/50% PBS	1 min
25% MeOH/75% PBS	1 min
PBS	1 min
Toluidin Blau/PBS (0,001%)	1 min

Danach wird mit PBS entfärbt und die Embryonen wurde fotografiert. Die zugehörigen Genotypen wurden wie unter 3.2.1.5 beschrieben ermittelt.

3.2.3.10 Perfusion zur Fixierung von murinen Geweben für die Histologie

Alle verwendeten Lösungen wurden kurz vorher angesetzt und steril filtriert (\varnothing 0,22 μm). Als Prä-Perfusionslösung wird PBS eingesetzt, für die Fixierung entweder 4%PFA/PBS oder Phosphat-gepufferte 3%ige Glutaraldehydlösung. Im Flüssigkeitskreislauf durften keine Luftblasen mehr sein. Die Mäuse wurden mit Ketamin/Rompun (100/10 mg/kg Körpergewicht i.p.) betäubt und auf einer Präparationsunterlage fixiert. Der Körper wird mit 70% EtOH abgewaschen und die abdominale Haut mit einem longitudinalem Schnitt durchtrennt. Danach wurde der Brustkorb durchtrennt und das Herz freigelegt. Eine 23g Schmetterlingskanüle wurde in die linke Herzkammer gelegt und ein Druck von ca. 100 mm Hg in der Perfusionapparatur aufgebaut. Zeitgleich mit dem zunächst einströmenden PBS wurde die linke Herzkammer mit einem Schnitt

geöffnet und das Blutkreislaufsystem solange gespült bis kein Blut im Durchfluss mehr erkennbar war. Dann wurde anstatt PBS die jeweilige Fixierungslösung mit einem Druck von ebenfalls 100 mm Hg verwendet, bis alle Gewebe eine eindeutige Steifheit aufwiesen.

3.2.3.11 p.i. Injektion von Kalium poly-Inosid poly-Cytosid (pI-pC)

Für die Induktion der Cre-Rekombinase Expression wurden Mäuse im Alter von 6 Wochen dreimal in einem zwei-Tage Intervall mit einer Dosis von 250 µg pI-pC i.p. gespritzt. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere für weitere Experimente genutzt.

3.2.3.12 Schwanzbiopsie und Präparation genomischer DNA

Zur Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde den Tieren im Alter zwischen zwei und vier Wochen ein etwa 0,3 – 1 cm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen und Entzündungen an der abgeschnittenen Schwanzspitze wurde ein Glasperlensterilisator (Inotech) verwendet. Die DNA wurde mit Hilfe des InnuPrep DNA Mini Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in 50µl destilliertem Wasser eluiert und am Nanodrop quantifiziert.

3.2.3.13 Verpaarungs-Schemata und Nomenklatur

Da für die Generation von konditionalen und induzierbar konditionalen Mäusen ein komplexeres Verpaarungsschema genutzt wurde als bei klassischen Knockout Mäusen, wurden im Folgenden alle vier Verpaarungs-Schemata für die im Verlaufe dieser Arbeit generierten Stämme sowie eine einheitliche Nomenklatur abgebildet:

Verpaarungs-Schema für den konditionalen Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis

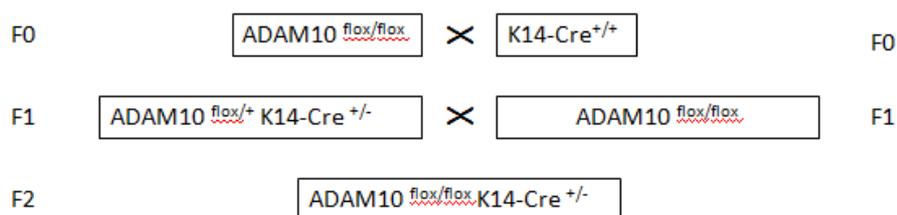


Bild 3.4: Verpaarungsschema für dem konditionalem Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis

Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in Interferon-sensitiven Zellen des Hämatopoetischen Systems

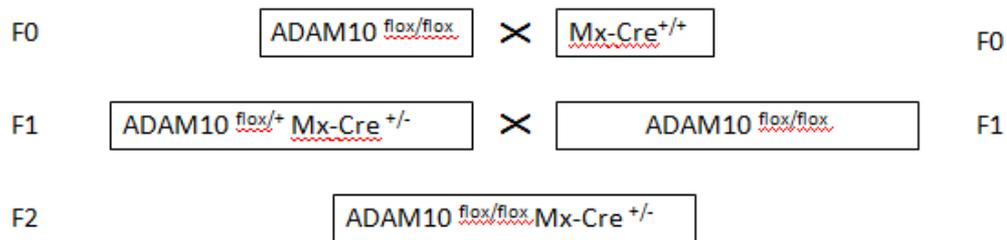


Bild 3.5: Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in Interferon-sensitiven Zellen des Hämatopoetischen Systems

Die Expression der Cre-Rekombinase kann theoretisch in jedem Alter der Mäuse, wie unter 0 beschrieben, induziert werden.

Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis

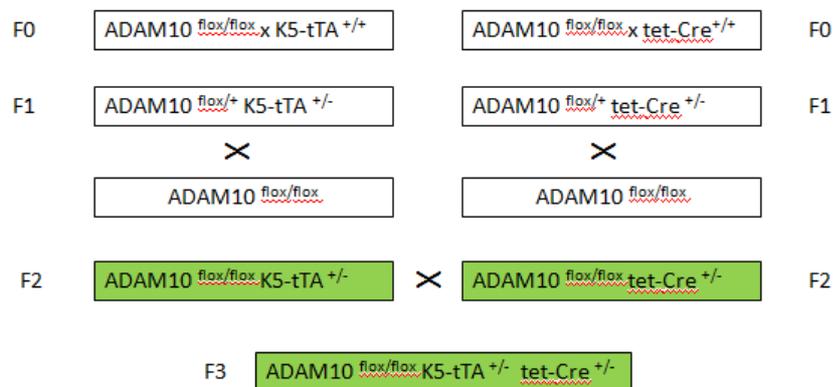


Bild 3.6: Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis

Das Hinterlegen mit grüner Farbe markierte den Zeitpunkt, ab dem eine ständige Doxzyklingabe im Futter der Mäuse erfolgen musste, damit es nicht zu einer vorzeitigen Deletion von ADAM10 in der Epidermis kam. Anstatt der Tet-Cre Maus konnte dieses Verpaarungsschema auch mit der Lc1-Cre Maus durchgeführt werden. Dies ermöglichte die Analyse der Cre-Rekombinase Expression in zellbasierten Assays (luminometrische Messung lysierter Epidermis) oder *in vivo* mit geeigneten Aufnahmemethoden.

Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in Zellen mit aktivem hCMV Promotor

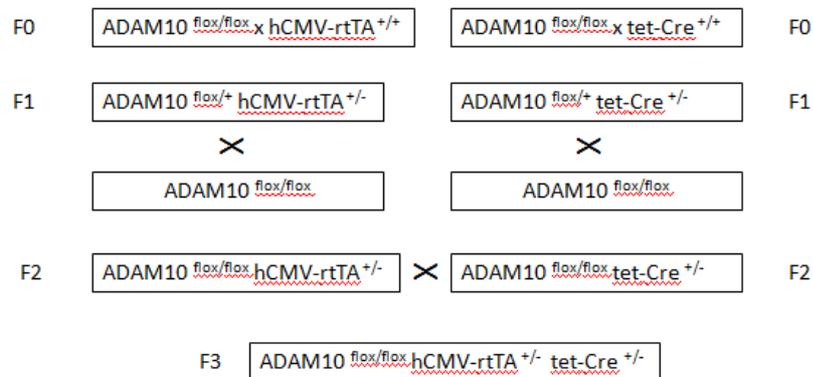


Bild 3.7: Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in Zellen mit aktivem hCMV Promotor

In Tieren ab der F3 Generation konnte durch Gabe von Doxzyklin die Deletion von ADAM10 induziert werden. Dies kann theoretisch in allen Altersstadien durchgeführt werden. Zudem ist hier ebenfalls die Einkreuzung der Lc1-Cre Maus als Reportersystem für die Cre-Rekombinase Expression möglich.

3.2.4 Zell- und Immunbiologische Methoden

3.2.4.1 Kultivierung von primären Keratinozyten

Die Keratinozyten wurden auf Kollagen-beschichteten 6cm Kulturschalen (Bd BioCoat) kultiviert. Die Kulturbedingungen betragen 32°C und 5% CO₂ bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Zur optimalen Versorgung wurden die Keratinozyten während der ersten Passagen zusammen mit abgetöteten Fibroblasten (J23T3) als Feeder Zellkultur gehalten.

Mediumwechsel, Feederwechsel und Teilung

Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Sofern weder ein Feederwechsel noch eine Teilung der Zellen beabsichtigt war, wurden die Keratinozyten mit 2 ml frischem Kulturmedium versorgt. Ansonsten erfolgte eine kurze Inkubation mit Trypsin/EDTA, nach der die Fibroblasten gründlich mit PBS von

der Kulturschale gewaschen wurden. Nachdem das PBS mit den abgelösten Fibroblasten abgesaugt wurde, wurden entweder neue Fibroblasten zu den Keratinozyten pipettiert oder es erfolgte eine erneute Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 32°C bis die Keratinozyten sich ebenfalls abzulösen beginnen. Durch vorsichtiges Klopfen an die Zellkulturschale konnte dieser Prozess beschleunigt werden. Nach etwa 10-15 min wurde der Prozess durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 210x g und 4°C zentrifugiert und mit 4-6 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Subkultivierungsratio betrug zwischen 1:2 und 1:3. Auch hier wurden Feeder Zellen zugegeben.

Zählen der Zellen

Für alle Experimente, sowie das gleichmäßige Aussäen von Kontroll- und ADAM10-defizienten Keratinozyten wurden die Zellen bis zur Zentrifugation wie unter dem Punkt Mediumwechsel und Teilung behandelt. Nach sorgfältigem resuspendieren wurde von diesen Zellen ein Aliquot abgenommen und im CASY (Innovatis) auf Zelldichte und Vitalität vermessen.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Keratinozyten wurden wie unter dem Punkt Mediumwechsel und Teilung behandelt, dann 5 min bei 4°C und 210x g zentrifugiert und komplett in 4° kaltem 10% (v/v) DMSO enthaltendem Keratinozyten-Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Einfrierröhrchen überführt und in einer geschlossenen Styroporbox 24h bei -70°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurde. Das Auftauen der Einfrierproben erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden sofort einmal mit dem entsprechenden Kulturmedium gewaschen und dann in frischem Kulturmedium ausgesät.

3.2.4.2 Kultivierung von murinen Fibroblasten (J23T3)

Die Zellen wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

Mediumwechsel und Teilung

Ein Mediumwechsel erfolgte spätestens alle drei Tage. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht haben, wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale lösen und dann in einer ausreichenden Menge Kulturmedium resuspendiert um die Reaktion zu stoppen. Die Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, 5 min bei 210x g und 4°C zentrifugiert und mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Subkultivierungsratio lag zwischen 1:5 und 1:20.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden 5min bei 4°C und 210xg zentrifugiert und mit einer Dichte von $1-1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml in kaltem 10% (v/v) DMSO enthaltendem DMEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Einfrierröhrchen überführt und in einer geschlossenen Styroporbox 24h bei -70°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Vorbereitung der Zellen für die Feeder Zellkultur mit primären Keratinozyten

Eine konfluente 10cm Kulturschale mit Fibroblasten wurde 2h mit Mitomycin C (5 µg/ml) behandelt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Fibroblasten mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und in 6ml Keratinozyten Zellkulturmedium resuspendiert. Dies war ausreichend für die Feederzellkultur von Keratinozyten in sechs 6 cm Zellkulturschalen.

3.2.4.3 Isolierung und Kultivierung von primären Makrophagenvorläuferzellen aus dem Knochenmark

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, *femora* und *tibiae* von anhaftendem Gewebe befreit und in semisteriles eiskaltes PBS überführt. Alle weiteren Schritte fanden unter der Sterilbank statt. Die Knochen einer Maus wurden mit dem Skalpell oder einer Rasierklinge unmittelbar an den Gelenken lateral abgeschnitten. Das so zugängliche Knochenmark wurde dann mit einer 27G-Kanüle und eiskaltem Makrophagenmedium aus den Knochen gespült. Zur Vereinzelung wurden die Zellen durch ein Nylonsieb (Ø 70 µm) in ein 50 ml Polystyrenröhrchen gespült und auf 50 ml mit Makrophagenmedium aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde auf fünf

Bakterienplatten (P100) verteilt und durch Zugabe von 20 ng/ml murinem *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) innerhalb von 7 bis 10 Tagen zu reifen Makrophagen differenziert. Sobald die Zellen auf der Platte ausreichend adhären wurden, konnte ein Mediumwechsel erfolgen. Für weitere Experimente konnten die differenzierten Makrophagen entweder mit Accutase (für Durchflusszytometrie) oder mit eiskaltem PBS und einem Zellschaber (Western Blot) geerntet werden.

3.2.4.4 Durchflusszytometrie von primären murinen Zellen

Für jede Messung wurden 5×10^5 Zellen verwendet, die zunächst 30 min lang bei 4°C mit Fc-Block (anti-CD16/CD32, BD Biosciences) im Roller inkubiert wurden. Hierdurch kann die unspezifische Bindung der Fc-Fragmente der eingesetzten Primärantikörper an Fc-Rezeptoren auf murinen Zellen verhindert werden. Der Erfolg dieser Behandlung wurde durch Verwendung einer Isotypkontrolle kontrolliert. Sofern der Primärantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, erfolgte die Inkubation der Zellen in einem Reaktionsvolumen von 100 µl bei 4°C und im Dunkeln. Die Zellen wurden mindestens zweimal mit 700 µl Waschlösung gewaschen, in 500 µl eiskaltem PBS mit einer 1:1000 Verdünnung der Propidium-Stammlösung (BD Biosciences) resuspendiert und konnten dann direkt für die Messung am Durchflusszytometer eingesetzt werden. Ansonsten wurden nicht gebundene Primärantikörper durch drei Waschschriffe entfernt, die Zellen 45 min bei 4°C und im Dunkeln mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, danach erneut dreimal gewaschen und anschließend für die durchflusszytometrische Messung vorbereitet. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte für alle Propidiumiodid-negativen Zellen in den vorhandenen Fluoreszenzkanälen. Bei Mehrfarben-Messungen musste je nach Verwendung der Farbstoff-Kombinationen gegebenenfalls kompensiert werden. Abhängig von den verwendeten Geweben wurden 10-100.000 Zellen im Propidium-negativen Kanal gezählt und für die Auswertung herangezogen. Die anschließende Analyse der Daten erfolgte mit WinMDI 2.8 oder mit BD FACSDiva.

3.2.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale SDS-PAGE bietet die Möglichkeit Proteine, unabhängig von ihrer Eigenladung, anhand ihrer molekularen Masse aufzutrennen. Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (Laemmli, 1970) wurden die Proben zunächst 5min bei 95°C im denaturierenden Probenpuffer aufgeköcht, kurz abgekühlt und dann in die vorgeformten Taschen eines 4,5%igen Sammelgels überführt. Je nach Anwendung wurden dabei Proteinmengen zwischen 5 und 50 µg geladen, die dann entsprechend dem gewünschten Auftrennungsbereich durch ein 5-15% Sammelgel liefen. Sollten sowohl große Proteine (100-250kDa) als auch kleinere (<60kDa) Proteine auf einem einzigen SDS-Gel getrennt werden, wurden 4-12% Gradientengele (Invitrogen) genutzt. Damit die Proteine vor dem Eintritt in das Sammelgel konzentriert werden, erfolgte die Elektrophorese zunächst 15 min bei 60 V, während die Spannung nach Eintritt der Proteine ins Trenngel auf bis zu 140V gesteigert werden konnte. Zur Überprüfung der molekularen Größe wurde in mindestens einer Tasche ein molekularer Marker (Fermentas) mitgeführt.

3.2.4.6 Western Blot und Immundetektion

Proteintransfer durch Western-Blot

Zur Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) wurde in Richtung von Kathode zur Anode ein *Sandwich* aus Watte, *Whatmann-Paper*, PVDF-Membran, SDS-Gel, *Whatmann-Paper*, Watte aufgebaut. Für eine gleichmäßige und vollständige Übertragung wurde das *Sandwich* ständig feucht und luftblasenfrei gehalten. Die Übertragung konnte nun bei 4°C 2 h lang mit einer konstanten Stromstärke von 800mA oder über Nacht mit einer konstanten Spannung von 20 V erfolgen. Der Erfolg der gleichmäßigen Übertragung konnte durch Anfärben der PVDF-Membran mit Ponceau-Rot kontrolliert werden. Dazu wurde die Membran für ca. 2 min in der Ponceau-Lösung belassen und anschließend solange mit Wasser entfärbt bis nur noch die Proteinbanden zu sehen waren.

Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die PVDF-Membran entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver in TBST inkubiert. Nun konnte die Bindung des Primäantikörpers (in 5% Magermilchpulver/TBST), je nach Anwendung, entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C erfolgen. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 10 min wurde die PVDF-Membran mit dem für den Erstantikörper spezifischen *horsereddish peroxidase* (HRP) gekoppelten Zweitantikörper 45 min in TBST inkubiert und erneut dreimal mindestens 10 min mit TBST gewaschen. Durch Zugabe von ECL advanced (erwartete Signalstärke: gering) oder plus (erwartete Signalstärke: hoch) gemäß den Herstellerangaben (beide GE Healthcare) konnte anhand der im LAS-3000 (Fujifilm) gemessenen Chemilumineszenz Rückschluss auf die Peroxidaseaktivität und somit indirekt auch die Menge des detektierten Proteins gezogen werden. Sofern die detektierten Banden nicht schon gesättigt waren, durfte eine weitere quantitative Auswertung z.B. mit dem Programm ImageJ (z.B. Densitometrie) erfolgen.

3.2.4.7 Dot Blot Analyse mit Proteome Profiler Array (RnD Systems)

Der Proteome Profiler Array (Ary006) wurde mit jeweils 100 µl Heparin-Plasma von vier Mäusen (2 KO vs. 2 WT) inkubiert und gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.4.8 Quantifizierung von murinem Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), Granulocyte-Colony Stimulation Factor (G-CSF) und Tissue Inhibitor of Metalloproteases 1 (TIMP-1) mit Hilfe des ELISA

Für die Quantifizierung von murinem TSLP, G-CSF und TIMP-1 aus Serum, Plasma oder Zellkulturüberständen wurden die DuoSets von RnD Systems gemäß den Herstellerangaben verwendet. Für die jeweiligen Eichgeraden aus den Proteinstandard-Reihen wurden hiervon abweichend mindestens drei *wells* für jede eingestellte Proteinkonzentration pipettiert. Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt, damit sie im linearen Messbereich der Proteinstandardreihe lagen.

3.2.4.9 Colony Forming Assay (CFA) von primären Keratinozyten

In einer Kollagen-beschichteten 6-*well* Platte (BioCoat, BD Biosciences) wurden 4×10^3 Keratinozyten pro well in 1,5 ml Kulturmedium ausgesät. Hierzu wurden 1/6 einer mit Mitomycin C abgetöteten Fibroblasten, konfluent bewachsenen 10 cm Kulturschale, in 1 ml Kulturmedium pipettiert. Dies wurde sowohl für die Kontrolle als auch für die ADAM10-defizienten Keratinozyten im Triplikate durchgeführt. Die Zellen wurden unter regelmäßigem Fibroblastenwechsel (2x wöchentlich) zwei Wochen lang gemäß den unter 3.2.4.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Danach wurden die Fibroblasten sorgfältig abgewaschen und die Zellen 15 min lang mit 1% PFA/PBS fixiert. Das PFA wurde abgesaugt und die 6-*well* Platte zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation der 6-*well* Platte mit 1% Kristallviolett für 1h. Nach dieser Inkubationszeit wurde solange mit Wasser gewaschen bis keine Farbe mehr ausgewaschen wurde. Die Platte wurde luftgetrocknet, gescannt und mit ImageJ analysiert.

3.2.4.10 Aufnahme einer Wachstumskurve von murinen Keratinozyten

Auf einer Kollagen-beschichteten 96-*well* Platte (BioCoat, BD Biosciences) wurden von jeder Maus pro well 5000 Keratinozyten ohne Feederzellen ausgesät. Dies erfolgte auf sieben 96-*well* Platten und für jede Keratinozytenlinie mindestens als Dreifachmessung. Im Abstand von 24 h wurde dann jede Platte mit dem CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) gemäß der Produktbeschreibung vermessen.

3.2.4.11 Histologie

Einbettung und Schneiden von Geweben in Paraffin

Die in PFA/PBS fixierten Gewebe wurden in einer ansteigenden Ethanolreihe schrittweise entwässert. Das genaue Protokoll für murine Rückenhaut ist unter 3.2.3.5 zu finden. Danach wurden die Gewebe in vergleichbarer Orientierung in *low melting point* Paraffin eingebettet, über Nacht ausgehärtet, kurz auf -20°C gekühlt und mit dem Mikrotom geschnitten. Für die Epidermis betrug die Schnittdicke 5 µm für alle übrigen Gewebe 7 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Histobond[®], Marienfeld) aufgezogen und ebenfalls über Nacht bei 37°C getrocknet.

Einbettung und Schneiden von Geweben in Einfriermedium

Die präparierten Gewebe wurden ohne Fixierung in vergleichbarer Orientierung in Tissue Freezing Medium eingebettet. Das genaue Protokoll für murine Rückenhaut ist unter 3.2.3.5 zu finden. Sofern die Proben nicht direkt am Kryostaten geschnitten wurden und auf Objektträger (SuperFrost®Plus) aufgezogen wurden, konnten die gefrorenen Blöcke bei -80°C gelagert werden. Die Schnittdicke betrug ebenfalls 5µm für die Epidermis und 7µm für alle übrigen Gewebe.

3.2.4.12 Elektronenmikroskopie von muriner Rückenhaut

Für die Elektronenmikroskopie wurden Ultradünnschnitte aus Rückenhautproben angefertigt und 2 h in Osmiumtetroxid postfixiert. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Zeiss EM900 Mikroskop untersucht. Alle technischen Arbeiten wurden dabei vom Anatomischen Institut Kiel durchgeführt.

3.2.4.13 Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten

Protokoll für Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte wurden wie folgt rehydriert

10 min	Xylol
5 min	100% Isopropanol
5 min	96% EtOH
5 min	70% EtOH
5 min	50% EtOH
Kurz	dest. H ₂ O
5min	PBS

Damit die Schnitte nicht austrocknen und leichter auf dem Objektträger zu erkennen sind, wurden sie mit einem Fettstift (DAKO) umrandet. Danach erfolgte eine 10 min Inkubation mit etwa 30 µl Trypsin/PBS bei 37°C, dreimaliges Waschen mit PBS und das Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit 30 µl Blockierungspuffer für 1 h bei RT. Der Blockierungspuffer wurde abgezogen, durch 30 µl der Primär-

Antikörperlösung ersetzt und entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal 5 min mit PBS gewaschen, bevor sie mit 30 µl der Sekundärantikörperlösung 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert wurden. Es erfolgten drei weitere 10min Waschschrte mit PBS, eine kurze Postfixierung für 10 min in 4% PFA/PBS und das Aufziehen auf den Objektträger mit 30 µl vorgelegtem Gelvatol. Dieses wurde über Nacht im Dunkeln ausgehärtet und konnte dann im Fluoreszenzmikroskop fotografiert werden.

Protokoll für Kryoschnitte

Die Kryoschnitte wurden kurz in PBS(ABC) equilibriert, 10 min bei RT mit 4% PFA/PBS(ABC) fixiert und dann 30 min in Blockierungspuffer bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte entsprechen dem Protokoll für Paraffinschnitte mit den entsprechenden Puffern für Kryoschnitte (3.2.4.13).

3.2.4.14 Immunhistochemie von Gewebeschnitten

H&E Färbung

Für die H&E Färbung konnten entweder deparaffinisierte Schnitte (s. 3.2.4.11) oder postfixierte Kryoschnitte verwendet werden. Die erste Inkubation erfolgte mit Hämatoxylin – sie konnte je nach gewünschter Intensität zwischen 1 und 10 min betragen. Der Objektträger wurde solange mit Leitungswasser gespült bis keine Farbe aus der Probe mehr ausgewaschen wurde. Es erfolgte eine kurze Inkubation in 1%HCl/EtOH und anschließendes Spülen bis eine bläuliche Färbung erreicht wurde. Bei zu intensiver Färbung konnten die letzten beiden Schritte wiederholt werden. Die Objektträger wurden anschließend für 5-30 sec mit Eosin angefärbt und solange mit Leitungswasser gespült bis die rötliche Färbung die gewünschte Intensität aufwies. Danach wurde schrittweise für 20-30 sec in einer ansteigenden Alkoholreihe (75% EtOH, 96% EtOH, 2x Isopropanol, 2x Xylol) dehydriert. Die Schnitte wurden anschließend mit einem wasserfreien Eindeckmedium auf den Objektträger aufgezogen.

Ki67 Färbung

Wie schon im vorherigen Protokoll beschrieben, wurden die Schnitte deparaffiniert, 5min mit PBS gewaschen und für die bessere Antigenerkennung 20 min bei 95° mit *Antigen Retrieval* Puffer (EMS Services) in einem Dampfkochtopf aufgekocht. Die Schnitte mussten mindestens 30 min auskühlen und wurden dann 10 min bei RT mit "Peroxidase Block" von DAKO behandelt. Es wurde erneut mit PBS gewaschen und dann 30 min mit Blockierungspuffer bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte nacheinander 1 h lang mit dem primären Ki67 Antikörper, einem anti-Ratten-Biotin sowie einem anti-Ratten Streptavidin-HRP Antikörper bei RT inkubiert. Zwischen allen Antikörper-Inkubationsschritten wurde dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Umsetzung des DAB, welches nach Herstellerangaben vorbereitet wurde und durch Spülen mit destilliertem Wasser nach Erreichen der gewünschten Intensität gestoppt werden konnte. Für eine bessere Übersicht wurde eine H&E Gegenfärbung durchgeführt (3.2.4.11).

Nile Red Färbung

Für diese Färbung wurden ausschließlich Kryoschnitte verwendet. Diese wurden kurz in PBS equilibriert und dann wenige Minuten mit der Nile Red Färbelösung bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal 5 min mit PBS gewaschen, im letzten Waschschritt wurde dabei DAPI (1:1000) zugegeben. Die Deckgläser wurden mit 30 µl Eindeckmedium auf die Objektträger aufgezogen und über Nacht im Dunkeln getrocknet.

3.2.4.15 Serologie

Hämatokritmessung

Vollblut wurde mit Hilfe einer heparinisierten Hämatokrit-Kapillare gewonnen. Ein Ende der Kapillare wurde mit Knetgummi verschlossen und 10 min bei 13000 rpm in einer Hämatokrit-Zentrifuge zentrifugiert. Der Anteil des Hämatokrits konnte dann mit einem Lineal vermessen und als Anteil am Gesamtblut dargestellt werden.

EDTA-Blut und Knochenmarksausstriche

5-15 μ l EDTA-Blut oder 20-30 μ l Zellsuspension der mit PBS ausgespülten Femora und Tibiae einer Maus wurden mit sanftem Druck zwischen zwei Objektträgern verrieben und luftgetrocknet. Zur weiteren Analyse wurden die Ausstriche mit der Giemsa-Methode angefärbt und mikroskopisch beurteilt.

4 Ergebnisse

4.1 Konditionaler Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis

Für die Funktionsanalyse der Zink-Metalloprotease ADAM10 in der murinen Epidermis war es zunächst die Aufgabe, einen konditionalen Knockout von ADAM10 zu erreichen, der ausschließlich oder primär in der Epidermis stattfindet. Hierfür wurde, wie unter 1.1 beschrieben, das bereits häufig verwendete Cre/Lox Mutagenese System für transgene Mäuse genutzt. Während ADAM10 das gefloxtete Gen darstellt, wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Keratin 14 Promotors exprimiert, der ausschließlich in der Basalschicht der Epidermis, also per Definition von verhorntem Plattenepithelien der Maus exprimiert wird. Die nun folgenden Kapitel enthalten eine umfassende Analyse dieser konditionalen Knockout Mäuse. Da es im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht möglich war Inzuchtstämme durch gezielte Rückkreuzungen auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund zu erzeugen, wurden für alle (sofern nicht anders angegeben) beschriebenen Experimente mit den konditionalen ADAM10 Knockout Mäusen die jeweiligen Wurfgeschwister als Kontrolltiere verwendet. Einzelne der durchgeführten Experimente wurde in Kooperation mit dem ZMMK Köln (Ag Niessen), dem anatomischen Institut Kiel (Prof. Lüllmann) und des pathologischen Instituts des UK-SH Kiel (PD. Dr. Klapper) durchgeführt und werden im folgenden Text gekennzeichnet.

4.1.1 Genotypisierung

Für die eindeutige Identifizierung aller gezüchteten und für Experimente verwendeten Mäuse erfolgen die Ohrlochmarkierung (3.2.3.6) und die PCR-basierten Genotypisierungsreaktion aus genomischer DNA von Schwanzbiopsien der Mäuse (3.2.3.12) im Alter von drei Wochen. Zur Generierung der ADAM10^{flox/flox} Maus standen zu Beginn dieser Arbeit zwei chimäre Männchen aus der ersten erfolgreichen Blastozysteninjektion zur Verfügung, die dann gemäß 3.2.3.13 mit einem C57B6J-Weibchen gekreuzt

wurden. Die hieraus resultierende F₁-Generation wurde auf eine Keimbahntransmission des geflochten Exon 2 von ADAM10, sowie der Anwesenheit der Hygromyzinkassette überprüft.

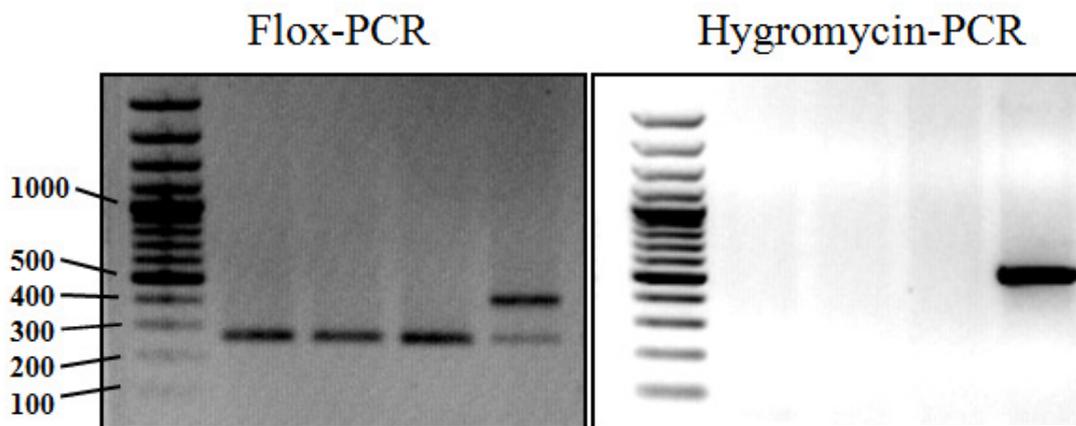


Bild 4.1: Genotypisierungs-PCR zur Detektion der Keimbahntransmission des mutierten Genlokus des Exon 2 von ADAM10

500 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurden für die Flox- und die Cre-PCR (3.2.1.5) eingesetzt, anschließend mit 6xDNA Ladebuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 2% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Bei der Flox-PCR zeigt die 420 Bp große Bande das geflochte Exon 2, die 262 Bp Bande das Wildtypallel an. Das Hygromycin-Transgen wurde durch eine 500 Bp große Bande detektiert.

Die Genotypisierungs-PCR (Bild 4.1) zeigte durch Vergleich mit dem mitgeführten Größenmarker, sowie der Positivkontrolle, dass in einem der beiden Würfe eine Keimbahntransmission stattgefunden hat, da neben der Wildtypbande bei 262 Bp noch eine weitere Bande bei 420 Bp sichtbar ist, die auf eine Insertation der loxP-Seite in die Intronsequenz 3' vom Exon 2 des ADAM10 Gens zurückzuführen ist. Die Probe der heterozygot geflochten Maus zeigte dementsprechend auch eine Bande bei der Genotypisierung auf die wirtsfremde DNA-Sequenz der Hygromycin-Resistenzkassette. In einem weiteren Verpaarungsschritt konnten die ersten homozygoten Nachkommen erhalten werden (Bild 4.2 A). Sie waren phänotypisch unauffällig und hatten eine Lebensdauer, die ihren Wildtypgeschwistern entsprach (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde die erste transgene Cre-Rekombinase Maus in die ADAM10^{flox/flox}-Linie eingekreuzt (Bild 4.2 B).

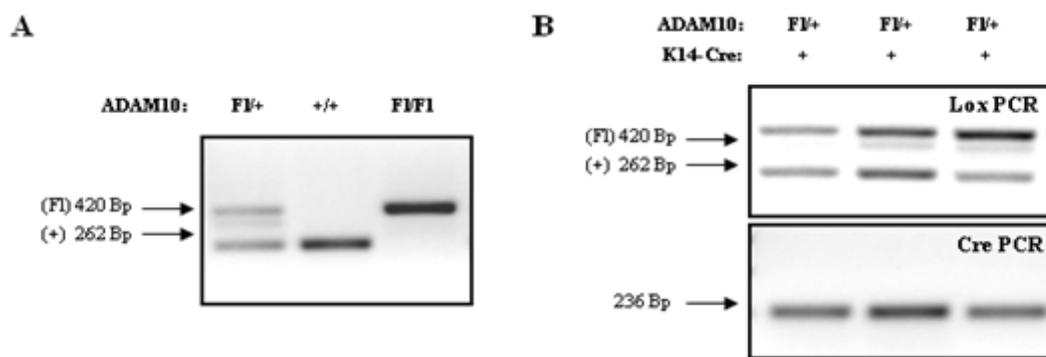


Bild 4.2: Genotypisierungs-PCR für die Zucht konditionaler ADAM10 Knockout Mäuse

500 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurden für die Flox (F)I- und die Cre-PCR (3.2.1.5) eingesetzt, anschließend mit 6xDNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 2% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Bei der Flox-PCR zeigt die 420 Bp große Bande das gefloxtete Exon 2, die 262 Bp Bande das Wildtypallel an. Das Cre Transgen wurde durch eine 236 Bp große Bande detektiert.

Da es sich um Mäuse mit einer homozygoten Insertion der Cre-Rekombinase handelte, waren alle Nachkommen wie erwartet heterozygot - sowohl für das gefloxtete ADAM10 Allel, als auch für die Cre-Rekombinase. Für den nächsten Verpaarungsschritt sollten die Genotypen von Männchen und Weibchen so gewählt werden, dass ein möglichst großer Prozentsatz der Nachkommen homozygot für das gefloxtete ADAM10 Allel - $ADAM10^{flox/flox}$ - und zeitgleich positiv für die Cre-Rekombinase - $K14-Cre^{+/-}$ - ist. Weiterhin sollte die Expressionsstärke der Cre-Rekombinase in allen Nachkommen möglichst ähnlich sein und es wurden daher ausschließlich Mäuse mit einer heterozygoten Insertion der Cre-Rekombinase gezüchtet. Nach der klassischen Mendelschen Vererbungslehre mussten hierfür eine $ADAM10^{flox/flox}$ mit einer $ADAM10^{flox/+}$ $K14-Cre^{+/-}$ -Maus gekreuzt werden. Dies ergibt im statistischen Mittel einen Prozentsatz von 37,5% für den $ADAM10^{flox/flox}$ $K14-Cre^{+/-}$ -Genotyp (ab hier auch als $ADAM10^{Epi^{-/-}}$ bezeichnet).

In einer vorangegangenen Publikation (Hafner et al., 2004) konnte zudem gezeigt werden, dass der Keratin 14 Promotor auch bei der Reifung der Oozyte aktiv sein kann. Daher wurden für alle in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stets weibliche Tiere mit dem $ADAM10^{flox/flox}$ -Genotyp und Männchen mit dem $ADAM10^{flox/+}$ $K14-Cre^{+/-}$ -Genotyp verwendet. Als nach etwa 50 Nachkommen jedoch keine einzige drei Wochen alte Maus mit dem $ADAM10^{flox/flox}$ $K14-Cre^{+/-}$ -Genotyp gefunden werden konnte, zeigte eine ständige Beobachtung der Wurfgrößen nach der Geburt, eine ungewöhnlich hohe Sterberate innerhalb der ersten 24 h (P0). Daraufhin wurden die Nachkommen unmittel-

bar nach ihrer Geburt von dem Muttertier entfernt, genotypisiert und für die weiteren Analysen verwendet.

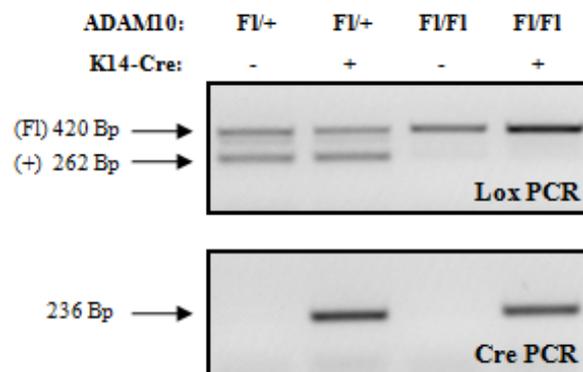


Bild 4.3: Genotypisierungs-PCR zur Identifikation epidermaler ADAM10 Knockout Mäuse

500 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurden für die Flox (FI)- und die Cre-PCR (3.2.1.5) eingesetzt, anschließend mit 6xDNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 2% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Bei der Flox-PCR zeigt die 420 Bp große Bande das gefloxt Exon 2, die 262 Bp Bande das Wildtypallel an. Das Cre Transgen wurde durch eine 236 Bp große Bande detektiert.

Bild 4.3 zeigt, dass nun alle theoretisch möglichen Genotypen auch tatsächlich in einem einzigen Wurf gefunden werden konnten.

4.1.2 Verifizierung des epidermalen Knockouts von ADAM10

Auch wenn die Ergebnisse der Genotypisierungen schon gezeigt haben, dass die ADAM10^{Epi/-}-Mäuse aus bis dato ungeklärten Gründen sehr viel früher sterben als ihre Wurfgeschwister, ist mit Hilfe verschiedener Methoden zu zeigen, dass die Ursache hierfür ein tatsächlich erfolgter Knockout von ADAM10 in der Epidermis und nicht nur das Ergebnis einer Beeinflussung benachbarter Gene durch die genetische Modifikation in einem gemeinsamen Genlocus darstellt.

4.1.2.1 Genomische Deletion

Für die Verifizierung des erfolgreichen Ausschneidens einer genomischen DNA-Sequenz, kann bei Kenntnis der genauen Sequenz eine PCR mit genomischer DNA und sequenzspezifischen Primern, die außerhalb der deletierten Sequenz liegen, durchgeführt werden. Da die Rekombination und die damit verbundene Deletion der Gensequenz im ADAM10-Gen ein irreversibler Vorgang ist, kann mit dieser Methode sehr verläss-

lich gezeigt werden, dass das Cre/Lox System fehlerfrei funktioniert. Im Gegensatz zu den Genotypisierungen, die unter 4.1.1 beschrieben sind, kommt es nur in denjenigen Geweben zu einer Deletion, in denen auch der Cre-Rekombinase Promotor aktiv ist. Daher wurden für den folgenden Versuche Epidermisisolate aus epidermalen Splits der Gesamthaut von P0-Mäusen verwendet. Die Größe des deletierten Fragments ist aus der dieser Arbeit vorangegangenen Klonierung für den elektroporierten Zielvektor bekannt und beträgt einschließlich des 2. Exons von ADAM10, der Hygromylin-Resistenzkassette sowie benachbarter intronischer Sequenzen etwa 1,3 Kb.



Bild 4.4: PCR und RT-PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon2 von ADAM10

500 ng genomische (A) oder cDNA (B) aus epidermalem Gewebe wurde durch epidermale Splits gewonnen und für die ADAM10 Exon2-Deletions-PCR (A) bzw. die ADAM10 RT-PCR eingesetzt, anschließend mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 1% (A) bzw. 2% (B) Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

Bild 4.4 A zeigt, dass sowohl in den $ADAM10^{flox/+}$ $K14-Cre^{+/-}$ -Mäusen – hier jedoch nur auf einem Allel - als auch in den $ADAM10^{flox/flox}$ $K14-Cre^{+/-}$ -Mäusen eine Deletion auf genomischer Ebene stattgefunden hat. Die Deletion der genomischen Sequenz entspricht dabei einer erwarteten Größe von 1,3 Kb. Alternativ konnte die Effizienz der genomischen Deletion auch durch die RT-PCR Analyse der ADAM10 Genexpression verifiziert werden (Bild 4.4 B). Hierbei wurden die Primer zur Detektion eines 118bp großen Fragmentes innerhalb des 2. Exon der ADAM10-Sequenz entworfen. In der Epidermis der konditionalen Knockouts konnte eine vollständige Reduktion des ADAM10 Transkriptes nachgewiesen werden.

4.1.2.2 Generation und Charakterisierung eines polyklonalen Serums gegen murines ADAM10

Für die einwandfreie Detektion des murinen ADAM10 in Anwendungen wie Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie sollte ein polyklonales Serum aus Peptid-immunisierten Kaninchen erhalten werden. Hierfür wurde die Firma Pineda

(Berlin) beauftragt. Sie führte die Synthese des Peptids, die Haltung und Immunisierung von zwei Kaninchen, sowie die Blutentnahmen und die Aufreinigung der finalen Blutung an einer Immunisierungspeptid-gekoppelten Säule durch. Die Auswahl der Kaninchen, der Immunisierungspeptide, die Art der Kopplung (KLH-Protein) und auch die Testung, der im Abstand von 30 Tagen zugeschickten Kaninchenseren nach Immunisierung, wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Testung erfolgte an zuvor isolierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) der klassischen ADAM10 Knock-out Mäuse. Als zusätzliche Kontrolle wurden die ADAM10 $-/-$ MEFs mit einer murinen ADAM10 cDNA transfiziert.

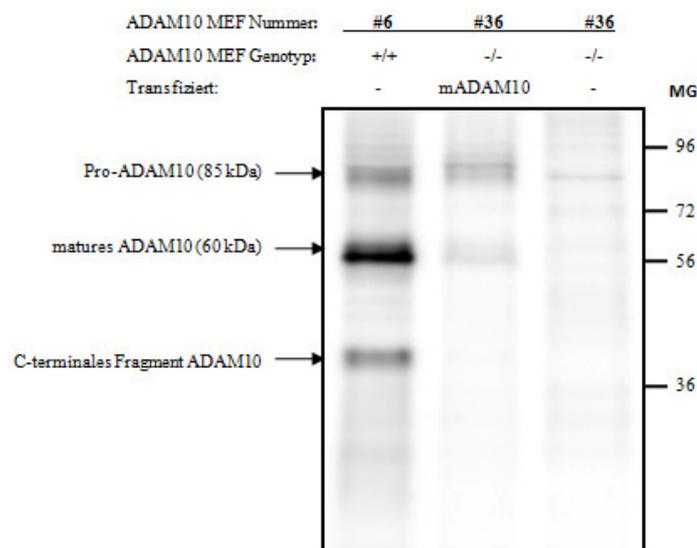


Bild 4.5: Testung des anti-murinen ADAM10 Antikörper (Pineda) an murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

ADAM10 $-/-$ und ADAM10 $+/+$ MEFs wurden mit ADAM10 Lysispuffer homogenisiert, die extrahierten Proteine (20 μ g je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit der monospezifischen IgG Fraktion gegen ADAM10 – Pin1 - (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1 h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert und mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Dieser Blot ist ein repräsentatives Beispiel von $n=3$ durchgeführten Experimenten.

Die Proteinexpressionsanalyse zeigt, dass der generierte Antikörper Pin1 sowohl die Pro-Form von ADAM10 (85 kDa) als auch die mature Form (60 kDa) in den ADAM10 $+/+$ MEFs und den ADAM10 retransfizierten ADAM10 $-/-$ MEFs erkennt, während in den ADAM10 $-/-$ MEFs keine Banden detektiert wurden. Bei etwa 40 kDa konnte in den ADAM10 $+/+$ zudem noch eine zusätzliche Bande detektiert werden, die weder in den

ADAM10^{-/-}, noch bei den retransfizierten ADAM10^{-/-} MEFs erkennbar war. Die Herkunft dieser Bande wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.1.2.3 Proteinexpressionsanalyse

Das gewünschte Ziel der genomischen Deletion stellt auch eine hieraus resultierende Nicht-Expression oder Fehlfunktion des translatierten Proteins dar. Sofern die genomische Deletion bzw. Mutation nicht durch das Einbringen eines künstlichen Transkriptionsstopps (Poly A-Schwanz) die Transkription der DNA in mRNA unmöglich macht, kann auch nach der genomischen Deletionen noch eine funktionsfähige und stabile mRNA transkribiert werden. Diese kann ebenfalls abgelesen und ein verkürztes Protein synthetisiert werden. Daher war die Proteinexpressionsanalyse von ADAM10 in der Epidermis ein entscheidendes Experiment zur Interpretation der beobachteten Phänotypen. Mit Hilfe des unter 4.1.2.2 beschriebenen Antikörpers wurden Lysate von epidermalen Splits auf die Expression von ADAM10 untersucht.

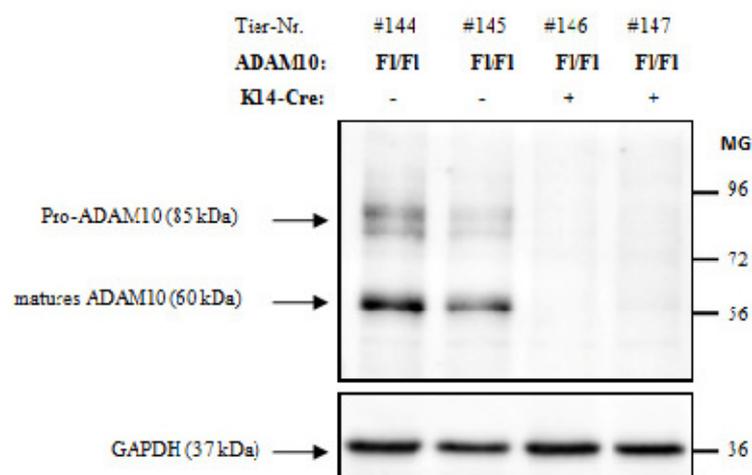


Bild 4.6: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM10 aus epidermalem Gewebe

Epidermales Gewebe wurde mit Hilfe von epidermalen Splits gewonnen, mit NP-40 Lysispuffer homogenisiert und die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen Serum B42.1 gegen ADAM10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (1:1000) und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert. Beide Teile des Blots wurden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Dieser Blot ist ein repräsentatives Beispiel von n=5 durchgeführten Experimenten.

Anhand des Vergleichs der beiden Kontrolltiere (#144, #145) mit den konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse (#146, #147), sowie der Beladungskontrolle (anti-GAPDH), kann festgestellt werden, dass ADAM10 nicht mehr in der Epidermis exprimiert wird. Neben dem Erfolg des Knockouts lässt sich zudem zeigen, dass das Cre/Lox System in nahezu allen Zellen der Epidermis funktioniert und es nicht zu einer mosaikartigen Deletion im Gewebe, wie z.B. bei dem epidermalen *Msx*-Cre Promotor (Demehri et al. 2008) kommt. Wurde der Immunoblot wesentlich länger belichtet ist eine schwache Bande auch in den ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse zu sehen. Dies lässt sich auf die Einwanderung von Zellen mit einem abweichenden morphogenetischen Ursprung (Melanozyten, Immunzellen) erklären.

Alle eingesetzten Methoden, um den konditionalen Knockout von ADAM10 in der Epidermis zu verifizieren, zeigten eine eindeutigen Deletion des Proteins. Somit eignet sich das angewendete System zur Untersuchung der Funktion der Zink-Metalloprotease ADAM10 bei der embryonalen Entwicklung von muriner Epidermis.

4.1.3 Beschreibung des epidermalen Phänotyps

Bei der Analyse der molekularen Funktion von ADAM10 in der Entwicklung der murinen Epidermis, ist eine ausführliche Deskription von möglichen Unterschieden der ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse und den entsprechenden Kontrollen die Grundlage weiterer Experimente. Die Reihenfolge der Deskription wird dabei von makroskopischer zu mikroskopischer Betrachtung durchgeführt und mit Hilfe der hierbei verfügbaren Zell- und immunbiologischen, sowie biochemischen Techniken qualifiziert und quantifiziert.

4.1.3.1 Vitalität

Die Untersuchung der Vitalität der ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse zeigt die Bedeutung des Proteins für die Entwicklung und den akuten Gesundheitsstatus der gesamten Maus. Obwohl eine eingeschränkte Vitalität nicht zwangsweise primär einem durch Deletion des Proteins ausbleibenden oder fehlregulierten biochemischen Prozesse zugeordnet werden kann, sondern oft auch eine sekundäre oder tertiäre Reaktion auf Veränderungen im betreffenden Gewebe darstellt, kann hiermit eine Aussage über mögliche Redundanzen verwandter Proteine oder auch zeitspezifischer Aktionsmuster des untersuchten Proteins getroffen werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die

Verteilung aller aus den Verpaarungen möglichen Genotypen zu den Zeitpunkten des Absatzes von der Mutter (P21) und kurz nach der Geburt (P0) bestimmt.

Tabelle 4.1: Verteilung der Genotypen der epidermalen Knockout Mäuse und Kontrollen an P0 und P21.

Genotyp	ADAM10 flox/+, Cre negativ	ADAM10 flox/+, Cre positiv	ADAM10 flox/flox Cre negativ	ADAM10 flox/flox Cre positiv
Statistischer Wert in %	12,5	12,5	37,5	37,5
P0 (250 Tiere)	18,7	20,7	30,4	30,2
P21 (153 Tiere)	20,0	28,8	50,6	0,6

Wie schon unter 4.1.1 erwähnt, konnten nach Absatz der ersten 50 Mäuse keine ADAM10^{Epi/-/-}-Maus gefunden werden. Die genotypisierten Mäuse wiesen jedoch kurz nach der Geburt in etwa die statistisch erwartete Verteilung aller Genotypen auf. Im Verlaufe der weiteren Zucht erfolgte dabei die Trennung von Erhaltungszucht und der Zucht zur Analyse der Jungtiere. Im Rahmen der Erhaltungszucht wurden etwa 250 Tiere geboren und hiervon überlebten knapp 3% länger als einen Tag. Sofern nicht anders angegeben, wurden hiervon lediglich eine homogene Gruppe mit einem Alter von 18 Tagen (P18) untersucht. Sie werden in den folgenden Kapiteln als ADAM10^{Epi/-/-} (P18)-Mäuse gekennzeichnet. Mit diesen Mäusen konnten aufgrund der begrenzten Zahl und der Variabilität des untersuchten Alters jedoch nicht alle Experimente durchgeführt werden, die mit den P0 Mäusen gezeigt werden.

Die biochemische Funktion der Zink-Metalloprotease ADAM10 in der Epidermis ist dementsprechend nicht vollständig durch andere Proteine kompensierbar und ihr Knockout führt in der Regel unmittelbar nach der Geburt zum Tod der Mäuse. Die wenigen überlebenden Tiere erreichen in keinem Fall ein fortpflanzungsfähiges Alter.

4.1.3.2 Allgemeine Morphologie

Zur Deskription der allgemeinen Morphologie der Mäuse gehören u.a. Gewicht, Größe, Haut- und Haarbeschaffenheit, die Proportionen der einzelnen Körpersegmente zueinander, sowie die Erscheinung der inneren Organe. Sie dienen einer Beurteilung des

Entwicklungsstandes der Maus im untersuchten Alter und geben erste Hinweise auf pathologische Zustände des Tieres. Es wurden hierfür Mäuse des Alters Embryonaltag E17.5, P0 und P18 verwendet.

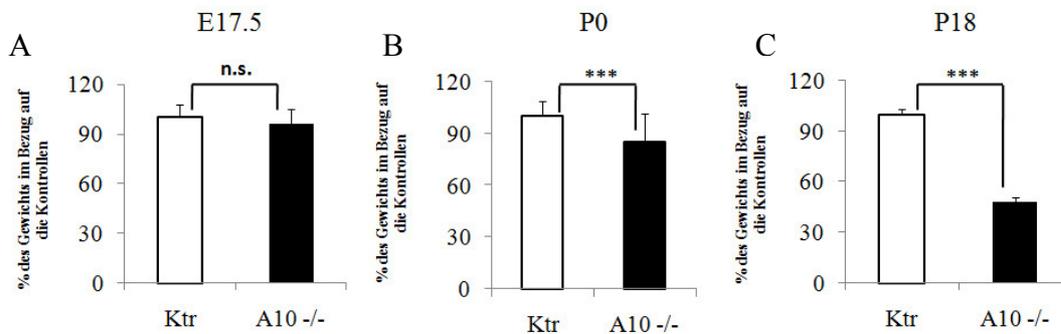


Bild 4.7: Gewichtsanalyse von prä-, peri und postnatalen ADAM10^{lox/flox} K14-Cre Mäusen und Kontrollen

Zu den angegebenen Altersstadien wurden alle Tiere eines Wurfes gewogen und genotypisiert. Alle Tiere die nicht als konditionale Knockouts (A10^{-/-}) identifiziert wurden, wurden als Kontrolle (Ktr) zusammengefasst. Der Mittelwert ihres Gewichtes wurde als 100% gesetzt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert aller untersuchten Würfe an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0.01, ** p<0,001, *** p<0,0001.

Das Bild 4.7 zeigt den Gewichtsunterschied von ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen und ihren Kontrollen. Während sich für die E17.5 Embryos (A) noch kein signifikanter Unterschied feststellen ließ, zeigten die P0 Mäuse (B) eine etwa 15% und die P18 Mäuse (C) ein bis zu 50% geringeres Körpergewicht als die Kontrollen. Neben dem Gewichtsunterschied weisen die P0 und die P18 Tiere auch einen signifikanten Größenunterschied auf (Bild 4.8).

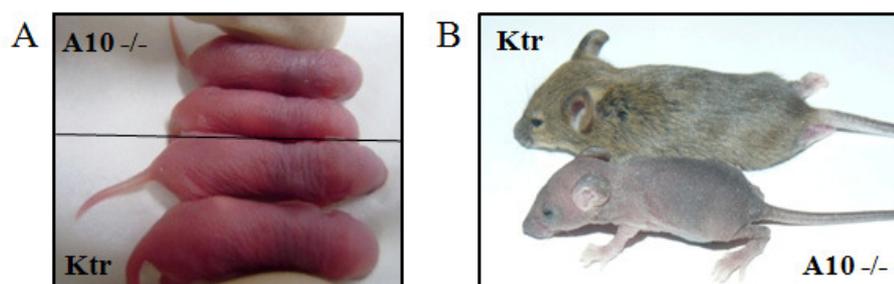


Bild 4.8: Größenvergleich und allgemeine Morphologie

ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (A10^{-/-}) und Kontrolltieren (Ktr) wurden im Alter von P0 (A) und P18 (B) fotografiert. Zu beiden Zeitpunkten lassen sich signifikante Größenunterschiede erkennen, die an P18 wesentlich stärker ausfallen. Auf beiden Bildern werden ausschließlich Wurfgeschwister miteinander verglichen, die für Bild A aus n>30 Würfen und für Bild B aus n=7 Würfen ausgewählt wurden. Die ADAM10^{Epi-/-} (alt)-Mäuse sind im Gegensatz zu ihren Wurfgeschwistern völlig nackt.

Während Bild 4.8 B schon eindeutig zeigt, dass neben der Größe auch leicht sichtbare Unterschiede in der Charakteristik von Haut- und Haarbeschaffenheit bei den $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18)-Mäusen vorliegen, wurden Unterschiede zwischen den $ADAM10^{Epi-/-}$ (P0)-Mäusen und den entsprechenden Kontrollen erst bei näherer Betrachtung deutlich (Bild 4.9 A, B und B').

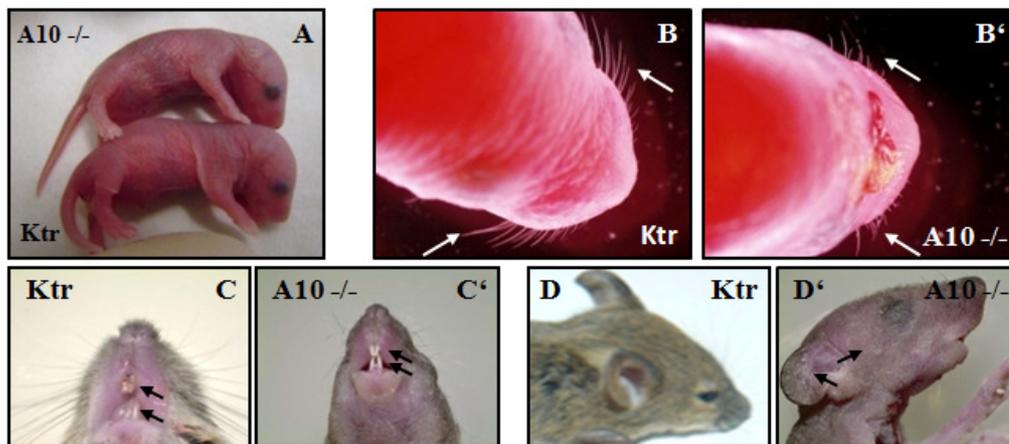


Bild 4.9: Makroskopische Detailaufnahmen der konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse und Kontrolltiere.

(A) zeigt die optischen Unterschiede der Haut neugeborener $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse (A10-/-) und ihrer entsprechenden Kontrolltiere (Ktr). Der Vergleich von Bild 4.9 (B) und (B') zeigt die Morphologie der Vibrissae von P0 Mäusen (weiße Pfeile). (C) und (C') weisen auf Unterschiede in der Morphologie der vorderen Schneidezähne (weiße Pfeile) und den Vibrissae von $ADAM10^{Epi-/-}$ (alt)-Mäusen (P18) ($ADAM10^{-/-}$) und entsprechenden Kontrollen (Ktr) hin (schwarze Pfeile). Anhand der Bilder (D) und (D') ist zu sehen, dass die Augen der $ADAM10^{Epi-/-}$ (alt)-Mäuse (P18) im Gegensatz zu dem Kontrolltier geschlossen und die Haut Stellen von Hyperkeratinisierung aufweist (schwarze Pfeile). Die Aufnahmen (B) und (B') wurden am Binokular mit einer 1,3 fachen Vergrößerung, alle anderen als Nahaufnahme mit einer Digital-Fotokamera aufgenommen.

Die $ADAM10^{Epi-/-}$ (P0)-Mäuse haben im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine durchscheinende, leicht glänzende Haut (Bild 4.9 A) die bei Berührung sehr gespannt und mechanisch instabil wirkt. Ihre Vibrissae waren sehr vereinzelt, stark verkürzt und besaßen keine gleichmäßige Orientierung (Bild 4.9 B). Für die $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18)-Mäuse konnten eine fehlende Körperbehaarung, unregelmäßigen Vibrissae, eine anormale Zahnbeschaffenheit, (schwarze Pfeile in Bild 4.9 C, C') sowie Stellen ausgeprägter Hyperkeratinisierung (schwarze Pfeile Bild 4.9 D, D') beobachtet werden. Die $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18) wiesen im Gegensatz zu ihren Wurfgeschwistern ein extrem apathisches und desorientiertes Verhalten auf. Sie zittern oft am ganzen Körper und atmen langsam und stoßweise. Im Gegensatz zu den Kontrollen bleiben die Augenlider bis P18 geschlossen. Ein Vergleich ihrer inneren Organe zeigte zudem morphologische Auffälligkeiten für die Milz und den Thymus (Bild 4.10).

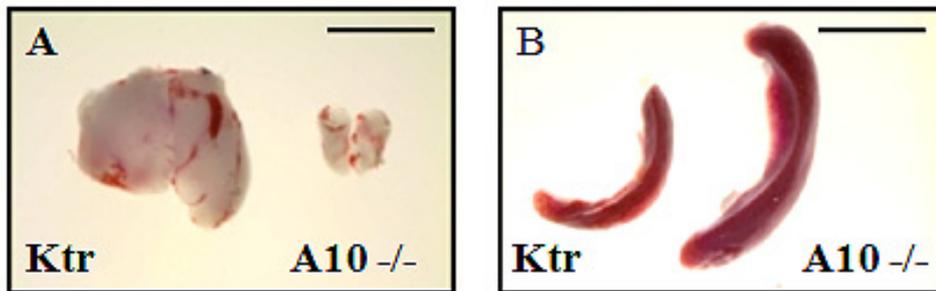


Bild 4.10: Makroskopische Aufnahme von Thymus (A) und Milz (B) mit dem Binokular

Thymus (A) und Milz (B) von $ADAM10^{Epi-/-}$ (alt)-Mäusen (P18) ($A10^{-/-}$) und Kontrollen (Ktr) wurden präpariert und mit einer 0,66 fachen Vergrößerung am Binokular fotografiert. Es handelt sich um ein repräsentatives Bild von $n > 5$ präparierten Mäusen. Der Messbalken in beiden Bildern entspricht einer Länge von 10 mm.

Während bei allen untersuchten $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18)-Mäusen ($n=7$) eine starke Thymusatrophie vorlag, konnte auch in sechs von sieben Tieren eine ausgeprägte Splenomegalie festgestellt werden. Alle anderen Organe zeigten keine sichtbaren Deformationen oder Größenunterschiede.

Die Deletion von ADAM10 in der murinen Epidermis zeigt weitreichende Auswirkungen, die sich neben den Gewebe-autonomen Auffälligkeiten bezüglich Haut und Fell auch in Form einer systemische Beeinträchtigung des Gesamtgewicht und der Gesamtgröße der inneren Organe Milz und Thymus darstellen.

4.1.3.3 Untersuchung der Hautbarriere

Die zentrale Aufgabe der murinen Haut ist die Barrierefunktion zum Schutz vor unkontrolliertem Eindringen von toxischen Substanzen oder Mikroben, sowie einem unkontrollierten Wasserverlust. Die Überprüfung dieser Barrierefunktion zeigt, ob die Integrität der Haut vollständig gewährleistet ist und kann gegebenenfalls die Ursachen für eine pathologische Situation der Haut eingrenzen. Da die $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse einen signifikanten Gewichtsunterschied aufweisen, der sich in der Größenordnung nicht allein auf den Größenunterschied zurückführen lässt, wurden zunächst Experimente zur Untersuchung der sogenannten *Inside-Out* Barriere durchgeführt. Dabei wurden der transepidermale Wasserverlust mit Hilfe eines TEWA meters (Bild 4.11 A), der Hämatokritanteil von Heparin-Blut durch Zentrifugation (Bild 4.11 B) und der zeitabhängige Gewichtsverlust bei Inkubation der P0-Tiere in einer 37°C warmen und trockenen Umgebung bestimmt (Bild 4.12).

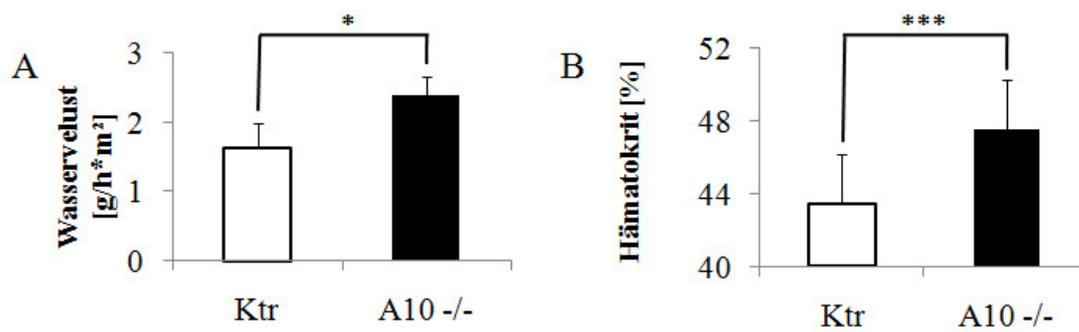


Bild 4.11: Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes und des Hämatokritgehalts von P0 Mäusen

(A) Der transepidermale Wasserverlust von jeweils n=4 ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (A10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) wurde kurz nach der Geburt mit Hilfe eines TEWAmeters vermessen. Der speziell für kleine Mäuse angefertigte Detektionsfühler (Courage und Khazaka) wurde am unteren Bauch der Mäuse aufgesetzt und die Messung solange durchgeführt bis mindestens 30 Sekunden lang ein konstanter Wert detektiert werden konnte. Die statistische Signifikanz für beiden Experimente wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0.05 (B) P0 Tiere wurden dekapitiert und das Blut mit einer Na-Heparin beschichteten Hämatokritkapillare aufgefangen. Die Kapillaren wurden 10 min bei 13000 rpm in einer Hämatokritzentrifuge zentrifugiert und der Hämatokritgehalt mit einem geeigneten Messinstrument bestimmt. Das Diagramm zeigt die Auswertung von n=16 Messungen für die Kontrollen (Ktr) und n=13 für die ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (A10^{-/-}). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0.05, ** p<0,005, *** p<0,0005.

Für die Messungen des transepidermalen Wasserverlustes der ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (A10^{-/-}) wurde ein Mittelwert von 1,6 +/- 0,2 g/h*m², für die Kontrollen ein Mittelwert von 2,2 +/- 0,2 g/h*m² berechnet. Die statistische Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes bei den ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen. Ebenfalls signifikant war der Anstieg des Hämatokritgehalts in den ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (Bild 4.11 B).

Die Messung des Körpergewichtes nach 5h Inkubation bei 37°C ergab für die Kontrollen im Mittelwert einen prozentualen Gewichtsverlust von 9,8 +/- 0,3%, während die ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse einen Gewichtsverlust von 2,2 +/- 0,15% aufwiesen. Bild 4.12 zeigt neben dem prozentualen Gewichtsverlust auch die Dehydrierung des stratum corneums der ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (A10^{-/-}) nach einem Zeitraum von 5h. Nach etwa 5,5h starb eine der ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse an der fortwährenden Dehydrierung, daraufhin wurde dieses Experiment und alle weiteren nach 5h abgebrochen. Die strikte Regulation des Wasserhaushaltes stellt also eine essentielle Lebensgrundlage für neugeborene Mäuse dar.

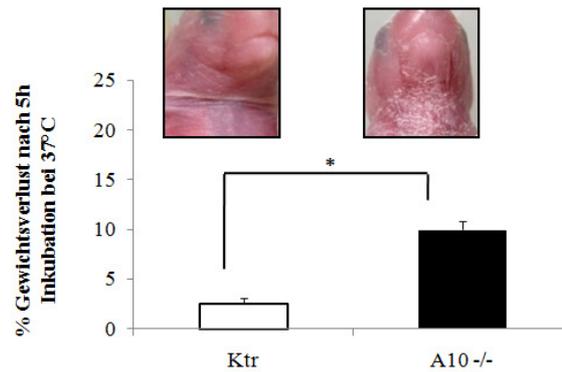


Bild 4.12: Analyse des Gewichtsverlustes von P0-Mäusen bei einer Umgebungstemperatur von 37°C

Alle Tiere eines Wurfes wurden kurz nach der Geburt von der Mutter getrennt und in eine trockene Umgebung mit einer konstanten Temperatur von 37°C gebracht. Das Gewicht der Tiere wurde alle 60 min über einen Zeitraum von 5h ermittelt. Die Gewichtsabnahme wurde als prozentualer Anteil des verlorenen Gewichtes in Bezug auf das Gesamtgewicht ermittelt. Das Experiment zeigt ein repräsentative Ergebnis von zwei durchgeführten Experimente, bei dem n=2 ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäusen (A10^{-/-}) und n=5 Kontrollen (Ktr) gewogen wurden. Die Fehlerbalken wurden aus dem Standardfehler des Mittelwertes errechnet. Die statistische Signifikanz für beiden Experimente wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0.05

Alle durchgeführten Experimente lassen damit auf eine gestörte *Inside-Out* Barriere der epidermalen Knockout Mäuse schließen. Neben der Integrität der *Inside-Out* Barriere ist es ebenfalls wichtig, wenn auch vermutlich nicht unmittelbar lebensnotwendig, die *Outside-In* Barriere intakt zu halten. Diese Barriereentwicklung beginnt ab E16 und ist etwa an E18.5 vollständig abgeschlossen um den Organismus z.B. vor einer mikrobiellen Invasion (Hardmann et al., 1998) zu schützen.

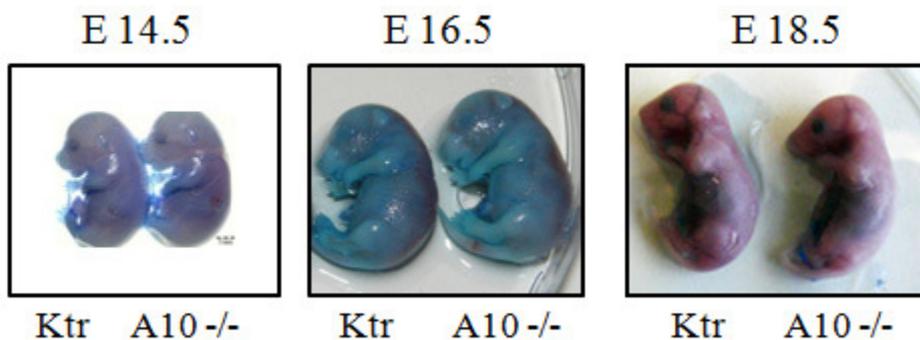


Bild 4.13: Analyse der Integrität der Outside-in Barriere

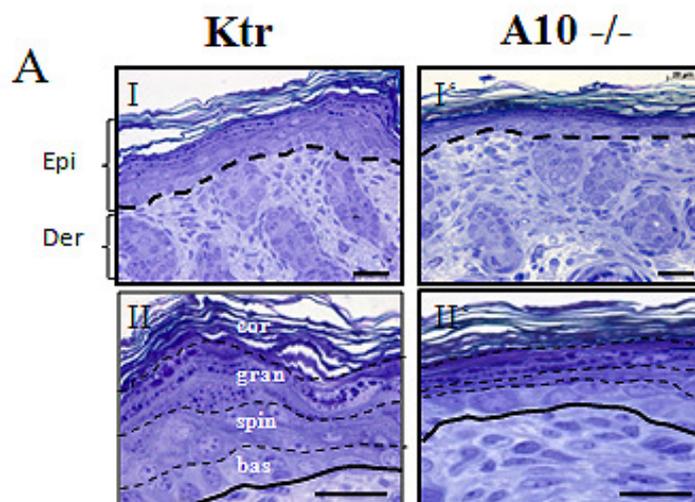
An den angegebenen Embryonaltagen wurden die Embryonen aus terminverpaarten Weibchen präpariert und im Ganzen einer Toluidin-Blau Färbung unterzogen (3.2.3.9). Die Embryos wurden hierfür zunächst schrittweise in ansteigenden Methanolkonzentrationen dehydriert, danach in absteigenden Methanolkonzentrationen wieder rehydriert und in das Toluidin-Färbebad eingelegt. Das Entfärben erfolgte solange in PBS bis keine Farbe mehr ausgewaschen wurde. Die Embryos wurden anschließend fotografiert und genotypisiert.

Die gezeigten Bilder fassen die verschiedenen Stadien der *Outside-In* Barrierebildung zusammen. Während an E14.5 noch die komplette Haut durchlässig für den Farbstoff war, sieht man an E16.5, dass die Rückenhaut nicht mehr angefärbt wurde und an E18.5 war der Farbstoff nur noch an der zuvor durchtrennten Nabelschnur und in geringem Ausmaß in die Pfoten der Mäuse eingedrungen. Grundsätzlich war jedoch in keinem der betrachteten Stadien ein Unterschied zwischen den $ADAM10^{Epi/-}$ -Mäusen oder den Kontrollen zu beobachten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine leichte Barrierestörung der $ADAM10^{Epi/-}$ -Mäuse im Bereich der *Inside-Out* Barriere vorliegt, während die *Outside-In* Barriere in sämtlichen Entwicklungsstadien der murinen Epidermis intakt zu sein scheint. Durch eine Stresssituation, wie eine erhöhte Temperatur, kann der Wasserverlust enorm gesteigert werden und führt letztendlich zum vorzeitigen Tod der $ADAM10^{Epi/-}$ -Mäuse.

4.1.3.4 Histologie

Zur genaueren Charakterisierung der bis jetzt beschriebenen makroskopischen Phänotypen, wurden mit Hilfe von Semi- bis Ultradünnschnitten fixierter Gewebe, geeigneter Anfärbung und Kontrastierung sowie anschließender licht- oder elektronenmikroskopischer Untersuchung, Aussagen über die Architektur der Epidermis getroffen. Dabei können von der Ansicht ganzer Gewebeabschnitte, über Morphologie einzelner Zellen bis hin zur Charakterisierung aller Kompartimente der untersuchten Zellen, vielschichtige Beobachtungen erfolgen.



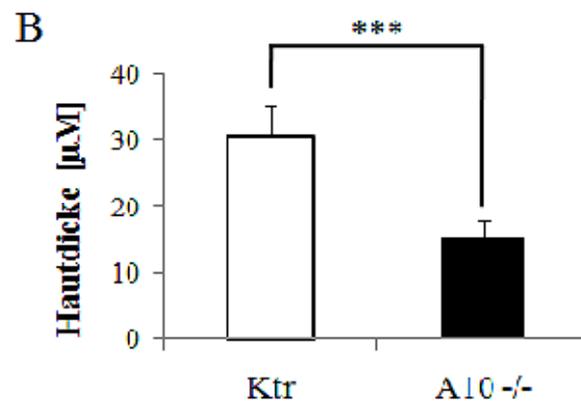


Bild 4.14: Toluidin-Blau Färbung der Rückenhautproben von P0 Mäusen (A) und Quantifizierung der Dicke von Epidermis der Rückenhaut (B)

(A) Rückenhautproben von ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäusen (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5 μm dicke Sektionen geschnitten und mit Toluidin-Blau gemäß des Standardprotokolls angefärbt. (I) und (I') Die gestrichelte Linie deutet die Basalmembran, also den Übergang von Dermis zu Epidermis an. Epi = Epidermis, Der = Dermis. (AII) und (AII') Die durchgehenden schwarze Linie zeigt die Basallamina, die gestrichelten Linien die epidermalen Schichtgrenzen an. cor = *stratum corneum*, gran = *stratum granulosum*, spin = *stratum spinosum*, bas = *stratum basale*. Die Messbalken in (A) und (A'), sowie in (AII) und (AII') entsprechen einer Länge von 20 μm . Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=5 Proben. (B) Es wurden je fünf Messstrecken an repräsentativen Stellen lichtmikroskopischer Aufnahmen von jeweils drei ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäusen (A10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) mit ImageJ ausgewertet. Die Fehlerbalken wurden aus den Standardabweichungen des Mittelwertes berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0.05, ** p<0,005, *** p<0,0005.

Die Übersichtsbilder Bild 4.14 (I) und (I') zeigen im Bezug auf die Lage und die Anzahl der Haarfollikel, sowie auf die erfolgte Differenzierung der epidermalen Schicht in *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* keine nennenswerten Unterschiede. Schon bei dieser Vergrößerung ist jedoch erkennbar, dass die Gesamtdicke der Epidermis (ohne das *stratum corneum*) in den ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse (A10^{-/-}) gegenüber den Kontrollen (Ktr) stark verringert ist. Bild 4.14 (II) und (II') belegen, dass diese Beobachtung am stärksten auf das *Stratum spinosum* der ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse (A10^{-/-}) zutrifft, das in seiner Dicke die stärkste Reduktion gegenüber den Kontrolltieren (Ktr) aufwies. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurden jeweils fünf repräsentative Stellen der Epidermis von drei Mäusen ausgewählt und (ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse und Kontrollen) mit Hilfe der Analyse-Software *ImageJ* vermessen. Die Messungen ergaben einen Mittelwert von 30 +/- 3 μm für die Kontrollen und 14 +/- 2 μm für die ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse (A10^{-/-}). Somit wies die konditionalen Knockout Mäuse eine etwa 50% reduzierte Dicke der Epidermis gegenüber ihren Wurfgeschwistern auf. Da eine korrekte Einteilung und

morphologische Beurteilung der Zellen aus den einzelnen epidermalen Schichten im Lichtmikroskop oft nicht zweifelsfrei möglich war, wurden aus den Semidünnschnitten der in Bild 4.14 gezeigten Proben Ultradünnschnitte angefertigt und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Dabei ging es um folgende Fragestellungen: Ist die epidermale Schicht der ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäuse mit der geringsten Dicke im Vergleich zu den Kontrollen, wie im Lichtmikroskop befundet, das *stratum spinosum*? Ist das *stratum spinosum* in seiner Morphologie verändert, bzw. zeigt es morphologische Charakteristika benachbarter epidermaler Schichten? Wie verhalten sich Quantität und Qualität der Zell-Zell Kontakte (Desmosomen, Hemidesmosomen und Corneodesmosomen).

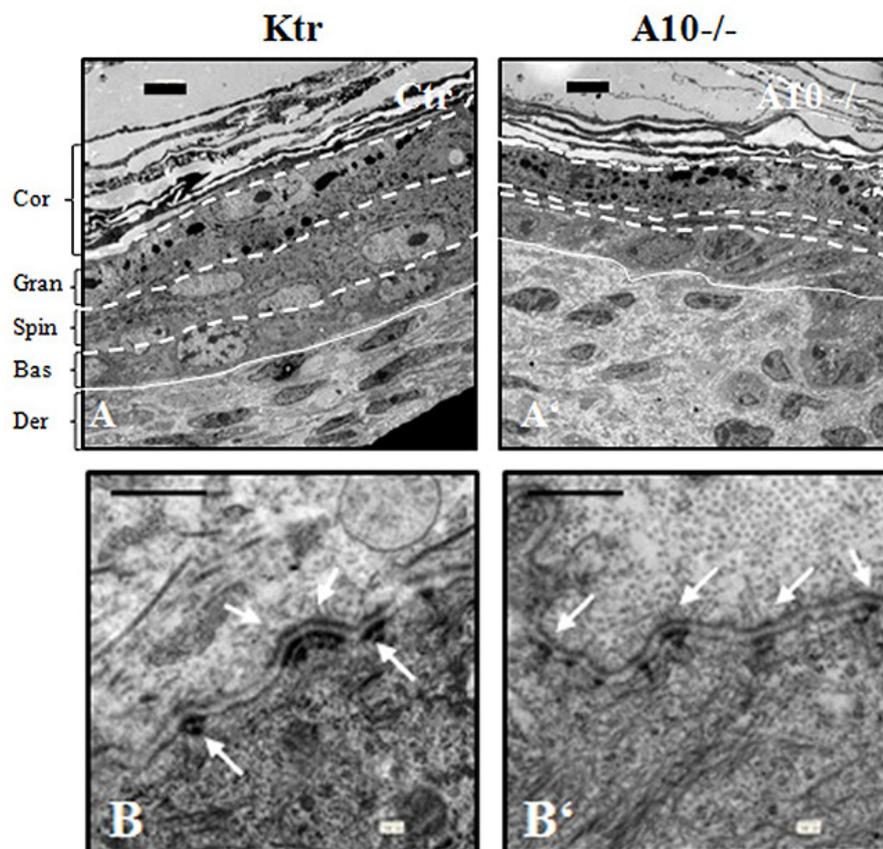
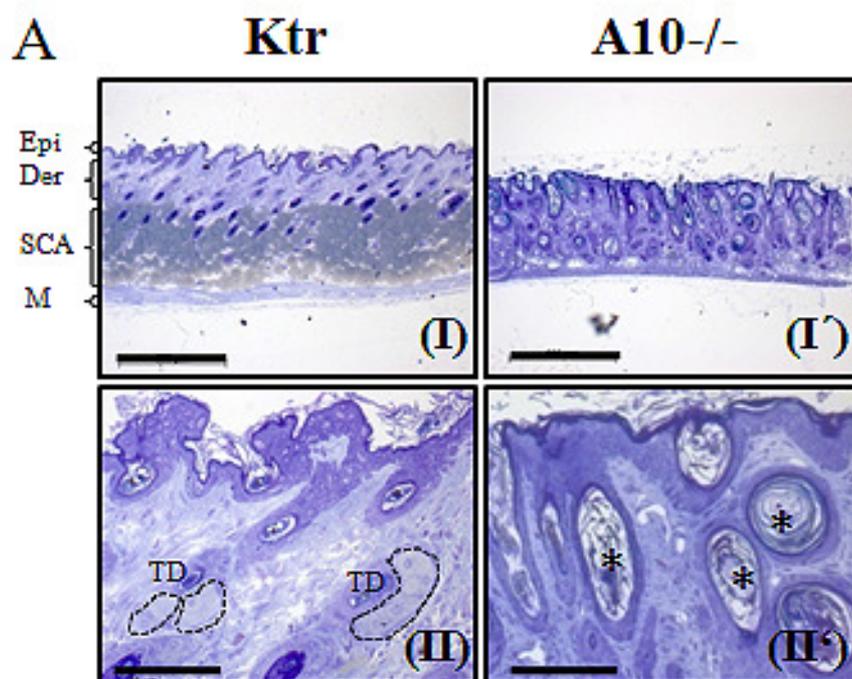


Bild 4.15: Elektronenmikroskopie von Rückenhautproben

Ultradünnschnitte von Rückenhautproben von jeweils drei ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäusen (A10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) wurden gemäß Standardprotokoll (Prof. Lüllmann, Anatomisches Institut Kiel) angefertigt und im Elektronenmikroskop untersucht. (A) und (A') zeigen eine Übersichtsaufnahme der Epidermis. Der Messbalken entspricht einer Länge von 1 μ m. Der = Dermis, Bas = *stratum basale*, Spin = *stratum spinosum*, Gran = *stratum granulosum*, Cor = *stratum corneum*. Die Bilder (B) und (B') zeigen den Übergang von Dermis zu Epidermis und die dort vorliegenden Hemidesmosomen, angedeutet durch weiße Pfeile. Der Messbalken entspricht einer Länge von 500 nm.

Die Übersichtsvergrößerung (A) und (A') zeigten als Bestätigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen (Bild 4.14) eine Reduktion der Dicke der Epidermis der $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse ($ADAM10^{-/-}$) und dabei speziell des *stratum spinosum*. Dies könnte u.U. auf eine abgeflachte Morphologie der Keratinozyten des *stratum spinosum* zurückzuführen sein. Neben dieser Beobachtung konnten aber keine zusätzlichen Unterschiede in der Charakteristik dieser Schicht zwischen $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse ($ADAM10^{-/-}$) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) beobachtet werden. Weiterhin konnte kein Unterschied bei den Zell-Zell-Kontakten der Desmosomen (Daten nicht gezeigt), Hemidesmosomen (B) und (B') und Corneodesmosomen (Daten nicht gezeigt) gefunden werden. Da der K14 Promotor auch im dentalen Epithel aktiv ist (Dassule et al., 2000), wurden auch komplette Schädel von Mäusen beider Genotypen histologisch untersucht. Es konnten jedoch weder im Bereich des Gaumens, der Zunge oder der Zahnanlagen Unterschiede zwischen Knockout Mäusen und Kontrollen bemerkt werden (Daten nicht gezeigt). Von diesen $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18)-Mäusen wurden auch histologische Bilder der Rückenhaut angefertigt.



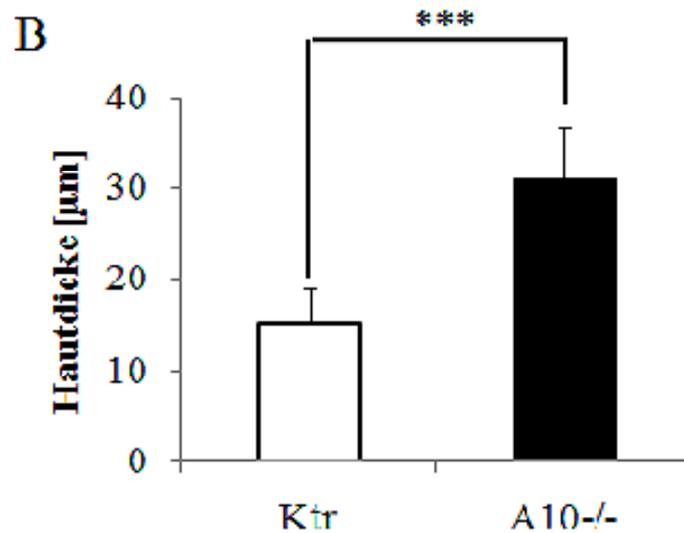


Bild 4.16: Toluidin-Blau Färbung (A) der Rückenhautproben von P18 alten Mäusen und Quantifizierung der Dicke von Epidermis der Rückenhaut (B)

(A) Rückenhautproben von ADAM10^{Epi^{-/-}(alt)}-Mäusen (P18) - (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und mit Toluidin-Blau gemäß des Standardprotokolls angefärbt. Die Messbalken in (I) und (I') entsprechen einer Länge von 500 µm. Epi = Epidermis, Der = Dermis, SCA = Subkutanes adipöses Fettgewebe, M = Muskel. In (II) sind die Talgdrüsen (TD) der Haarfollikel von gestrichelten Linien umgeben, die in (II') sichtbaren epidermalen Zysten der ADAM10^{Epi^{-/-}(alt)}-Mäusen (P18) - (A10^{-/-}) werden durch schwarze Asterices angezeigt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 200 µm. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=3 Mäusen je Genotyp. (B) Es wurden je fünf Messstrecken an repräsentativen Stellen lichtmikroskopischer Aufnahmen von jeweils drei ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäusen (P18) (A10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) mit ImageJ ausgewertet. Die Fehlerbalken wurden aus den Standardabweichungen des Mittelwertes berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0005.

Die Toluidin-Blau Färbungen von Paraffinschnitten der Proben von ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18)-Mäusen zeigten eine vielseitige Veränderung der murinen Epidermis. Am auffälligsten war die Veränderung der Haarfollikel, die zu einem großen Anteil die Charakteristik epidermaler Zysten aufwiesen. Sie waren angefüllt mit keratinhaltigem Material, das jedoch nicht, wie schon in 4.1.3.2 gezeigt zum Aufbau von Haaren genutzt werden kann. Weiterhin war auch die Anzahl der Haarfollikel erhöht, sowie ihre Lage in der Dermis. Der Anteil der sehr tief liegenden Haarfollikel war in den ADAM10^{Epi^{-/-}} (alt)-Mäusen (A10^{-/-}) gegenüber den Kontrollen (Ktr) ebenfalls stark angestiegen. Obwohl die Haut in den ADAM10 defiziente Tieren insgesamt viel dünner erscheint, ist dies in erster Linie dem nahezu vollständigen subkutanen Fettgewebe zuzuordnen, denn die Epidermis war, wie Bild 4.16 B zeigt, sogar signifikant dicker als in den Kontrollen. Neben den destrukturierten Haarfollikeln fiel der komplette Verlust der Talgdrüsen in

den ADAM10^{Epi-/-}(P18)-Mäusen (A10^{-/-}) auf. Da in den ADAM10^{Epi-/-}(P18)-Mäusen auch eine Thymusatrophie und eine Splenomegalie beobachtet wurde, sollten auch diese Organe histologisch untersucht werden. Damit die erhaltenen Daten adäquat interpretiert werden konnten, erfolgte jedoch zunächst die Überprüfung, ob in den beiden Geweben eine Deletion von ADAM10 stattfand. Dies geschah mit der unter 4.1.2.1 erläuterten Methode.

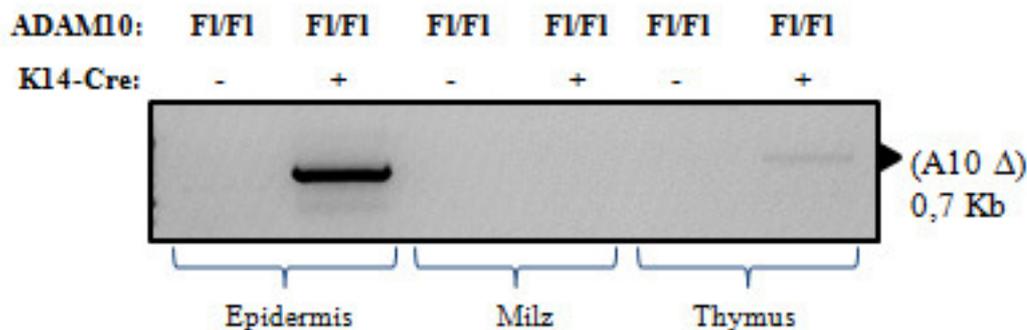


Bild 4.17: PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon 2 von ADAM10

500 ng genomische DNA aus den angegebenen Geweben wurden für die ADAM10 Exon 2-Deletions-PCR eingesetzt, anschließend mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromid-haltiges 1% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

Neben der Positivkontrolle der Epidermis konnte beobachtet werden, dass in der Milz wie erwartet keine Deletion stattfand, während im Thymus eine schwache Bande detektierbar war. Da schon publiziert wurde, dass die Thymusepithelzellen auch Keratin14 exprimieren können (Byrne et al., 1994) entspricht dies ebenfalls den Erwartungen. Der beobachtete Phänotyp der Splenomegalie stellt somit einen sekundären Effekt der konditionalen Deletion von ADAM10 dar, während in den Thymusepithelzellen aufgrund der gezeigten Aktivität des K14 Promotors eine verringerte ADAM10 Expression möglich ist.

Die beiden prominentesten Zelltypen des Thymus sind die Thymozyten und die thymischen Epithelzellen. Während die Anzahl der Thymozyten in den ADAM10^{Epi-/-}(alt)-Mäusen (A10^{-/-}) stark reduziert ist, sind sie morphologisch unauffällig gegenüber den Kontrollen (Ktr). Die thymischen Epithelzellen (TECs) hingegen wiesen sehr große vakuoläre Strukturen im Zytoplasma, dessen Ursprung und Inhalt nicht definiert werden konnte, auf (Bild 4.18).

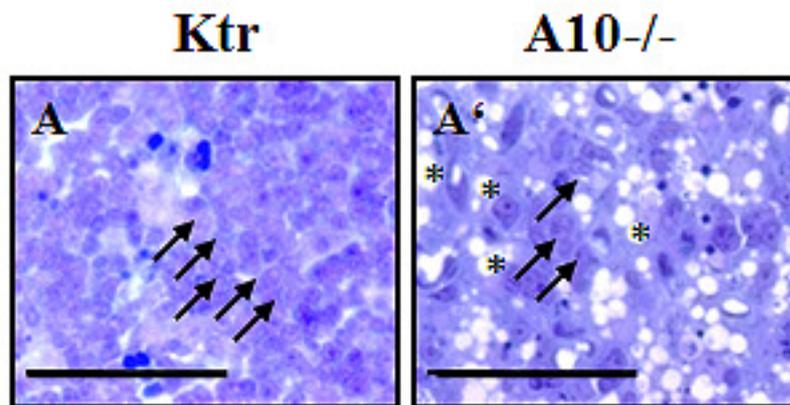


Bild 4.18: Toluidin-Blau Färbung des Thymus von P18 alten Mäusen

Thymusproben von $ADAM10^{Epi-/-}$ (alt)-Mäusen (P18) - ($A10^{-/-}$) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in $5\mu\text{m}$ dicke Sektionen geschnitten und mit Toluidin-Blau gemäß des Standardprotokolls angefärbt. Die schwarzen Pfeile zeigen beispielhaft auf Thymozyten, die schwarzen Asterices kennzeichnen die Vakuolen der thymischen Epithelzellen (TEC) in den Proben der $ADAM10^{Epi-/-}$ (alt)-Mäusen (P18) - ($A10^{-/-}$). Die Messbalken entsprechen einer Länge von $50\mu\text{m}$.

Die durchgeführte Histologie von Rückenhautproben der $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse des Alters P0 und P18 zeigten unterschiedliche Befunde im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung. Für die $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse (P0) zeigte sich eine deutliche Reduktion der suprabasalen Hautdicke bei vollständiger Differenzierung aller epidermalen Schichten. Die Morphologie der Zellen ist lediglich im *stratum spinosum* verändert, wobei keine Veränderungen innerhalb der Zellen gegenüber den Kontrollen gefunden werden konnten. Bei den Haaranlagen zeigten sich keine Unterschiede im Bezug auf Gestalt, Verteilung und Häufigkeit und auch die darunter liegenden Hautschichten bis zum Muskel wirkten einheitlich. Auch die Qualität und Quantität der Zell-Zell Kontakte (Desmosomen, Hemidesmosomen, Corneodesmosomen) war nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu zeigten die $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse (P18) eine erhöhte suprabasale Hautdicke, begleitet von einer Zunahme der Haarfollikel, die jedoch in den meisten Fällen zu epidermalen Zysten degeneriert und mit keratinhaltigem Material angefüllt waren. Weiterhin waren in keiner der untersuchten Proben fetthaltige Talgdrüsen zu finden. Die subepidermalen Schichten der Haut waren ebenfalls drastisch verändert. So konnte in der Dermis eine erhöhte Anzahl der Haarfollikel und eine hyperzelluläre Charakteristik bei nahezu völliger Abstinenz des subkutanen Fettgewebes beobachtet werden. Die Histologie der Haut konnte zeigen, dass sowohl eine starke Beeinträchtigung der Morphogenese als auch der Homöostase der Epidermis bzw. der gesamten

Haut vorliegt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die epidermalen Zellen des Thymus morphologisch stark beeinträchtigt sind.

4.1.3.5 Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie von Rückenhautproben

Während die Histologie vorwiegend einen Überblick aufgrund morphologischer und chemischer Eigenschaften der einzelnen Gewebeabschnitte oder Zellpopulationen gewähren kann, können die antikörperbasierte Immunfluoreszenz und Immunhistochemie Aufschluss über die Expression, Lokalisation und z.T. auch die Aktivität von spezifischen Proteinen geben. Dies lässt eine noch definiertere Beschreibung des vorliegenden pathologischen Zustands anhand dieser Parameter zu. Rein morphologisch lässt sich die murine Epidermis in vier klar abgegrenzte Schichten: *Stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum*, unterteilen. Diese Schichten entstehen aus der terminalen Differenzierung der Basalzellen aus dem *stratum basale* und können neben ihren morphologischen Eigenschaften auch durch die spezifische Expression einzelner Keratine oder vergleichbarer Proteine voneinander abgegrenzt werden. So werden im *stratum basale* Keratin 14 und Keratin 5, im *stratum spinosum* Keratin 10 und Keratin 1, im *stratum granulosum* Loricrin oder Involucrin und im *stratum corneum* z.B. Filaggrin exprimiert. Da sich im *stratum corneum* auch viele tote Hautzellen befinden ist jedoch die Gefahr der unspezifischen Detektion von Proteinen durch Antikörper erhöht und das *stratum corneum* wird daher in der Regel nicht mit Immunfluoreszenz-technischen Methoden untersucht. Neben diesen, auch als Differenzierungsmarker bekannten Proteine gibt es auch Marker für Stammzellen (Keratin 15) oder Marker für verwundete Stellen in der Epidermis (Keratin 6 und Keratin 16), die oft zur Erkennung pathologischer Situationen in der Haut eingesetzt werden. Die unter 4.1.3.4 untersuchten Rückenhautproben wurden nun mit den eben genannten Markern analysiert.

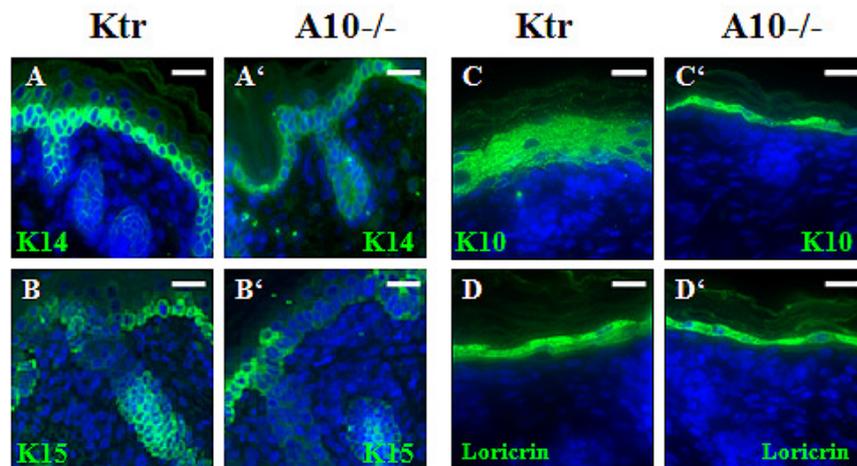


Bild 4.19: Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P0 Mäusen

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (P0) - (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.13) angefärbt. Primär und Sekundärantikörper wurden dabei in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=3 Proben je Genotyp. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Während die Bilder A/A', B/B' und D/D' keinen offensichtlichen Unterschied in der Expression von Differenzierungsmarkern zwischen den ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (ADAM10^{-/-}) und den Kontrollen (Ktr) zeigen, konnte eine deutliche Verringerung in der Keratin 10 positiven Schicht – dem *stratum spinosum* – festgestellt werden. Eine Analyse der Keratin 10 Expression anhand des Western Blot Verfahrens bestätigte den Eindruck der geringeren Keratin 10 Expression.

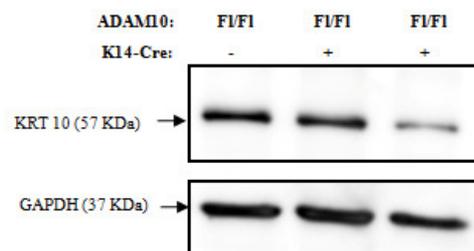


Bild 4.20: Proteinexpressionsanalyse von Keratin 10 aus epidermalen Geweben

Epidermales Gewebe wurde mit Hilfe von epidermalen Splits gewonnen, mit NP-40 Lysispuffer homogenisiert und die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-Keratin 10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (1:1000) und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert. Beide Teile des Blots wurden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Dieser Blot ist ein repräsentatives Beispiel von n=3 durchgeführten Experimenten.

Für die Durchführung weiterer Experimente wurden zunächst zwei mögliche Szenarien, die zu einer Reduktion der Dicke des *stratum spinosum* führen, in Betracht gezogen. Ein Grund für die geringere Dicke könnte ein massiver Zellverlust durch eine erhöhte Apoptose, welcher exklusiv in den epidermalen Zellen des *stratum spinosum* stattfindet, sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein fluoreszenzbasierter Test zur Erkennung apoptotischer Zellen (TUNEL, Promega) eingesetzt.

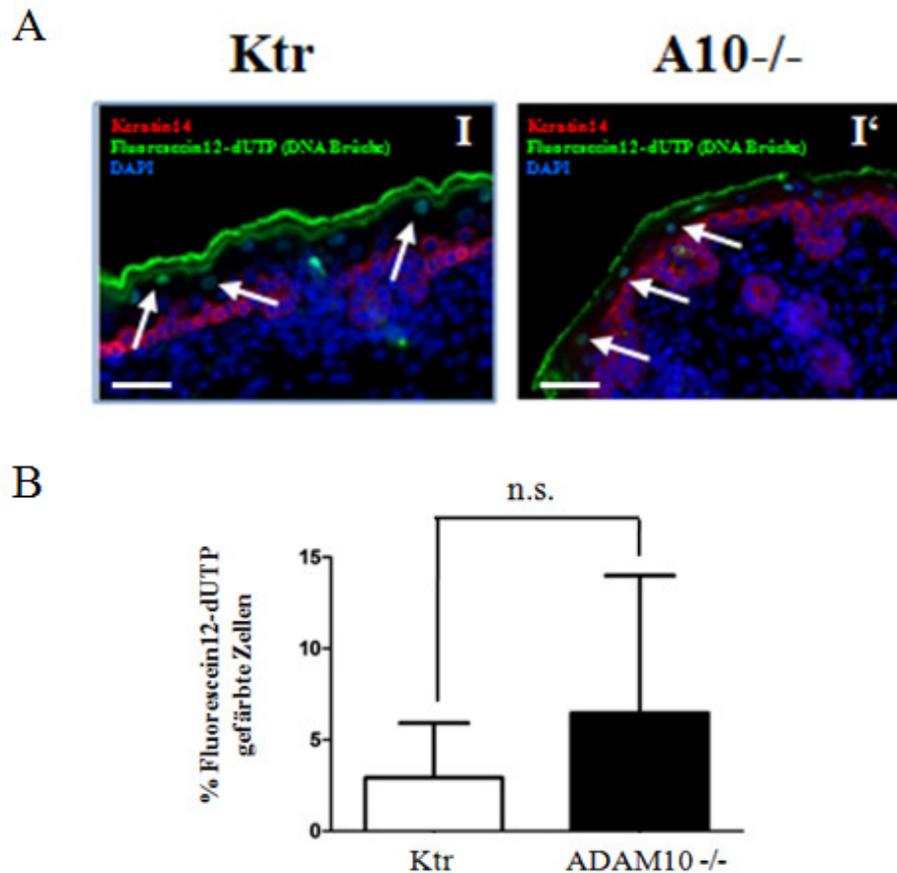


Bild 4.21: Fluoreszenz-basierte Detektion (A) und Quantifizierung (B) apoptotischer Zellen (TUNEL) in der Epidermis von Rückenhautproben von P0-Mäusen

(A) Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (P0) - (A10^{-/-}) (I') und Kontrollen (Ktr) (I) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und wie und gemäß des Herstellerprotokolls (3.1.9) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=5 Proben je Genotyp. Die weißen Pfeile deuten auf apoptotische Zellen, die durch Anfärbung von DNA-Brüchen sichtbar gemacht werden. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 50 µm. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von n=5 Mäusen je Genotyp. (B) Die Fluoreszenzpositiven Zellen von n=5 Mäusen je Genotyp wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und als Anteil aller Zellen der IFE aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert an und die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: n.s. p>0,05.

Da alle suprabasalen Zellen ein terminales Differenzierungsprogramm durchlaufen an dessen Ende der nekrotische Untergang in Form des *stratum corneum* steht, sind

apoptotische Vorgänge in einer intakten Epidermis nur äußerst selten anzutreffen. Eine erhöhte Apoptoserate wäre somit ein weiteres wichtiges Indiz für eine pathologische Situation in der Epidermis. Die Immunfluoreszenz, sowie die anschließende quantitative Auswertung ergaben jedoch weder einen signifikanten Unterschied des prozentualen Anteils der apoptotischen Vorgänge zwischen den $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäusen ($ADAM10^{-/-}$) - 6 +/- 6,5%- und den Kontrollen (Ktr) - 2 +/- 3% - noch eine ungewöhnlich hohen Anteil apoptotischer Zellen in einer der untersuchten Proben. Eine weitere Ursache für die Reduktion der Dicke des *stratum spinosum*s könnte auch in einer reduzierten proliferativen Kapazität der basalen Epidermiszellen begründet liegen. Das Proliferationsantigen Ki67 ist ein häufig verwendeter Marker für die Identifikation proliferativ aktiver Zellen.

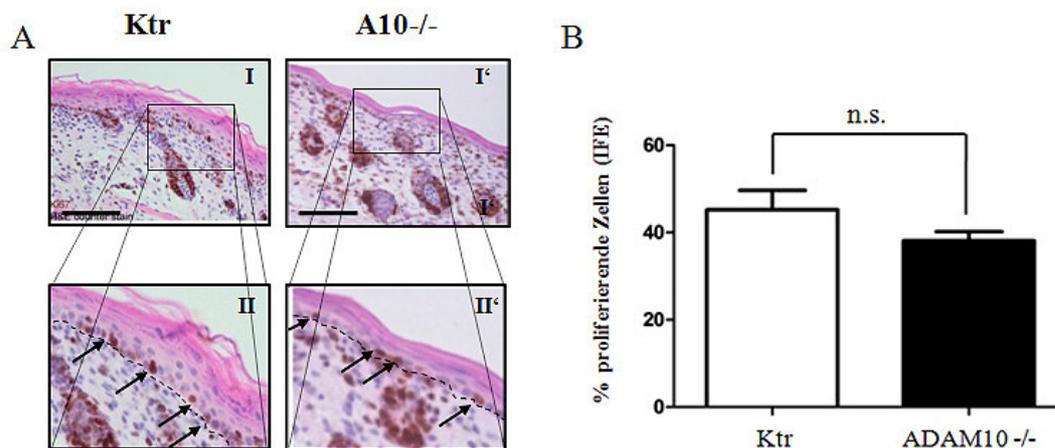


Bild 4.22: Fluoreszenz-basierte Detektion (A) und Quantifizierung (B) der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung auf Rückenhautproben von P0 Mäusen.

(A) Rückenhautproben von $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäusen (P0) - ($A10^{-/-}$) (I) und Kontrollen (Ktr) (I^c) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5µm dicke Sektionen geschnitten und wie und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt, der Primärantikörper (anti-Ki67) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100 der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als Gegenfärbung wurde eine H&E Färbung durchgeführt. Die schwarzen Pfeile deuten auf proliferativ aktive Zellen. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100µm. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=5 Mäusen je Genotyp. (B) Die DAB-positiven Zellen von n=5 Mäusen je Genotyp wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und als Anteil aller Zellen der IFE aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert an und die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: n.s. $p > 0,05$

Der Vergleich der proliferativ aktiven Zellen in der Basalschicht der interfollikulären Epidermis (IFE) zeigten einen prozentualen Anteil von 38 +/- 0,9% für die $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäuse ($ADAM10^{-/-}$) und einen Anteil von 43 +/- 4% für die Kontrollen. Somit konnte auch hier kein signifikanter Unterschied bezüglich des proliferativen Verhaltens der Basalzellen der Epidermis detektiert werden. Da in der Histologie der $ADAM10^{Epi-/-}$

(P18)-Mäuse (4.1.3.4) im Gegensatz zu den $ADAM10^{Epi-/-}$ (P0)-Mäuse eine Verdickung der Epidermis beobachtet wurde, sollte durch immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 geprüft werden, ob die Epidermis dieser Mäuse einen hyperproliferativen Zustand aufweist.

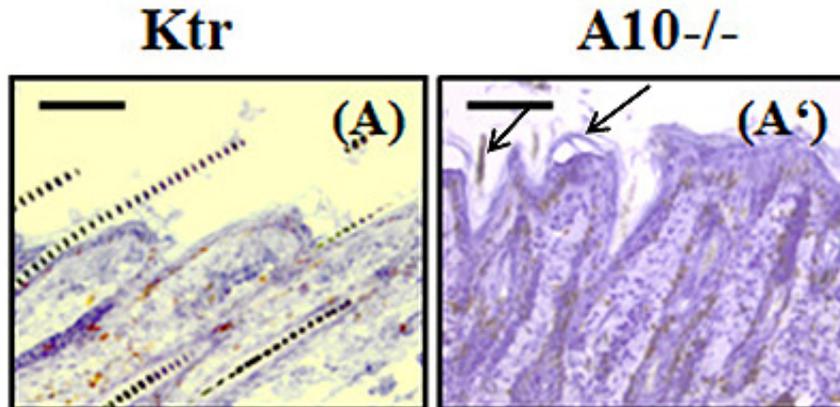


Bild 4.23: Untersuchung der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung auf Rückenhautproben von P18 Mäusen.

Rückenhautproben von $ADAM10^{Epi-/-}$ -Mäusen (P18) - ($A10^{-/-}$) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt, der Primärantikörper (anti-Ki67) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100 der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Proliferierende Zellen sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

Neben der in Bild 4.16 gezeigten Verdickung der Epidermis, konnte in der Basalschicht der IFE und den Haarfollikeln ein deutlicher Anstieg der Ki67-positiven Keratinozyten, sowie eine ausgeprägte Hyperkeratinisierung (schwarze Pfeile in Bild 4.23 A') beobachtet werden. Neben einer Hyperproliferation und Hyperkeratinisierung der Epidermis ist auch eine gesteigerte Invasion von Entzündungszellen eine häufig beobachtete Reaktion der Haut auf eine gestörte Barriere. Zur Überprüfung dieser Kriterien wurden Giemsa-Färbungen von Paraffinschnitten P18 alter Mäuse angefertigt.

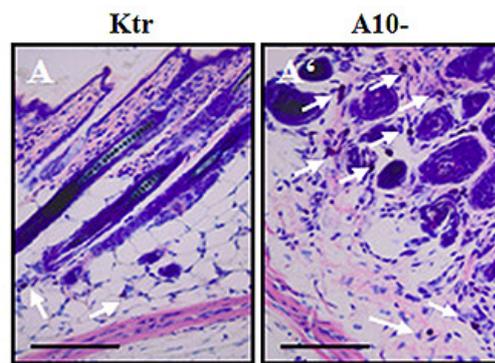


Bild 4.24: Giemsa Färbung auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P18 alten Mäusen

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (P18) - (A10^{-/-}) (A') und Kontrollen (Ktr) (A) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Zellen, die violett angefärbt sind, stammen aus der granulozytären Reihe der Hämatopoese. Weiße Pfeile deuten auf die Entzündungszellen, die sich in allen Schichten der Haut befinden. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

Bei den infiltrierten Entzündungszellen handelt es sich um eine Mischung aller verschiedener Leukozyten (Aussage Dr. Klapper, UK-SH Kiel). Obwohl die Granulozyten des angeborenen Immunsystems die erste Abwehrlinie gegen Pathogene darstellen, können auch Lymphozyten in die Haut einwandern. Aufgrund der beobachteten Splenomegalie (Bild 4.10) der ADAM10^{Epi-/-}(alt)-Mäuse (P18), wurden im Weiteren CD45R-positiven Zellen (B-Lymphozytenmarker) in den Hautschnitten angefärbt.

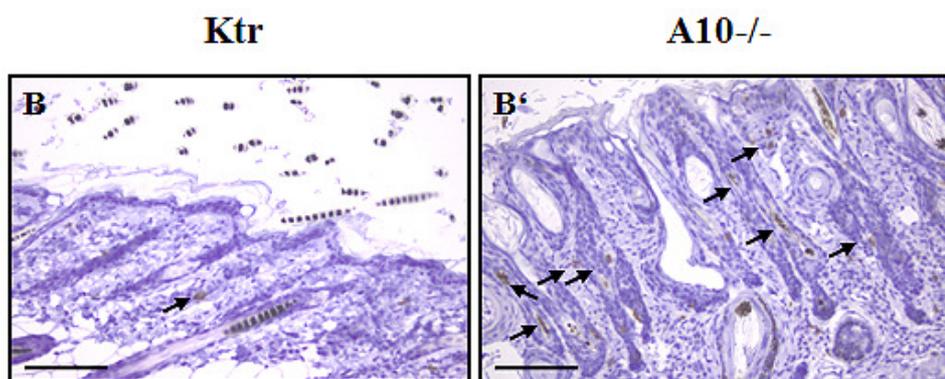


Bild 4.25: Immunhistochemische Färbung von B-Lymphozyten auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P18 alten Mäusen

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (P18) - (A10^{-/-}) (A') und Kontrollen (Ktr) (A) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Der Primärantikörper (anti-CD45R) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100 der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Infiltrierte B-Lymphozyten sind an einer Braunfärbung zu erkennen und werden durch schwarze Pfeile angezeigt. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

Die immunhistochemische Färbung zeigte eine deutliche Steigerung der Anzahl von B-Lymphozyten in der Haut der ADAM10^{Epi-/-}(alt)-Mäuse (P18) gegenüber den Kontrollen (Ktr). Insgesamt konnten die immunhistochemisch Untersuchung für die ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (P0) die Information liefern, dass das *stratum spinosum* stark reduziert ist, während Proliferation und Apoptose der Basalzellen unverändert sind. Im Hinblick auf die ADAM10^{Epi-/-}(alt)-Mäuse (P18) konnten ein hyperproliferatives Verhalten des *stratum basale*, eine ausgeprägte Hyperkeratinisierung und die erhöhte Infiltration von Leukozyten, unter denen sich auch ein signifikanter Anzahl von B-Lymphozyten befindet, gezeigt werden.

4.1.3.6 Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten

Die Kultur primärer Zellen erlaubt eine Vielzahl von Experimenten, z.B. Manipulation durch Transfektion von RNA oder DNA, Behandlung mit Inhibitoren oder Stimulanzen oder Einzellzellbetrachtung (Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz) die *in vivo* nur sehr schwer oder gar nicht durchführbar sind. Sie bietet dabei einen Vorteil gegenüber zellbasierten Experimente mit äquivalenten Zelllinien, da ihre Charakteristik während den ersten Passagen noch nicht so stark durch klonale Selektion und Entartung des genetischen Materials beeinträchtigt ist. Neben der erfolgreichen Isolation von einer ausreichenden Anzahl von Keratinozyten-Linien aus ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (P0) und ihren entsprechenden Kontrollen (n=5), um biologische Varianzen in die Betrachtung miteinbeziehen zu können, sollten zunächst Parameter wie Morphologie, Wachstumsverhalten und Kolonie-formende Eigenschaften untersucht werden.

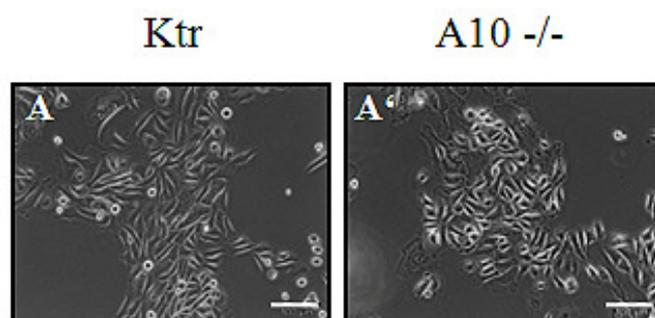


Bild 4.26: Lichtmikroskopische Aufnahme einer primären Keratinozytenzellkultur

Keratinozyten von ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (P0) (ADAM10^{-/-}) (A') und Kontrollen (Ktr) (A) wurden bis zur Subkultivierungsdichte kultiviert, von Feederzellen befreit und mit einem Kamerasystem des Lichtmikroskops fotografiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von n=5 verschiedenen Keratinozytenlinien je Genotyp. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 μm .

Da die Keratinozyten in einem Kalziumfreien Wachstumsmedium kultiviert werden, differenzieren sie in der Regel nicht, besitzen also vorwiegend den Charakter von Basalzellen, und können daher mit Hilfe einer 6-tägigen Wachstumskurve auf ihre proliferative Kapazität untersucht werden. Beobachtungen in der Zellkultur zeigten, dass die Keratinozyten von ADAM10 defizienten Mäusen stets vor den Kontrollen die optimale Konfluenz zur Subkultivierung erreichten. Dies sollte nun durch den Einsatz des unter 3.2.4.10 beschriebenen Experimentes quantifiziert werden.

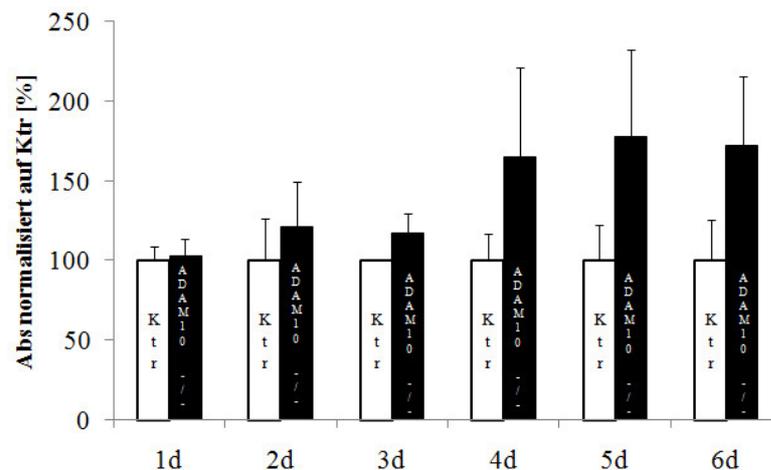


Bild 4.27: 6-Tägige Analyse der proliferative Kapazität von murinen Keratinozyten

5000 Keratinozyten von ADAM10^{Epi/-}-Mäusen (P0) (ADAM10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden im Triplikate auf sechs 96-well Platten ausgesät. Jeden Tag (d) wurde an äquivalenten Zeitpunkten eine definierte Menge eines Tetrazoliumderivates gegeben, dass die Zellen über einen Zeitraum von 4h zu einem Formazanderivat metabolisieren. Dieses Formazanderivat emittiert Licht einer Wellenlänge von 570 nm und die metabolische Aktivität der Zellen konnte hierdurch mit einer Endpunktbestimmung ermittelt werden. Je mehr Zellen in dem well sind, desto höher ist die gemessene Absorption. Gezeigt ist eins von zwei repräsentativen Experimenten, von jedem Genotyp wurden zwei verschiedene Keratinozytenlinien eingesetzt.

Nach etwa 3-4 Tagen Wachstum lässt sich ein signifikanter Unterschied in der proliferativen Kapazität der Keratinozyten erkennen. So zeigten die ADAM10^{Epi/-}-Mäuse (P0) auch hier ein deutlich schnelleres Wachstum als die Keratinozyten der Kontrollmäuse (Ktr). Neben der reinen Wachstumsgeschwindigkeit lässt sich mit dem Koloniebildungs-Experiment zudem eine Aussage über den Stammzellcharakter der kultivierten Keratinozyten treffen. Solange die Zellen nicht terminal differenzieren, können sie ungehindert proliferieren und sich teilen. Dabei entstehen aus kleinen Einzelklonen immer größere Kolonien. Durch die im Folgenden immer häufiger auftretenden Zell-Zellkontakte und die zunehmende Sekretion von löslichen (Wachstums-)Faktoren in das umgebende Medium, wird die Wahrscheinlichkeit, dass

die Zellen trotz der äußerst geringen Menge an Kalzium differenzieren und damit das Koloniewachstum gestoppt wird, immer größer. Das Verhältnis aus der Anzahl entstandener Kolonien zu ihrer ausgebildeten Fläche gibt dann Aufschluss über den Stammzellcharakter der entsprechenden Keratinozytenlinie. Bild 4.28 zeigt ein repräsentatives Beispiel für ein solches Experiment.

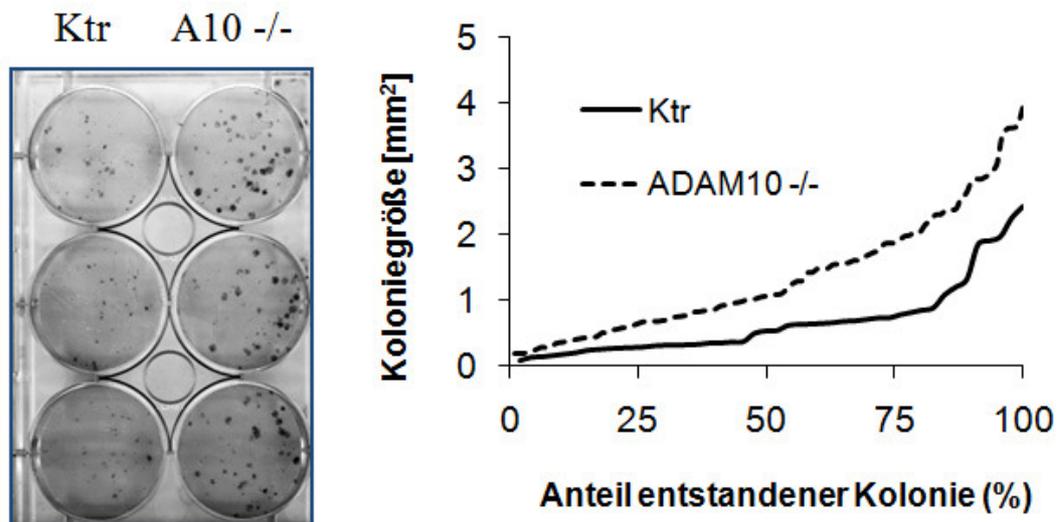


Bild 4.28: Koloniebildungs-Experiment mit Keratinozyten P0 alter Mäuse

Auf einer 6-well Schale wurden im Triplikate pro Schale 4000 Keratinozyten von ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäusen (P0) (ADAM10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) zusammen mit Feederzellen ausgesät. Die Keratinozyten wurden zwei Wochen lang inkubiert und es erfolgte ein regelmäßiger Feederzellwechsel. Nach den zwei Wochen wurden die Feederzellen abgelöst, die Zellen fixiert und mit Kristall Violett gefärbt. Die Koloniegrößen wurden mit ImageJ ermittelt und gegen die Anzahl der gewachsenen Kolonien aufgetragen. Gezeigt ist eins von drei durchgeführten Experimenten.

Aus diesen bis jetzt gewonnenen Daten lässt sich für weitere Experimente vor allen Dingen die Erkenntnis gewinnen, dass die ADAM10 defizienten Keratinozyten-Linien eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit bei einer möglicherweise verstärkten Stammzellcharakteristik aufweisen. Dies sollte aber noch durch weitere Experimente belegt werden.

4.1.3.7 Microarray Analyse von epidermalen Splits

Die Gesamtheit eines beobachteten Phänotyps ist letztendlich das Ergebnis eines bestimmten Proteinexpressionsmusters in allen lebenden Zellen des Organismus. Beschränken sich etwaige pathologische Vorgänge auf einzelne Gewebe, wie in dem hier vorliegenden Fall die Epidermis, ist es von großem Interesse die Unterschiede in dem jeweiligen Proteinexpressionsmuster herauszufinden und nachfolgend

Rückschlüsse auf die mögliche Beteiligung dieser (fehl-)regulierten Proteine an dem beobachteten Phänotyp zu ziehen. Da es sich aufgrund der Komplexität und auch der höchst variablen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine äußerst schwierig gestaltet die gesamten Proteine einer Zelle oder sogar eines Gewebes zu erfassen, bedient man sich oft der Analyse der Gesamtheit der exprimierten mRNAs (Transkriptom). Chip-basierte System erlauben die vollständige Untersuchung aller derzeit bekannte Gene der Maus.

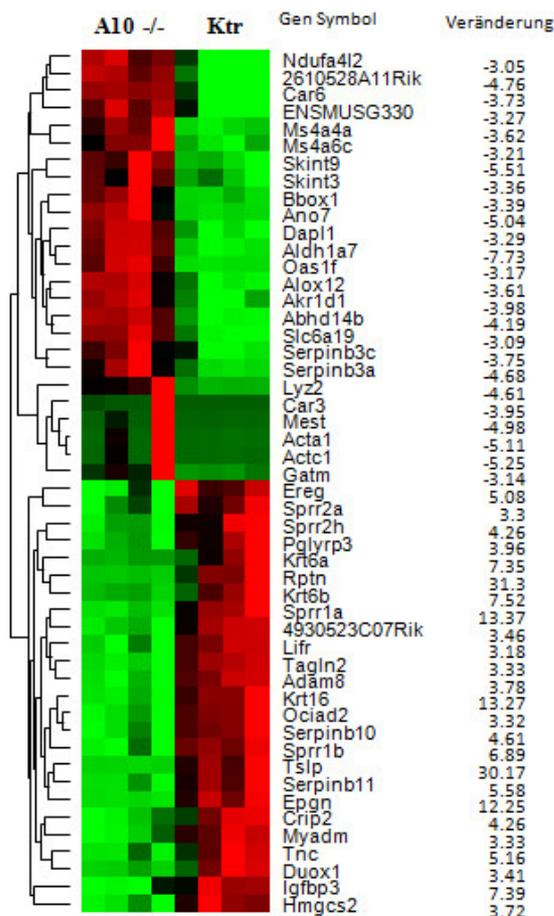


Bild 4.29: Microarray-Analyse zeigt die 50 am stärksten regulierten Gene ADAM10-defizienter Epidermis

Die Gesamt mRNA aus epidermalen Splits von jeweils n=4 ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäusen (P0) (ADAM10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurde einer Expressionsanalyse unterzogen. Hieraus wurden die 50 am stärksten regulierten Gene ausgewählt und in einem Farbdigramm dargestellt. Grün bedeutet eine erhöhte Expression, rot eine verminderte Expression gegenüber dem jeweiligen Genotyp.

Die statistische Auswertung des Microarrays erfolgte durch R. Häsler (UK-SH Kiel) und ist unter Hasler et al., 2009 ausführlich beschrieben. Hierdurch konnten 93 Gene der ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäuse (P0) gefunden werden, dessen mRNA Expression mehr als

zweifach gegenüber den Kontrollen (Ktr) erhöht und 51 Gene, dessen mRNA Expression mehr als zweifach gegenüber den Kontrollen (Ktr) erniedrigt waren. Dabei konnten drei ganz eindeutige Trends aus den Ergebnissen extrahiert werden. Sehr viele Gene des Lipid- und des Retinolmetabolismus sind in ihrer Expression stark erniedrigt (Tabelle 4.3 A und B) und von den 15 am stärksten in ihrer mRNA Expression erhöhten Gene, befinden sich 13, die alle im Zusammenhang mit Hyperproliferation, Hyperkeratinisierung und Wundheilung in der murinen Epidermis beschrieben sind (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der mindestens 2-fach regulierte Gene, dessen Überexpression mit Hyperproliferation, Hyperkeratinisierung und Wundheilung in Zusammenhang stehen.

Name des Gens	Regulation
repetin	31,3
thymic stromal lymphopoietin	30,17
small proline-rich protein 1A	13,37
keratin 16	13,27
epithelial mitogen	12,25
keratin 6B	7,52
insulin-like growth factor binding protein 3	7,39
keratin 6A	7,35
small proline-rich protein 1B	6,89
epiregulin	5,08
cysteine rich protein 2	4,26
small proline-rich protein 2H	4,26
a disintegrin and metallopeptidase domain 8	3,78
small proline-rich protein 2A	3,3
leukemia inhibitory factor receptor	3,18
interferon regulatory factor 7	2,78
insulin-like growth factor binding protein 2	2,73
met proto-oncogene	2,72
lymphocyte antigen 6 complex, locus A	2,68
integrin alpha 6	2,68
integrin alpha 3	2,54
small proline-rich protein 2A	2,44
small proline-rich protein 2A	2,44
transforming growth factor, beta induced	2,07
transforming growth factor, beta receptor II	2

Die Untersuchung der Proteinexpression und –lokalisierung dieser Gene wurde für die Gene *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP), Keratin 6 und Integrin $\alpha 6$ an ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse (P0) und Kontrollen durchgeführt. Die Expression von TSLP wurde im Plasma mit einem ELISA, die Expression von Keratin 6 und Integrin $\alpha 6$ durch Immunoblots von epidermalen Splits, sowie durch Immunfluoreszenzen von Paraffinschnitten aus Rückenhautproben untersucht. In keinem der Fälle konnte jedoch eine signifikante Änderung der Proteinexpression oder –lokalisierung gezeigt werden

(Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Plasmakonzentration des TSLP auch in P9 und P18 Mäusen bestimmt.

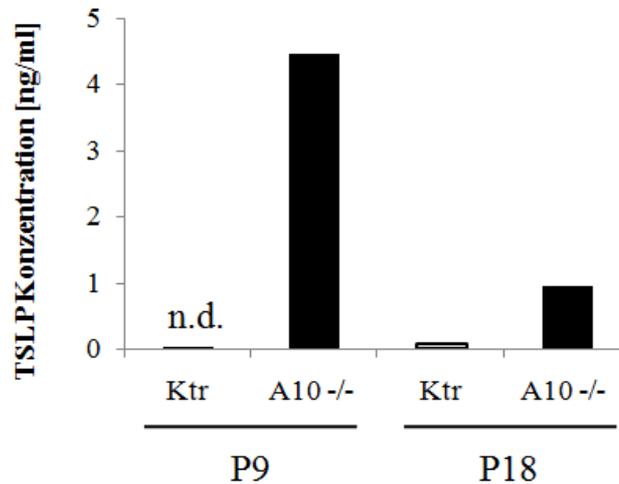


Bild 4.30: Auswertung des ELISA zur Quantifizierung der Plasmakonzentration von TSLP in epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen

Vergleichbare Volumina von Plasmaproben der ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden zur Quantifizierung der TSLP-Konzentration einem ELISA gemäß Herstellerangaben (RnDSytems) unterzogen. Dabei wurden je Messpunkt das Plasma von drei verschiedenen Mäusen gepoolt, n.d. = nicht detektierbar.

Zu den untersuchten Zeitpunkten P9 und P18 konnten bis zu 4000fache TSLP-Konzentrationen im Plasma von epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen gegenüber den entsprechenden Kontrollen detektiert werden.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung regulierter Gene, die eine wichtige Rolle im Lipid- (A) und Retinolmetabolismus (B) einnehmen.

A Name des Gens	Regulation	B Name des Gens	Regulation
aldo-keto reductase family 1, member D1	-3,98	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	-7,73
carbonic anhydrase 6	-3,73	lysozyme 2	-4,61
arachidonate 12-lipoxygenase	-3,61	abhydrolase domain containing 14b	-4,19
butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase 1	-3,39	arachidonate 12-lipoxygenase	-3,61
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-2,39	glycine amidotransferase	-3,14
enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	-2,39	cytochrome b5 reductase 4	-2,58
arachidonate lipoxygenase, epidermal	-2,32	cytochrome b5 reductase 4	-2,5
StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5	-2,29	retinol dehydrogenase 12	-2,36
stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	-2,27	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	-2,32
acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	-2,18	lysosomal-associated protein transmembrane 5	-2,18
short chain dehydrogenase	-2,17	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-2,02
alkaline ceramidase 1	-2,05	short chain dehydrogenase	-2,01
acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9	-1,88	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	-1,99
fatty acid binding protein 5, epidermal	-1,63	short chain dehydrogenase	-1,88
alkaline ceramidase 2	-1,62	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	-1,63
fatty acid binding protein 5, epidermal	-1,6	retinol binding protein 2, cellular	-1,55

Für die Gene des Lipid- oder Retinolmetabolismus wurden im Rahmen dieser Arbeit keine direkten Expressionsanalysen durchgeführt. In 4.1.4.4 wird jedoch eine Analyse der Verteilung der epidermalen Lipide am Zeitpunkt P0 gezeigt.

Die Auswertung des Microarrays zeigte, dass in der Epidermis von ADAM10^{Epi/-}-Mäusen (P0) eine große Gruppe von Genen, die als Marker für Hyperproliferation und Hyperkeratinisierung gelten, eine vielfach stärkere Expression aufwies, während Gene des Lipid- und des Retinolmetabolismus fast ausschließlich, stark reduziert exprimiert wurden. Die Vielzahl der regulierten Gene lassen, wie schon alle vorherigen Ergebnisse, auf die Beeinträchtigung eines oder evtl. auch mehrerer zentraler Signalübertragungswege in der Haut schließen.

4.1.4 Analyse zur Ursache des Phänotyps

Die Analyse des Phänotyps von ADAM10^{Epi/-} (P0)- und ADAM10^{Epi/-}(P18)-Mäusen lieferte ein breites Spektrum an Ergebnissen, die es in den molekularen Kontext einzufügen galt. Wie schon in 4.1.3.7 angedeutet, wurde vermutet, dass einer der zentralen Signalkaskaden für die Morphogenese der murinen Epidermis beeinträchtigt war. Aus zahlreichen Knockout-Studien wurden bis zum heutigen Zeitpunkt der Wnt/ β -Catenin, der TGF- β /BMP, der NF- κ B, der EGFR/c-Jun/junB, der p63, der Sonic Hedgehog und der Notch-Signalübertragungsweg als zentrale Signalvermittlungswege identifiziert. Den meisten dieser Wege ist eine Redundanz der beteiligten Signalübermittler in unterschiedlichen Stadien der Signalkaskade gemeinsam (z.B. Notch1-4 Rezeptor oder EGFR1-4 Rezeptor) und wie schon beschrieben kann es auch zu einem Crosstalk dieser Signalkaskaden durch gemeinsam genutzte Signalvermittler kommen. Unter Berücksichtigung dieser Kenntnisse, wurde die Literatur im Hinblick auf alle bis dahin ermittelten Ergebnisse der Phänotyp-Analyse durchsucht und auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede geprüft. Hierbei konnte in erster Linie eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit beschriebenen Phänotypen epidermaler, Basalzellen-spezifischer Knockout Mäuse des Notch-Signalübertragungsweges gefunden werden. Eine eingehende Erörterung dieses Vergleichs lässt sich in 5.1 der Diskussion finden. In den nun folgenden Kapiteln wurde mit Hilfe verschiedener biochemischer und zell-sowie immunbiologischer Methoden untersucht, ob sich eine Beeinträchtigung des Notch-Signalübertragungsweges aufgrund der epidermalen ADAM10 Defizienz verifizieren lässt.

4.1.4.1 Einfluss von ADAM10 auf die Prozessierung des Notch1-Rezeptors

Ein zentraler Schritt des Notch-Signalweges *in vivo*, ist die unter 1.3.3.1 beschriebene sequenzielle proteolytische Prozessierung der Notch-Rezeptoren nach erfolgter Notch-Ligandenbindung. Während für die Notch-Rezeptoren 1-3 eine Expression in der murinen Epidermis nachgewiesen werden konnte, kann der Literatur auch entnommen werden, dass die Deletion des Notch1-Rezeptors1 den stärksten Einfluss auf eine pathologische Veränderung der Epidermis ausübt. Daher sollten durch die Verwendung geeigneter Antikörper die Bildung möglicher Spaltungsfragmente des Notch1-Rezeptors *in vivo* untersucht werden.

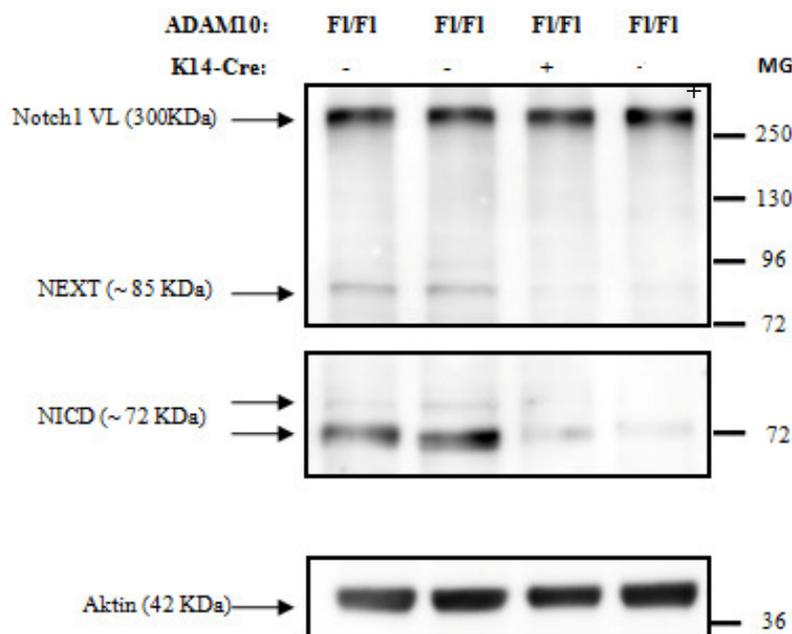


Bild 4.31: Proteinexpressionsanalyse von proteolytischen Notch1-Rezeptor Fragmenten (NEXT und NICD) aus epidermalemem Gewebe

Epidermales Gewebe wurde mit Hilfe von epidermalen Splits gewonnen, mit NP-40 Lysispuffer homogenisiert und die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 4-12% Bis/Tris Gradienten-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Rattenantikörper 5E9 gegen das NEXT Fragment des Notch1-Rezeptors (1:1000) und der polyklonale Kaninchenantikörper gegen das NICD Fragment des Notch1-Rezeptors (1:1000) Danach wurde 1h lang mit dem sekundären HRP-Ziege-anti-Ratte- bzw. HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Aktin (1:3000) und anschließend mit dem gleichen HRP-Esel-anti-Kaninchen Sekundäntikörper inkubiert. Beide Teile des Blots wurden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Diese Blots sind repräsentative Beispiele von n=3 durchgeführten Experimenten. VL = Volllängenrezeptor, NEXT = S2 Spaltfragment des VL, NICD = S3 Spaltfragment des VL.

Die Analyse der beiden gezeigten Western Blots ergaben eine drastische Reduktion bei der Bildung des Metalloprotease-abhängigen Spaltfragments (NEXT) und des γ -Sekretase-abhängigen Spaltfragments NICD für die Lysate der epidermalen Splits von ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäusen (P0) im Gegensatz zu den Kontrollen, während die Expression des Volllängenrezeptors sowohl auf mRNA (nicht gezeigte Daten aus dem Microarray - 4.1.3.7) als auch auf Proteinebene unverändert war. Die durchgeführte Aktinkontrolle zeigte zudem eine gleichmäßige Proteinbeladung des SDS-Gels. Hiermit konnte demonstriert werden, dass ADAM10 auch *in vivo* die maßgebliche Sheddase für den Notch1-Rezeptor darstellt. Weiterhin wurde gezeigt, dass für die Generation des NICD eine vorherige Spaltung des Notch1-Rezeptors durch ADAM10 erfolgen muss

4.1.4.2 Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Serums gegen murines ADAM17

Da aus der bisherigen Literatur neben ADAM10 vorwiegend ADAM17, als hauptsächliche Sheddase für die Prozessierung des murinen Notch1-Rezeptors beschrieben wurde (Mumm et al., 2000; Brou et al., 2000), sollte gezeigt werden, ob die Deletion von ADAM10 auch einen Einfluss auf die Expression von ADAM17 hat. Genau wie zur Detektion von murinem ADAM10 musste auch hierfür ein eigener Antikörper generiert werden, da die kommerziell erhältlichen Antikörper nur gegen humane Epitope gerichtet und für die Analyse der endogenen murinen Proteine ungeeignet waren (Daten nicht gezeigt).

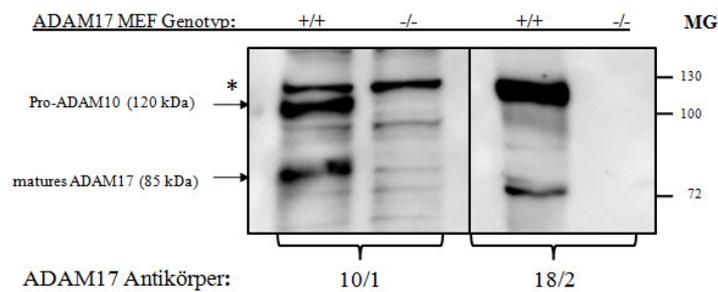


Bild 4.32: Testung der anti-murinen ADAM17 Antikörper (Pineda) an murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

ADAM17^{-/-} und ADAM17^{+/+} MEFs wurden mit ADAM10 Lysispuffer homogenisiert, die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit den monospezifischen IgG Fraktionen 10/1 und 18/2 gegen ADAM17 (1:1000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1 h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert und mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Der schwarze Asterix kennzeichnet eine unspezifische Kreuzreaktion es 10/1 Antikörpers. Dieser Blot ist ein repräsentatives Beispiel von n=2 durchgeführten Experimenten.

Beide Antikörper konnten sowohl die pro- als auch die mature Form von ADAM17 spezifisch detektieren. Für die ADAM17 Analyse der murinen Epidermis wurden die selben Lysate wie in 4.1.2.3 benutzt.

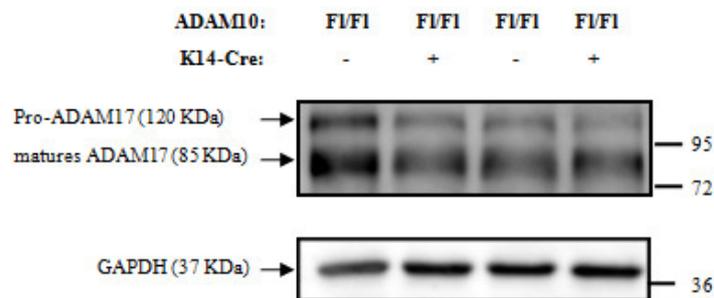


Bild 4.33: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM17 aus epidermalem Gewebe

Epidermales Gewebe wurde mit Hilfe von epidermalen Splits gewonnen, mit NP-40 Lysispuffer homogenisiert und die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen die Ektodomäne von murinem ADAM17 (10/1) (1:1000) Danach wurde 1 h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (1:1000) und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert. Beide Teile des Blots wurden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Dieser Blot ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Die Western Blot Analyse zeigte weder eine signifikante Änderung des Expressionsstärke noch eine Veränderung im Verhältnis von Pro- und maturaer Form von ADAM17 in den epidermalen Lysaten der ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäuse. Da trotzdem nicht auszuschließen war, dass die proteolytische Aktivität von ADAM17 durch die Deletion von ADAM10 verändert wurde, wurden ein TNF- α Elisa mit vereinigten Plasmaproben der P0-Tiere durchgeführt. TNF- α gilt als eines der Hauptsubstrate für ADAM17, sowohl in zellbasierten als auch in *in vivo* Systemen. Da jedoch beide Plasmaproben keine Werte oberhalb des Detektionslimits des TNF- α ELISA lieferten (Daten nicht gezeigt), ließ sich zeigen, dass in keiner der beiden Mäuse eine pathologische Erhöhung des löslichen TNF- α Levels im Blut vorlag.

4.1.4.3 Expression von Notch1 Zielgenen

Die Expressionsanalyse von direkten Notch1-Zielgenen ermöglicht eine Bestätigung der Bedeutung von ADAM10 im Bezug auf die kanonische Notch1-Signalkaskade und könnte auf evtl. auftretende kompensatorische Mechanismen hinweisen. Daher wurde die Expressions direkter Notch1-Zielgene anhand von semi-quantitativer Real-Time PCR epidermaler Splits untersucht. Die Messungen der Zielgene erfolgte dabei in Kooperation mit Dr. Ralf Schwanbeck (Ag Just, Biochemisches Institut Kiel).

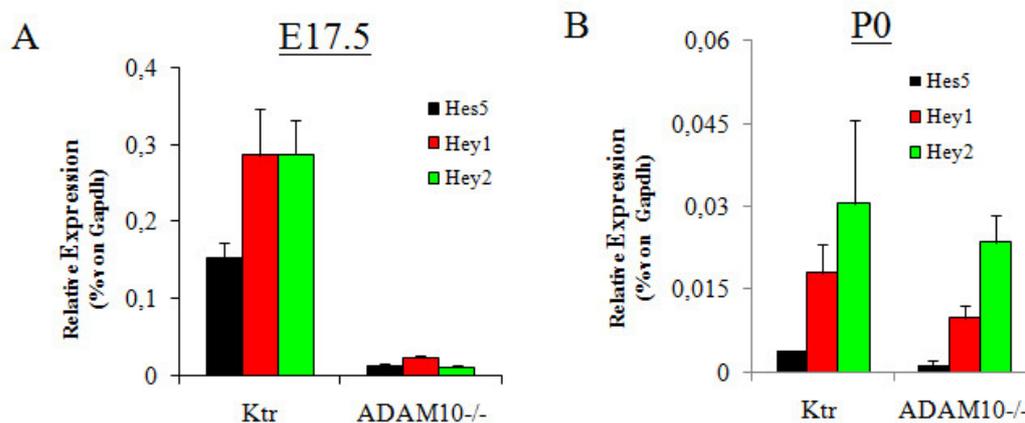


Bild 4.34: Relative Expressionslevel von direkten Notch1-Rezeptor Zielgenen

Es wurden 100 ng cDNA aus epidermalen Splits von jeweils drei verschiedenen ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäusen (P0) (ADAM10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) im Alter von E17.5 (A) oder und P0 (B) für die Real-Time PCR eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte durch die Anlagerung sequenzspezifischer Taqman-Primer. Die Expressionsstärke wurde als relativer Wert im Bezug auf die GAPDH-Expression angegeben.

Die Analyse der Expression direkter Notch Zielgene in der Epidermis von ADAM10 defizienten Mäusen zeigte besonders an E17.5 eine drastische Reduktion für die Expression der Gene Hes5, Hey1 und Hey2. Diese Tendenz konnte auch noch an P0 detektiert werden, allerdings sind hier neben den Genexpressionsunterschieden auch die Gesamtexpressionsraten stark vermindert. Neben der direkten Beeinträchtigung der Notch1-Rezeptorproteolyse konnten mit diesem Experiment auch eine funktionale Beeinträchtigung von direkten Notch-Zielgenen gezeigt werden.

4.1.4.4 Untersuchung der Lipidverteilung in der Haut

Die Analyse des Microarrays (s. 4.1.3.7) hat gezeigt, dass die Expression zwei großer Gruppen von funktionell verwandten Genen herunter reguliert ist. Neben den Genen, die im Retinolmetabolismus eine Rolle spielen, sind dies die Gruppe der Lipid-, Fettsäure- und Steroidmetabolismus-Gene. Zusammen mit der Beobachtung aus der Histologie, dass ADAM10^{Epi}^{-/-}(P18)-Mäuse keine fetthaltigen Talgdrüsen aufweisen und der Kenntnis, dass es eine direkte Interaktion des Notch-Signalwegs mit einem zentralen Regulator der epidermalen Lipidsynthese, PPAR- γ , gibt, wurde die Haut von ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäuse (P0) auf ihre Lipidverteilung untersucht. Durch Anfärbung der Proben mit Nile Rot können nicht-polare Lipide im grünen und polare Lipide (hauptsächlich im *stratum corneum*) im roten Fluoreszenzkanal detektiert werden.

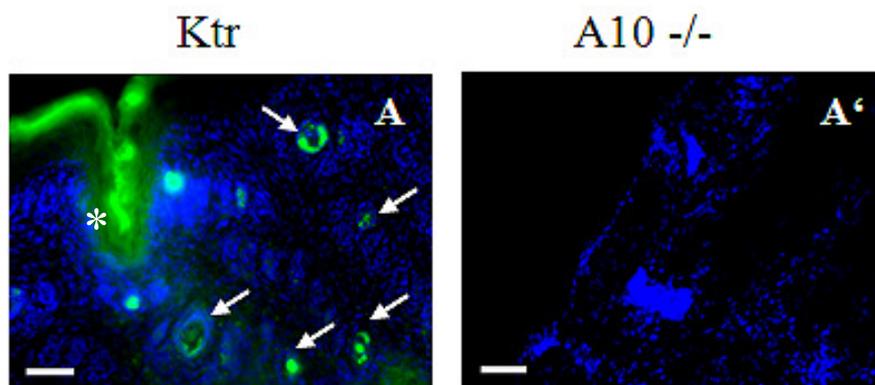


Bild 4.35: Analyse der epidermalen Lipidverteilung in P0 alten Mäuse durch Nilrot Färbung

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäusen (P0) (ADAM10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden mit Einfriermedium eingebettet und bei -20°C am Kryostat in 7 μ m dicke Sektionen geschnitten. Die Färbung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll. Polare und nicht-polare Lipide werden durch das Nile Rot gefärbt und konnte im grünen Fluoreszenzkanal des Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Die weißen Pfeile in der Kontrolle zeigen auf Anreicherungen von Lipiden, welche die Anlagen der Talgdrüsen in der Nähe der Haarfollikel darstellen. Durch den weißen Asterix ist eine unspezifische Färbung des *stratum corneum* gekennzeichnet. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von insgesamt n=3 Proben je Genotyp. Die Länge der Messbalken entspricht 50 μ m.

Mit Hilfe der Nilrotfärbung konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Expression der Gene für den Lipidmetabolismus sondern wahrscheinlich auch deren Aktivität stark verringert ist, da die ADAM10^{Epi}^{-/-}-Mäuse (P0) (ADAM10^{-/-}) gegenüber den Kontrollen (Ktr) überhaupt keine Lipideinlagerungen in den Anlagen der Talgdrüsen zeigen. Auch im roten Fluoreszenzkanal konnte eine Färbung der polaren Lipide des *stratum corneums* gesehen werden, hierbei konnten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse für einen Unterschied in der Lipidkonzentration gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.4.5 Einfluss von ADAM10 auf die Proteolyse von E-Cadherin

Neben den epidermalen Lipiden und den im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten Korneozyten, spielen die *Tight-* und die *Adherens-junctions* eine essentielle Rolle bei der Integrität der epidermalen Barriere. Eines der wichtigsten und auch am stärksten exprimierten Proteine ist dabei das E-Cadherin. Durch zellbasierte Systeme konnte schon eine mögliche Beteiligung von ADAM10 an der proteolytischen Prozessierung von E-Cadherin beobachtet werden (Maretzky et al., 2005). Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob dies nun auch *in vivo* zutrifft. Hierfür wurden Lysate von epidermalen Splits nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Transfer durch Western Blotting anhand eines C-Terminus-spezifischen E-Cadherin Antikörpers auf die Generierung C-terminaler Spaltfragmente untersucht.

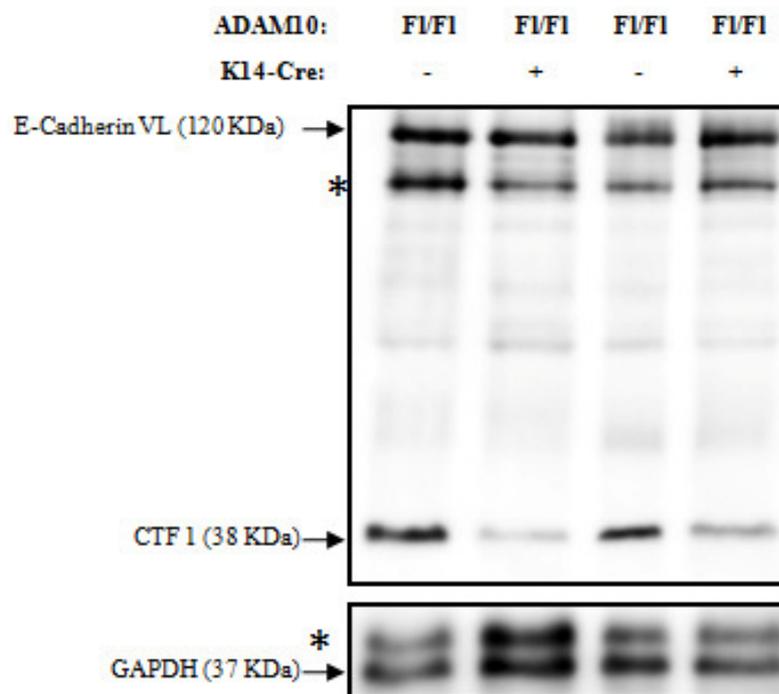


Bild 4.36: Proteinexpressionsanalyse von murinem E-Cadherin aus epidermalem Gewebe

Epidermales Gewebe wurde mit Hilfe von epidermalen Splits gewonnen, mit NP-40 Lysispuffer homogenisiert und die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin (1:2500). Danach wird 1 h lang mit dem sekundären HRP-Schaf-anti-Maus Antikörper (1:10000) inkubiert. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (1:1000) und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert. Beide Teile des Blots werden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Dieser Blot ist repräsentativ für n=4 durchgeführte Experimente. VL = Volllängenprotein, Asterices zeigen unspezifische Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper an.

Der Vergleich der proteolytischen Prozessierung von E-Cadherin in der Epidermis von ADAM10 defizienten Mäusen und den entsprechenden Kontrollen, zeigte wie auch bei der proteolytischen Prozessierung des Notch1-Rezeptors (Bild 4.31) keinen signifikanten Unterschied in der Expression des Volllängenproteins (VL), dafür jedoch eine starke Reduktion des Metalloproteaseabhängigen C-terminalen Spaltfragments (CTF1). Da zuvor publiziert wurde, dass das CTF1 ebenfalls durch γ -Sekretasen (Marambaud et al., 2000) prozessiert und das entstehende intrazelluläre Fragment als Transkriptionsfaktor oder –Modulator wirken könnte, wurden Paraffinschnitte von Rückenhautproben P0 alter Mäuse mit dem gleichen Antikörper, wie in der Proteinexpressionsanalyse untersucht.

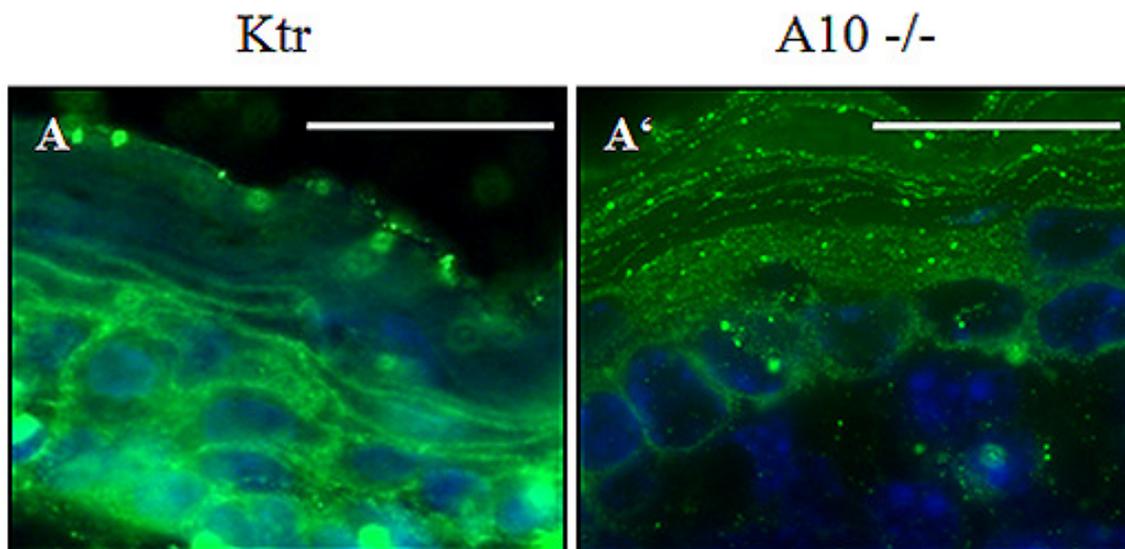


Bild 4.37: Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P0 Mäusen

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-/-}-Mäusen (P0) - (A10^{-/-}) (A') und Kontrollen (Ktr) (A) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.13) angefärbt. Der Primärantikörper gegen E-Cadherin wurde in einer Verdünnung von 1:200 der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=3 Mäusen je Genotyp. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Die Immunfluoreszenz der Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (P0) (ADAM10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) zeigten in beiden Fällen die Membranlokalisation des E-Cadherins. Ob in der zytoplasmatischen oder nukleären Lokalisation des dort evtl. vorliegenden intrazellulären Spaltfragmentes des E-Cadherins ein Unterschied zwischen den beiden Proben besteht, konnte anhand dieser Bilder nicht zweifelsfrei entschieden werden. β-Catenin ist als einer der zentralen stromabwärts liegenden Signalvermittler von E-Cadherin bekannt und wurde ebenfalls im Westernblot, der Immunfluoreszenz und auch in luminometrischen Reporter-Experimente untersucht. Die Ergebnisse hierzu waren jedoch teilweise uneinheitlich und werden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht abgebildet oder diskutiert. Mit Hilfe der gewonnen Daten konnte zwar ein Einfluss von ADAM10 auf die proteolytische Prozessierung von E-Cadherin *in vivo* gezeigt, eine funktionelle Relevanz jedoch mit zusätzlichen Experimenten noch nicht belegt werden.

4.2 Induzierbarer konditionaler Knockout von ADAM10 in der Epidermis

Die Analyse, sowohl der ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (P0) als auch der ADAM10^{Epi-/-} (P18)-Mäuse zeigten, dass ADAM10 einen unentbehrlichen Anteil an der embryonalen Entwicklung der murinen Epidermis trägt. Aufgrund der frühen Letalität und der Vielzahl an sekundären Antworten auf die ursprüngliche primäre Beeinträchtigung des Notch1-Signalübertragungsweges, lassen sich nur schwer Aussagen zur Bedeutung von ADAM10 für die Homöostase der postnatalen murinen Haut treffen. Für die Etablierung klinischer Modelle ist es zudem wünschenswert, den Zeitpunkt der genetischen Mutation eigenhändig wählen zu können. Zu diesem Zweck sollte ein induzierbar konditionales System für die Deletion von ADAM10 in der murinen Epidermis etabliert werden.

4.2.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte wie unter 4.1.1 beschrieben mit der zusätzlichen Durchführung einer PCR zur Überprüfung der Transaktivatorproteinexpression. Nach dem unter 3.2.3.13 beschriebenen Verpaarungsschema können sich die in Bild 4.38 gezeigten Genotypen in einem Wurf befinden:

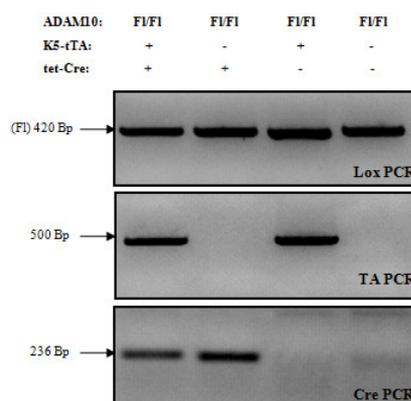


Bild 4.38: Genotypisierungs-PCR zur Identifikation induzierbarer epidermaler ADAM10 Knockout Mäuse

500 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurden für die Flox-, die TA- und die Cre-PCR (3.2.1.5) eingesetzt, anschließend mit 6xDNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 2% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Bei der Flox-PCR zeigt die 420 Bp große Bande das gefloxtes Exon 2 an. Das TA-Transgen wird durch eine 500 Bp und das Cre-Transgen durch eine 236 Bp große Bande detektiert.

Mit den gezeigten Genotypisierungs-PCRs konnten induzierbare epidermal Knockout Mäuse dementsprechend zweifelsfrei identifiziert werden.

4.2.2 Verifizierung des epidermalen Knockouts von ADAM10

Für die eindeutige Identifizierung aller gezüchteten und für Experimente verwendeten Mäuse erfolgen die Ohrlochmarkierung (3.2.3.6) und die PCR-basierten Genotypisierungsreaktion aus genomischer DNA von Schwanzbiopsien der Mäuse (3.2.3.12) im Alter von etwa drei Wochen. Die Induktion des epidermalen Knockouts von ADAM10 erfolgt wie unter 3.2.3.2 beschrieben. Als Kontrollen werden entweder (in der Bildunterschrift vermerkt) Kontrolltiere mit Doxyzyklinentzug oder induzierbare epidermale ADAM10 Knockout Mäuse (ab hier: ADAM10^{Epi-induz}) auf doxyzyklinhaltigem Futter gezüchtet. Die Verifizierung des epidermalen Knockouts erfolgt zunächst auf genomischer Ebene. Da sich Dermis und Epidermis von adulten Mäusen sehr viel schwerer trennen lassen als von neugeborenen, wurden beiden Tiere nach Tötung (sofern nötig) rasiert und ein Stück Bauch- und Rückenhaut an vergleichbaren Positionen entfernt.

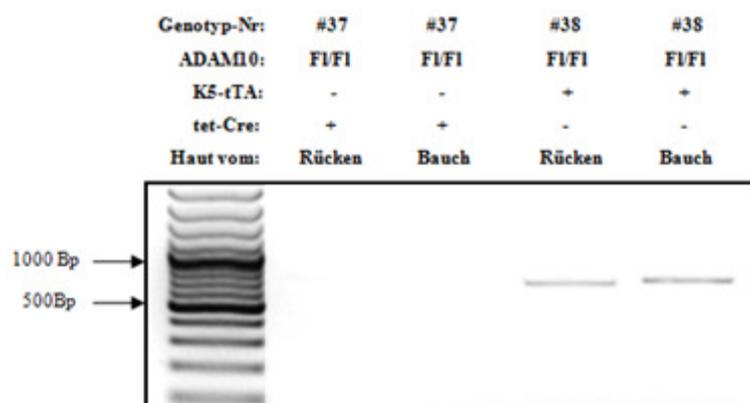


Bild 4.39: PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon 2 von ADAM10

500 ng genomische DNA werden aus Rücken- oder Bauchhautproben gewonnen und für die ADAM10 Exon2-Deletions-PCR eingesetzt, anschließend mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 1% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

Die Deletions-PCR zeigt den Erfolg der Deletion von ADAM10 in den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen auf genomischer Ebene sowohl für die Bauch- als auch für die Rückenhaut, während in den Kontrollen keine eindeutige Deletion erkennbar ist.

4.2.3 Beschreibung des Phänotyps

Auch bei der Analyse der molekularen Funktion von ADAM10 in der Homöostase der murinen Epidermis ist eine ausführliche Beschreibung von möglichen Unterschieden der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse und den entsprechenden Kontrollen die Grundlage weiterer Experimente. Als Besonderheit ist dabei die Möglichkeit gegeben, die Folgen der epidermalen Deletion von ADAM10 am lebenden, adulten Tier direkt zu beobachten und in jeder gewünschten Phase genauer zu untersuchen.

4.2.3.1 Allgemeine Morphologie und Viabilität

Für die induzierbaren konditionalen epidermalen Knockout Mäuse galt es neben der *steady-state* Betrachtung der unter 4.1.3.2 genannten Parameter, auch die Kinetik der durch die Deletion von ADAM10 beeinträchtigten Homöostase zu dokumentieren. Im Gegensatz zu den ADAM10^{Epi-/-}-Mäuse (P0) und den ADAM10^{Epi-/-}(P18)-Mäusen (P18) sollten die eingesetzten Tiere zu Beginn des Experimentes phänotypisch identisch sein. Dies konnte im Zeitrahmen dieser Arbeit lediglich durch makroskopische Begutachtung der Tiere beurteilt werden. Es gab jedoch keinerlei Anzeichen, dass eines der Kontrolltiere (bis zu einem Alter von 7 Monaten – Daten nicht gezeigt) pathologische Auffälligkeiten, vergleichbar zu den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen, zeigte.

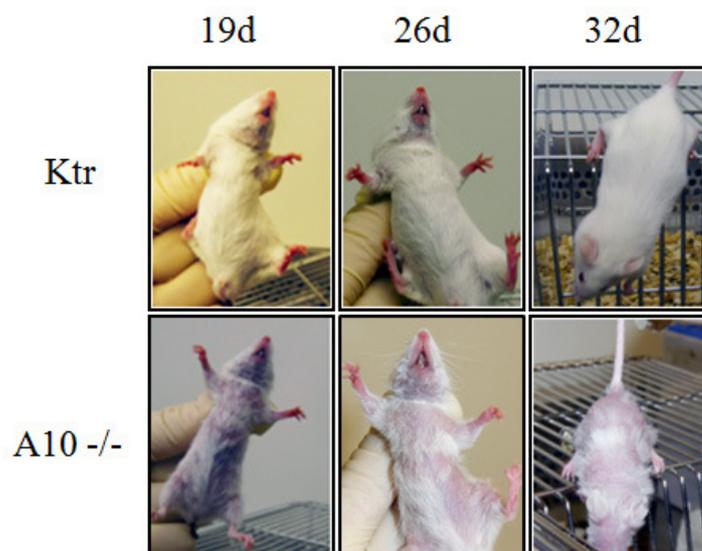


Bild 4.40: Fotografische Dokumentation des Fellverlustes von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen.

ADAM10^{Epi-induz} Mäuse wurden ab dem 21. Lebenstag (d21) auf Doxyzyklinfreiem Futter gehalten und periodisch fotografiert. Die Bilder sind repräsentativ für n=7 Mäuse je Genotyp.

Bild 4.40 zeigt den schrittweisen Haarverlust (Alopezie) der $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäuse ($A10^{-/-}$) gegenüber den entsprechenden Kontrollen (Ktr). Die Alopezie betrifft den gesamten Körperbereich der $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäuse. Da ein normaler Haarzyklus bei Mäusen 18 Tage dauert, kann davon ausgegangen werden, dass die Alopezie bleibend ist und nicht durch einen verkürzten Haarzyklus verursacht wird. Eine genauere makroskopische Betrachtung der $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäusen nach 40 Tagen (Bild 4.41 B) zeigte zudem eindeutige Zeichen von Hyperkeratosen und blutigen Läsionen, die Ähnlichkeit mit den blutigen Läsionen von Psoriasis-Patienten aufweisen (Bild 4.41).

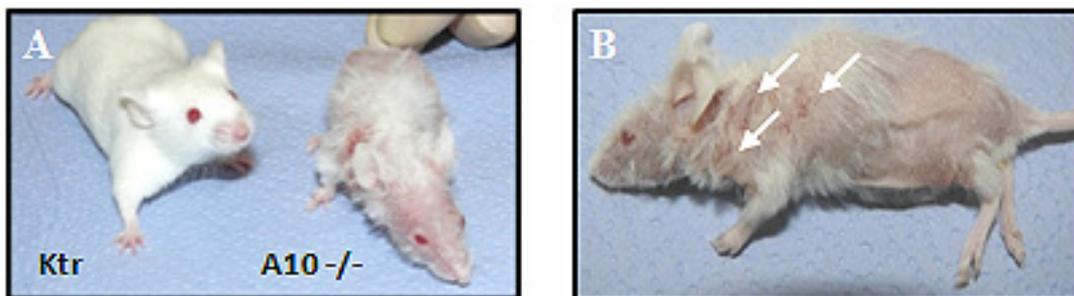


Bild 4.41: Hyperkeratose in induzierbaren epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen

Induzierbare epidermale ADAM10 Knockout Mäuse wurden nach 40 Tagen Doxyzyklin-Entzug untersucht. Die ADAM10 defiziente Maus (B) zeigt punktuell eine ausgeprägte Hyperkeratose und blutigen Läsionen. Die Bilder sind repräsentativ für $n=7$ Mäuse je Genotyp.

Da in den $ADAM10^{Epi-/-}$ (alt)-Mäusen (P18) eine Thymusatrophie und Splenomegalie gefunden wurde, wurden diese Organe auch in den $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäusen präpariert. Auch hier konnte eine starke Atrophie des Thymus bei jedoch unveränderter Größe der Milz beobachtet werden.

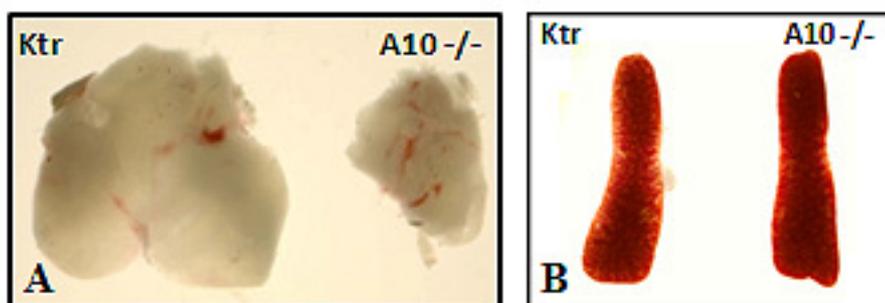


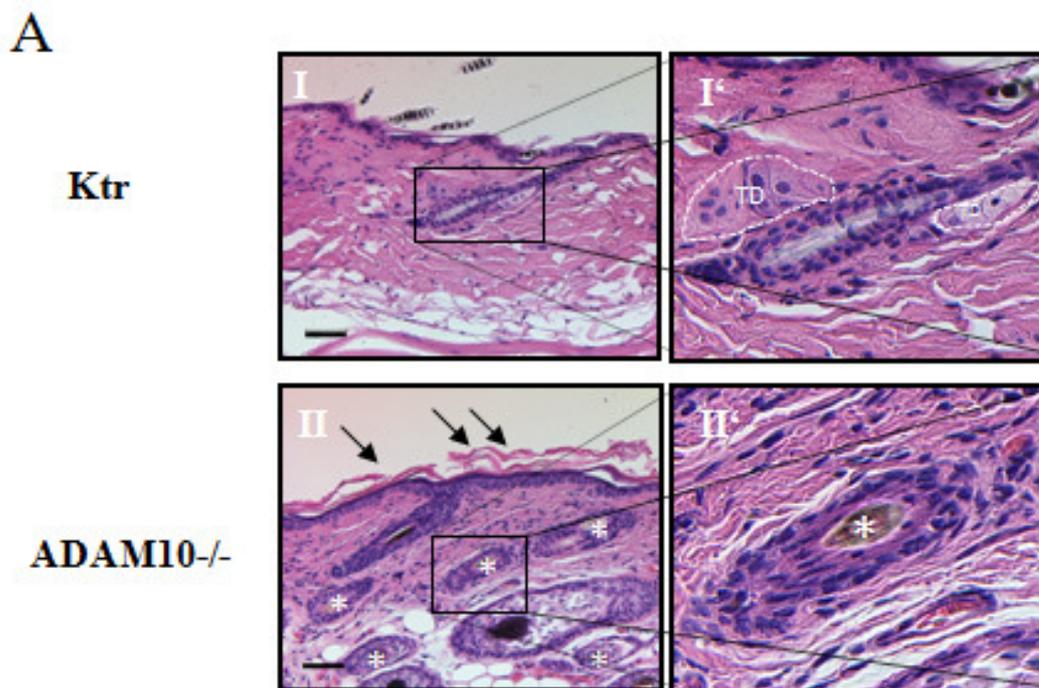
Bild 4.42: Makroskopische Aufnahme von Thymus (A) und Milz (B) mit dem Binokular

Thymus (A) und Milz (B) von $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäusen ($A10^{-/-}$) und Kontrollen (Ktr) wurden präpariert und mit einer 0,66 fachen Vergrößerung am Binokular fotografiert. Es handelt sich um ein repräsentatives Bild von $n>3$ präparierten Mäusen.

Die Betrachtung der allgemeinen Morphologie zeigt, dass ADAM10 auch in der Homöostase der Epidermis eine entscheidende Rolle spielt. Hierbei sind der bleibende Haarverlust am kompletten Körper, sowie die Hyperkeratose auf großflächigen Hautbereichen, speziell im dorsalen Bereich zu nennen.

4.2.3.2 Histologie der Rückenhaut

Anhand der Histologie der Rückenhaut sollen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede mit den bereits untersuchten $ADAM10^{Epi-/-}$ (P0) und $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18)-Mäusen ermittelt werden. Die Färbung der in Paraffin eingebetteten Proben wurde in Kooperation mit der Hämatopathologie des UK-SH Kiel, PD Dr. Klapper und der Ag Niessen (ZMMK Köln) durchgeführt.



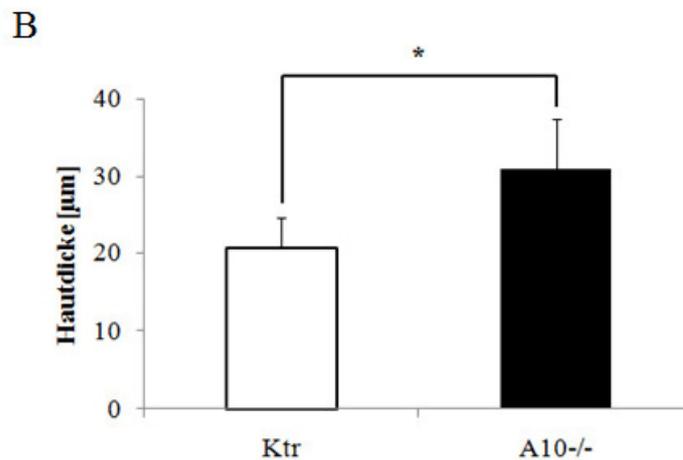


Bild 4.43: H&E Färbung (A) Quantifizierung der Dicke von Epidermis der Rückenhaut (B) von Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen

(A) Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5 μm dicke Sektionen geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gemäß des Standardprotokolls angefärbt. Schwarze Pfeile kennzeichnen Hyperkeratose, weiße Asterices deuten auf epidermale Zysten. Die Bilder (II) und (II') zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Haarfollikel, bei denen die Talgdrüsen (TD) von weißen, gestrichelten Linien umgeben und die keratinisierte, epidermale Zyste mit einem weißen Asterix gekennzeichnet ist. Die Messbalken in (I) und (II) entsprechen einer Länge von 20 μm . Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=3 Mäusen je Genotyp. (B) Es wurden je fünf Messstrecken an repräsentativen Stellen lichtmikroskopischer Aufnahmen von jeweils drei ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (A10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) mit ImageJ ausgewertet. Die Fehlerbalken wurden aus den Standardabweichungen des Mittelwertes berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: * p<0.05.

Die H&E Färbung der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse zeigt wie bei den ADAM10^{Epi-/-}(P18)-Mäusen eine Verdickung der Epidermis (Bild 4.43), mit ebenfalls deutlichen Zeichen der Hyperkeratose (durch schwarze Pfeile gekennzeichnet), sowie eine reduzierte Anzahl der Talgdrüsen (TD) bei einer ansteigenden Zahl von epidermalen Zysten (gekennzeichnet durch weiße Asterices). Auch das subkutane Fettgewebe ist in den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen an einigen Stellen stark reduziert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin kann durch die Giemsa-Färbung in den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen eine stark gesteigerte Infiltration der kompletten Haut mit Leukozyten (Bild 4.44 A', schwarze Pfeile) beobachtet werden.

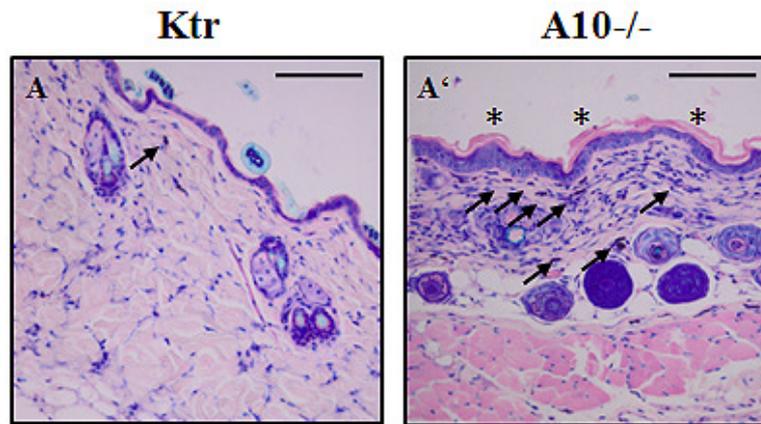


Bild 4.44: Giemsa Färbung auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von induzierbaren epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen

Rückenhautproben von $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäusen ($ADAM10^{-/-}$) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 μm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Zellen, die violett angefärbt sind, stammen aus der granulozytären Reihe der Hämatopoese. Schwarze Pfeile deuten auf die Entzündungszellen, die sich in allen Schichten der Haut befinden, schwarze Asterices zeigen Stellen mit ausgeprägter Hyperkeratose. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 μm .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäuse einen Phänotyp aufweisen, der den $ADAM10^{Epi-/-}$ (P18)-Mäusen entspricht und dementsprechend von den $ADAM10^{Epi-/-}$ (P0) Mäusen, wie schon zuvor gezeigt (4.1.3), abweicht. Die Ausprägung des Phänotyps der $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäuse war jedoch zu dem untersuchten Zeitpunkt (nach 40 Tagen Deletion von ADAM10 in der Epidermis) milder als in den $ADAM10^{Epi-/-}$ Mäusen (P18).

4.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie von Rückenhautproben

Die Immunfluoreszenz und Immunhistochemie der Rückenhautproben von $ADAM10^{Epi-induz}$ Mäusen sollte klären, ob die in der Histologie gezeigte Verdickung der Epidermis auf ein hyperproliferatives Verhalten der Basalzellen zurückzuführen ist. Weiterhin sollte versucht werden die interfollikuläre Epidermis (IFE) und die epidermalen Zysten mit Differenzierungsmarkern anzufärben und so besser zu charakterisieren. Das Einbetten, Färben und anschließende Fotografieren der Proben wurde in Kooperation mit der AG Niessen (ZMMK Köln) von der Doktorandin Michaela Niessen (Epidermale Differenzierungsmarker) und von der Hämatopathologie des UK-SH Kiel, PD Dr. Klapper (Ki-67) durchgeführt. Die Färbung der basalen Keratinozyten (Bild 4.45 A, A') zeigte eine mehrschichtige K14 Expression in der Epidermis der $ADAM10^{Epi-induz}$

Mäuse (A10^{-/-}) gegenüber der physiologisch-normalen einschichtigen Expression in den Kontrollen (Ktr). Diese Verdickung der Basalschicht trägt somit maßgeblich zur Verdickung der gesamten Epidermis bei, da Bild 4.45 B, B' und C, C' keine Veränderung des *stratum spinosum* oder des *stratum granulosum* zeigen. Die K10 Färbung schien in den Proben der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse sogar eher schwächer als in den Kontrollen zu sein.

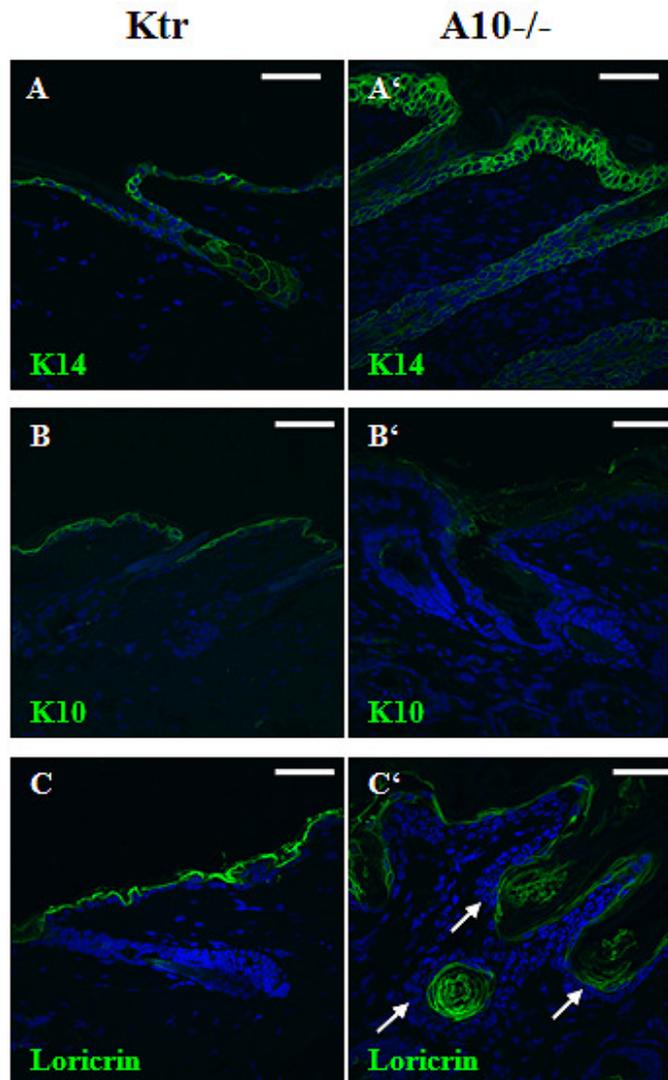


Bild 4.45: Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.13) angefärbt. Primär- und Sekundäntikörper wurden dabei in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Loricrin-positive epidermale Zysten werden im Bild C' durch weiße Pfeile angezeigt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 50 µm. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=3 Proben je Genotyp.

Nachdem die Entstehung von epidermalen Zysten in der Epidermis der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse schon in der H&E Färbung (Bild 4.43) beobachtet wurde, zeigt die Immunfluoreszenz, dass diese epidermalen Zysten eine positive Färbung mit dem Antikörper gegen den terminalen Differenzierungsmarker Loricrin (Differenzierungs-marker für das *stratum granulosum*) aufwiesen.

Die Mehrschichtigkeit der K14 positiven epidermalen Kompartimente in den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen unterstützt den Eindruck der H&E Färbung, dass die Epidermis einen hyperproliferativen Charakter aufweist. Ob dies auch tatsächlich der Fall ist, sollte durch eine immunhistochemische Färbung der Rückenhaut mit dem Proliferationsmarker Ki67 geklärt werden. Ein Vergleich der Färbungen der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse (A10^{-/-}, Bild 4.46 A^c) mit den entsprechenden Kontrollen (Ktr, Bild 4.46 A) zeigt einen drastischen Anstieg der proliferierenden Zellen in der IFE und den Haarfollikeln der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse.

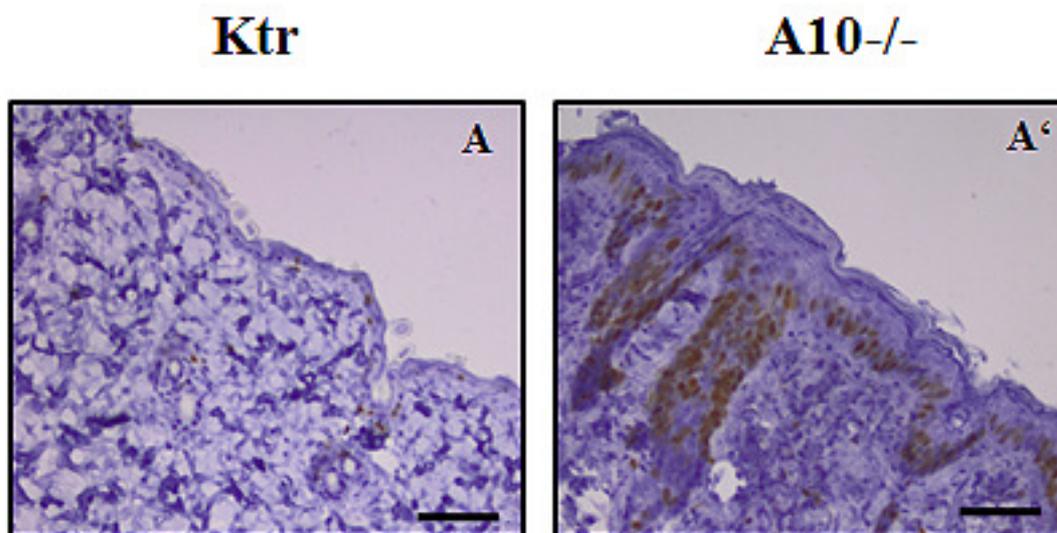


Bild 4.46: Untersuchung der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung auf Rückenhautproben von induzierbaren epidermalen Knockout Mäusen.

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (A10^{-/-}) (A^c) und Kontrollen (Ktr) (A) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls ((3.2.4.14) angefärbt. Der Primärantikörper (anti-Ki67) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100 der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Proliferierende Zellen sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

Durch eine Giemsa-Färbung konnte schon gezeigt werden, dass die Haut der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse durch eine massive Infiltration von Granulozyten gekennzeichnet ist. Da die ADAM10^{Epi-/-}(P18)-Mäuse auch eine starke Einwanderung von B-

Lymphozyten in die Haut, begleitet von einer ausgeprägten Splenomegalie, zeigten, sollten sie auch in Proben der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse untersucht werden. Obwohl die Splenomegalie nicht in den untersuchten ADAM10^{Epi-induz} Mäusen beobachtet werden konnte, zeigte sich ebenfalls eine stark erhöhte Einwanderung von B-Lymphozyten in die Haut von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (Bild 4.47 A, A').

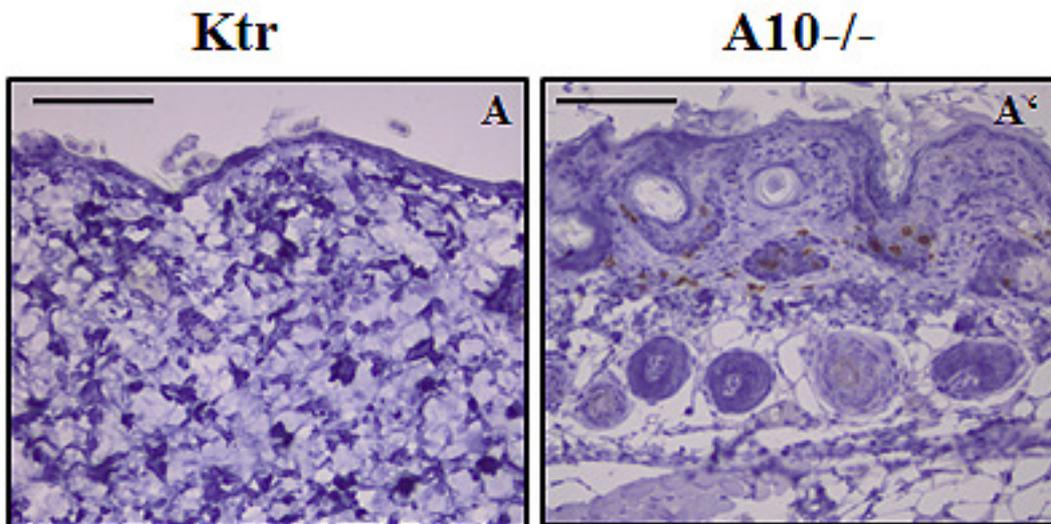


Bild 4.47: Immunhistochemische Färbung von B-Lymphozyten auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von induzierbar epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen

Rückenhautproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (P18) - (A10^{-/-}) (A') und Kontrollen (Ktr) (A) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Der Primärantikörper (anti-CD45R) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100 der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Infiltrierte B-Lymphozyten sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Epidermis der ADAM10^{Epi-induz} Mäuse einen deutlich hyperproliferative Charakteristik zu Lasten des *stratum spinosum*, sowie die Entstehung Loricrin-positiver epidermaler Zysten und eine ausgeprägte Hyperkeratose zeigt. Talgdrüsen und subkutanes Fettgewebe sind reduziert aber nicht vollständig abwesend, wie in den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen. In gleicher Weise erfolgt in den verschiedenen ADAM10 defizienten Tieren eine Einwanderung von Leukozyten.

4.3 Induzierbarer konditionaler Knockout von ADAM10 in Interferon-sensitiven Zellen des hämatopoetischen Systems

Da sich unter den verschiedenen ADAM10 Substraten auch eine Reihe von Proteinen mit immunologisch relevanten Funktionen befinden, war es von besonderem Interesse auch in Zellen des hämatopoetischen Systems einen konditionalen Knockout zu erreichen. Da im Rahmen dieser Arbeit schon erste Ergebnisse mit dem konditionalen Knockout Mäusen in der Epidermis und auch im Bereich des Zentralen Nervensystems vorlagen, die beide einen perinatalen Tod der Mäuse zur Folge hatten, wurde hierfür ein Promotor gewählt, der vorrangig in aktivierten, Interferon-sensitiven Zellen des hämatopoetischen Systems aktiv ist (Kuhn et al., 1995). Hierdurch ist eine reguläre Ausbildung des kompletten Immunsystems ohne Entwicklungsdefekte gewährleistet. Mit diesem System sollte es möglich sein, auch *in vivo* die Beteiligung von ADAM10 bei der Generierung löslicher, immunpathologischer Fragmente (sTNF- α , sCD23, sFasL, etc.) zu untersuchen.

4.3.1 Genotypisierung

Für die eindeutige Identifizierung aller gezüchteten und für Experimente verwendeten Mäuse, erfolgten eine Ohrlochmarkierung (3.2.3.6) und die PCR-basierte Genotypisierungsreaktion aus genomischer DNA von Schwanzbiopsien der Mäuse (3.2.1.5) im Alter von drei Wochen. Es wurden die gleichen PCRs wie für die Genotypisierung der unter 4.1.1 beschriebenen Mäuse verwendet und die Genotypisierung von drei Wochen alten Mäusen ergab die erwartete Mendelsche Verteilung der möglichen Genotypen.

4.3.2 Verifizierung des Knockouts von ADAM10 in Geweben des hämatopoetischen Systems

Für die induzierte Cre-Rekombinase Expression wurden die Mäuse im Alter von sechs Wochen, dreimal im Abstand von zwei Tagen mit 250 μ g pI-pC i.p. injiziert und zwei

Wochen später analysiert (ab hier ADAM10^{Mx1-Cre-induz}). Überraschenderweise zeigten auch Mäuse ohne eine Induktion des Mx1-Promotors durch die Gabe von pI-pC nach einem Zeitraum von etwa vier Monaten erste phänotypische Veränderungen. Dies waren ein glanzloses und struppiges Fell, sowie eine geringere soziale Aktivität. Etwa einen Monat später zeigten die konditionalen Tiere Hautläsionen mit partieller Alopezie und apathisches Verhalten. Eine Präparation der Mäuse zeigte eine Reihe von weiteren Phänotypen, die in Kapitel 4.3.4 beschrieben werden. Der Grund für diesen unerwarteten Phänotyp ist eine basale Transkriptionsaktivität („leakiness“) des Mx1-Promotors. Sie wird in Kapitel 5.3.2 der Diskussion ausführlich erörtert. Im Weiteren wird daher zwischen dem induzierten Knockout Mäusen und den „leaky“ Mäusen unterschieden.

4.3.3 Induktion des Knockout von ADAM10

Vorangegangene Publikationen zeigten eine unterschiedliche Deletionseffizienz durch die Aktivierung des Mx-Cre Promotors in Organen und Geweben des hämatopoetischen Systems. Aus diesem Grund sollten die hier induzierten Mäuse sowohl auf genomischer, als auch auf Gen- und Proteinexpressionsebene bezüglich ADAM10 analysiert werden. Die allgemeine Morphologie der Tiere zeigte mit Ausnahme der Leber keine Unterschiede zwischen ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäusen und den entsprechenden Kontrollen (induzierte ADAM10^{flox/flox} Mäuse oder nicht-induzierte ADAM10^{Mx1-Cre}-Mäuse). Die Lebern der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse wiesen eine ungleichmäßige Oberfläche bei normaler Größe und Farbe auf (Daten nicht gezeigt). Durchflusszytometrische Analysen der hämatopoetischen Zellen von Knochenmark, Milz, Thymus und Blut zeigten im Weiteren keine signifikanten Unterschiede in der Proportion der einzelnen Leukozytenpopulationen zueinander (Daten nicht gezeigt).

4.3.3.1 Genomische Deletion

Diese Analyse entspricht der schon unter 4.1.2.1 beschriebenen und wird hier exemplarisch für Knochenmark, Milz und Thymus dargestellt. Gleiche Ergebnisse konnten auch für Leber und Lymphknoten erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

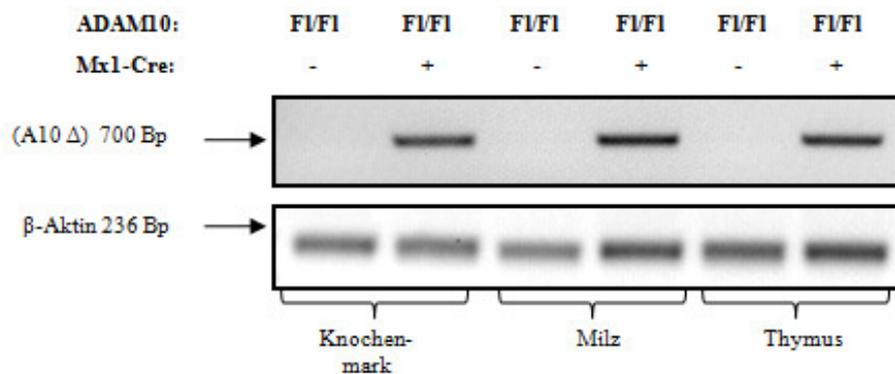


Bild 4.48: PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon2 von ADAM10 in induzierbaren ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Aus schockgefrorenen Geweben von Knochenmark, Milz und Thymus wurden nach Proteinase K Verdau genomische DNA isoliert, von der 500 ng für die ADAM10 Exon 2-Deletions-PCR eingesetzt, anschließend mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 1% Agarosegel aufgetragen wurde. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

Während die Kontrollen erwartungsgemäß keine genomischen Deletionen innerhalb des ADAM10 Genlokus aufwiesen, konnten für alle untersuchten Gewebe der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des 2. Exons und der intronisch gelegenen Hygromycin Resistenzkassette gezeigt werden.

4.3.3.2 Genexpressionsanalyse

Während die Analyse der genomischen Deletion von ADAM10 anzeigen kann, ob in dem betreffenden Gewebe Deletionen stattgefunden haben, können mit dieser Methode kaum Aussagen über die Effizienz der Deletion getroffen werden. Durch eine semiquantitative RT-PCR kann im Folgenden abgeschätzt werden, wie stark die Verringerung der Genexpression ausfällt. Starke Unterschiede können mit dieser Methode zuverlässig identifiziert werden, während kleinere Unterschiede oder genaue Quantifizierung der mRNA einer anderen Technik, z.B. der Real-Time PCR bedürfen. Das Bild 4.3.3.2 zeigt die beispielhafte RT-PCR Analyse der ADAM10 Genexpression in den beiden Organen Leber und Milz der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse und den entsprechenden Kontrollen.

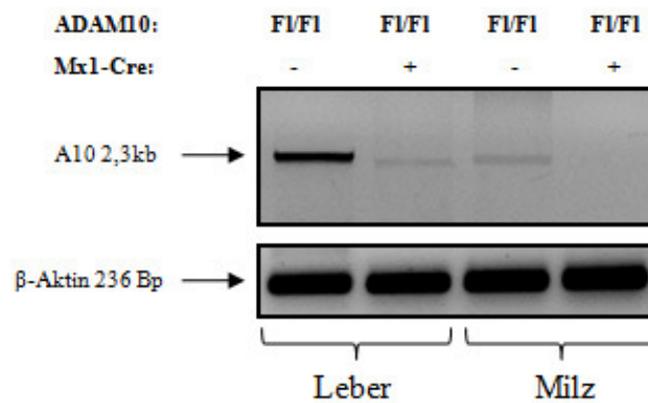


Bild 4.49: RT-PCR Analyse zur Detektion der ADAM10 (A10) mRNA Expression in der Leber und der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Aus schockgefrorenen Geweben der Leber und der Milz wurde die Gesamt mRNA durch Isolation mit dem RNAII Kit von Macherey-Nagel gewonnen und hiervon 2 µg für die ADAM10 RT-PCR eingesetzt. 500ng der hieraus erhaltenen cDNA wurden mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromidhaltiges 1% Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

Die Analyse zeigt die eindeutige Reduktion der ADAM10 mRNA Expression sowohl in der Leber als auch in der Milz der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse. Unerwarteter Weise scheint die ADAM10 Genexpression, normalisiert auf die β-Aktin Kontrolle, in der Leber wesentlich stärker als in der Milz zu sein. Zur Absicherung dieser Vermutung ist jedoch eine Quantifizierung der mRNA Expression über Northern Blot, *RNase protection assays* oder Real-Time PCR notwendig.

4.3.3.3 Proteinexpressionsanalyse

Da es eine Reihe von verschiedenen posttranskriptionalen Regulationsmechanismen gibt, besteht die Notwendigkeit die untersuchten Proben mit einer unterschiedlichen ADAM10 mRNA Genexpressionsrate auch auf die entsprechenden Proteinexpressionsraten zu überprüfen. Dies wurde für Milz, Leber und Knochenmark durchgeführt und die Ergebnisse hiervon sind in dem Bild 4.50 zu sehen.

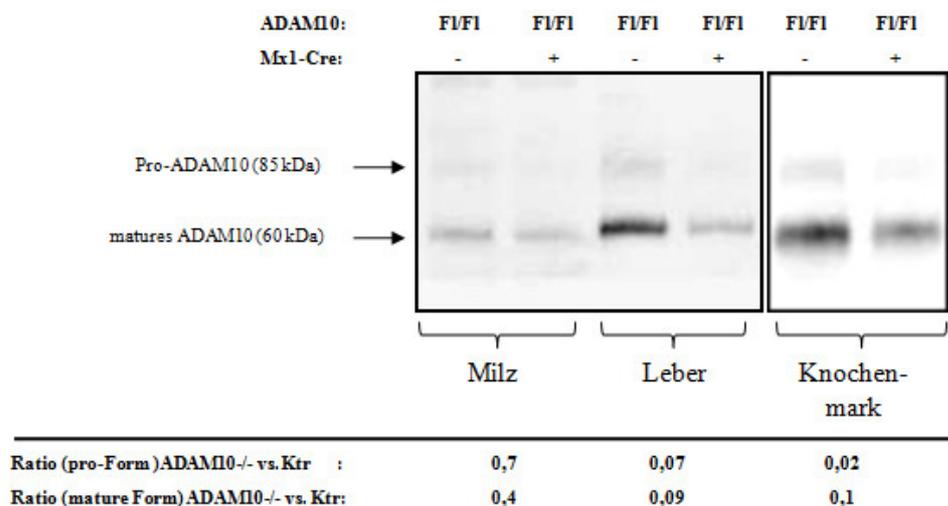


Bild 4.50: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM10 in der murinen Milz, Leber und dem Knochenmark induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Die schockgefrorenen Gewebe der Milz, Leber und des Knochenmarks wurden mit ADAM10 Lysispuffer homogenisiert, die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen Serum B42.1 gegen ADAM10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1 h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert und mit ECL advanced detektiert. Die densitometrische Analyse wurde mit der ImageJ Software durchgeführt. Dies ist ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Während in der Milz nur eine geringe Reduktion der ADAM10 Proteinexpression detektiert wurde, zeigten Leber und Knochenmark der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse maximal 1/10 der ADAM10 Expression der entsprechenden Kontrollen. Weiterhin ist eine stärkere Reduktion der inaktiven Proform gegenüber der aktiven maturen Form zu sehen. Ein Effekt der auch schon in vorangegangenen zellbasierten Experimenten mit siRNA gegen ADAM10 beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.3.3.4 Substratanalyse – Shedding des niedrig-affinen IgE-Rezeptors CD23 *in vivo*

Der niedrig-affine IgE Rezeptor wurde im Vorfeld dieser Arbeit als potenzielles ADAM10 Substrat durch zellbasierte Experimente mit murinen embryonalen Fibroblasten (Weskamp et al., 2006) und primären humanen Lymphozyten identifiziert. Bis zum heutigen Beginn dieser Arbeit konnten diese Versuche nicht *in vivo* bestätigt werden, da der klassische ADAM10 Knockout embryonal letal ist (Hartmann et al., 2002) und an E9.5 noch keine reifen B-Lymphozyten zur Analyse zur Verfügung

stehen. Daher wurden die folliculären B-Lymphozyten der Milz und die rezirkulierenden B-Lymphozyten im Blut, welche die höchste CD23 Expression aller B-Lymphozytenpopulationen aufweisen, auf ihre durchschnittliche CD23-Oberflächenexpression untersucht.

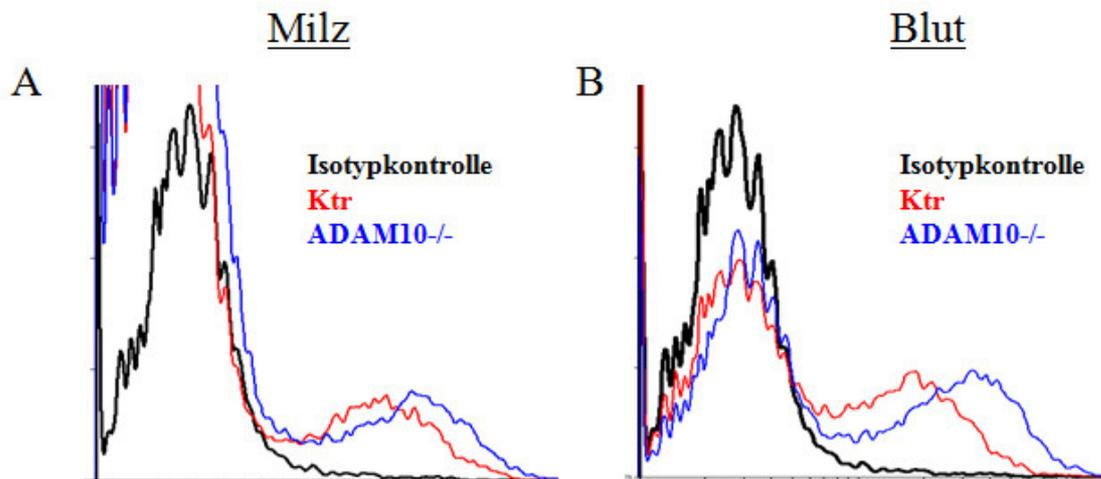


Bild 4.51: Analyse der CD23-Oberflächenexpression auf B-Lymphozyten der Milz (A) und des Blutes (B)

Zur Analyse der CD23-Oberflächenexpression von B-Lymphozyten der Milz (A) und des Blutes (B) wurden jeweils 5×10^5 Zellen von $ADAM10^{Mx1-leaky}$ ($A10^{-/-}$) Mäusen und Kontrollen (Ktr) zunächst 30 min mit einer Mischung aus unmarkierten α -CD16/32 Antikörpern zur Absättigung der murinen Fc-Rezeptoren inkubiert und anschließend 1 h, bei 4°C und im Dunkeln mit folgenden Antikörpern (Verdünnung 1:100 für alle genannten Antikörper) gefärbt: α -CD45R-APC, α -CD21-Pe und α -CD23-FITC. Die Bestimmung der CD23-Oberflächenexpression lebender Zellen erfolgte nach Ausschluss Propidiumiodid-positiver und Analyse der CD45R-positiven Zellen am Durchflusszytometer. Es wurden jeweils $n=3$ Mäuse je Genotyp verwendet.

Die Analyse der Daten konnte ADAM10 auch *in vivo* als Sheddase von CD23 identifizieren. Trotz der relativ ineffizienten Deletion von ADAM10 in der Milz (s. Bild 4.50) zeigten die folliculären B-Lymphozyten der $ADAM10^{Mx1-Cre-induz}$ Mäuse eine etwa 40% höhere, die rezirkulierenden B-Lymphozyten des Blutes der $ADAM10^{Mx1-Cre-induz}$ Mäuse eine sogar 60% höhere mittlere Oberflächenexpression von CD23 als die entsprechenden Kontrollen.

4.3.3.5 Kultivierung von primären Makrophagen des Knochenmarks

Da aus den unter 4.3.3.3 gezeigten Ergebnissen die stärkste Reduktion der ADAM10 Proteinexpression in den Geweben des Knochenmarks nachgewiesen werden konnte, sollten in einem ersten Schritt primäre Makrophagenvorläufer aus dem Knochenmark isoliert und *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert werden. Sowohl die

Makrophagenvorläuferzellen der $ADAM10^{Mx1-Cre-induz}$ Mäuse als auch die der entsprechenden Kontrollen zeigten innerhalb von 24h eine deutliche Adhärenz. Weiterhin konnten nach etwa 72h für beide Proben die Differenzierung der Makrophagenvorläuferzellen zu reifen Makrophagen mit charakteristischen Ausläufern (Bild 4.52 A) beobachtet werden.

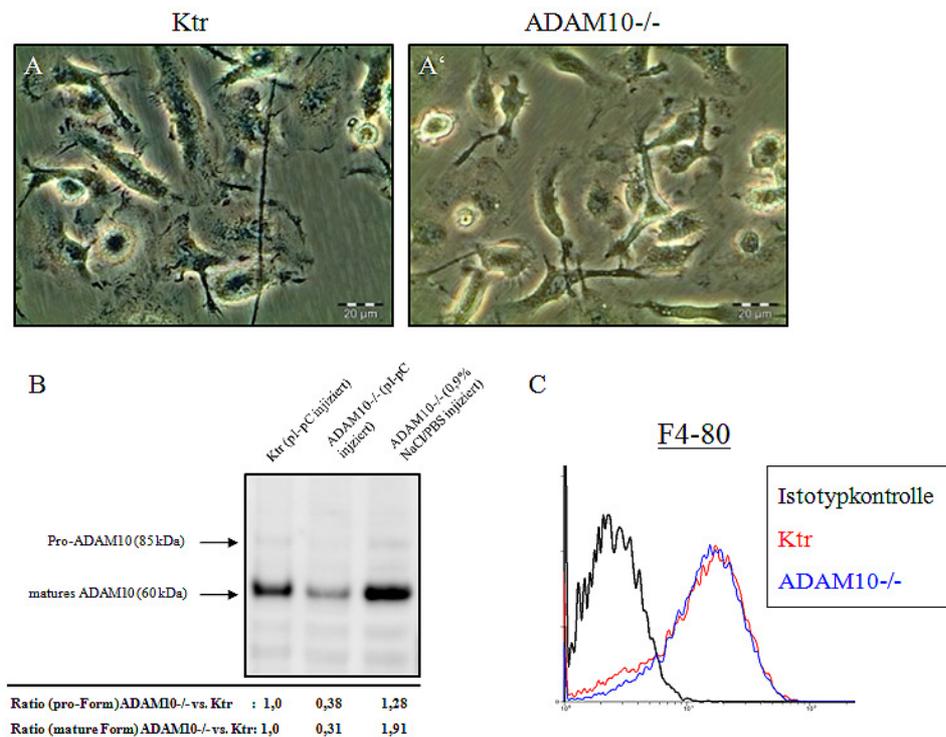


Bild 4.52: Kultur und Differenzierung von Makrophagenvorläuferzellen des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Femur und Tibiae wurden mit PBS gespült und die ausgewaschenen Zellen vereinzelt, gezählt und mit einer Gesamtzellzahl von 2×10^7 Zellen auf eine Petrischale ausgesät. Die Differenzierung der Makrophagenvorläuferzellen erfolgte durch Zugabe von M-CSF (20 ng/ml) zum Makrophagenmedium. (A) Nach sieben Tagen wurde ein repräsentatives Phasenkontrastbild der ausdifferenzierten Makrophagen der $ADAM10^{Mx1-Cre-induz}$ Mäusen ($ADAM10^{-/-}$) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) am Lichtmikroskop aufgenommen. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 20 μ m. (B) Nach sieben Tagen wurden die adhärennten Makrophagen geerntet und mit ADAM10 Lysis-puffer lysiert. Die Proteinlysate (20 μ g) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran 1 h lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen Serum B42.1 gegen ADAM10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1 h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert und mit ECL advanced detektiert. Als Kontrollen neben der $ADAM10^{Mx1-Cre-induz}$ Maus ($ADAM10^{-/-}$ pI-pC injiziert) wurden pI-pC injizierte Kontrollen (Ktr) und 0,9% NaCl/PBS-injizierte $ADAM10^{Mx1-Cre}$ Mäuse verwendet. (C) Die Makrophagen wurden durch Accutase von der Petrischale gelöst und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Sowohl die $ADAM10^{Mx1-Cre-induz}$ Mäuse ($ADAM10^{-/-}$) als auch die entsprechenden Kontrollen (Ktr) zeigten einen >95% Anteil von F4/80 positiven Zellen. Die densitometrische Analyse wurde mit der ImageJ Software durchgeführt. Alle Versuche wurden mit n=2 Mäuse je Genotyp bzw. Injektionslösung durchgeführt.

Nach weiteren vier Tagen exprimierten mehr als 95% aller Zellen der Kontroll- und der induzierten Knockout Mäuse das F4/80 Antigen reifer Makrophagen auf ihrer Oberfläche. Die zeitgleich durchgeführte Proteinexpressions-analyse zeigte hingegen nur für die ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse eine etwa 150%ige (pI-pC injizierte Ktr Mäuse) bzw. 200%ige (0,9% NaCl/PBs injizierte ADAM10^{Mx1-Cre} Mäuse) Abnahme der ADAM10 Proteinexpression gegenüber den Kontrollen.

Neben dem induzierten ADAM10 Proteinexpressionsunterschied, konnten nach etwa neun Tagen Kultivierungsdauer auch phänotypische Unterschiede zwischen den Makrophagen der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse und den entsprechenden Kontrollen beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Ablösung der ADAM10 defizienten Makrophagen von der Zellkulturschale, die bei den Kontrollen auch nach elf Tage noch nicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Alle durchgeführten Experimente konnten somit zeigen, dass die Injektion von pI-pC in den ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der ADAM10 Proteinexpression in den untersuchten Zellen führte und damit ein geeignetes Zellkultursystem zur Analyse der Funktion von ADAM10 in primären Makrophagen darstellt. Dabei zeigten sich bis zu einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen vergleichbare Eigenschaften im Bezug auf Adhärenz und Morphologie.

Die weitere Analyse der induzierten ADAM10 Knockout Mäuse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Lionel Ivashkiv (HSS, New York) begonnen und ist aufgrund der noch nicht vollständig reproduzierten Ergebnisse kein Bestandteil dieser Arbeit. Durch persönliche Kommunikation mit Xiaoyu Hu (Ag Ivashkiv) konnte jedoch eine wichtige Bedeutung von ADAM10 bei der Kreuzkommunikation des Notch- und des Toll-like Rezeptor (TLR) Signalwegs in präliminären Experimenten mit primären ADAM10 defizienten Makrophagen gezeigt werden.

4.3.4 Beschreibung des Phänotyps der ADAM10 „leaky“ Mäuse

Alle im Folgenden gezeigten Ergebnisse wurde mit fünf Monate alten „leaky“ ADAM10 Knockout Mäusen (ab hier ADAM10^{Mx1-leaky}) und den entsprechenden Kontrollen (Wurfgeschwister) generiert. Da mehrere Gewebe einen deutlichen Phänotyp aufwiesen, wurden alle Ergebnisse der Analyse aus Gründen der Übersicht-

lichkeit in Bezugnahme auf die untersuchten Organe gegliedert. Dabei wurden die beiden primären lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus, die größten sekundären Organe Milz und Lymphknoten, die Leber als fakultativ blutbildendes Organ und die Haut als primäre immunologische Barriere gegen mikrobielle und virale Invasionen untersucht. Abschließend erfolgte die Analyse des Blutes, da dies den einzigen Verbindungsweg zwischen allen untersuchten Organen darstellt.

4.3.4.1 Analyse des Knochenmarks

Das Knochenmark ist der primäre Ort der Hämatopoese der Maus. Hier werden alle verschiedenen roten und weißen Blutkörperchen gebildet, bevor sie zur endgültigen Reifung in den Thymus (nur die Thymozyten) bzw. die peripheren, immunologisch relevanten Gewebe wandern. Daher können pathophysiologische Situationen in diesem Gewebe zu Beeinträchtigung weiter Teile des hämatopoetischen Systems und der angeschlossenen Organe führen.

Allgemeine Morphologie

Schon bei der Präparation des Knochenmarks fiel der geringe Anteil von Erythrozyten im Zellpellet der ausgespülten und zentrifugierten Knochenmarkszellen der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse auf.

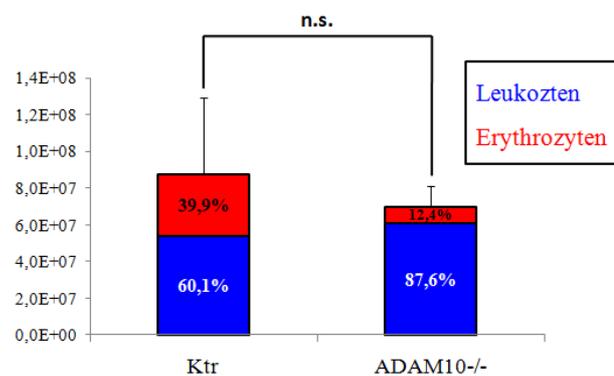


Bild 4.53: Bestimmung der Gesamtzellzahl des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem automatischen CASY® Zellzählgerät

Die Zellkonzentration eines vergleichbaren Aliquots der isolierten Zellsuspension des Knochenmarks von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden in einem definierten Volumen physiologischen Puffers (CASY-Ton®) aufgenommen und mit dem Casy® Zellzählgerät bestimmt. Durch Verrechnung mit dem Gesamtvolumen der Einzelzellsuspensionen erfolgte die Ermittlung der Gesamtzellzahl. Für jeden Genotyp wurden die Knochenmarkszellen von n=3 Mäuse gezählt und durch ein repräsentatives Beispiel von n=3 Experimenten dargestellt.

Zudem wirkten die Knochen spröde und splitterten leichter bei der Präparation, als die Knochen der entsprechenden Kontrollen. Diese anfänglichen Beobachtungen bestätigten sich durch den Vergleich der Zellularität des Knochenmarks vor und nach der Erythrozytenlyse.

Während die Gesamtzellularität des Knochenmarks der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse und den entsprechenden Kontrollen nicht signifikant verändert war, betrug der Erythrozytenanteil im Knochenmark der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse nur knapp 1/3 des normalen Wertes. Da mit diesem Experiment nicht ermittelt werden kann, welchen Reifegrad die fehlenden Erythrozyten aufweisen und welche Leukozytenpopulation im Gegensatz hierzu erhöht ist, wurden die Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks durchflusszytometrisch untersucht.

Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks bestimmt. Dabei wurde in einem Ansatz die genaue Aufteilung der Lymphozyten und myeloiden Leukozyten nach einer Erythrozyten-Lyse der Knochenmarkszellen bestimmt, und in einem zweiten Ansatz auch der Anteil und der Reifegrad von Erythrozyten gegenüber den Leukozyten der Milz ermittelt.

Die Analyse des Knochenmarks (Bild 4.54) zeigte eine signifikante Reduktion nahezu aller Zellpopulation, außer den reifen Erythrozyten und den Makrophagen. Während die Zellpopulationen der reifen (rezirkulierende) und unreifen B-Zellen etwa um die Hälfte reduziert waren, konnten im Knochenmark der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse nur noch knapp 1/7 der unreifen Erythrozyten von Kontrollmäusen detektiert werden. Durch die etwa gleichbleibende Zahl an reifen, vermutlich rezirkulierenden Erythrozyten des Blutstroms zeigte sich bei der Gesamtzellularität der roten Blutkörperchen (Bild 4.53) lediglich ein Verlust von 2/3 der Population im Knochenmark der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse.

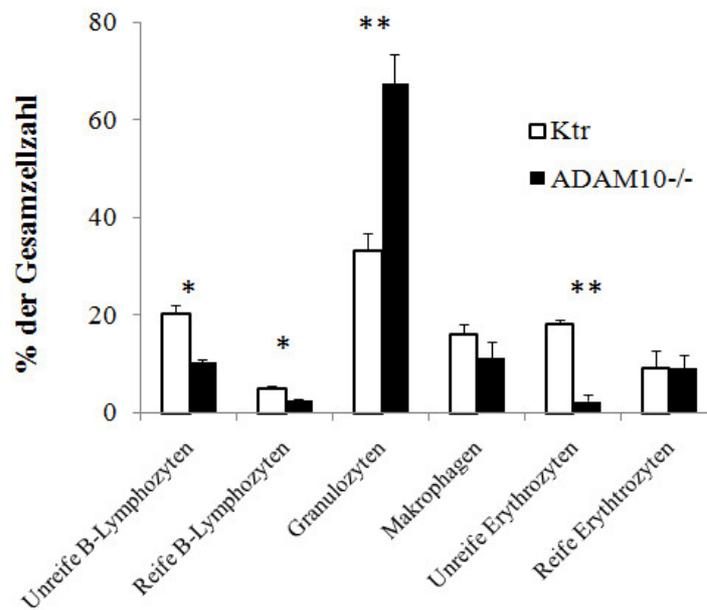


Bild 4.54: Durchflusszytometrie von Zellen des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung des Knochenmarks von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden jeweils 5×10^5 Zellen zunächst 30 min mit einer Mischung aus unmarkierten α -CD16/32 Antikörpern zur Absättigung der murinen Fc-Rezeptoren inkubiert und anschließend 1 h, bei 4°C und im Dunkeln mit folgenden Antikörpern (Verdünnung 1:100 für alle genannte Antikörper) gefärbt: α -CD45R-APC, α -CD21-Pe und α -CD23-FITC zur Bestimmung von reifen und unreifen B-Lymphozyten; α -F4/80-APC, α -CD11b-Pe und α -Ly6g-FITC zur Bestimmung von Makrophagen, Granulozyten und Neutrophilen α -Ter119-Pe und α -CD71-FITC. Als unspezifische Bindungskontrolle der Fc-Portionen der verwendeten Antikörper an endogene Fc-Rezeptoren der untersuchten Zellen wurden isotypspezifische Kontrollantikörper verwendet. Die Analyse der Oberflächenexpression lebender Zellen erfolgte nach Ausschluss Propidiumiodid-positiver Zellen am Durchflusszytometer. Es wurden jeweils n=3 Mäuse je Genotyp verwendet und das dargestellte Ergebnis zeigt ein repräsentatives Bild von n=3 Experimenten.

Als einzige Zellpopulation wiesen die CD11b positiven Granulozyten einen mehr als 2-fachen Anstieg im Bezug auf den Anteil an der Gesamtzellularität des Knochenmarks auf.

Proteinexpressionsanalyse

Aus vorangegangenen Publikationen war bekannt, dass die Mx1-Cre vermittelte Deletion von Proteinen besonders effizient in Zellen des Knochenmarks funktioniert. Dies konnte u.a. auch für ein induzierbar konditionales Mausmodell der Metalloprotease ADAM17 gezeigt werden (Horiuchi et al., 2007). Daher wurde zunächst das Knochenmark der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse untersucht.

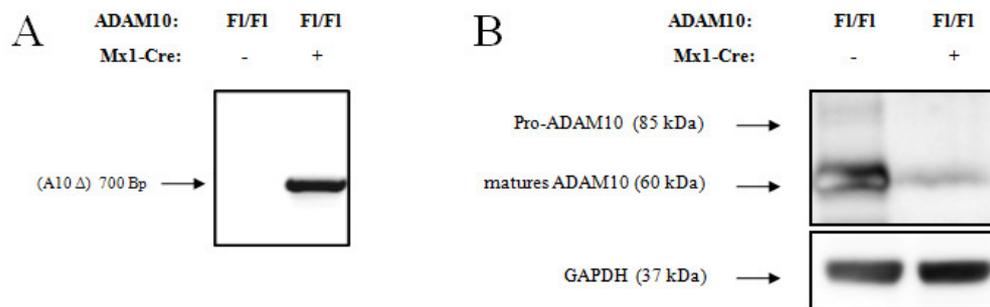


Bild 4.55: Analyse der genomischen (A) und proteomischen (B) ADAM10 Deletion im Knochenmark induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

(A) Aus den Einzelzellsuspensionen von Erythrozytenfreien Knochenmarkszellen wurde genomische DNA isoliert, von der 500 ng für die ADAM10 Exon 2-Deletions-PCR eingesetzt, anschließend mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromid-haltiges 1% Agarosegel aufgetragen wurde. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert. (B) Die Einzelzellsuspensionen von Erythrozytenfreien Knochenmarkszellen wurden mit ADAM10 Lysispuffer homogenisiert, die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen Serum B42.1 gegen ADAM10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (1:1000) und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert. Beide Teile des Blots werden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Der gezeigte Blot ist ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Analyse der genomischen, sowie der proteomischen Deletion konnten diese Vorkenntnisse absolut bestätigen. So konnten in den Proteinlysaten des Knochenmarks von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen nur noch äußerst schwache Signale durch Bindung des ADAM10 Antikörpers erhalten werden. Obwohl die wichtige histologische Beurteilung des Knochenmarks noch nicht durchgeführt werden konnte, konnten allein aus der allgemeinen Morphologie und der durchflusszytometrischen Analyse essentielle Daten für die Beschreibung des vorliegenden Phänotyps gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse eine massive Expansion von Zellen der myeloiden Differenzierungsreihe vorlag, die zu einer Verdrängung bzw. Reduktion fast aller weiteren Zellpopulationen des Knochenmarks, im Besonderen der unreifen Erythrozyten führte. Weiterhin konnte in diesem Gewebe eine starke Reduktion der ADAM10 Proteinexpression nachgewiesen werden, was auf eine besonders starke Aktivität des Mx1-Promotors in den Zellen des Knochenmarks schließen lässt.

4.3.4.2 Analyse des Thymus

Die Analyse des Thymus im Bezug auf allgemeine Morphologie, Histologie und Oberflächenexpression erfolgte gemäß den bereits beschriebenen Organen. Abgesehen, von einer durchschnittlich 60% geringeren Gesamtzellularität konnten keine signifikanten Unterschiede der Thymi von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen und den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden. Dabei wurden im Rahmen der Durchflusszytometrie Oberflächenfärbungen zur Detektion von reifen und unreifen B-Lymphozyten, unreifen und reifen Thymozyten, verschiedenen Granulozytenpopulationen sowie NK-Zellen durchgeführt. Die histologische Färbung (H&E Färbung) der Thymi zeigte bisher keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Knockout und Kontrollen, allerdings müssen hier noch weitere Färbungen im Bezug auf die Verteilung von B- und T-Zellen und das proliferative Potenzial der vorliegenden Zellen erfolgen.

4.3.4.3 Analyse der Milz und Lymphknoten

Die wichtigsten peripheren (sekundären) lymphatischen Organe für die Reifung und Aktivierung von B-Lymphozyten und der damit verbundenen humoralen Immunantwort stellen die Milz und die Lymphknoten dar. Daher wurden sie als erstes auf ihre allgemeine Morphologie, ihre zelluläre Zusammensetzung und die Lokalisation dieser Zellpopulationen innerhalb des Organes untersucht.

Allgemeine Morphologie

Die Präparation der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse zeigte eine starke Splenomegalie und Lymphadenopathie, die sich mit fortschreitendem Alter der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse verstärkte (Bild 4.56).

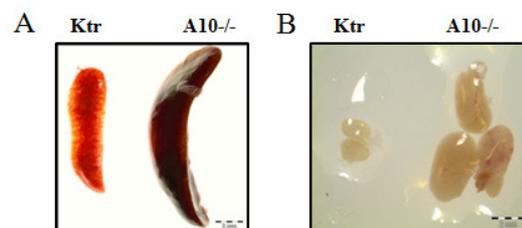


Bild 4.56: Makroskopische Aufnahme von Milz (A) und Lymphknoten (B) induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem Binokular

Milz (A) und Lymphknoten (B) von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10-/-) und Kontrollen (Ktr) wurden präpariert und mit einer 0,66 fachen Vergrößerung am Binokular fotografiert. Es handelt sich um ein repräsentatives Bild von n>15 präparierten Mäusen. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 2 mm.

Im Weiteren wurde die Gesamtzellularität der Milz und der Lymphknoten nach Vereinzelung durch ein entsprechendes Zellsieb bestimmt. Dies gab zusätzlich zu der reinen morphologischen Betrachtung von Größe und Gewicht auch einen ersten Eindruck von der proliferativen Kapazität der untersuchten Gewebe. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden für die Analyse der Lymphknoten jeweils die beiden größten Lymphknoten der Beine verwendet.

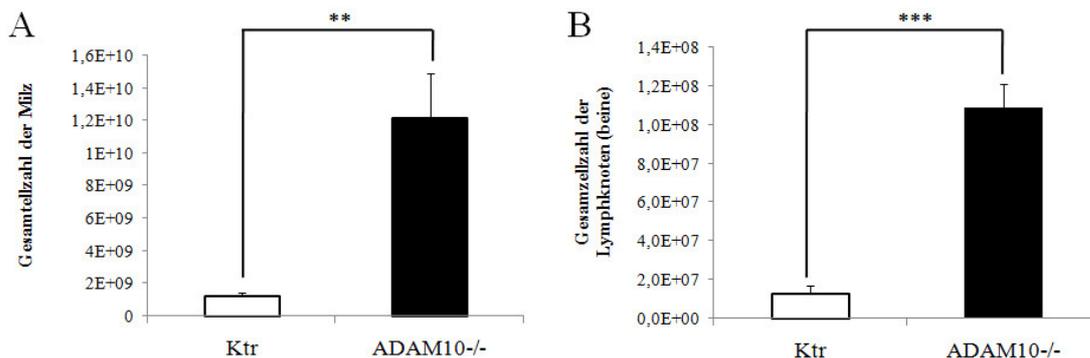


Bild 4.57: Bestimmung der Gesamtzellzahl von Milz (A) und Lymphknoten induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem automatischen CASY® Zellzählgerät

Die Zellkonzentration eines vergleichbaren Aliquots der isolierten Zellsuspension der Milz (A) und Lymphknoten (B) von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden in einem definierten Volumen physiologischen Puffers (CASY-Ton®) aufgenommen und mit dem Casy® Zellzählgerät bestimmt. Durch Verrechnung mit dem Gesamtvolumen der Einzelzellsuspensionen erfolgte die Ermittlung der Gesamtzellzahl. Für jeden Genotyp wurden n=3 Organe vermessen und ist ein repräsentatives Beispiel von n=3 Experimenten.

Während die Milz und die Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse im Schnitt das fünf- bis Zehnfache der Organe der entsprechenden Kontrollen wogen, ist auch die Zellularität beider Organe in etwa um den Faktor 10 gesteigert. Dies wies auf eine starke Zunahme der Population kleiner und leichter Zellen, z.B. Erythrozyten oder unreifer Leukozyten, hin. Zum Beweis dieser Vermutung wurden die Einzelzellsuspensionen der Organe durchflusszytometrisch auf ihre zelluläre Zusammensetzung und zusätzlich durchgeführte Gewebeschnitte histologisch untersucht.

Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die zelluläre Zusammensetzung der Milz und der Lymphknoten bestimmt. Dabei wurde in einem Ansatz die genaue Aufteilung der Lymphozyten und myeloiden Leukozyten nach einer Erythrozyten-Lyse der Milz und der Lymphknoten bestimmt und in einem zweiten Ansatz auch der Anteil und der Reifegrad von Erythrozyten gegenüber den Leukozyten der Milz ermittelt.

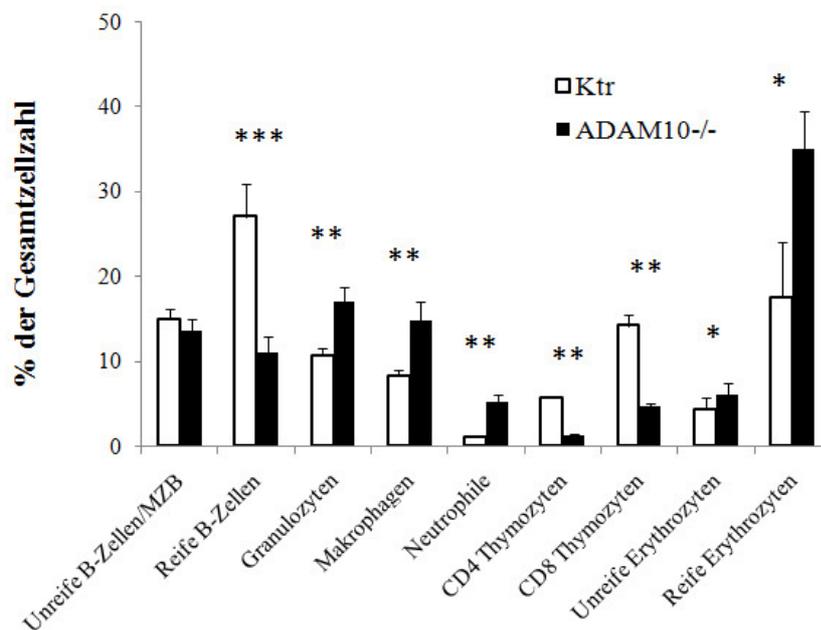


Bild 4.58: Durchflusszytometrie von Leukozyten und Erythrozyten der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Milz wurden jeweils 5×10^5 Splenozyten von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) zunächst 30min mit einer Mischung aus unmarkierten α -CD16/32 Antikörpern zur Absättigung der murinen Fc-Rezeptoren inkubiert und anschließend 1h, bei 4°C und im Dunkeln mit folgenden Antikörpern (Verdünnung 1:100 für alle genannte Antikörper) gefärbt: α -CD45R-APC, α -CD21-Pe und α -CD23-FITC zur Bestimmung von unreifen, Marginalzonen-B-Zellen (MZB) und reifen B-Lymphozyten; α -CD8a-APC, α -CD4-Pe und α -CD3e-FITC zur Bestimmung der verschiedenen Thymozytenpopulationen; α -F4/80-APC, α -CD11b-Pe und α -Ly6g-FITC zur Bestimmung von Makrophagen, Granulozyten und Neutrophilen und α -Ter119-Pe und α -CD71-FITC zur Unterscheidung von reifen und unreifen Erythrozyten. Als unspezifische Bindungskontrolle der Fc-Portionen der verwendeten Antikörper an endogene Fc-Rezeptoren der untersuchten Zellen wurden isotypspezifische Kontrollantikörper verwendet. Die Analyse der Oberflächenexpression lebender Zellen erfolgte nach Ausschluss Propidiumiodid-positiver Zellen am Durchflusszytometer. Es wurden jeweils n=3 Mäuse je Genotyp verwendet und das dargestellte Ergebnis zeigt ein repräsentatives Bild von n=3 Experimenten.

Die Analyse der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse zeigte eine deutliche Expansion der myeloiden Leukozyten auf Kosten der Lymphozyten. So wuchs der Anteil der Cd11b positiven Granulozyten um durchschnittlich 60%, der Anteil F4/80 positiver Makrophagen um durchschnittlich 77% und die Anzahl der Ly-6g positiven Neutrophilen stieg im Mittel sogar um 250% gegenüber den Kontrollen. Auch die unreifen (~ +40%) und die reifen Erythrozyten (~ +100%) waren in der Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse deutlich erhöht. Demgegenüber zeigten alle Lymphozytenpopulationen in der Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse, mit Ausnahme der unreifen B-Lymphozyten/MZB, eine vergleichbare Reduktion im Bezug auf die Populationsgrößen in den entsprechenden Kontrollen. Diese Tendenz konnte auch für die sehr kleine und daher nicht abgebildete Population der NK-Zellen beobachtet

werden. Im Gegensatz zur Milz übernehmen die Lymphknoten auch in pathologischen Situationen keine Aufgabe bei der Bildung, Speicherung und Abbau des Blutes. Daher erfolgten hier lediglich die Analyse der zellulären Zusammensetzung der Leukozyten.

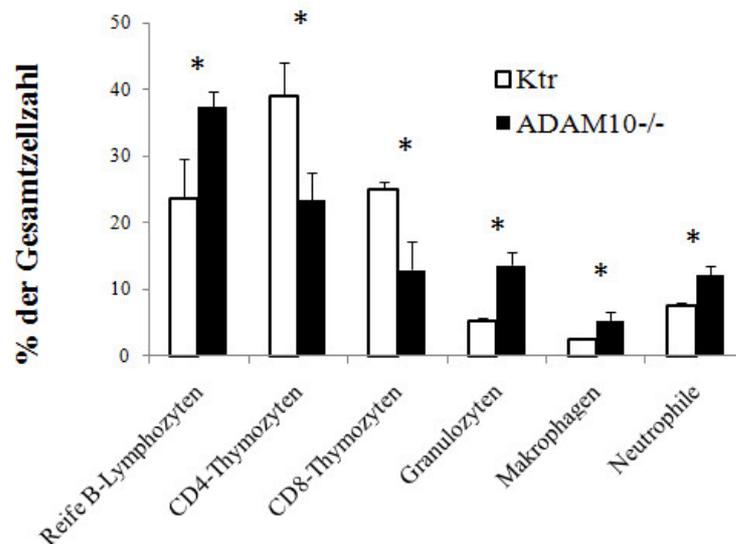


Bild 4.59: Durchflusszytometrie von Leukozyten in den Lymphknoten der Beine induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Lymphknoten von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden jeweils 5×10^5 Zellen zunächst 30 min mit einer Mischung aus unmarkierten α -CD16/32 Antikörpern zur Absättigung der murinen Fc-Rezeptoren inkubiert und anschließend 1h, bei 4°C und im Dunkeln mit folgenden Antikörpern (Verdünnung 1:100 für alle genannte Antikörper) gefärbt: α -CD45R-APC, α -CD21-Pe und α -CD23-FITC zur Bestimmung von B-Lymphozyten; α -CD8a-APC, α -CD4-Pe und α -CD3e-FITC zur Bestimmung der verschiedenen Thymozytenpopulationen und α -F4/80-APC, α -CD11b-Pe und α -Ly6g-FITC zur Bestimmung von Makrophagen, Granulozyten und Neutrophilen. Als unspezifische Bindungskontrolle der Fc-Portionen der verwendeten Antikörper an endogene Fc-Rezeptoren der untersuchten Zellen wurden isotypspezifische Kontrollantikörper verwendet. Die Analyse der Oberflächenexpression lebender Zellen erfolgte nach Ausschluss Propidiumiodid-positiver Zellen am Durchflusszytometer. Es wurden jeweils n=3 Mäuse je Genotyp verwendet.

Die untersuchten Lymphknoten wiesen genau wie die Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse signifikante Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung auf. So waren die Populationsgrößen von Granulozyten (~ +160%), Makrophagen (~ +115%) und Neutrophilen (~ +65%) erhöht und die von CD4- (~ -40%) und CD8-Thymozyten (-93%) gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Eine nicht erwartete Abweichung zeigte die Populationsgröße der reifen B-Lymphozyten, die in den Lymphknoten im Gegensatz zur Milz von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen signifikant erhöht war.

Histologie

Während die Durchflusszytometrie eine quantitative Auskunft über die zelluläre Zusammensetzung gibt, kann sie keine qualitative Aussage über die Architektur oder

die Lokalisation bestimmter Zellpopulationen in den untersuchten Organen treffen. Weiterhin werden durch die Durchflusszytometrie in der Regel nur oberflächenassoziierte Proteinantigene detektiert und quantifiziert, während die Analyse anderer Zellbestandteile, wie Fette oder Kohlehydraten nicht möglich ist. Daher wurden die zu untersuchenden Organe in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit verschiedenen Markern immunbiologisch oder histochemisch angefärbt. Die Einbettung dieser und aller folgenden Organe, sowie die Schnitte und die anschließende Färbung wurde in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der UK-SH (PD Dr. Klapper) durchgeführt.

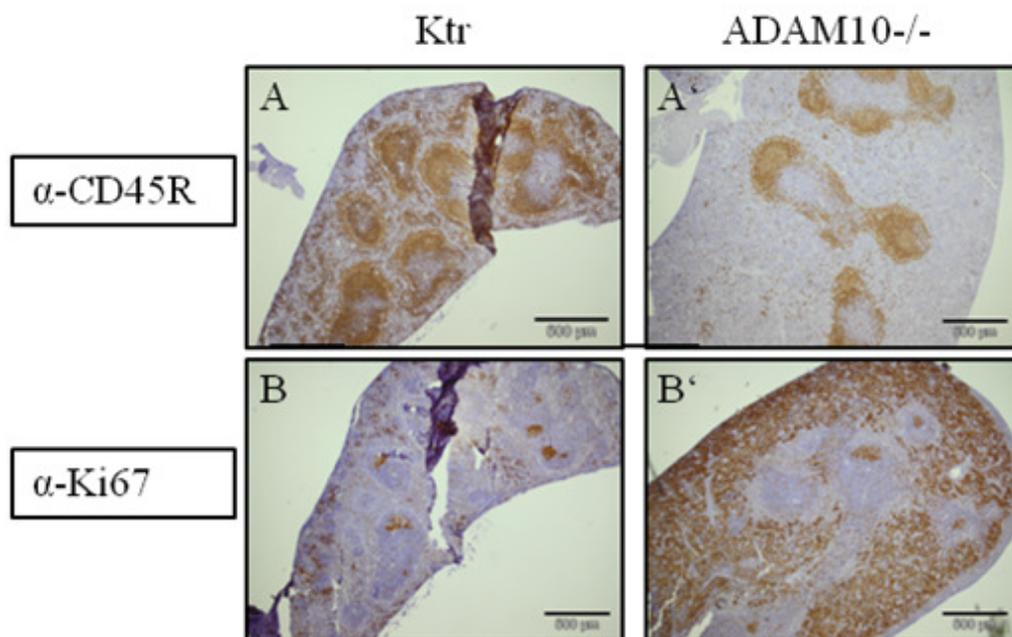


Bild 4.60: Immunhistochemische Färbungen von B-Lymphozyten und proliferierenden Zellen (Ki67 positiv) auf Paraffinschnitten der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Vollständige Milzen von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 μm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Die Primärantikörper (α -CD45R – A, A', α -Ki67 – B, B') wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. B-Lymphozyten und proliferierende Zellen sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 500 μm . Gezeigt sind repräsentative Beispiele von n=3 Mäusen je Genotyp.

Der Vergleich der histologischen Färbung der B-Lymphozyten in der Milz von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen und den entsprechenden Kontrollen zeigte für beide Mäuse eine klare follikuläre Organisation von Lymphfollikeln, die teilweise auch proliferierten, wie die ebenfalls durchgeführte Färbung gegen das nukleäre Proliferationsantigen Ki67 zeigte. Auch kleine, ungleichmäßig verteilte Populationen von B-

Lymphozyten außerhalb dieser Lymphfollikel, bei denen es sich wahrscheinlich um zirkulierende oder unreife B-Lymphozyten handelte, waren in beiden Mäusen zu erkennen. Sehr offensichtlich war jedoch der enorm vergrößerte zelluläre Bereich der roten Pulpa zwischen den Lymphfollikeln der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Dieser war zudem nahezu komplett von proliferierenden Zellen ausgefüllt, die in den entsprechenden Kontrollen außerhalb der Keimzentren nur sehr selten zu sehen waren. Die gleichen Färbungen wurden auch auf Paraffinschnitten der Lymphknoten durchgeführt.

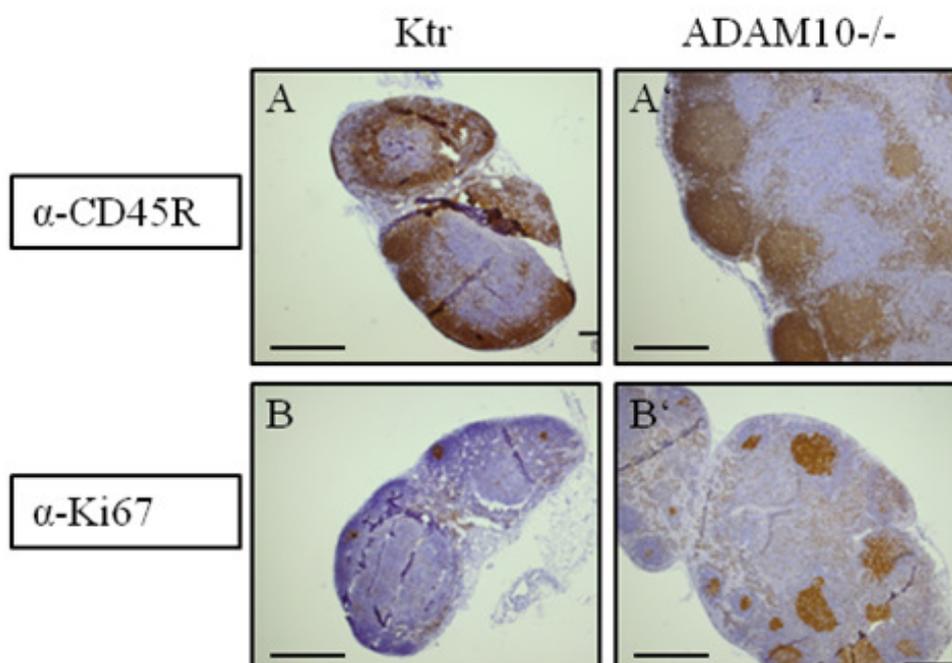


Bild 4.61: Immunhistochemische Färbungen von B-Lymphozyten und proliferierenden Zellen (Ki67 positiv) auf Paraffinschnitten der Lymphknoten induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Die beiden größten Beinlymphknoten von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Die Primärantikörper (α -CD45R – A, A', α -Ki67 – B, B') wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. B-Lymphozyten und proliferierende Zellen sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 500 µm. Gezeigt sind repräsentative Beispiele von n=3 Mäusen je Genotyp.

Ähnlich wie in den analysierten Milzen zeigten auch die Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen abgesehen von der starken Vergrößerung keine signifikante Unterschiede in der Architektur des Cortex, der Medulla und der dazwischen liegenden Überganszone. So befanden sich die B-Lymphozyten beider Lymphknoten überwiegend in der Rinde, teilweise konnten jedoch in den Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky}

Mäuse auch Keimzentren in der eigentlich überwiegend von T-Lymphozyten besetzten Überganszone oder der Medulla gefunden werden. Mit der gesteigerten Größe der Lymphknoten stieg auch die Größe der Keimzentren in den Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Diese Beobachtung ging mit einer stark erhöhten proliferativen Aktivität einher, die in dem Lymphknoten jedoch im Gegensatz zur Milz, auch den Keimzentren und damit den B-Lymphozyten zuzuordnen ist. Da die beobachtete Hyperproliferation in den Organen der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse ein häufiges Merkmal von lymphoiden oder myeloiden Leukämien darstellt, wurden die Schnitte immunhistochemisch mit der PAS-Reaktion behandelt. Die PAS-Reaktion ermöglicht primär die Detektion von Glykogen, Glykolipiden und Mukopolysacchariden. Sie kann aber auch zur Detektion von erythrozytärer, myeloider oder lymphoider Leukämien eingesetzt werden. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass diese Art der Färbung lediglich einen ersten Hinweis auf diese Formen der Leukämien gibt, die dann durch zusätzliche Färbung mit spezifischen Markern einen genaueren Hinweis auf die vorliegende Situation zulässt.

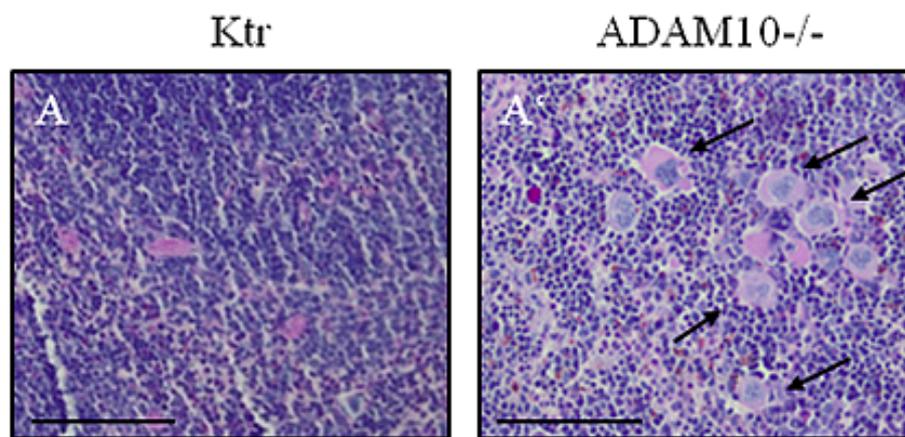


Bild 4.62: Periodic Schiff Acid (PAS) Reaktion auf Paraffinschnitten der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Vollständige Milzen von ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Schwarze Pfeile zeigen auf Blasten des hämatopoetischen Systems. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 µm. Gezeigt sind repräsentative Beispiele von n=3 Mäusen je Genotyp.

Die PAS-Reaktion zeigte die Anwesenheit nicht näher differenzierbarer Blasten in den Milzen der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Sie können entweder lymphoiden oder myeloiden Ursprungs sein.

Proteinexpressionsanalyse

Der offensichtliche Phänotyp der peripheren lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten, ließen auf eine wichtige Bedeutung von ADAM10 bei der Homöostase dieser Organe schließen. Die Analyse der Proteinexpression sollte zeigen, wie groß der Anteil der ADAM10 defizienten Zellen z.B. in der Milz ist.

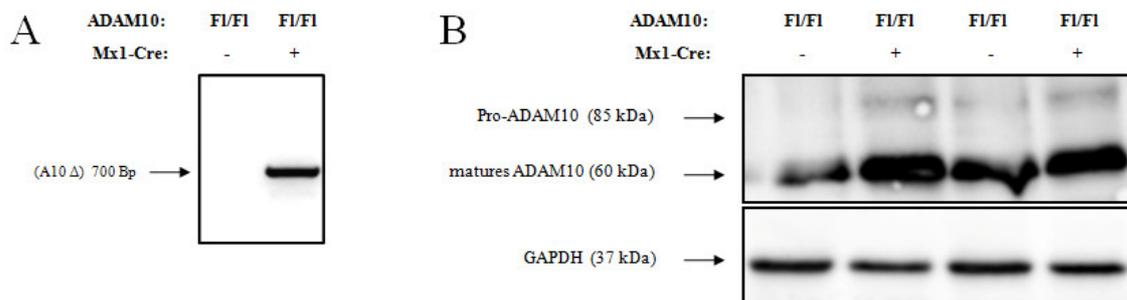


Bild 4.63: Analyse der genomischen (A) und proteomischen (B) ADAM10 Deletion in der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

(A) Aus den Einzelzellsuspensionen von Erythrozytenfreien Milzen wurde genomische DNA isoliert, von der 500 ng für die ADAM10 Exon2-Deletions-PCR eingesetzt, anschließend mit 6xfach DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromid-haltiges 1% Agarosegel aufgetragen wurde. Die Banden wurden mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und dokumentiert. (B) Die Einzelzellsuspensionen von Erythrozytenfreien Milzen aus jeweils zwei Knockout- und zwei Kontrollmäusen wurden mit ADAM10 Lysispuffer homogenisiert, die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen Serum B42.1 gegen ADAM10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert. Als Proteinbeladungskontrolle wurde der untere Abschnitt mit einem primären Kaninchen-anti-Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (1:1000) und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert. Beide Teile des Blots werden mit ECL advanced detektiert. Die molekularen Größen (MG) wurden durch einen mitgelaufenen Protein Marker ermittelt. Dies ist ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Bild 4.63 A zeigt eine eindeutige Induktion der Deletion des 2. Exons von ADAM10 auf genomischer Ebene. Ein Blick auf die ADAM10 Proteinexpression jedoch zeigte, dass in den aufgetragenen Proteinlysaten der Milzen von den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen eine vergleichbare oder evtl. sogar leicht erhöhte ADAM10 Expression detektiert werden konnte. Auch die Wiederholung mit Tieren einer unabhängigen Zuchtlinie brachte ein ähnliches Ergebnis, so dass hier nicht von einem experimentellen Fehler auszugehen ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Milz und Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse einen klaren pathophysiologischen Phänotyp aufweisen. So konnte für beide Organe eine um den Faktor zehn erhöhte Zunahme der Zellularität, eine massive Einwanderung von myeloiden Leukozyten, sowie eine hierdurch bedingte

Abnahme des Anteils CD4 und CD8 positiver Thymozyten bei jedoch unveränderter Zellarchitektur beobachtet werden. Für die Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} konnte weiterhin die starke Zunahme von unreifen und reifen Erythrozyten (verbunden mit einer sehr starken Zunahme der Größe und proliferativen Aktivität der roten Pulpa (extramedulläre Hämatopoese), die proportionale Abnahme der reifen B-Lymphozyten und das Auftreten von großen Blasten noch ungeklärter Herkunft gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu zeigte die Lymphknoten eine Zunahme reifer B-Lymphozyten, die jedoch ebenfalls durch einen Anstieg der proliferativen Aktivität im Bereich der Lymphfollikel gekennzeichnet waren.

4.3.4.4 Analyse der Leber

Auch wenn die Leber nicht zu den primären oder sekundären lymphatischen Organen zählt, kann sie doch in bestimmten Entwicklungsstadien (z.B. der Embryonalentwicklung) oder pathophysiologischen Situationen ein weiterer Ort extramedullärer Hämatopoese neben der Milz und dem Thymus sein. Die Präparation fast aller Mäuse zeigte neben einer leichten Hepatomegalie (etwa 2-fache Zunahme des Organgewichts – Daten nicht gezeigt) weitere morphologische und histologische Auffälligkeiten, die im Weiteren beschrieben werden.

Allgemeine Morphologie

Schon bei der Öffnung des Bauchraumes der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse konnte in fast allen Tieren (>80%) das Auftreten von roten Flecken (Bild 4.64) auf der Oberseite und nach Präparation auch im Inneren der Leber beobachtet werden. Ein Vergleich mit der Literatur ließ auf eine evtl. extramedulläre Hämatopoese in den Lebern der ADAM10 defizienten Mäuse schließen.

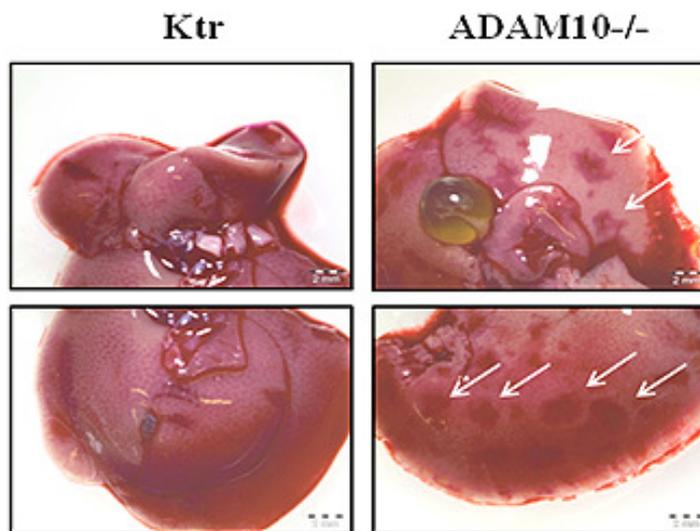


Bild 4.64: Makroskopische Aufnahme der Leber induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem Binokular

Die Leber von $ADAM10^{Mx1-leaky}$ ($A10^{-/-}$) und Kontrollen (Ktr) wurde präpariert und mit einer 0,66 fachen Vergrößerung am Binokular fotografiert. Es handelt sich um ein repräsentatives Bild von $n > 15$ präparierten Mäusen. Die weißen Pfeile zeigen die Bereiche mit roten Verfärbungen auf der Oberfläche der Lebern an. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 2 mm.

Da hierfür die histologische Untersuchung einer der aussagekräftigsten Nachweismethoden ist, wurden die Lebern der $ADAM10^{Mx1-leaky}$ Mäuse und den entsprechenden Kontrollen zunächst auf diese Weise untersucht.

Histologie

Die Paraffinschnitte der Leber von $ADAM10^{Mx1-leaky}$ Mäusen und der entsprechenden Kontrollen wurden zunächst anhand der H&E Färbetechnik charakterisiert (Bild 4.65 A und A') und zeigten keine offensichtlichen morphologischen Auffälligkeiten bezüglich der Struktur oder der Verteilung von Hepatozyten oder anderer typischer Zellpopulationen der Leber. Eine häufige Beobachtung war jedoch das stark vermehrte Auftreten von großen Blutgerinnseln in den Venen der Leber von $ADAM10^{Mx1-leaky}$ Mäusen (im Bild 4.65 A' durch schwarze Pfeile markiert), die in dieser Größe und Häufigkeit in keiner der untersuchten Kontrollen gefunden werden konnten. Durch Giemsa-Färbung (Bild 4.65 C und C'), PAS-Reaktion (Bild 4.65 E und E') und α -Ki67 Färbung (Bild 4.65 D, D' und DII'), konnte gezeigt werden, dass diese Bereiche durch eine starke Infiltration von proliferierenden Leukozyten und eine extrem gesteigerte Menge an Mukopolysacchariden (angezeigt durch die pinke Farbe in Bild 4.65 DII') gekennzeichnet sind, während in den übrigen Bereichen der Leber keine erhöhten

Zahlen von Entzündungszellen zu finden waren und auch die PAS-Färbung auf eine vergleichbare Akkumulierung von Mukopolysacchariden bzw. Glykogen schließen lässt.

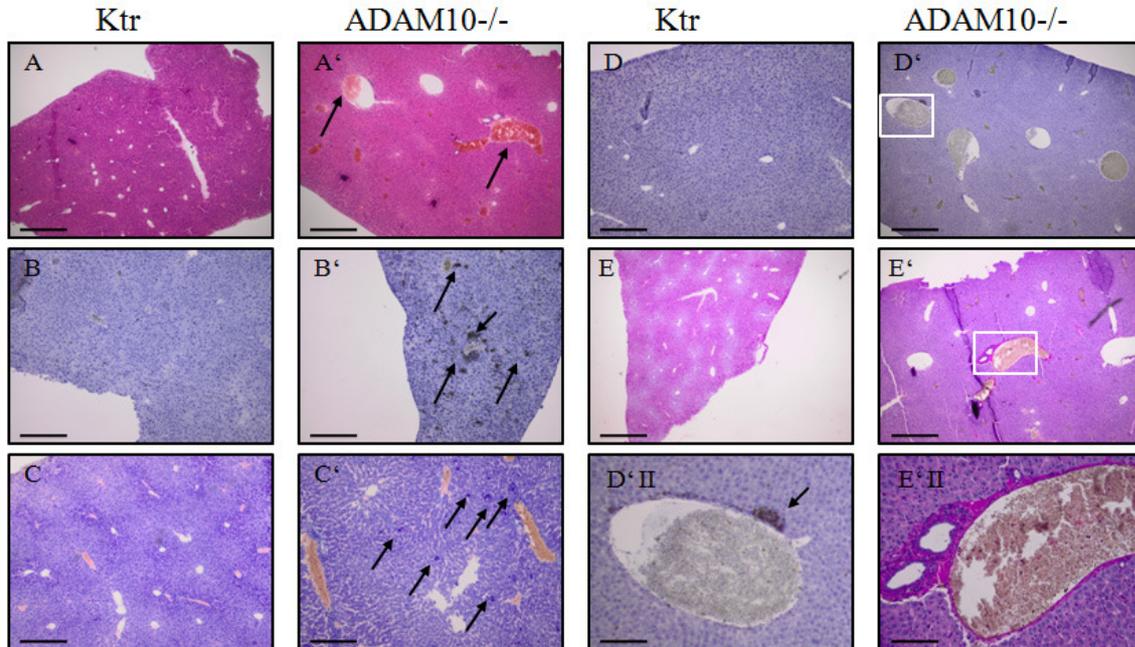


Bild 4.65: H&E (A, A'), Giemsa Färbung (C, C') und PAS Reaktion (E, E'), sowie immunhistochemischer Nachweis von proliferierender Zellen (Ki67 positiv – B, B') und B-Lymphozyten (D, D') auf Paraffinschnitten der Leber induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Die großen Lappen der Leber von $ADAM10^{Mxl-leaky}$ ($A10^{-/-}$) Mäusen und Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 μm dicke Sektionen geschnitten und gemäß der verschiedenen Standardprotokolle (3.2.4.14) angefärbt. Die Primärantikörper (α -Ki67 – B, B', α -CD45R – D, D') wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. B-Lymphozyten und proliferierenden Zellen (angezeigt durch schwarze Pfeile) sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde bei diesen Proben eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Von Bild (D') wurde eine Ausschnittsvergrößerung (DII') vorgenommen, die durch einen weißen Kasten gekennzeichnet ist. Die erhöhte Ansammlung von B-Lymphozyten im Bereich der Vene ist mit einem schwarzen Pfeil markiert (A) und (A') zeigen eine H&E Färbung der Leber bei denen Thrombosen in den Lebervenen der $ADAM10^{Mxl-leaky}$ ($A10^{-/-}$) Mäuse mit schwarzen Pfeilen angezeigt werden. Giemsa Färbung (C) und (C'), sowie die PAS-Reaktion (E) und (E') zeigen die vermehrte Invasion von Leukozyten, sowie die Anfärbung der Bereiche rund um die thrombozytär verstopften Venen der $ADAM10^{Mxl-leaky}$ ($A10^{-/-}$) Mäuse. Von Bild (E') wurde eine Ausschnittsvergrößerung (EII') vorgenommen, die durch einen weißen Kasten gekennzeichnet ist. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 500 μm bei den Bildern (A), (A'), (B), (B'), (D), (D'), (E) und (E'), 200 μm bei den Bildern (C) und (C'), sowie 50 μm bei den Bildern (DII') und (EII'). Gezeigt sind repräsentative Beispiele von n=3 Mäusen je Genotyp.

Zur Überprüfung der Leberfunktion wurden zusätzlich die Enzymaktivitäten der diagnostischen Marker Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), γ -Glutamyltransferase (GGT), sowie der Anteil von Billirubin und Tryglyzeriden im Blutplasma von $ADAM10^{Mxl-leaky}$ Mäusen und den entsprechenden Kontrollen mit Hilfe eines Reflotron® (Roche) bestimmt. Die Messung von erhöhten

enzymatischen Aktivitäten oder zu hohen Konzentrationen an Billirubin kann einen ersten Hinweis auf die Zerstörung oder Disregulation von Leberzellen geben. Für beide Genotypen konnten jedoch vergleichbare Werte ermittelt werden, die in keinem Fall oberhalb des Grenzwertes lagen. Durch die Proteinexpressionsanalyse von ADAM10 in Gewebelysaten der Leber sollte nun geklärt werden, ob in der Leber eine Reduktion der ADAM10 Expression oder Aktivität detektierbar ist.

Proteinexpressionsanalyse

Die allgemein morphologische und histologische Untersuchung hatte phänotypische Unterschiede der Lebern von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen gegenüber den entsprechenden Kontrollen gezeigt. Diese beschränkten sich jedoch vorrangig auf die Venen mit sichtbaren Blutgerinnseln. Mit Hilfe der Proteinexpressionsanalyse sollte nun gezeigt werden, ob diese Phänotypen auch primär mit einer Reduktion der ADAM10 Expression in der Leber verbunden sind.

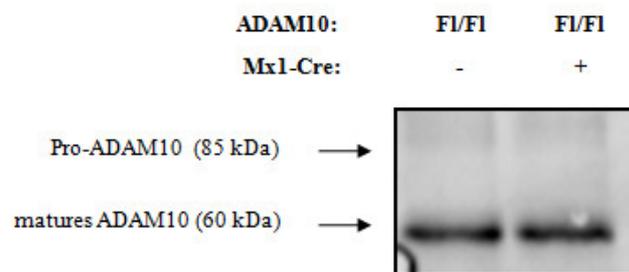


Bild 4.66: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM10 in der Leber induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems.

Die schockgefrorenen Lebern wurden mit ADAM10 Lysispuffer homogenisiert, die extrahierten Proteine (20 µg je Spur) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die aufgetrennten Proteine im Tank-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran eine Stunde lang mit 5% Milchpulver blockiert wurde, erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen Serum B42.1 gegen ADAM10 (1:3000) im Kühlraum über Nacht. Danach wurde 1 h lang mit dem sekundären HRP-Esel-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000) inkubiert und mit ECL advanced detektiert. Dies ist ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Analyse der ADAM10 Proteinexpression zeigte nahezu identische ADAM10 Proteinkonzentrationen in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen und den Kontrollen. Die Zusammenfassung aller vorliegenden Daten lässt auf das Vorliegen eines systemischen Effektes als Ursache für die phänotypischen Auffälligkeiten der Lebern von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen schließen. Veränderungen konnten lediglich in exklusiven Bereichen der Lebervenen in Form von Blutgerinnseln gesehen werden, die neben der

leichten Hepatomegalie auch bei äußerer morphologischer Betrachtung als rote Bereiche auf und in der Leber auffallen, während die Anatomie und die Leberfunktion offensichtlich ungestört ist.

4.3.4.5 Analyse der Haut

Auch wenn die Haut selbst kein hämatopoetisches Organ ist, nimmt sie eine wichtige Rolle in der immunologischen Abwehr ein und ist in Aufbau und Funktionsweise ausführlich unter 1.4.1 beschrieben. Die Haut wurde in die Analyse der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse mit einbezogen, da vorwiegend im Bereich der Schnauze aber auch auf wechselnden Bereichen des gesamten Körpers Bereiche mit akutem Haarverlust, Schwellungen und Blutungen der unterliegenden Haut beobachtet werden konnten.

Allgemeine Morphologie

Etwa nach vier Monaten konnten bei nahezu allen ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen der Verlust von Haaren im Bereich der Schnauze festgestellt werden. Die Tiere zeigten ein stark erhöhtes Putzverhalten und zum Zeitpunkt der Untersuchung wiesen viele der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse starke entzündete Hautläsionen mit Bereichen ausgeprägter Hyperkeratose und offenen Wunden auf.



Bild 4.67: Makroskopische Aufnahme von Hautläsionen induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem Binokular

Die Hautläsionen im Bereich der Köpfe der ADAM10^{Mx1-leaky} (A10^{-/-}), sowie als Vergleich die entsprechenden Kontrollen wurden mit einer 0,66 fachen Vergrößerung am Binokular fotografiert. Es handelt sich um ein repräsentatives Bild von n>15 präparierten Mäusen. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 2 mm.

Das restliche Fell, sowie die Extremitäten der $ADAM10^{Mxl-leaky}$ Mäuse sahen phänotypisch identisch mit denen der Kontrollen aus. Die einfachste Methode zur Untersuchung der entzündeten Hautbereiche stellt die histologische Untersuchung dar, welche im folgenden Teil für die $ADAM10^{Mxl-leaky}$ Mäuse und die entsprechenden Kontrollen beschrieben ist.

Histologie

Zunächst sollte eine Basischarakterisierung der verschiedenen Hautschichten mit Hilfe der H&E Färbung erfolgen. Bild 4.68 A und A' zeigen dabei eine Übersichtsaufnahme der kompletten Haut, während in Bild 4.68 B und B' der Bereich der Interfollikulären Epidermis und der Haarfollikel als terminale immunologische Barriere gezeigt ist.

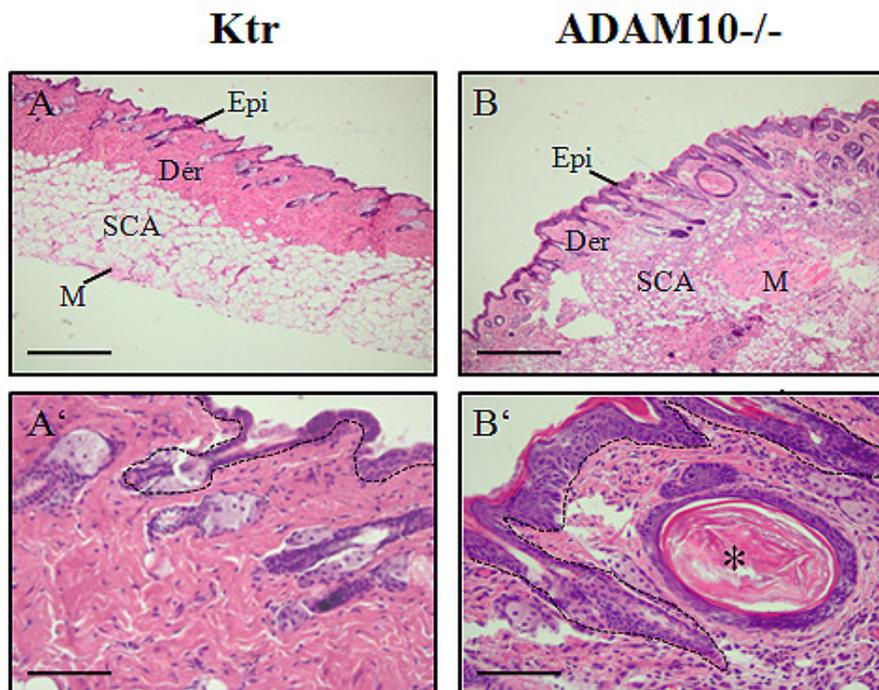


Bild 4.68: H&E Färbung von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Hautproben der sichtbaren Läsionen von $ADAM10^{Mxl-leaky}$ Mäusen ($A10^{-/-}$) und Hautproben von vergleichbaren Körperregionen der Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5 μ m dicke Sektionen geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.11) angefärbt. (A) und (A') zeigen Übersichten der präparierten Haut. M = Muskel, SCA = Subkutanes adipöses Fettgewebe, Der = Dermis; Epi = Epidermis, HF = Haarfollikel. Die Schichtgrenzen sind durch die gestrichelten schwarzen Linien dargestellt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 500 μ m. (B) und (B') zeigen die obere Schicht der Dermis (Der), sowie die Epidermis (Epi) und die Haarfollikel (HF). Die Grenze zwischen Dermis und Epidermis (Basallamina) wird durch die gestrichelte schwarze Linie angezeigt. Der schwarze Asterix weist auf eine epidermale Zyste hin, während Bereiche der Hyperkeratinisierung mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet sind. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 μ m. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus n=3 Mäusen je Genotyp.

Die Übersichtsbilder Bild 4.68 A und A' zeigen eine starke Reduktion des subkutanen Fettgewebes der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse, welches offenbar durch Fibroblastenartige Zellen ersetzt wird. Weiterhin sind in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen einzelne epidermale Zysten mit keratinhaltigem Material zu sehen, die in keiner der Kontrollen gefunden werden konnten. Die nähere Betrachtung der Haut in Bild Bild 4.68 B und B' zeigt zudem eine Verdickung der Epidermis, eine ausgeprägte Hyperkeratose sowie eine stark erhöhte Anzahl kernhaltiger Zellen in der Dermis. Zur Identifizierung dieser kernhaltigen Zellen wurden die fixierten Hautproben mit der Giemsa-Färbung untersucht.

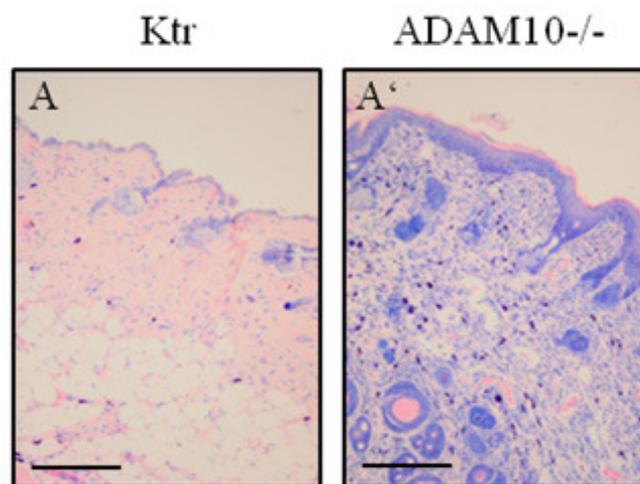


Bild 4.69: Giemsa Färbung auf Paraffinschnitten von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Hautproben der sichtbaren Läsionen von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen (A10^{-/-}) und Hautproben von vergleichbaren Körperregionen der Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5µm dicke Sektionen geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Zellen, die violett angefärbt sind, stammen aus der granulozytären Reihe der Hämatopoese. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

Die Giemsa-Färbung zeigte ein stark erhöhtes gemischt-leukozytäres Infiltrat in allen Schichten der Haut von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen. Aus der Morphologischen Betrachtung der violett angefärbten Leukozyten konnten sowohl verschiedene Granulozyten als auch Lymphozyten erkannt werden (Aussage PD Dr. Klapper, UK-SH Kiel). Zur genaueren Analyse der Lymphozytenpopulationen wurde die Proben mit einem B-Zellspezifischen Antikörper (CD45R) gefärbt. Als alleinige Mediatoren der humoralen Immunantwort nehmen den B-Lymphozyten eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung von extrazellulär persistierenden Bakterien, einer Reihe von Pilzen und anderer mehrzelliger Parasiten ein.

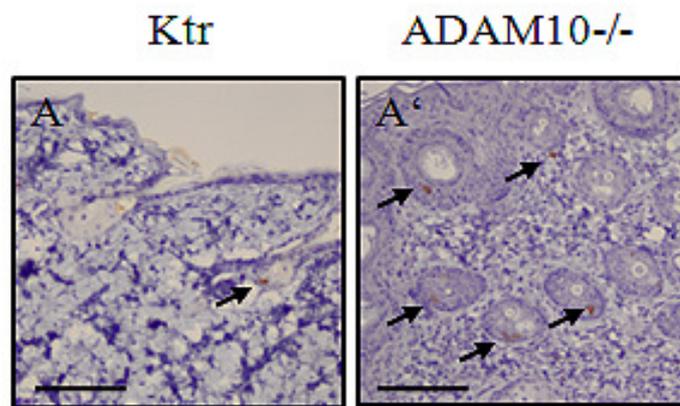


Bild 4.70: Immunhistochemische Färbung von B-Lymphozyten auf Paraffinschnitten von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Hautproben der sichtbaren Läsionen von $ADAM10^{Mx1-leaky}$ Mäusen (A10 $^{-/-}$) und Hautproben von vergleichbaren Körperregionen der Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5 μm dicke Sektionen geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Der Primärantikörper (anti-CD45R) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:100, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Infiltrierte B-Lymphozyten sind an einer Braunfärbung zu erkennen und werden mit schwarzen Pfeilen angezeigt. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 200 μm .

Bei einem geringen Anteil, der in der Giemsa-Färbung gezeigten Leukozyten, handelte es sich um B-Lymphozyten. Obwohl sie relativ ungleichmäßig in der Haut verteilt waren, konnten jedoch in den Proben der $ADAM10^{Mx1-leaky}$ Mäuse eindeutig mehr B-Lymphozyten als in den entsprechenden Kontrollen beobachtet werden. Neben der erhöhten Infiltration von Leukozyten zeigten die Haut der $ADAM10^{Mx1-leaky}$ Mäuse, wie in Bild 4.68 zu sehen ist, eine Verdickung der Epidermis. Die Färbung der Hautschnitte mit einem Antikörper gegen das nukleäre Proliferationsantigen Ki67 sollte zeigen, ob der Grund hierfür in einer gesteigerten Proliferation der basalen Keratinozyten liegt.

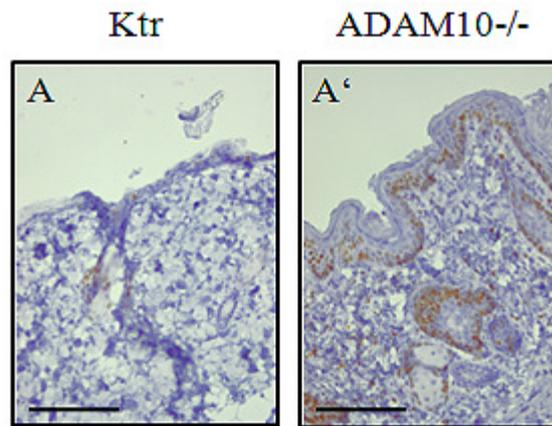


Bild 4.71: Untersuchung der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung Paraffinschnitten von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

Hautproben entnommen aus Bereichen mit sichtbaren Läsionen von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen (A10^{-/-}) und Hautproben von vergleichbaren Körperregionen der Kontrollen (Ktr) wurden fixiert, eingebettet, in 5 µm dicke Sektionen geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gemäß des Standardprotokolls (3.2.4.14) angefärbt. Der Primärantikörper (anti-Ki67) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:200, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Proliferierende Zellen sind an einer Braunfärbung zu erkennen. Als Gegenfärbung wurde eine Toluidin-Blau Färbung durchgeführt. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

Während in den Kontrollen nur vereinzelte Zellen der Basalschicht der IFE und der Haarfollikel eine positive Färbung aufwiesen, zeigten nahezu alle basalen und teilweise auch suprabasalen Keratinozyten der IFE und der Haarfollikel in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen eine proliferative Aktivität. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Haut von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen eine starke Infiltration von gemischten Leukozytenpopulationen, sowie eine eindeutige Hyperproliferation der basalen Keratinozyten und eine Ausprägung zur Hyperkeratose in den Bereichen der Hautläsionen aufwiesen. Weiterhin wurden vereinzelte Bakterienkolonien auf der Epidermis der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse erkannt (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation PD Dr. Klapper, UK-SH Kiel), die jedoch in keiner der mit den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen in einem Käfig gehaltenen Kontrollen beobachtet werden konnten. Zum Abschluss der bis jetzt durchgeführten Analyse erfolgt die Betrachtung des Blutes, welches alle bis hierhin betrachteten Organe verbindet.

4.3.4.6 Analyse des Blutes

Die Analyse des Blutes sollte Auskunft sowohl über Änderungen in Menge und Zusammensetzung der korpuskulären Bestandteile als auch in der Konzentration von Plasmaproteinen oder anderen löslichen Faktoren geben. Nach retrobulbärer

Blutabnahme wurde das Vollblut in EDTA-Röhrchen zur Verhinderung der Koagulation gesammelt und zunächst auf die korpuskulären Bestandteile untersucht.

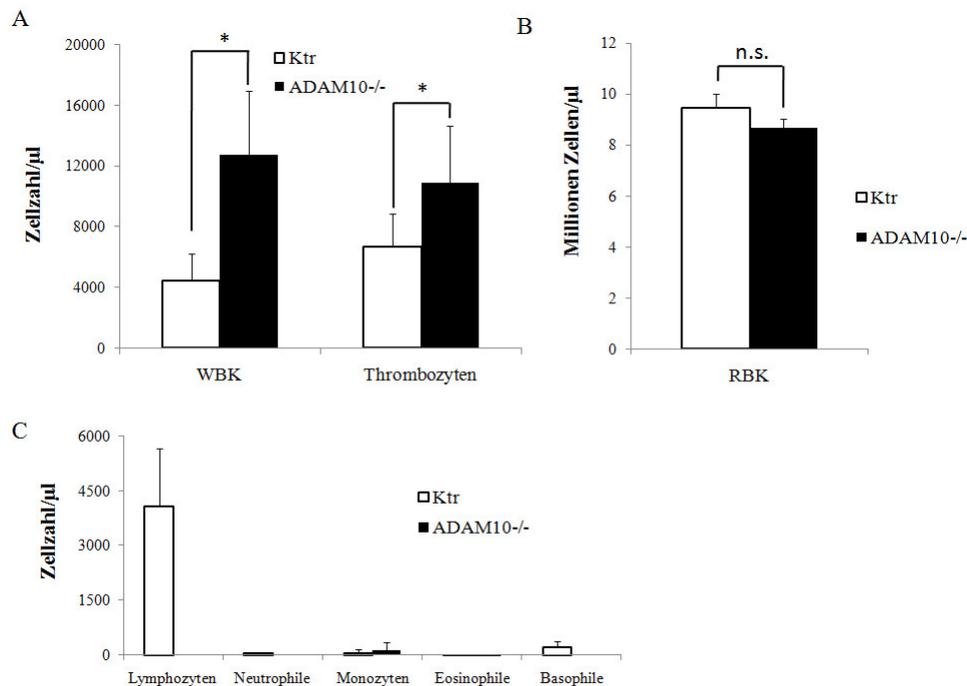


Bild 4.72: Blutbild induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

20µl EDTA-Blut aus retrobulbärer Blutabnahme von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen (A10^{-/-}) oder entsprechender Kontrollen (Ktr) wurden in einem Autoanalyzer (Pädiatrie, UK-SH Kiel) vermessen und auf ihre korpuskulären Bestandteile und Charakteristik, sowie den Hämoglobingehalt untersucht. (A) zeigt den Vergleich der weißen Blutkörperchen (WBK) und der Thrombozyten, (B) den Vergleich der roten Blutkörperchen (RBK) und (C) zeigt den Vergleich der wichtigsten Leukozytenpopulationen. Für jeden Genotyp wurden n=3 Mäuse vermessen.

Die automatische Analyse des Blutes zeigte eindeutige Unterschiede im Hinblick auf den Vergleich von Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen und den hierzu gehörenden Kontrollen. So ist die Konzentration der Erythrozyten in beiden Proben vergleichbar und in keinem Fall höher als der Normwert. Auch der Hämoglobingehalt lag sowohl in ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen als auch in den Kontrollen im physiologischen Bereich. Die Gesamtkonzentration der Leukozyten (etwa +190%) und der Thrombozyten (etwa +63%) war in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen jedoch erhöht. Die Betrachtung der wichtigsten Leukozytenpopulationen in Bild 4.72 (C) zeigte hingegen, dass abgesehen von einem kleinen Anteil von Monozyten überhaupt keine regulären Leukozytenpopulationen im Blut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse zu finden sind. Der Autoanalyzer detektierte zudem in allen

Blutproben der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse Zellpopulationen, die keinem der bekannten Parameter für Größe und Granularität zuzuordnen waren. Sie wurden als unreife Granulozyten und/oder anormale Lymphozyten eingestuft. Die Ergebnisse des Autoanalysers wurden durch die Befundung von Blutaussstrichen auf Objektträger mit anschließender Giemsa-Färbung verifiziert. Die Beurteilung der durchgeführten Blutausstriche wurde dabei als Blindversuch durch die Praxis von Dr. Christian Beck (Hämatologie, Mönchengladbach) durchgeführt und sind exemplarisch für eine Kontrolle (von n=4) und eine ADAM10^{Mx1-leaky} Maus (von n=3) im Bild 4.73 gezeigt.

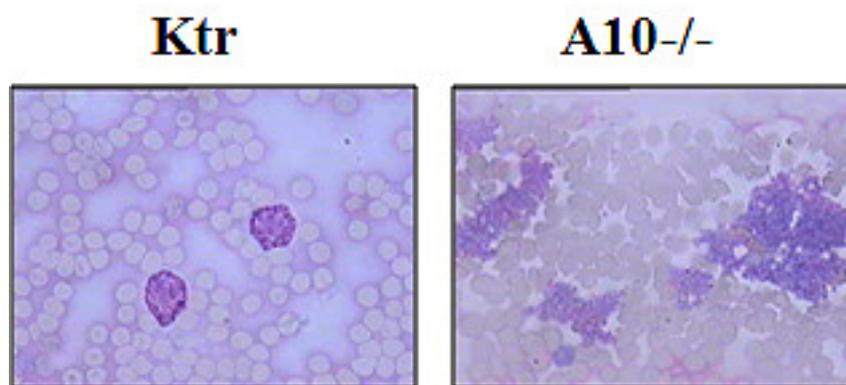


Bild 4.73: Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems

10 µl EDTA-Blut aus Herzpunktionen wurden auf einem Objektträger dünn ausgestrichen. Die Giemsa-Färbung der Blutausstriche erfolgte gemäß dem Standardprotokoll. Es wurden Ausstriche von n=4 verschiedenen Proben je Genotyp analysiert.

Die Praxis von Dr. Christian Beck stellte für vier Proben zytologisch normale Gutachten und für drei Proben einen deutlich pathologischen Befund. Bei allen dieser drei Proben handelte es sich um die Blutausstriche der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Hierbei wurde eine deutlich bis sehr deutlich gesteigerte Zellularität, eine erhöhte Anzahl von Granulozyten und Monozyten, das Auftreten von Pseudo-Pelger Formen (bis zu 12%), zahlreiche Thrombozytenaggregate und eine ausgeprägte Polychromasie der Erythrozyten festgestellt. Nachdem alle korpuskulären Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt wurden, erfolgte die Analyse der Plasmakonzentration von 42 verschiedenen Zytokinen durch einen Proteome Profiler Array (RndSystems).

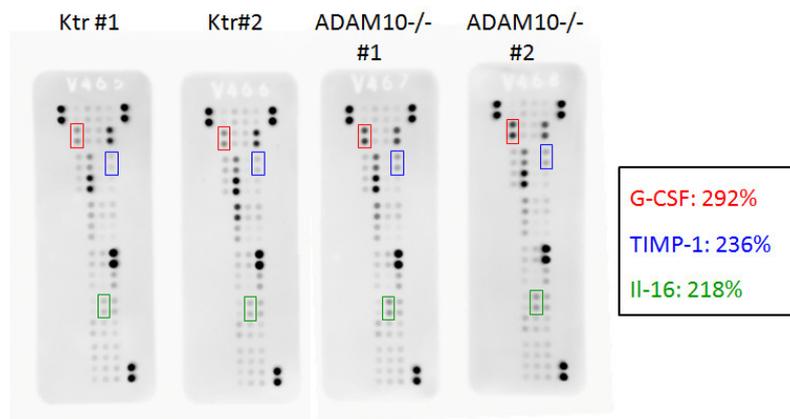


Bild 4.74: Vergleich der Konzentrationen von 42 verschiedenen Zytokinen im Plasma von induzierbaren ADAM10 Knockout Mäusen des hämatopoetischen Systems und Kontrollen

100 μ l Heparin-Plasma aus Herzpunktionen von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen (A10^{-/-}) oder entsprechender Kontrollen (Ktr) wurden zur Analyse der Zytokinkonzentration mit einem Proteome Profiler Array (RnDSystems) untersucht. Für die densitometrische Analyse mit ImageJ wurden die Duplikate beider Dot Blots je Genotyp gemittelt und die Ratio im Bezug auf die durchschnittliche Expressionsstärke der Zytokine im Plasma der Kontrollen (Ktr) berechnet.

Die densitometrische Auswertung zeigte für drei der 42 untersuchten Zytokine eine unterschiedliche Plasmakonzentration. Hierbei zeigten G-CSF, TIMP-1 und IL-16 in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen eine stark erhöhte Plasmakonzentration gegenüber den entsprechenden Kontrollen. Da für G-CSF und TIMP-1 eine Bedeutung bei der Differenzierung und Proliferation von Granulozyten bekannt ist, wurde die Plasmakonzentration einer größeren Gruppe von Mäusen durch ELISAs quantifiziert. Die durchgeführten ELISAs konnten die Zunahme der Plasmakonzentration von G-CSF und TIMP-1 eindeutig bestätigen (Bild 4.75).

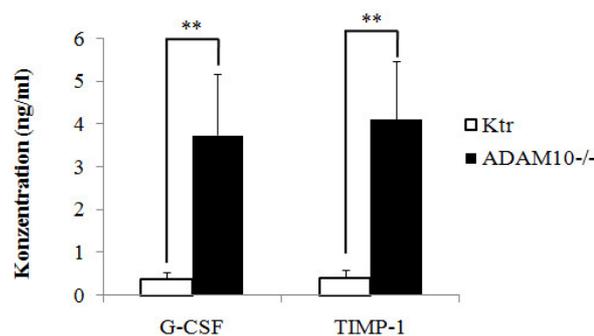


Bild 4.75: G-CSF und TIMP-1 ELISA von Plasmaproben von induzierbaren ADAM10 Knockout Mäusen des hämatopoetischen Systems

Vergleichbare Volumina von Plasmaproben der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen (A10^{-/-}) und Kontrollen (Ktr) wurden zur Quantifizierung der G-CSF und TIMP-1 Konzentration einem ELISA gemäß Herstellerangaben (RnDSystems) unterzogen. Hierfür wurden Proben von n=5 ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen und n=3 Kontrollen jeweils im Duplikat aufgetragen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Analyse des Blutes der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse die starke Zunahme einer bis jetzt undefinierten Leukozytenpopulation sowie der Thrombozyten, bei nahezu völliger Abwesenheit von regulären Lymphozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen Granulozyten zeigte. Der Gehalt an Erythrozyten und der hiermit verbundene Hämoglobingehalt sind jedoch bei beiden Genotypen vergleichbar. Weiterhin zeigte die Analyse von 42 essentiellen Zytokinen des Immunsystems eine deutliche Erhöhung der Plasmakonzentration von G-CSF, TIMP-1 und pro-Interleukin 16

4.4 Induzierbarer konditionaler Knockout von ADAM10 in Zellen mit aktivem hCMV Promotor

Da die induzierbar konditionalen ADAM10 Knockout unter Kontrolle des Mx1 Promotors vorwiegend in Zellen des hämatopoetischen Systems stattfindet, wurde noch ein weiteres Mausmodell zur induzierbaren Deletion von ADAM10 etabliert. Dabei handelt es sich um ein Tet-on System, unter Kontrolle des hCMV-Promotors. Da bisher noch nicht gezeigt wurde in welchen Geweben der Maus dieser Promotor auch *in vivo* aktiv ist, sollte dies mit Hilfe einer geeigneten Imaging Methode detektiert werden.

4.4.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte entsprechend Kapitel 4.2.1 und zeigte ebenfalls die erwartete Mendelsche Verteilung der Nachkommen ohne offensichtlichen Phänotyp. Damit konnte gezeigt werden, dass die induzierbar konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse keine sichtbaren Entwicklungsdefekte oder embryonale Letalität durch eine mögliche basale Aktivierung des hCMV Promotors aufweisen.

4.4.2 Verifizierung des Knockouts

Da für den hCMV-rtTA transgene Mauslinie noch keine publizierten Daten für die *in vivo* Expression des Transaktivatorproteins zur Verfügung stehen, wurde ein Luziferase-basiertes Reportersystem zur Analyse der Promotoraktivität verwendet. Hierfür wurde eine Maus mit einem bidirektional ablesbarem TRE Element eingekreuzt (Lc1-Cre). Durch die Aktivierung des tetrazyklingebundenen Transaktivatorproteins wird sowohl die Cre-Rekombinase als auch die Luziferase abgelesen und exprimiert. Durch i.p. Injektion von Luziferin kann die Aktivität der Luziferase durch Detektion des Lumineszenzsignals gezeigt werden. Hierfür wurde ein sensitives CCD-Kamera System benutzt, das die Lumineszenz-Detektion in der lebenden Maus ermöglicht.

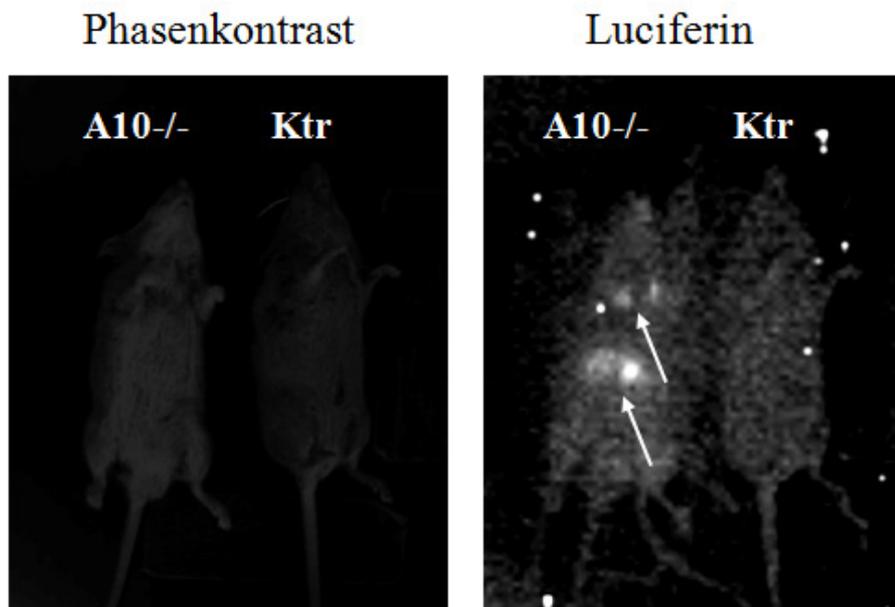


Bild 4.76: *In Vivo* Imaging von induzierbar transgenen Luziferase Mäusen unter Kontrolle des hCMV Promotors

Die bidirektionale Expression der Luziferase und der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des hCMV-Promotors von Plasmaproben wurde durch Gabe von doxyzyklinhaltigem Futter (A10^{-/-}) in drei Wochen alten Mäusen induziert. Als Kontrolle wurden Mäuse mit identischem Genotyp auf normalem Futter verwendet (Ktr). Zur Analyse der Promotoraktivität und der hiermit verbundenen Luziferase-Expression wurden A10^{-/-} und Ktr Mäuse mit Luziferin i.p. gespritzt und 5min später mit Hilfe einer CCD-Kamera im entsprechenden Lumineszenzkanal fotografiert. Weiße Pfeile zeigen Stellen mit hoher Luziferase-Aktivität.

Der Vergleich von induzierten konditionalen ADAM10^{-/-} Mäusen (A10^{-/-}) und den entsprechenden Kontrollen (Ktr) zeigte eine eindeutige Aktivität der Luziferase, vorwiegend in der Leber und vermutlich im Herz der Mäuse. Die Analyse von anderen Organen z.B. im Luminometer, könnte auch geringere Aktivitätsunterschiede der Luziferase zwischen induzierten und nicht induzierten Mäusen detektieren. Weitere Experimenten, wie sie unter Kapitel 4.3.3.1, 4.3.3.2 und 4.3.3.3 beschrieben sind könnten nun zeigen, dass in diesen Geweben auch die Cre-Rekombinase exprimiert und zu einer sequenzspezifischen Rekombination des ADAM10 Locus mit nachfolgender Erniedrigung des ADAM10 Gen- und Proteinexpressionslevels führt.

5 Diskussion

5.1 Die Funktion von ADAM10 in der Morphogenese der murinen Epidermis

Die murine Epidermis stellt neben den Mucosae des Atem- und Verdauungstraktes die größte Kontaktfläche zur Gesamtheit aller Umwelteinflüsse (Temperatur, Druck, Pathogene und toxische Substanzen) dar. Während die Embryos im Mutterleib die schützende Atmosphäre der sie umgebenden Fruchtblase und des in ihr enthaltenen Fruchtwassers umgibt, muss die epidermale Barriere während und unmittelbar nach dem Geburtsvorgang vollständig aufgebaut sein, um das eigene Überleben zu sichern. Da die Epidermis sich innerhalb weniger Wochen und das ganze Leben lang ständig selbst erneuert, nehmen Defekte in der embryonalen Entwicklung häufig auch Einfluss auf die Homöostase der Epidermis und stellen daher ganz besondere Anforderungen an die Fehlerfreiheit der epidermalen Morphogenese.

Das konditionale Cre/Lox System erlaubte die gewebespezifische Deletion von ADAM10 durch die Wahl eines gewünschten Promotors der Cre –Transgen Expression. Einer der ersten und sichersten Marker für den Übergang von dermalen Fibroblasten zu epidermalen Keratinozyten stellt das Differenzierungsantigen Keratin 14 (K14) dar und wurde daher für diese gewebespezifische Deletion ausgewählt. Eine spezifische Expression des Cre-Transgens der von uns verwendeten Mauslinie, konnte im frühesten Stadium der Entwicklung von verhorntem Plattenepithel dokumentiert werden (Dassule et al., 2000). Die unter 4.1 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen den Erfolg dieser konditionalen Proteindeletion und alle im Weiteren diskutierten Ergebnisse mit diesem System beruhen daher primär auf dem molekularen Verlust von ADAM10 in der murinen Epidermis.

Da für ADAM10 bis zum heutigen Zeitpunkt keine belegte Funktion als Transkriptionsfaktor oder Regulator von Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte, kann die Vielfalt der gezeigten Phänotypen jedoch nur sehr unwahrscheinlich in direkter Weise ADAM10 zugeordnet werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Studien konnten eine eindeutige Rolle von ADAM10 bei der proteolytischen Prozessierung des Notch1-

Rezeptors belegen und aus diesem Grund soll in den folgenden Kapiteln diskutiert werden, an welchen Stellen und auf welche Art ADAM10 regulatorischen Einfluss, insbesondere auf diesen bekannten Signalweg der epidermalen Differenzierung in der Maus, nimmt.

Weiterhin wird diskutiert ob neben den vielfältigen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede zu den bekannten epidermalen Notch-defizienten Mausmodellen auftreten und ob die verwandte Metalloprotease ADAM17, die lange Zeit als potenziell wichtigste Sheddase für den Notch1-Rezeptor galt (Mumm et al., 2000; Brou et al., 2000), eine redundante Rolle in der ADAM10 defizienten Epidermis einnehmen kann.

5.1.1 Der Verlust von ADAM10 in der murinen Epidermis führt vorwiegend zum perinatalen Tod der Mäuse

Wie anhand Tabelle 4.1 gezeigt werden kann, sterben über 95% der ADAM10^{Epi^{-/-}}-Mäuse innerhalb der ersten 24h nach ihrer Geburt. Die Phänotypen der wenigen überlebenden Mäuse wird unter 5.2 diskutiert. Der entscheidende Grund für den vorzeitigen Tod der ADAM10 defizienten Mäuse konnte nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Neben dem erhöhten Wasserverlust durch eine defekte Barriere, könnte eine gestörte Nahrungsaufnahme oder -verwertung möglich sein, da eine K14 Expression auch für die Epithelien des Verdauungstraktes z.B. der Zunge, des Gaumens, der Zähne, des Ösophagus und des Magens berichtet wurde (Byrne et al., 1994; Dassule et al., 2000). Die wenigen überlebenden Tiere zeigen jedoch, dass die Funktion von ADAM10 in der Epidermis in jedem Fall essentiell für das Überleben der Mäuse ist.

Ein Vergleich mit den bekannten epidermalen Notch Knockout Mäusen zeigt, dass der Verlust einzelner Notch-Rezeptoren (Rangarajan et al., 2001; Demehri et al., 2008) und Notch-Liganden (Estrach et al., 2006; Estrach et al., 2008) im Gegensatz zum Knockout universeller *downstream* Mediatoren des Notch Signalweges, z.B. Presenilin, RBP-jk und Hes-1 (Pan et al., 2004; Blanpain et al., 2006; Moriyama et al., 2008) nicht zum perinatalen Tod der Mäuse führt. Dies lässt auf eine Redundanz der einzelnen Rezeptoren und Liganden untereinander schließen.

Der frühe Tod der ADAM10^{epi^{-/-}} Mäuse zeigt somit, dass ADAM10 auf der einen Seite ein universeller *upstream* Regulator des Notch Signalwegs ist und auf der anderen Seite nicht durch eine andere Protease in seiner Funktion ersetzt werden kann. Zwar wurde

zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine Publikation eines epidermalen Knockouts von ADAM17 veröffentlicht, aber die Analyse der Epidermis einer hypomorphen ADAM17 Maus (Chalaris et al., 2010 und persönliche Kommunikation Chalaris, Biochemisches Institut Kiel) zeigte keinerlei Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp ADAM10 oder Notch-defizienter epidermaler Knockout Mäuse. Während die Epidermis der hypomorphen ADAM17 Mäuse morphologisch unverändert scheint, kann eine Zunahme des subkutanen adipösen Fettgewebes und eine Infiltration der Haarfollikel mit Entzündungszellen beobachtet werden. Dies zeigt weiterhin, dass ADAM17 in der murinen Epidermis sehr wahrscheinlich keine redundanten Funktion für ADAM10 *in vivo* besitzt

5.1.2 Neugeborene Mäuse mit einer ADAM10 defizienten Epidermis zeigen eine Barrierestörung

Die murine Epidermis ist ein stratifiziertes Plattenepithel, mit der Fähigkeit zur ständigen Selbsterneuerung durch einige wenige mitotisch aktive Zellen in der Basalmembran und den Haarfollikeln. Der entscheidende Schritt ist dabei der gleichzeitige Austritt aus dem Zellzyklus, sowie die Ablösung von der Basalmembran. Eine genaue Steuerung dieses Prozesses ist sowohl in der Morphogenese, der Homöostase als auch im Wundheilungsprozess entscheidend. Die Integrität der epidermalen Barriere wird nach heutigem Wissenstand von drei maßgeblichen Faktoren gewährleistet: Die Bildung eines *Cornified Envelope* (CE) aus terminal differenzierten Keratinozyten (im wesentlichen durch die Kalzium-induzierte Spaltung von Profilaggrin zu Fillaggrin und deren Verbindung mit Makrofibrillen), die Einlagerung von freien epidermalen Lipiden in das *stratum granulosum* und *stratum corneum* sowie die Ausbildung von *Tight/Adherence junctions* in allen Schichten (Koster und Roop, 2007, Fuchs 2007). Ist die Synthese oder Lokalisation dieser Komponenten zu stark beeinträchtigt, kann die Barrierefunktion nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Experimente zum transepidermalen Wasserverlust zeigten, dass die neugeborenen ADAM10^{Epi/-}-Mäuse eine gestörte Barriere aufweisen, da sie signifikant mehr Wasser verlieren als die Kontrollen. Die Analyse eines Microarrays der Epidermis von neugeborenen ADAM10^{Epi/-}-Mäusen zeigte, dass die Expression der meisten Gene, denen eine Funktion im Bereich *Tight/Adherence Junctions* zugeordnet wird (z.B. E-Cadherin, P-Cadherin, Claudin 1), nahezu unverändert, die Expression von Genen, die bei der

Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten eine wichtige Rolle spielen (z.B. *Sppr* Gene), sehr stark erhöht und die Expression der Gene für den epidermalen Lipidmetabolismus (z.B. *arachidonate 12-lipoxygenase*, *stearoyl-Coenzyme desaturase 2*), nahezu durchgängig erniedrigt ist. Daraus ergab sich die Überlegung, dass eine Beeinträchtigung der Lipidbarriere am wahrscheinlichsten in Betracht zu ziehen ist. Die durchgeführten Nilrot Färbungen konnten diese Vermutung bestätigen. Diese Beobachtungen entsprechen dem Phänotyp von Knockout Mäusen des Notch Signalwegs (Pan et al., 2004; Demehri et al., 2008) und weitergehende molekularbio-logische Untersuchungen anderer Forschungsgruppen konnten auch eine direkte Verbindung dieses Signalwegs mit zentralen Mediatoren des Lipidmetabolismus (z.B. Ppar γ) zeigen (Nickoloff et al., 2002; Huang et al., 2010).

In präliminären Experimente konnten im Weiteren keine Veränderung der Proteinexpression und -lokalisation von typischen *Tight/Adherence Junction* Proteinen (z.B. E-Cadherin) oder Keratinisierungsmarkern (z.B. Fillagrin, Keratin 6) detektiert werden. Eine detaillierte Analyse dieser Klassen von Proteinen könnte Aufschluss über einen eventuellen Beitrag von Defekten bei der epidermalen Stratifizierung sowie der Integrität von *Tight/Adherence Junctions* zur Ausbildung einer Barrierestörung liefern. Im Gegensatz zu den hier untersuchten Mäusen liegen nur unvollständige Angaben über einen möglichen Barrieredefekt in neugeborenen epidermalen Knockout Mäusen des Notch Signalweges vor. Lediglich Presenilin1/2 doppeldefiziente Mäuse zeigen einen vergleichbare Reduktion der Expression von Genen des Lipidmetabolismus und eine hieraus folgende, verminderte Inkorporation von epidermalen Lipiden in Talgdrüsen und suprabasalen Schichten (Pan et al., 2004; Demehri et al., 2008). Diese Mäuse zeigten jedoch auch einen Defekt der *Outside-In* Barriere an E18.5, der in den ADAM10^{Epi/-} Mäusen nicht evident war. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass Notch-defiziente Tiere, die älter als P1 oder erst postnatal defizient für Komponenten des Notch-Signalweges sind, sekundäre Antworten auf eine mögliche Barrierestörung zeigen. Dies sind in erster Linie Hyperproliferation und Verdickung der basalen Schicht der Epidermis, Hyperkeratinisierung und die Infiltration von Leukozyten (Segre, 2003). Auch die wenigen überlebenden ADAM10^{Epi/-} Tieren zeigen diese Antworten, sie werden eingehend in Kapitel 5.2.1.1 erläutert. Im Hinblick auf die Bedeutung von

ADAM17 für die embryonale Entwicklung einer intakten Barriere liegen keine Daten vor.

5.1.3 Die ADAM10 defiziente Epidermis von neugeborenen Mäusen zeigt einen Defekt im terminalen Differenzierungsprogramm der Epidermis

Die epidermale Stratifizierung ist ein streng regulierter Prozess, der letztendlich zur Bildung einer wasserundurchlässigen Barriere führt. Bei Mäusen dauert er etwa 10 Tage und beginnt mit der epidermalen Spezifizierung des embryonalen Ektoderms an Embryonaltag 8.5 (E8.5) in die Basalschicht. Hieraus entsteht zunächst eine Intermediärschicht, die einem noch nicht vollständig aufgeklärten Prozess durch das *stratum spinosum* ersetzt wird (E9.5 - E15.5). Diese postmitotischen Zellen differenzieren dann zunächst zum *stratum granulosum* und abschließend zum *stratum corneum* (E15.5 – E18.5). Jeder Differenzierungsschritt ist durch die Expression von spezifischen Differenzierungsmarkern und Transkriptionsfaktoren charakterisiert. Konditionale Knockout-Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor p63 eine essentielle Rolle bei dem Beginn der epidermalen Stratifizierung einnimmt (Mills et al., 1999).

Die Histologien der ADAM10 defizienten Mäuse zeigen nun, dass außer dem *stratum spinosum* alle weiteren Schichten offensichtlich unverändert in Morphologie und der Expression von Differenzierungsmarkern sind. Eine elektronenmikroskopische Betrachtung des *stratum spinosum* konnte eine Verringerung der Schichten im *stratum spinosum* und eine Abflachung der Keratinozyten bei jedoch vergleichbarer Charakteristik im Bezug auf das Vorhandensein von Keratinfilamenten und desmosomalen Kontakten sowie der Abwesenheit von Keratohyalingranula (die vorzeitige Anwesenheit von Keratohyalingranula im *stratum spinosum* wurde schon in pathophysiologisch veränderter Epidermis beschrieben (Kirwan und Dokal, 2009; Alter et al., 2009) zeigen. Dies bedeutet, dass ADAM10 im Gegensatz zu p63 nicht für die Initiation der epidermalen Stratifizierung notwendig und vermutlich auch keine entscheidende Funktion bei der Differenzierung der granulären Keratinozyten zu Korneozyten ausübt. Dies wurde gleichermaßen auch für den Notch Signalweg gezeigt

(Rangarajan et al., 2001; Nicolas et al., 2003, Pan et al., 2004; Vauclair et al., 2005; Blanpain et al., 2006; Demehri et al., 2008, Moriyama et al., 2008).

Nachdem Unterschiede der Keratinozyten von ADAM10^{Epi-/-} Mäusen bezüglich ihres proliferativen oder apoptotischen Verhaltens an P0 ausgeschlossen werden konnten, könnte der Defekt entweder im Übergang der Keratinozyten von der mitotischen intermediären Schicht und des postmitotischen *stratum spinosum* oder in der beeinträchtigten Homöostase bzw. einer frühzeitigen terminalen Differenzierung der Keratinozyten im *stratum spinosum* in Richtung des *stratum granulosum* begründet sein. Für beide Vorgänge konnte eine essentielle Beteiligung des Notch Signalweges gezeigt werden (Rangarajan et al., 2001; Blanpain et al., 2006, Moriyama et al., 2008). Dabei ist eine suprabasale Aktivierung von Notch während der Embryogenese sehr wahrscheinlich für eine ausreichende Aufenthaltsdauer der spinalen Keratinozyten erforderlich. Diese werden dann durch evtl. negative *feedback* Mechanismen wieder reduziert, was eine terminale Differenzierung der Keratinozyten ermöglicht. Ein direkter Vergleich von ADAM10 und den Komponenten des Notch Signalweges im Hinblick auf Defekte der epidermalen Stratifizierung zeigt, dass es durchaus phänotypische Unterschiede gibt, die sich wohl in erster Linie auf mögliche Redundanzen von z.B. Notch-Rezeptoren und -liganden sowie der pleiotropen Funktionen von Notch *downstream* Mediatoren wie Rbp-jk oder Hes-1 zurückführen lassen. Weiterhin konnte für den Notch Signalweg auch eine Bedeutung der nicht-kanonischen Signalweiterleitung gezeigt werden (Vied und Kalderon, 2009; Sanakulmar et al., 2010), welcher keiner Proteolyse des Notch-Rezeptors bedarf und daher in den ADAM10 defizienten Zellen im Gegensatz zu den Notch-defizienten Zellen unbeeinflusst bleibt. So zeigen z.B. Mäuse mit Hes-1, RBP-jk oder Notch1/Notch2 defizienter Epidermis ebenfalls eine drastischer Verringerung der epidermalen Dicke durch ein schmaleres *stratum spinosum*, zeichnen sich aber zudem z.B. durch ein hypoproliferatives Verhalten der basalen Keratinozyten und fehlenden Keratinfilamente im *stratum spinosum* (Hes-1 Knockout), einer verminderten Expression von Differenzierungsgenen des *stratum granulosum* und verminderten Anzahl von Keratohyalin granula (RBP-jk Knockout) oder einer verminderten Dicke des *stratum granulosum* (Notch1/Notch2 Doppel Knockout) aus (Moriyama et al., 2008). Die Epidermis der Notch1 defizienten Maus zeigt sogar ein hyperproliferatives Verhalten

der basalen Keratinozyten und eine Verdickung der Epidermis (Rangarajan et al., 2001). Hierbei ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass schon geringe Abweichungen im Bezug auf den Präparationszeitpunkt (embryonal, perinatal oder postnatal) einen starken Einfluss auf den beobachteten Phänotyp haben können.

Weiterhin könnten der abweichende genetische Hintergrund sowie die Verwendung verschiedener K14- oder K5-Cre transgener Mauslinien ebenfalls zu den Unterschieden beitragen. Ein Abgleich mit den epidermalen Knockouts anderer bekannter wichtiger Proteine der epidermalen Differenzierung zeigte jedoch eindeutig die größte Übereinstimmung mit Notch defizienten Modellen (Segre, 2003; Koster und Roop 2007, Fuchs, 2007; Watt et al., 2008). Nicht auszuschließen bleibt jedoch die Möglichkeit, dass ADAM10 neben den Notch-Rezeptoren noch weitere Oberflächenmoleküle, die eine wichtige Rolle bei der epidermalen Stratifizierung besitzen, auch *in vivo* prozessieren (z.B. E-Cadherin). Der Verlust der proteolytischen Prozessierung dieser Proteine, kann ebenfalls zur Komplexität des beobachteten Phänotyps der ADAM10^{Epi-/-} Mäuse beitragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ADAM10 in der murinen Epidermis eine universelle *upstream* Regulationsfunktion des kanonischen Notch Signalweges ausübt, die zu einem Defekt im terminalen Differenzierungsprogramm der suprabasalen Keratinozyten führt. Die Generation der ADAM10^{Epi-/-} -Mäuse konnte somit als erstes Mausmodell, die funktionelle Relevanz von ADAM10 bei der Morphogenese der murinen Epidermis beschreiben und die Beeinträchtigung des kanonischen Notch-Signalwegs als eine molekulare Ursache des beobachteten Phänotyps identifizieren.

5.2 Die Funktion von ADAM10 in der Homöostase der murinen Epidermis

Wie schon in 5.1.2 erwähnt, stellt die Epidermis eine sich ständig selbst erneuernde Barriere zur Vermeidung des unkontrollierten transepidermalen Wasserverlustes und einer mikrobiellen oder toxischen Invasion von außen dar. Bei der Selbsterneuerung oder auch der Wundheilung müssen aus einer geringen Zahlen von Stammzellen oder epidermalen Progenitorzellen mit erhöhtem Differenzierungs und erniedrigtem Selbsterneuerungspotenzial, den sogenannten *transit-amplifying* Zellen, durch asymmetrische

Zellteilungen Tochterzellen mit einem aktivierten terminalen Differenzierungsprogramm hervorbringen und die epidermale Barriere so schnell wie möglich wieder einwandfrei zu gewährleisten (Blanpain und Fuchs, 2009, Fuchs 2007).

Wie bei der Wundheilung, zeigen auch Mäuse mit einer verzögerten oder unvollständigen Barrierebildung *in utero* eine starke Kompensationsreaktion der Epidermis um die Barriere zu schließen, sobald sie geboren werden (Blanpain und Fuchs, 2009, Fuchs 2007). Diese Reaktionen führen jedoch häufig zu sekundären Antworten, die in den wenigen ADAM10^{Epi-/-} Mäusen, die länger als 24h vital waren beobachtet werden konnten und in den folgenden Kapiteln diskutiert werden. Auch hierbei werden Parallelen und Unterschiede zu bekannten Knockout Mausmodellen des Notch Signalweges aufgezeigt.

5.2.1 Der andauernde Verlust von ADAM10 in der murinen

Epidermis führt neben zellautonomen Defekten in der Epidermis auch zur stromalen und systemischen Beeinträchtigung anderer Gewebe

Die Aktivität des K14 Promotors ist nahezu ausschließlich auf die basale Schicht des verhornten Plattenepithels beschränkt (Byrne et al., 1994; Dassule et al., 2002). Dies macht ihn zu einem bevorzugten Promotor bei der konditionalen Deletion von Proteinen in der Epidermis. Neben der Epidermis, gibt es aber auch noch andere Gewebe in der Maus, die ein verhorntes Plattenepithel aufweisen oder hiervon unabhängig eine Aktivität des K14 Promotors aufweisen. Dies sind z.B. Epithelien des Ösophagus, der Gaumenplatte und der Zähne, des Thymus, des Magens und der weiblichen Geschlechtsorgane (Byrne et al., 1994). Phänotypen die in diesen beschriebenen Geweben auftreten, können dementsprechend rein zell-autonom oder durch eine Mischung von zell-autonomen, stromalen oder systemischen Antworten ausgelöst werden. Sind jedoch Gewebe betroffen, die keinerlei K14 positive Epithelien besitzen, so ist davon auszugehen, dass hier stromale oder systemische Effekte dominieren.

Die untersuchten ADAM10^{Epi-/-} Mäuse (P18) zeigen eine Vielzahl dieser stromalen und systemischen Antworten, die nicht nur Rückschluss auf die molekulare Funktion von

ADAM10 zulassen, sondern auch die generelle Funktion der Haut, z.B. als Regulator des Immunsystems, der Hämatopoese oder des Fettstoffwechsels zulassen.

5.2.1.1 Betrachtung der Interfollikulären Epidermis (IFE) und der epidermalen Appendizes

Die Analyse der neugeborenen ADAM10 defizienten Mäuse zeigt ein eher hypoproliferatives Verhalten der Epidermis, das im Wesentlichen durch eine dünnere Epidermis und im Besonderen durch ein kaum vorhandenes *stratum spinosum* gekennzeichnet ist. Werden die Mäuse älter ist jedoch eine epidermale Verdickung, begleitet von einem hyperproliferativen Verhalten der basalen Keratinozyten zu beobachten. Wie ist diese Diskrepanz zu erklären? Zunächst einmal ist auffällig, dass diese Diskrepanz ebenso in PS1/PS2 oder Notch1/Notch2 defizienten Mäusen auftritt (Rangarajan et al., 2001; Pan et al., 2004; Moriyama et al., 2008; Demehri et al., 2008). Auch hier könnte also die Beeinträchtigung des Notch Signalweges eine entscheidende Rolle spielen. Hinzu kommt die Erkenntnis, dass offenbar abweichende Formen der asymmetrischen Zellteilung von Stammzellen auftreten. Diese verschiedenen Formen der Zellteilung und die Bedeutung der Notch-Aktivität während der Morphogenese und der Homöostase von ADAM10 defizienter und normaler Epidermis werden als Modell in Bild 5.1 zusammengefasst.

Wie in 1.4.3 beschrieben, findet in der adulten Epidermis vorwiegend eine parallel zur Basalmembran ausgerichtete asymmetrische Zellteilung statt, während in der embryonalen Morphogenese die asymmetrische Zellteilung lotrecht zur Basalmembran geschieht um eine schnelle und gleichmäßige Stratifizierung der Epidermis zu erreichen. Die hieraus entstandene Tochterzelle ist somit schon suprabasal und hat keinen Kontakt mehr zur Basalmembran. Dementsprechend ist in diesem Fall keine Erhöhung der Notch-Aktivität für den basalen-suprabasalen Übergang erforderlich. Weiterhin erfolgt ein beschleunigter Übergang der Keratinozyten vom *stratum spinosum* zum *stratum granulosum*. Dieser wird im Normalfall durch eine Reduktion der Notch-Aktivität eingeleitet, welche in den ADAM10 defizienten Keratinozyten, wie unter 4.1.4 gezeigt, dauerhaft erniedrigt ist. In der adulten Epidermis hingegen wird der Übergang der Tochterzelle aus der basalen in die suprabasale Schicht durch eine Erhöhung der Notch-Aktivität induziert, die in den ADAM10 defizienten Keratinozyten

stark vermindert ist. Dies könnte die Akkumulierung der Ki67 positiven Zellen in der basalen Schicht als eine Folge des verspäteten Eintritts in die terminale Differenzierung erklären.

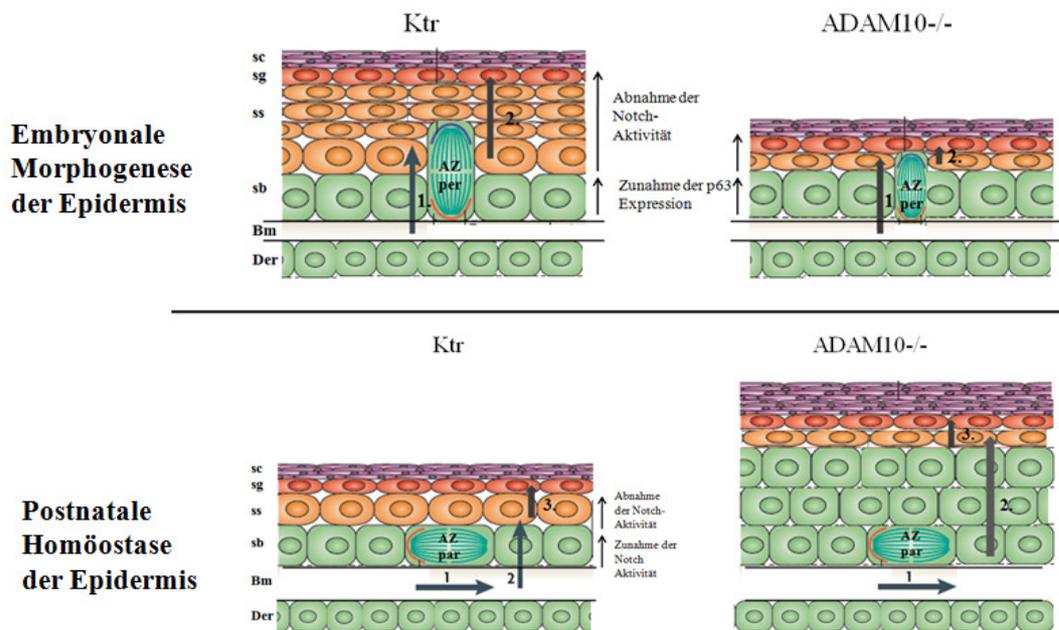


Bild 5.1: Modell zur Funktionsanalyse von ADAM10 bei der Morphogenese und der Homöostase der murinen Epidermis

Während der embryonalen Morphogenese der Epidermis kommt es zu asymmetrischen Zellteilungen (AZ), die perpendicular (per) zur Basalmembran (BM) erfolgen. Dieser Schritt (1.) wird hauptsächlich durch die Expressionsteigerung des epidermalen Transkriptionsfaktors p63 ausgelöst. In einem zweiten Schritt erfolgt der Übergang der Keratinozyten vom *stratum spinosum* (ss) zum *stratum granulosum* (sg) durch die Reduktion der Notch Aktivität. Demgegenüber erfolgt die asymmetrische Zellteilung in der postnatalen Epidermis parallel (par) zur Basalmembran. Für den Übergang der Keratinozyten vom *stratum basale* (sb) zum *stratum spinosum* (ss) ist eine Erhöhung der Notch-Aktivität erforderlich. Gleichermassen muss für den späteren Übergang der Keratinozyten vom *stratum spinosum* zum *stratum granulosum* und *stratum corneum* (sc) die Reduktion der Notch Aktivität erfolgen.

Vergleichbar zur embryonalen Morphogenese der Epidermis ist jedoch auch hier der Übergang vom *stratum spinosum* zum *stratum granulosum* beschleunigt, was durch eine Reduktion des *stratum spinosum* bei gleichzeitiger Hyperkeratose angezeigt wird. Neben der IFE sind auch die Talgdrüsen und die Haarfollikel in ADAM10^{Epi-/-} Mäusen pathophysiologisch verändert.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden, ob nur die Lipideinlagerung oder die komplette Anlage der Talgdrüsen gestört ist. Ein Vergleich mit der Epidermis von Notch-defizienten Tieren weist daraufhin, dass die Anlage der Talgdrüsen nicht Notch-abhängig, sondern in erster Linie von Proteinen des *sonic hedgehog* (Shh) und des *bone morphogenetic protein* (bmp) Signalwegs gesteuert wird (Blanpain und Fuchs,

2009, Fuchs 2007). Da eine ADAM vermittelte proteolytische Prozessierung auch für Proteine dieses Signalweges gezeigt wurde (Maretzky et al., 2005; Dierker et al., 2009), ist anhand weiterer Analysen zu klären, ob die Anlage der Talgdrüse oder nur die Lipideinlagerung gestört ist.

Weiterhin ist noch völlig unbekannt, welchen Beitrag die Talgdrüsen zur physiologischen Funktion von Haarfollikeln und IFE einnehmen (Blanpain und Fuchs, 2009, Fuchs 2007). Eine weitere wichtige Funktion nimmt ADAM10 in der Haarentwicklung ein. Obwohl die Analyse der P0 und auch der P18 Tiere zeigte, dass Haarfollikel in gleicher, wenn nicht sogar in erhöhter Anzahl gebildet werden, bleiben die Tiere bis zu einem Alter von 18 Tagen völlig nackt. Die histologische Untersuchung zeigt, dass die Haarfollikel überwiegend zu epidermalen Zysten degeneriert sind. Die Stärke des Phänotyps ist vergleichbar mit den epidermalen Knockouts von universellen Notch *downstream* Regulatoren (Pan et al., 2004; Blanpain et al., 2006; Moriyama et al., 2008) und belegt erneut die universelle *upstream* Funktion von ADAM10 im Bezug auf den Notch Signalweg. Eine mögliche Erklärung warum es zu diesem Phänotyp kommt, ist die Erkenntnis, dass die Stammzellen des Haarschaftes ohne Notch-Aktivität bevorzugt das Schicksal von IFE Keratinozyten annehmen und nicht in Haarzellen differenzieren (Lee et al., 2007; Demehri et al., 2009b). Somit scheint auch für ADAM10 eine Rolle als Initiator für Zellschicksalsentscheidungen wahrscheinlich. Analog zu der vermutlichen Rolle des Notch Signalweges könnte die Stärke der ADAM10 Aktivität als Schalter für die eingeschlagene Richtung der Zelldifferenzierung von Stammzellen des Haarfollikels wirken.

Alle bis jetzt beschriebenen Phänotypen der ADAM10^{Epi-/-} Mäuse (P18) können vorrangig als zell-autonom eingestuft werden. Hiervon abweichend fällt eine starke Infiltration der Epidermis, aber auch der darunter liegenden Dermis und Kutis mit Leukozyten auf. Diese sekundäre Antwort auf einen Barrieredefekt kann häufig beobachtet werden und ist meistens von einer erhöhten Zytokinsekretion und Einwanderung von Entzündungszellen begleitet. (Watt et al., 2008; Demehri et al., 2008, Dumortier et al., 2010). Die histologische Betrachtung kann dies bestätigen und zeigt die Invasion eines gemischten leukozytären Infiltrats in den ADAM10^{Epi-/-} Mäuse (P18), jedoch noch nicht in den ADAM10^{Epi-/-} Mäuse (P0) Mäusen. Diese Beobachtungen bestätigen die Vermutung, dass es sich hierbei um eine sekundäre Antwort auf den

embryonal entstandenen Barrieredefekt handelt.

Die Auswertung des Microarrays der neugeborenen Tiere zeigte mit Ausnahme des Zytokins *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP) noch keine Steigerung von Genexpressionsleveln bekannter Entzündungsmediatoren, wie TNF- α oder Interleukin 6 (IL-6) in der Epidermis der ADAM10^{Epi-/-} Mäuse. Sehr interessant in diesem Zusammenhang war jedoch die 30fache Expressionssteigerung des Keratinozyten-entstammenden Zytokins TSLP, das ein starkes Chemokin für T-Zellen sowie ein Maturierungsfaktor für dendritische Zellen und Mastzellen darstellt (Demehri et al., 2008; He und Geha, 2010). Es steht im Verdacht einer der Hauptmediatoren für die systemische Entstehung von allergischem Asthma aus atopischen Erkrankungen der Haut (der sogenannte „Atopische Marsch“) zu sein. Eine ELISA-Analyse des Plasmas von P9 und P18 alten ADAM10 defiziente Mäusen zeigte dann auch eine drastische Erhöhung auf Proteinebene, die zum Zeitpunkt P0 noch nicht beobachtet werden konnte. Die Genexpression dieses Zytokins wurde auch in der Epidermis von Notch-defizienten Mäusen (Demehri et al., 2008, Demehri et al., 2009) gefunden und eingehend auf eine mögliche direkte molekulare Verbindung untersucht. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass die Erhöhung der Expressionslevel nicht direkt auf den Notch-Signalweg sondern auf eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges zurückzuführen und in einer Vielzahl von Mausmodellen mit einem signifikanten Barrieredefekt einhergeht (Demehri et al., 2008, Hirasawa et al., 2009; Briot et al., 2009).

5.2.1.2 Betrachtung von Dermis und (Sub-)Kutis

Als direkt benachbarte Hautschicht unterhalb der Epidermis konnte für die Dermis auch in vorangegangenen Studien eine direkte gegenseitige Wechselwirkung mit der Epidermis beobachtet werden (Segre, 2003; Koster und Roop, 2007; Dumortier et al., 2010). So wurde z.B. für epidermale Notch1-defiziente Mäuse eine tumorfördernde Wirkung des Stromas (Dermis) für die Bildung von *Basal Cell Carcinomas* (BCC) der darüber liegenden Epidermis postuliert. Dies konnte u.a. durch eine Hyperzellularität der Dermis, einem Anstieg von stroma-spezifischen Wachstumsfaktoren in der Epidermis, einer gesteigerten Infiltration von Leukozyten und einer erweiterten Vaskularisierung gezeigt werden. Abgesehen von der erhöhten Vaskularisierung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, konnten all diese Veränderungen auch in den

ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18) Mäusen, sowie den ADAM10^{Epi-induz} Mäusen (5.2.2) beobachtet werden. Da die ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18) Mäuse jedoch nicht die notwendige Lebensspanne für die Inokulation von Krebszellen oder für das spontane Auftreten von Tumoren besaßen, kann bis jetzt noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob auch ADAM10 eine tumor-suppressive Funktion in der Haut erfüllen kann.

Neben den Veränderungen in der Dermis waren auch in der Subkutis eindeutige Veränderungen zu bemerken. Einerseits wiesen die ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18) Mäuse einen nahezu totalen Verlust des subkutanen Fettgewebes auf, andererseits zeigten sie eine stark erhöhte Anzahl von kutanen Haarfollikeln, die in Wildtyptieren des gleichen Alters sehr viel seltener auftraten. Der Verlust oder die Reduktion des subkutanen Fettgewebes in konditionalen, epidermalen Mausmodellen mit einer Barrierestörung ist ähnlich der erhöhten Sekretion von TSLP ein häufiger beobachtetes Phänomen (Binczek et al., 2007), dem mehrere Ursachen zu Grunde liegen können. Zum einen führt das sich nicht entwickelnde Fell in der ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18) Maus zu einem beträchtlichen Wärmeverlust, der z.B. durch die gezielte Metabolisierung des energiereichen Fettgewebes ausgeglichen werden könnte. Eine weitere Ursache wird auch als *wasting syndrome* bezeichnet und beschreibt die verstärkte Metabolisierung von Fett- und Glykogenspeicher, als Folge erhöhter Zytokinlevel (z.B. TNF- α , Il-6) (Barton, 2001; Bennani-Baiti und Davis, 2008, Arruda et al., 2010). Sie konnte auch bei Krebspatienten und Personen mit chronischen entzündlichen Erkrankungen, z.B. rheumatoider Arthritis (Morley et al., 2006) nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der Glykogen- und Fettspeicher der Leber, sowie eine Analyse des Plasmas von ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18) Mäusen im Hinblick auf diese Zytokine könnte genutzt werden um diese Frage zu klären. Epidermale Knockout Mäuse des Transkriptionsfaktors JunB zeigten eine so drastische Variante des *wasting syndromes*, dass neugeborene Mäuse innerhalb von zwei Tagen daran starben (Meixner et al., 2008). Es ist nicht auszuschließen, dass auch ein Großteil der ADAM10^{Epi^{-/-}} Mäuse eine ähnliche Form des hypermetabolischen *wasting syndrome* aufweist und nicht allein aufgrund des erhöhten Wasserverlustes stirbt. Wie schon einleitend erwähnt, wiesen die ADAM10^{Epi^{-/-}} Mäuse ebenfalls eine große Anzahl von ungewöhnlich tief reichenden, kutanen Haarfollikeln auf. Dies könnte ebenfalls mehrere Gründe haben. Die Anzahl und die Polarisierung der Haarfollikel werden in starkem Maße durch den β -Catenin Signalweg gesteuert. Ein

übermäßig starkes Signal führt zu unkontrolliertem Haarwuchs (Gat et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der β -Catenin Signalweg dabei selbst durch die Aktivität des Notch Signalwegs reguliert wird (Ambler et al., 2007; Okuyama et al. 2008; Collins et al., 2008). In der ADAM10^{Epi-/-} Maus ist nahezu keine Notch-Aktivität detektierbar und es ist denkbar, dass die hierdurch gesteigerte β -Catenin Aktivität diesen beobachteten Haarphänotyp erklären könnte.

Weiterhin führt eine Verminderung der Notch-Aktivität in Haarfollikeln zu einer verlängerten Wachstumsphase (Anagen), bzw. zu einem verspäteten Eintritt in die Degenerationsphase (Katagen). Da sich Mäuse an P18 normalerweise genau am Ende des Katagens befinden, sind ihre Haarfollikel dementsprechend nah an der Epidermis lokalisiert, während Haarfollikel am Ende des Anagens (wie in den ADAM10^{Epi-/-} (P18) Mäusen) sehr tief in der Dermis oder Kutis liegen. Dementsprechend könnten die P18 ADAM10^{Epi-/-} Mäuse eine Verlängerung der anagenen Wachstumsphase aufweisen. Dies wurde auch für verschiedene Notch-defiziente Mauslinien beobachtet (Pan et al., 2004, Lee et al., 2007; Demehri et al., 2009).

5.2.1.3 Betrachtung der peripheren lymphatischen Organe und des Blutes

Obwohl die ADAM10^{Epi-/-} (P18) Mäuse starke Unterschiede des äußeren Erscheinungsbildes aufweisen, zeigen von den inneren Organen lediglich Milz, Lymphknoten und Thymus offensichtliche Unterschiede. Während durch die Keratin14 exprimierenden thymischen Epithelzellen, auch ein zusätzlicher zell-autonomer Effekt zu der thymischen Atrophie beitragen kann, sind Milz und Lymphknoten in keiner Weise von einer ADAM10 Deletion betroffen. Sie tragen jedoch eine Schlüsselfunktion für die Aufrechterhaltung der adaptiven, humoralen Immunantwort. Da für diese Organe aufgrund der geringen Anzahl der überlebenden Tiere noch keine histologischen oder immunologischen Experimente durchgeführt wurden, kann lediglich spekuliert werden, dass die Splenomegalie eine Antwort auf eine, durch die defekte Barriere, möglicherweise erhöhte Zytokinsekretion der Keratinozyten darstellt. Konkret konnte dies bis jetzt jedoch nur für das Chemokin TSLP gezeigt werden. Dieses ist aber bis jetzt noch nicht als Auslöser für eine Hyperproliferation von Milz oder Lymphknoten bekannt. Alle beschriebenen systemischen Phänotypen unterstreichen die Bedeutung der intakten Epidermis für die Homöostase und die Entwicklung des kompletten

Organismus und damit letztendlich auch der Bedeutung der regulierten Aktivität von ADAM10 in diesem Gewebe.

5.2.2 Der induzierte Verlust von ADAM10 in der murinen Epidermis führt zu irreversibler Alopezie, Hyperproliferation des *stratum basale* und Hyperkeratinisierung

Ziel dieses Mausmodells war die Funktionsanalyse von ADAM10 in der postnatalen Epidermis. Die unter 5.1 und 5.2 beschriebenen Beobachtungen zeigen eindeutig, dass die embryonale Deletion von ADAM10 einen starken Entwicklungsphänotyp nicht nur in der Haut, sondern auch in benachbarten Geweben verursacht. So kann der Verlust von subkutanem Fettgewebe oder das vermehrte Einwandern von Entzündungszellen die eigentliche Funktion von ADAM10 in der postnatalen Epidermis verdecken. Dies stellt ein großes Hindernis für die Erforschung der Beteiligung von ADAM10 bei der Entstehung und Progression von z.B. Tumoren oder chronischen Entzündungskrankheiten der Haut dar. Es ist daher essentiell, dass die Mäuse bis zu dem gewünschten Versuchszeitpunkt eine völlig gleiche Entwicklung nehmen. Mit Hilfe des unter 3.1.6 beschriebenen Tet-off Systems konnte dies erfolgreich durchgeführt werden.

Die Beobachtung induzierbarer Mäuse, die weiterhin auf doxyzyklinhaltigem Futter gezüchtet werden, zeigt zudem, dass keine basale Transkriptionsaktivität „leakiness“ des *Tetracycline Response Element* (TRE) des Promotors auftritt. Da bis jetzt nur Mäuse zur induzierten Deletion verwendet wurden, die ein Alter von 21 Tagen aufwiesen, ist es zu prüfen, ob die Deletion auch in noch älteren Mäusen durchführbar ist. Der Erfolg der Deletion konnte neben den ausführlich unter 4.2 beschriebenen Methoden auch leicht über den kontinuierlichen Haarverlust der Mäuse, welcher nach etwa 18 Tagen Doxyzyklin-Entzug einsetzt, beobachtet werden. Noch ist dabei unklar, ob die Latenzzeit von 18 Tagen auf eine Depotwirkung des Doxyzyklins oder auf eine pathologische Störung einer bestimmten Phase des Haarzyklus zurückzuführen ist. Die Degeneration der Haarfollikel zu epidermalen, Loricrin-positiven Zysten erfolgt ähnlich wie in den ADAM10^{Epi^{-/-}} (P18) Mäusen, jedoch mit geringerer Frequenz. Da in anderen Mausmodellen mit Hilfe von *Label-retaining* Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Stammzellen des Haaransatzes in adulten Tieren sich nur sehr langsam selbst

erneuern (Fuchs, 2007; Blanpain und Fuchs, 2009), konnte dies die bereits erfolgten Beobachtungen verifizieren.

Dies gilt in gleicher Weise für das subkutane Fettgewebe, das an einigen Stellen sehr stark an anderen Stellen noch gar nicht vermindert ist. Sehr eindeutig und mit der Stärke des Phänotyp der ADAM10^{Epi-/-} (P18) vergleichbar, fällt die Hyperproliferation der basalen Keratinozyten aus. Eine putative Erklärung hierfür wurde schon unter 5.2.1.1 gegeben. Zusammengenommen mit der erhöhten Infiltration von Leukozyten und der Hyperkeratinisierung zeigen also auch die ADAM10^{Epi-induz} Mäuse viele sekundäre Phänotypen einer Barrierestörung. Hierzu wurden präliminäre Experimente in Zusammenarbeit mit der Dermatologie Kiel (Ag Proksch, UK-SH Kiel) durchgeführt. Mit Hilfe von *tape stripping* Experimenten, bei denen eine oberflächliche Hautverletzung simuliert wurde, konnten erhöhte Werte des transepidermalen Wasserverlustes, bei einer stark erniedrigten Hydratation des *stratum corneum*, einen Defekt der *inside-out* Barriere aufzeige.

5.2.3 Molekulare Aspekte der postnatalen Deletion von ADAM10 in der murinen Epidermis

Da aus den Studien der epidermalen Entwicklung unter ADAM10 Defizienz schon bekannt war, dass die Proteolyse von Notch-Rezeptoren durch ADAM10 vermittelt wird, erfolgte ein erneuter Abgleich mit den bekannten induzierbaren Mausmodellen des Notch Signalweges. Dabei stellte sich heraus, dass die Ausprägung des ADAM10 Knockout Phänotyps deutlich stärker als in z.B. Notch1-Rezeptor einzeldefizienten Mäusen war und mehr den Mausmodellen mit einem kompletten Block des Notch-Signalweges entspricht (Rangarajan et al., 2001; Pan et al., 2004; Blanpain et al., 2006; Lee et al., 2007; Moriyama et al., 2008, Demehri et al., 2008, Demehri et al., 2009). Dies unterstreicht die universelle *Upstream* Funktion von ADAM10 zur Regulation der Aktivität des Notch Signalweges. Zur Verifizierung dieser Hypothese können die gleichen Methoden wie in 4.1.4 beschrieben, verwendet werden. Abschließend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit das erste Mausmodell zur Analyse der Funktionalität von ADAM10 für die Homöostase der murinen Epidermis ohne einen erkennbaren Entwicklungsphänotyp etabliert wurde.

5.3 Die Funktion von ADAM10 in der Homöostase des hämatopoetischen Systems der Maus

Die Analyse der induzierbar konditionalen ADAM10 Knockout Maus des hämatopoetischen Systems, führte zur Etablierung von zwei verschiedenen Mausmodellen. Zum einen kann in Mäusen mit einem Alter von weniger als sechs Wochen, eine signifikante Reduktion der ADAM10 Proteinexpression in Zellen des Knochenmarks, der Leber und der Milz durch Induktion mit synthetischer, doppelsträngiger RNA (pI-pC) erreicht werden. Die Diskussion der hieraus gewonnenen Daten erfolgt in Kapitel 5.3.1.

Auf der anderen Seite entwickelt sich nach mehreren Monaten auch in den nicht induzierten konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse ein komplexer Phänotyp, dessen Ursprung im Kapitel 5.3.2 diskutiert wird. Entscheidend für beide Modelle ist die Tatsache, dass die Analyse der Leukozytenpopulationen in den verschiedenen hämatopoetischen Organen bis zu einem Alter von acht Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout und Kontrollen aufwies. Weiterhin konnten keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede der untersuchten Organe (mit Ausnahme der Leber in den induzierten Knockout Mäusen) beobachtet werden. Auch wenn eine histologische Untersuchung der nicht-induzierten konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse in diesem Altersstadium (oder früher) noch aussteht, weisen alle bis jetzt erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die morphogenetische Entwicklung aller hämatopoetischen und auch nicht-hämatopoetischen Organe nicht offensichtlich beeinträchtigt ist.

Dementsprechend konnte mit Hilfe dieser beiden Mausmodelle, die Bedeutung von ADAM10 bei der Homöostase des hämatopoetischen Systems ohne vorherige Entwicklungsdefekte der verschiedenen Organe untersucht werden.

5.3.1 Die induzierte Deletion von ADAM10 in Zellen des hämatopoetischen Systems

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zur genomischen Deletion, Gen- und Proteinexpressionsanalyse von ADAM10 lassen auf eine weitreichende Reduktion der

ADAM10 Aktivität in verschiedenen Organen des hämatopoetischen Systems schließen. Besonders effektiv scheint der Knockout dabei in Zellen der Leber und des Knochenmarks stattzufinden. Diese Beobachtung entspricht den vorherigen Berichten verschiedener Nutzer dieses induzierbar konditionalen Knockout Systems (Kuhn et al., 1995; Akiyama et al., 2002; Tothova et al., 2007; Maillard et al., 2008). Aufgrund der derzeit noch nicht vorhandenen Antikörper für eine sichere Detektion von murinem ADAM10 in der Durchflusszytometrie oder der Immunhistochemie, bzw. Immunhistofluoreszenz ist es dabei bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich, die Zellpopulation mit der stärksten Reduktion von ADAM10 zu identifizieren. Dabei wäre es von Bedeutung zu erfahren, ob die Reduktion der Gewebeexpression von ADAM10 Folge einer erniedrigten Proteinexpression in allen Zellen oder einem starken Verlust in einzelnen Zellpopulationen zuzuordnen ist. So enthält die Milz zum Beispiel verschiedene B- und T-Zellpopulationen, Erythrozyten, dendritische Zellen, Neutrophile und Makrophagen, aber auch spezielle Stammzellen und Stromazellen. Während ADAM10 ubiquitär exprimiert wird (Edwards et al., 2008) sind viele Substrate von ADAM10 nur auf speziellen Zellpopulationen zu finden. Im Fall einer Beeinflussung der proteolytischen Prozessierung (*Shedding*) dieser Substrate in den untersuchten Zellen der induzierbar konditionalen Knockout Mäusen (ADAM10^{Mx1-Cre-induz}), könnte so abgeschätzt werden, ob das zellspezifische Substrat durch ADAM10 auf der selben Zelle, einer benachbarten Zelle oder vielleicht sogar nur durch einen indirekten Effekt unterschiedlich stark *geshededet* wird.

Hierzu wurde in dieser Arbeit das Shedding des niedrig-affinen IgE-Rezeptors CD23 untersucht. Verschiedenen zellbasierte Experimente zeigten, dass ADAM8, 9, 10, 28 und 33 eine Rolle beim Sheddingprozess von CD23 einnehmen können (Weskamp et al., 2006). Die höchste Oberflächenexpression von CD23 kann dabei auf den folliculären B-Lymphozyten der Milz sowie den rezirkulierenden B-Lymphozyten des Blutes nachgewiesen werden. Während membranständiges CD23 eine eher immunsuppressive Funktion erfüllt, spielt die lösliche Form von CD23 eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Allergien, atopischer Dermatitis und Asthma (Conrad et al., 2007). Die Identifikation der CD23 Sheddase *in vivo* würde somit ein wichtiges Ziel für die Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe zur Behandlung von Allergien bedeuten. Da die folliculären B-Lymphozyten und die reifen, rezirkulierenden

B-Lymphozyten des Blutes in den ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäusen eine deutlich erhöhte CD23 Oberflächenexpression zeigen, ist es nun von großem Interesse mit Hilfe von ELISAs zu testen, ob hierdurch die lösliche CD23-Konzentration im Blut reduziert ist. Weiterhin ist zu analysieren, ob und wie stark die Deletion von ADAM10 in diesen spezifischen B-Lymphozyten ausfällt.

Kurz vor Ende dieser Arbeit wurde Ergebnisse von Experimenten mit einer konditionale ADAM10 Knockout Maus unter Kontrolle des CD19-Cre Promotors, welcher ausschließlich in B-Lymphozyten aktiv ist, publiziert (Gibb et al., 2010). Die ADAM10-defizienten B-Lymphozyten weisen dabei ebenfalls eine erhöhte CD23 Oberflächenexpression auf und es ist damit wahrscheinlich, dass das Ektodomänen-shedding von CD23 *in cis* ausgeführt werden kann.

Neben CD23 haben zellbasierte Versuche den Fas-ligand (FasL) (Schulte et al., 2007; Kirkin et al., 2007), die Chemokine Fractalkine und CXCL16 (Scholz et al., 2007), sowie TRANCE/RANKL (Hikita et al., 2006) als potenzielle ADAM10 Substrate gezeigt. Die *in vivo* Funktion von ADAM10 beim Shedding dieser Substrate könnte ebenfalls untersucht werden. Auch in diesen Fällen stellt die vorherige Analyse der ADAM10 Expression in den spezifischen Zelltypen jedoch die wichtigste Voraussetzung dar, ohne die eine abschließende Beurteilung der Funktion von ADAM10 nur unzureichend möglich ist. Neben der Etablierung von ADAM10 spezifischen Antikörpern in den bereits genannten Techniken, kann alternativ auch die primäre Zellkultur von hämatopoetischen Zellen genutzt werden. Hierfür konnten im Rahmen dieser Arbeit z.B. reife Makrophagen aus dem komplexen Gemisch von Knochenmarkszellen mit einer Reinheit von mehr als 95% gewonnen werden. Proteinexpressionanalysen aus diesen Zelllysaten konnten zeigen, dass die Makrophagen der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse eine deutliche Reduktion der ADAM10 Expression aufweisen und sich daher sehr gut für weitergehende Analysen der ADAM10 Funktionalität *in vivo* eignen würden. Weiterhin könnten andere Reinigungsprozesse (z.B. *Magnetic-beads Associated Cell Sorting* - MACS oder *Fluorescence Associated Cell Sorting* -FACS) spezifische Zellpopulationen herausfiltern und durch Immunoblotanalysen auf die jeweilige ADAM10 Expression untersucht werden.

Sobald diese Fragen beantwortet sind, könnte anhand etablierter Tierversuche (z.B.

Endotoxin-induzierte Sepsis, oraler Ovalbumin-Sensibilisierung oder chemisch-induzierter Karziogenese) gezeigt werden, welcher der bis jetzt gezeigten ADAM10-abhängigen Sheddingprozesse die stärkste funktionale *in vivo* Relevanz besitzen.

So konnte zum Beispiel für die konditionale ADAM17 Knockout Maus unter Kontrolle des Mx1-Promotors, eine signifikante Resistenz gegen die Thioglykolat-induzierte Sepsis aufgrund eines stark verminderten TNF- α Sheddings gezeigt werden (Horiuchi et al., 2007). Der Vergleich dieser Maus mit der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Maus in weiteren Experimenten könnte eine Reihe von Informationen zur Regulation und Spezifität der beiden Proteasen liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Generierung der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Maus ein geeignetes Mausmodell zur Untersuchung der Funktionalität von ADAM10 bei der Homöostase des hämatopoetischen Systems und einer Vielzahl von immunpathologischen Prozessen (Allergien, Sepsis und Karziogenese) etabliert wurde. Hieraus konnte im Weiteren durch die Differenzierung von primären Makrophagen des Knochenmarks, ein vollständig definiertes und einfach zu manipulierendes System zur isolierten Betrachtung der Funktionalität von ADAM10 in einem einzelnen Zelltyp geschaffen werden. Damit stellt dieses System das erste Mausmodell zur Evaluierung der *in vivo* Relevanz von ADAM10 in Zellen des hämatopoetischen Systems ohne einen erkennbaren Entwicklungsphänotyp dar.

5.3.2 Der andauernde Verlust von ADAM10 in hämatopoetischen Zellen der Maus führt zu einer (chronisch) myeloproliferativen Erkrankung (CMPE)

Wie schon in 5.3 erwähnt, führte die Generation der induzierbar-konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems, auch ohne eine exogene Induktion nach mehreren Monaten zur Ausprägung eines komplexen Phänotyps (ADAM10^{Mx1-leaky} Maus) der im Weiteren diskutiert werden soll. Zunächst wird aber auf die Gründe für die unerwünschte Deletion von ADAM10 eingegangen. Der genutzte Mx1-Promotor für die transgene Expression der Cre-Rekombinase weist zwar in nicht aktivierten Zellen nur eine basale Transkriptionsaktivität auf, es ist aber nicht unwahrscheinlich, dass im Laufe der Monate genau diese basale Transkriptionsaktivität

ausreicht um eine ausreichende Cre-Rekombinase Aktivität zur weitreichenden genomische Deletion des Exon 2 von ADAM10 zu erzielen. Da die genomische Deletion irreversibel ist, könnten die hieraus entstehenden ADAM10 defizienten Zellen akkumulieren und schließlich zu den beobachteten Phänotypen führen. Weiterhin gibt es noch zwei weitere Faktoren die eine unerwünschte Aktivierung des Mx1-Promotors begünstigen. So werden die Mäuse lediglich in einer IVC-Haltung gezüchtet, die nicht völlig pathogen-frei ist. Auch kleinste Kontaminationen können im Lauf der Zeit zu einer ungewollten Aktivierung des Promotors durch eine erhöhte Interferon α/β -Konzentration führen.

Neben der Kontaminationsgefahr besteht im Weiteren die Möglichkeit, dass die Geschlechtsreife der Tiere ebenfalls zu einem erhöhten Interferonspiegel im Blut der Tiere führt (Le et al., 1988). Unter den gegebenen Umständen dieser Arbeit konnte jedoch keiner dieser Faktoren eliminiert werden.

Interessanterweise zeigten auch ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse erst nach mindestens vier Monaten den Phänotyp der ADAM10^{Mx1-leaky} Maus. Offenbar kann der Verlauf der Krankheit durch eine verstärkte ADAM10 Deletion nicht beschleunigt werden. Dies lässt weitere Rückschlüsse auf die Entstehung des vorliegenden Phänotyps zu. So kann anhand der gezeigten Ergebnisse mit großer Sicherheit gesagt werden, dass die Mäuse eine (chronisch) myeloproliferative Erkrankung (CMPE) zeigen. Dies wird in erster Linie an folgenden Diagnosen offensichtlich: Expansion der (unreifen) Granulozyten im Knochenmark der Mäuse bei gleichzeitiger Hypoerythrose, Lymphopenie, Thrombozytose (Aufreten von Pseudo-Pelger Formen) erythrozytäre Polychromasie und moderat erhöhte Leukozytenzahl (vermutlich durch unreife Granulozyten und Myeloblasten) im Blut der Mäuse; und evtl. Auftreten von myeloiden Sarcoma (Chlorome) in der Haut der Mäuse. Die letzte Beobachtung, sowie das vermehrte Auftreten von Myeloblasten spricht eher für eine akute myeloproliferative Erkrankung, bzw. das Eintreten in die sogenannte Akzelerationsphase von chronisch myeloproliferativen Erkrankungen. Aus diesem Grund kann der vorliegende Phänotyp auch noch nicht abschließend in eine der Kategorien eingeordnet werden. Das Kapitel 5.4.2 befasst sich eingehend mit einer Klassifizierung des Phänotyps. Die nun folgenden Abschnitte diskutieren die Funktion aller untersuchten Organe im Hinblick auf diese Krankheit.

5.3.2.1 Die Bedeutung der Deletion von ADAM10 im Knochenmark für die Entwicklung der CMPE

Das Knochenmark enthält neben den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, sowie deren linienspezifische Tochterzellen auch verschiedene Stromazellen, die für den Reifungs- und Differenzierungsprozess der Zellen notwendig sind. Hierdurch ist im Knochenmark in der Regel auch der Ursprung der CMPE zu finden. Dies wird in dem hier vorliegenden Fall durch die Beobachtung, dass in den Geweben des Knochenmarks die stärkste Reduktion der ADAM10 Proteinexpression stattfindet, unterstützt. Derzeit werden vier Gruppen der CMPE bei humanen Patienten unterschieden: Die chronische myeloide Leukämie (CML), Polycythaemia Vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET) und Osteomyelofibrose (OMF) (Vardiman et al., 2002). Allen CMPE ist die verstärkte Proliferation und damit verbundene Expansion von Zellen der myeloiden Reihe, sowie die Möglichkeit während des Krankheitsverlaufes in eine Akute myeloide Leukämie überzugehen, gemeinsam. Dies können z.B. vorrangig Zellen der Erythropoese, wie Blutplättchen (PV) oder Erythrozyten (ET) aber auch vorwiegend Zellen der Myelopoese (CML) sein und hängt in erster Linie von dem vorliegenden Differenzierungsblock der myeloiden Reihe ab.

In dem hier untersuchten Fall konnte im Knochenmark eine Steigerung der Myelopoese anhand der erhöhten Anzahl von CD11b positiven Zellen detektiert werden, während die Erythropoese nicht gesteigert war. Da die reifen Zellen der Erythropoese und der Myelopoese verschiedene Vorläuferzellen besitzen (*Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor* – MEP, *Granulocyte-Makrophage Progenitor* GMP, s. Passegue et al., 2003) ist es wahrscheinlich, dass es entweder in den *Common Myeloid Progenitors* (CMP), den undifferenzierten *Multi Potential Progenitors* (MPP) oder den Hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) des Knochenmarks zu einer Transformation durch die Deletion von ADAM10 kommt. Im Falle von leukämischen Erkrankungen sind dabei in der Regel MPP oder HSCs, die Ziele von Transformationsreaktionen, da sie im Gegensatz zu den CMPs oder den differenzierten Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Jedoch gibt es sowohl bei humanen Erkrankungen (z.B.: der Akuten Promyelozyten Leukämie – APL, Turhan et al., 1995) als auch bei Mausmodellen Fälle, in denen eben jene Progenitoren durch Transformation zur Ausbildung von (myelo-) proliferativen Erkrankungen führen (Passegue et al., 2004;

Walkley et al., 2007).

Da abgesehen von den Erythrozyten alle anderen hämatopoetischen Zellen allein im Knochenmark gebildet werden, ist die Bestimmung der Myelozyten- und Thrombozytenkonzentration im Blut ein verlässlicher Faktor zur Abschätzung der Beeinträchtigung von Myelo- und Erythropoese. Während für die Thrombozyten eine leicht erhöhte Konzentration mit einer jedoch stark erhöhten Thromboseneigung detektiert wurde, waren alle Zellen der Myelopoese (Eosinophile, Basophile, Mastzellen und Neutrophile), mit Ausnahme der (unreifen) Granulozyten, entweder mit gleicher Konzentration oder in reduzierter Zahl im Blut zu finden.

Noch ungeklärt ist die Situation bei der Lymphopoese. Obwohl z.B. in der Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse reduzierte Anteile von reifen B- und T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation zu finden waren, war ihre Gesamtzahl, aufgrund der erhöhten Zellularität der Milz, in etwa vergleichbar mit den Kontrolltieren. Größere Abweichungen gab es allerdings unter den verschiedenen B-Lymphozytenpopulationen, worauf in Kapitel 5.3.2.3 näher eingegangen wird. Weiterhin war die Anzahl der reifen, rezirkulierenden B-Lymphozyten im Knochenmark und auch im Blut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse drastisch reduziert. Eine umfassende Analyse der unreifen B-Lymphozyten im Knochenmark könnte zeigen, ob dies Folge einer fehlerhaften Entwicklung im Knochenmark oder einer reduzierten Überlebensdauer im peripheren Blut bzw. der peripheren lymphatischen Organe ist.

Bei der Erythropoese konnte eine starke Reduktion der unreifen Erythrozyten, bei gleichbleibender Menge der reifen Erythrozyten in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse festgestellt werden. Dieser Phänotyp kann häufig bei myeloproliferativen Krankheiten des Knochenmarks beobachtet werden. Die Ursache hierfür kann entweder in der übermäßigen Expansion der Granulozyten und damit verbundenen Verdrängung der Erythrozyten, der Schädigung des Stromas durch fibrotische Vorgänge, z.B. bei der OMF, oder auch in einer Kombination aus beiden Vorgängen liegen. Die Zahl der reifen Erythrozyten in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen bleibt aufgrund der extramedullären Hämatopoese in der Milz (s. 5.3.2.3) vergleichbar mit den Kontrollen. Durch Isolation und durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Stammzell- und Progenitorpopulationen des Knochenmarks könnte gezeigt werden, ob und an welchem speziellen Differenzierungsschritt eine Beeinflussung der Hämatopoese stattfindet. Weiterhin

könnte die histologische Untersuchung Aufschluss über mögliche Schädigungen des Knochenmarksstroma bzw. die Lage der verschiedenen Zellpopulationen liefern und wäre damit ein wichtiger Schritt zum Verständnis des vorliegenden Phänotyps.

Möglicherweise könnte auch das Stroma eine entscheidende Ursache für den vorliegenden Phänotyp darstellen. So zeigte eine aktuelle Publikation, dass der Mx-Promotor auch in Stromazellen des Knochenmarks aktiv ist (Kim et al., 2008) und durch die Deletion von *mindbomb1* (*mib1*), einem essentiellen Gen für die ligandenabhängige Notch-Aktivierung, zur Ausbildung einer defekten Mikroumgebung für die Hämatopoese mit anschließender myeloproliferativer Erkrankung führt. Während die Transplantation von genetisch unveränderten Knochenmarkszellen in die *mib1*-defizienten Tiere ebenfalls zur Ausbildung einer myeloproliferativen Erkrankung führt, zeigten Kontrolltiere nach einer Transplantation von Knochenmarkszellen der *mib1*-defizienten Tiere keinen entsprechenden Phänotyp. Damit konnte gezeigt werden, dass allein die Deletion von *mib1* in den Stromazellen des Knochenmarks für die Ausprägung des komplexen Phänotyps verantwortlich ist. Bild 5.2 zeigt das von Kim et al. postulierte Modell.

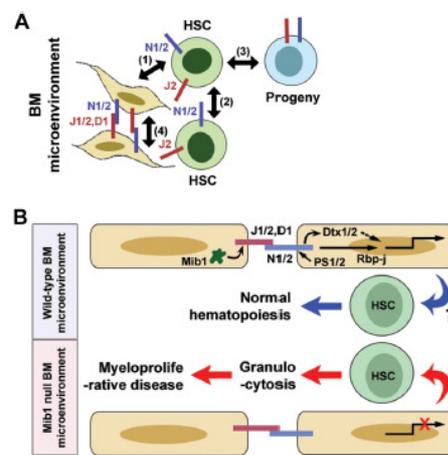


Bild 5.2: Beeinflussung der Hämatopoese durch eine gestörte stromale Mikroumgebung im Knochenmark Notch Signaling defizienter Mäuse (entnommen aus Kim et al, 2008)

(A) Schema der Interaktion von Notch Rezeptor 1/2 (N1/N2) und Notch Liganden (J1/2, D1) von Stromzellen des Knochenmarks (BM), hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und Progenitorzellen: (1) Mikroumgebung des Knochenmarks – HSC; (2) HSC-HSC; (3) HSC – Progenitorzellen; (4) Mikroumgebung des Knochenmarks – Mikroumgebung des Knochenmarks. (B) Vorgeschlagenes Modell für das defekte Notch Signaling im Knochenmark von *mindbomb1* (*mib1*) defizienten Mäusen. Die Aktivierung des Notch Signalweges (4) führt zur transkriptionellen Regulation von Genen in der Mikroumgebung des Knochenmarks, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der regulären Hämatopoese ausführen. Eine verminderte Notch Aktivität führt dann zur Ausbildung einer myeloproliferativen Krankheit.

Daher sollte die Beteiligung des Stromas in dieser Hinsicht ebenfalls untersucht werden. Abschließend lässt sich sagen, dass das Knochenmark der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse den Ursprungsort für die Entstehung der myeloproliferativen Erkrankung darstellt. Dabei ist noch ungeklärt, ob sie die Folge einer Proteindeletion von ADAM10 in den Knochenmarkszellen, dem Stroma oder beidem ist und in Hinblick auf den erst- und den letztgenannten Fall, bei welchem Differenzierungsschritt die Hämatopoese beeinträchtigt wird.

5.3.2.2 Analyse des Thymus

Neben dem Knochenmark zeigte der Thymus als einziges der untersuchten Gewebe in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen eine signifikante Reduktion der ADAM10 Proteinexpression. Abgesehen von einer verminderten Zellularität konnten präliminäre Untersuchungen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen und Kontrollen im Bezug auf Morphologie oder zelluläre Zusammensetzung des Thymus zeigen. Dies bestätigt die im Laufe dieser Arbeit veröffentlichte Publikation zur konditionalen Deletion von ADAM10 in intrathymischen T-Lymphozyten (Tian et al., 2008), welche ebenfalls eine Reduktion der Thymozytenzahl zeigen konnte.

Da in dieser Arbeit, wie auch in den unter 5.1 diskutierten Ergebnisse die Proteolyse des Notch1-Rezeptors als molekularer Hintergrund für den Entwicklungsdefekt der Zellen identifiziert werden konnte, wurde dies auch für die ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse in Erwägung gezogen. Ein Vergleich mit induzierbar konditionalen (Mx1-Cre) Knockout Mäusen des Notch Signalwegs zeigte jedoch eindeutige phänotypische Unterschiede zu den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen (Wilson et al., 2001b; Han et al., 2002). So konnten in induzierbar konditionalen RBP-jk und Notch1-Rezeptor Knockout Mäusen ein frühzeitiger Block der T-Zelldifferenzierung durch eine beeinträchtigte Zellschicksalsentscheidung von gemeinsamen B/T-Zellprogenitoren im Knochenmark und eine hiermit verbundene Expansion von B-Lymphozyten im Thymus der induzierbar konditionalen Knockout Mäuse gefunden werden. Keine der genannten Publikationen konnte hingegen das Auftreten einer myeloproliferativen Erkrankung beobachten.

Damit ist es wahrscheinlich, dass während der Hämatopoese der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse entweder präferentiell andere oder zusätzliche Signalwege als der Notch-Signalweg beeinflusst werden. Im Weiteren muss noch gezeigt werden, welche Zellpo-

pulation des Thymus die Reduktion der ADAM10 Expression im gesamten Gewebe hervorruft.

5.3.2.3 Analyse der sekundären lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten

Da sich die Phänotypen von Milz und Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse im Bezug auf ihre zelluläre Zusammensetzung von Leukozyten- und Erythrozytenpopulationen unterscheiden, werden sie getrennt voneinander betrachtet.

Milz

Die Analyse der Milzen von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen zeigte eine starke Splenomegalie durch die Manifestation der extramedullären Hämatopoese. Sie wird durch die reduzierte Erythropoese im Knochenmark hervorgerufen und kann, wie anhand der Erythrozytenkonzentration im Blut ersichtlich ist (4.3.4.6), den Verlust der reifen Erythrozyten des Knochenmarks vollständig kompensieren. Daher ist die rote Pulpa in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen im Gegensatz zu den Kontrollen hochproliferativ.

Im Weiteren konnte eine verstärkte Infiltration der Milz mit Zellen der granulozytären Differenzierungsreihe beobachtet werden. Dabei handelte es sich sowohl um unreife Granulozyten (Myeloblasten wurden durch PAS-Reaktion identifiziert) als auch um ausdifferenzierte Neutrophile und Makrophagen. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte Expansion der unreifen Granulozyten nicht auf einen Differenzierungsblock in der myeloiden Reihe zurückzuführen ist, wie es zum Beispiel für die APL bekannt ist. Damit wird ein weiteres Kriterium für einen Defekt bei der Zellschicksalsentscheidung während der Hämatopoese erfüllt.

Neben den myeloiden Zelltypen zeigen sich aber auch für die Lymphozyten der Milz von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen Auffälligkeiten. Dabei ist der zelluläre Anteil von T-Lymphozyten, jedoch nicht ihre CD4/CD8-Ratio verändert. Der reduzierte Anteil von T-Lymphozyten in der Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse ist vermutlich eine Folge der erhöhten Erythrozyten- und Granulozytenzahl. Da die Analyse des Blutes keine Akkumulation von T-Lymphozyten, die Lymphknoten ebenfalls vergleichbare Gesamtzahlen von T-Lymphozyten und eine präliminäre Begutachtung der histologischen Gewebeschnitte keine signifikant erhöhten Apoptose- oder Nekrosevorgänge zeigen, (Aussage PD Dr. Klapper, Hämatopathologie UK-SH Kiel) ist es eher unwahrscheinlich, dass ein *Homing*-Defekt oder eine gesteigerte Apoptoserate vorliegt.

Etwas komplexer ist die Situation der B-Lymphozyten in der Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Während die reifen B-Lymphozyten anteilig reduziert, aber in ihrer Gesamtzahl vergleichbar sind, bleibt der Anteil der unreifen und marginalen B-Lymphozyten konstant, was letztlich aufgrund der erhöhten Gesamtzellularität auch eine erhöhte Gesamtzahl der unreifen B-Lymphozyten bedeutet. Damit stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu der schon besprochenen Analyse der (CD19-Cre vermittelten) konditionalen Deletion von ADAM10 in B-Lymphozyten (Gibb et al., 2010). Die ebenfalls durchgeführte Proteinexpressionsanalyse von ADAM10 in Splenozyten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse zeigt zudem eine gleichbleibende oder sogar leicht erhöhte ADAM10 Expression. Da die meisten Milzzellen, abgesehen von den Erythrozyten der extramedullären Hämatopoese, aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks stammen, sollte sich eine Deletion von ADAM10 in den Stamm- oder Progenitorzellen des Knochenmarks auch auf die differenzierten hämatopoetischen Zellen der Milz auswirken. Nachdem die Proteinexpressionsanalyse von ADAM10 im Knochenmark eine deutliche Reduktion von ADAM10 gezeigt hat, ist zudem nicht davon auszugehen, dass nur einzelne Knochenmarkszellen eine Deletion des Proteins aufweisen.

Solange immunhistochemische oder Immunfluoreszenzanalysen von ADAM10 in den untersuchten Organen fehlen, kann hier über die Ursache jedoch nur spekuliert werden. Dabei erscheinen zwei Szenarien als naheliegend, die in Zukunft untersucht werden sollten: Während die Deletion von ADAM10 in Stamm- oder Progenitorzellen zu einer Expansion von Zellen der myeloiden Reihe führt, könnte die (andauernde) Deletion in differenzierten Zellen z.B. zu einer erhöhten Apoptoseneigung führen. So wäre die Reduktion von ADAM10 im Knochenmark und auch im Thymus detektierbar, da hier viele unreife Zellen lokalisiert sind, während sich in den peripheren Organen überwiegend differenzierte Zellen ohne ADAM10 Deletion befinden. Die erhöhte Infiltration von Granulozyten könnte demzufolge auf eine erhöhte Phagozytose von apoptotischen Zellen zurückzuführen sein. Auch wenn die präliminäre Analyse der histologischen Schnitte (H&E Färbung) der Milzen und Thymi von ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen keine stark erhöhte Anzahl von apoptotischen oder nekrotischen Zellen zeigten (Aussage PD Dr. Klapper, Hämatopathologie UK-SH Kiel) müssen zur genaueren Quantifizierung weitergehende Experimente erfolgen (TUNEL-, AnnexinV oder

Capase-3 Färbung).

Diese Techniken sollte auch auf Gewebeschnitten des Knochenmarks durchgeführt werden, da auch hier schon ADAM10 defiziente Zellen in die Apoptose gehen könnten. Alternativ könnte, wie schon unter 5.3.2.1 diskutiert, die Deletion von ADAM10 in den Stromazellen des Knochenmarks den entscheidenden Grund für den beobachteten Phänotyp darstellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse eine Splenomegalie durch eine stark gesteigerte extramedulläre Hämatopoese und eine erhöhte Infiltration von granulozytären Leukozyten aufweist. Möglicherweise geschieht diese Expansion auf Kosten der reifen B- und T-Lymphozyten in der Milz der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse.

Lymphknoten

Auch die Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse zeigten deutliche morphologische Auffälligkeiten (Lymphadenopathie). Die Gründe hierfür sind jedoch andere als in den untersuchten Milzen der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Im Gegensatz zur Milz erfolgt in den Lymphknoten keine extramedulläre Hämatopoese. Dafür zeigen die Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse ebenfalls eine Infiltration von Granulozyten und einen reduzierten Anteil von T-Lymphozyten. Abweichend hiervon ist die Population der reifen B-Lymphozyten in den Lymphknoten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse sowohl anteilig als auch in ihrer Gesamtzahl stark erhöht.

Histologische Färbungen konnten zudem zeigen, dass Zonen reifer B-Lymphozyten auch proliferativ hoch aktiv sind. Ohne weitergehende Experimente ist es jedoch schwer möglich diese Befunde zu interpretieren. Möglicherweise sind die reifen B-Lymphozyten der Milz durch die stark gesteigerte extramedulläre Hämatopoese nur eingeschränkt aktivierbar oder in ihrer Zirkulation durch das Blut gehemmt.

5.3.2.4 Analyse der Leber

Die Analyse der Leber zeigt ausschließlich im Bezug auf die hepatischen Blutgefäße einen signifikanten Phänotyp. Offenbar führt die auch im Blutbild der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse beschriebene Thromboseneigung der Blutplättchen zu der Bildung von Gerinnseln in den Venen der Leber. Das Auftreten der Gerinnsel führt dann im Weiteren auch zur Rekrutierung von Leukozyten und letztendlich durch den Blutstau auch zu der teilweise beobachteten Hepatomegalie. Dieses Phänomen konnte auch in

humanen Patienten mit myeloproliferativen Krankheiten beobachtet werden (Lavabre-Bertrand et al., 2002). Eine Analyse wichtiger Leberenzyme sowie der ADAM10 Proteinexpression in der Leber der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse wies keine Unterschiede zwischen Knockout und Kontrollen auf. Daher ist davon auszugehen, dass der beobachtete Phänotyp eher durch die Thrombozyten als durch Zellen der Leber ausgelöst wird. Da jedoch in der Leber von ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäusen und auch in vorangegangenen Publikationen, eine hohe Aktivität des Mx1-Promotors in der Leber gezeigt wurde, stellt sich die Frage, warum sie in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen nicht zu einer signifikanten Reduktion von ADAM10 führt. Ähnlich wie bei der Analyse der Milz, könnte auch hier eine erhöhte Apoptoseneigung der ADAM10-defizienter Hepatozyten und anschließende Regeneration des Gewebes mit nicht-induzierten Zellen erfolgt sein.

Weiterhin ist es auch möglich, dass durch die artifizielle Induktion des Mx1-Promotors mit pI-pC andere oder erweiterte Zellpopulationen als in den nicht-induzierten ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen von ADAM10-Deletionen betroffen sind. Da jedoch auch ADAM10^{Mx1-Cre-induz} Mäuse nach einer vergleichbaren Zeitdauer, wie die ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse eine myeloproliferative Krankheit entwickeln, scheint hierfür der gleiche Mechanismus verantwortlich zu sein.

5.3.2.5 Analyse der Haut

Die Haut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse zeigt deutliche Anzeichen von leukozytärer Infiltration, Hyperkeratose und teilweise auch epidermaler Zystenbildung. Zudem konnten bei vereinzelt Tieren auch Bakterien- und Pilzbefall der Haut beobachtet werden. Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Ursache hierfür eine geschwächte Barriere der Haut, ein Defekt des Immunsystems oder eine Kombination aus beidem ist. Weitegehende Experimente müssen zeigen, ob es sich bei den Leukozyten vorwiegend um unreife Granulozyten handelt. Dies wäre eines der sichersten Anzeichen für die Entwicklung von *myeloiden Sarcoma*. Diese unspezifische Infiltration von nicht-hämatopoetischen Geweben wird gelegentlich in CML- oder OMF-Patienten gefunden. Weiterhin sollte auch hier eine Expressionsanalyse von ADAM10 stattfinden.

5.3.2.6 Analyse des Blutes

Die Analyse des Blutes erfolgt getrennt nach zellulären Bestandteilen und Plasma:

Zelluläre Bestandteile

Zur Beurteilung der zellulären Bestandteile wurden Blutausstriche und eine automatisierte durchflusszytometrische Analyse (Kinderklinik, UK-SH Kiel) der Parameter Größe und Granularität durchgeführt. Diese beiden Analysemethoden gaben teilweise abweichende Befunde und werden daher im Folgenden diskutiert. Übereinstimmend konnten mit beiden Analyseverfahren eine vergleichbare Zahl von Erythrozyten im Blut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse und den entsprechenden Kontrollen gefunden werden. Die Blutausstriche zeigten zudem eine ausgeprägte Polychromasie von Erythrozyten, bzw. Erythroblasten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse an. Das Auftreten von Erythroblasten im peripheren Blut ist ein häufiges Phänomen der extramedullären Hämatopoese (Nicolaidis et al., 1988; Castellanos et al., 2007). Weiterhin konnten mit beiden Verfahren eine erhöhte Zellularität der weißen Blutkörperchen, sowie eine verstärkte Thromboseneigung der Thrombozyten detektiert werden.

Unterschiedlich fiel jedoch die Bewertung von Lymphozyten und Granulozyten aus. Während in der durchflusszytometrischen Analyse überhaupt keine regulären Lymphozyten und Granulozyten im Blut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse detektiert werden konnten, zeigten die Befunde der Blutausstriche normale Lymphozyten- und stark gesteigerte Monozyten- bzw. Granulozytenzahlen. Offenbar wiesen die Lymphozyten und die Granulozyten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse Größen- und Granularitätsunterschiede zu denjenigen auf, die in den Kontrollen untersucht wurden. Da die durchflusszytometrische Analyse in den Kontrollen alle Zellpopulation in physiologischer Konzentration finden konnte, ist zudem nicht von einem technischen Fehler auszugehen.

Eine Färbung der Blutzellen mit Markern für unreife Granulozyten und Lymphozyten vor der durchflusszytometrischen Analyse, könnte Aufschluss über die bestehende Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse geben. Sehr wahrscheinlich ist jedoch von einer stark erhöhten Anzahl von unreifen Granulozyten im Blut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse auszugehen. Da sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten und der Haut der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse gleichbleibende oder sogar erhöhte Zahlen von reifen

Lymphozyten beobachtet werden konnten, ist weiterhin zu klären warum diese nicht oder nur in äußerst geringer Zahl im peripheren Blut detektiert werden konnten.

Plasma

Die Analyse immunologisch relevanter Zytokine im Plasma der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse führte zu mehreren wichtigen Ergebnissen. Zunächst konnte in keinem der untersuchten Tiere erhöhte Mengen (pro-)inflammatorischer Zytokine, z.B.: TNF- α , Il- β , Il-6 oder Il-6R detektiert werden. Dies schließt mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vorliegen einer akuten Entzündungssituation in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen aus. Demgegenüber konnte aus 42 untersuchten Zytokinen nur für drei eine signifikante Veränderungen der Plasmakonzentration (in allen Fällen eine Erhöhung) nachgewiesen werden. Von diesen Zytokinen konnten bereits zwei (G-SCF und TIMP-1) als Marker myeloproliferativer Erkrankungen in humanen Patienten bzw. in entsprechenden Mausmodellen (hier nur G-CSF) beobachtet werden. Während G-SCF überwiegend von unreifen Granulozyten sekretiert wird (Weskamp et al., 2006), ist die Ursache der erhöhten TIMP-1 Expression noch nicht erforscht.

Da TIMP-1 auch zugleich ein endogener Inhibitor von ADAM10 ist (Amour et al., 2000), wäre es wichtig zu analysieren, ob es evtl. einen direkten Zusammenhang zwischen der ADAM10-Expression auf peripheren Blutzellen und der TIMP-1-Konzentration im Plasma gibt. Weiterhin wurde mit Il-16 noch ein drittes Zytokin gefunden, welches noch nicht im Zusammenhang mit myeloproliferativen Krankheiten beschrieben wurde.

Abschließend lässt sich sowohl durch die Analyse der zellulären Bestandteile als auch des Blutplasmas zeigen, dass in den untersuchten Mäusen nahezu alle Kriterien für die Beschreibung einer myeloproliferativen Erkrankung erfüllt sind. In Kapitel 5.4.2 werden noch einmal alle Ergebnisse im Hinblick auf die bekannten Kriterien verschiedener Gruppen der myeloproliferativen Erkrankungen untersucht zusammengefasst diskutiert.

5.4 Medizinische Aspekte der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von ADAM10

Anhand aller bis jetzt diskutierten Ergebnisse wird in den beiden folgenden Kapiteln erörtert, ob und in welcher Weise ADAM10 als ein therapeutisches Ziel für verschiedene Hautkrankheiten bzw. Krankheiten des hämatopoetischen Systems fungieren kann. Obwohl in dieser Arbeit viele Aspekte der physiologische Bedeutung von ADAM10 anhand der vorgestellten Mausmodelle aufgeklärt werden konnten, bleibt zu bemerken, dass trotz der großen Homologie von ADAM10 zwischen Maus und Mensch durchaus Unterschiede in der physiologischen Rolle der Metalloprotease zwischen den beiden Spezies auftreten können. So wurde z.B. für ADAM17 beobachtet, dass es in humanen Zellen die Hauptsheddase für den Il-6 Rezeptor darstellt, während dies im murinen System offenbar nicht der Fall ist (persönliche Kommunikation S. Rose-John, Biochemisches Institut Kiel). Eine direkte Übertragung der erhaltenen Ergebnisse in der Maus auf humane Krankheiten ist dementsprechend nur bedingt zulässig und enthalten immer die Notwendigkeit der sorgfältigen Prüfung in geeigneten Systemen.

5.4.1 ADAM10 als Kandidatengen für humane (Krebs-)erkrankungen der Haut?

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von ADAM10 ein Begleiter von basalen Zellkarzinomen der Epidermis, Ekzemen und Psoriasis sein kann (Maretzky et al., 2008; Oh et al., 2008; Oh et al., 2009). Da eine erhöhte Expression oder Aktivität von ADAM10 auch in Tumoren anderer Gewebe festgestellt wurde (Yoshimura et al., 2002; Fogel et al., 2003; McCulloch et al., 2004; Gavert et al., 2005; Ko et al., 2007), schreibt man ADAM10 im Allgemeinen eine eher tumorfördernde Wirkung zu. Auch wenn bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine Krebsmodelle mit den induzierbaren epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen durchgeführt wurden, so ist aufgrund des starken Einfluss auf den Notch Signalweg ein ähnlicher Phänotyp in den ADAM10 defizienten Mäusen, wie in den entsprechenden Notch Knockout Mäusen zu erwarten. Dies würde bedeuten, dass ADAM10

gleichermaßen auch eine tumorsuppressive Rolle einnimmt, z.B. durch die Repression des β -Catenin Signalwegs als Folge eines aktivierten Notch Signalwegs. Zusätzlich zu der Analyse einer erhöhten ADAM10 Expression, ist es daher denkbar in Patientenproben mit Hautkrebserkrankungen nach potenziellen Mutationen von ADAM10 zu suchen, welche zu einem Funktionsverlust oder zu mindestens einer Verringerung der proteolytischen Aktivität führen.

Die Analyse der Mausmodelle zeigte weiterhin einen Einfluss der ADAM10 Aktivität auf zwei wichtige Stoffwechselwege, welches zum einen den Lipid- und zum anderen den Retinolmetabolismus der Epidermis betrifft. Dabei führt die Defizienz von ADAM10 zu einer deutlichen Abnahme der Genexpression von Lipid- und Retinolmetabolismusgenen. Für die Differenzierung der Epidermis hat die Aktivität des Retinolmetabolismus einen entscheidenden Einfluss. So bedingt eine abnehmende Metabolisierung des Ausgangsmoleküls des Retinolmetabolismus, Vitamin A, zu der biologisch aktiven Komponente der Retinsäure eine terminale Differenzierung der Epidermis (Roos et al., 1998). Da eine direkte Verbindung des Notch-Signalweges mit dem Retinolmetabolismus schon gezeigt werden konnte (Vauclair et al., 2007), ist es auch hier wahrscheinlich, dass es sich nicht um einen direkten Effekt von ADAM10 handelt.

Interessanterweise scheint die transkriptionale Aktivität des ADAM10 Promotors selbst jedoch durch Retinsäure gesteigert zu werden (Prinzen et al., 2005; Tippmann et al., 2009) und stellt daher ein potenzielles Ziel für eine anti-amyloidogene Therapien des Morbus Alzheimer dar (Fahrenholz et al., 2010). Die Kombination aus geringer Retinsäure Produktion und gesteigerter Expression von Genen, die für die Keratinisierung entscheidend sind (z.B. *Sppr* und *S100A* Gene) wurden in einer Vielzahl von Publikationen (Saurat et al., 1999; Eckert et al., 2004; van de Kerkhof, 2006; Gudjonsson et al., 2007; Schon, 2008; Han et al., 2010) als Kennzeichen für die Entwicklung von Psoriasis und akuten Ekzemen der Haut charakterisiert. Beide Kennzeichen, sowie die aus ihr folgende Hyperkeratinisierung konnten mit den in dieser Arbeit untersuchten Mausmodellen, gefunden werden. Damit stehen sie in starkem Kontrast zu den bis jetzt veröffentlichten Daten, welche eine erhöhte ADAM10 Expression in Hautproben von Psoriasis-Patienten zeigen (Oh et al., 2008).

Zur Behandlung von Psoriasis und Akne (*acne vulgaris*) werden schon seit langer Zeit

Retinsäurederivate wie *Isotretinoin* und *Acitretin* eingesetzt (Merritt et al., 2009; Lee et al., 2009; Rigupoulos et al., 2010), die jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen, wie Ekzeme und Haarausfall bis hin zu teratogenen Effekten bei ungeborenem Leben (Geiger et al., 1994; Hietanen et al., 1998). Es bleibt spekulativ, ob diese Retinsäurederivate vielleicht auch über die Steigerung der ADAM10 Aktivität pharmakologisch wirken. Da Retinsäuren, über die Bindung an ihre Retinsäurerezeptoren, als aktive Transkriptionsfaktoren fungieren, lösen sie in der Regel, wie oben beschrieben eine Vielzahl von ungewollten Reaktionen aus, die mit einer direkten Aktivierung der ADAM10 Aktivität vermindert werden könnten. Weiterhin kann in Patienten mit einer erhöhten Aktivität des Retinolmetabolismus aber auch eine Inhibition der ADAM10 Aktivität sinnvoll sein. Da Retinol- und Lipidmetabolismus, z.B. durch die Regulation der Größe und Häufigkeit von Talgdrüsen, unmittelbar miteinander gekoppelt sind führen sie häufig zu einer verstärkten Entzündung von verstopften Hautporen oder einer übermäßigen Fettproduktion der Epidermis (Geiger, 1995; Zouboulis et al., 1998).

Weiterhin konnte eine erhöhte ADAM10 Aktivität in akuten ekzematischen Erkrankungen der Haut gefunden werden (Maretzky et al., 2008), so dass sich ein breites Anwendungsspektrum der topischen Applikation von ADAM10 Inhibitoren ergeben könnte. Dabei bleibt jedoch noch zu klären, ob in den zuletzt genannten Erkrankungen die verstärkte Expression bzw. Aktivität ADAM10 auch *in vivo* eine ursächliche Wirkung besitzt oder ein Symptom vorangegangener pathologischer Reaktionen in der Epidermis darstellt.

5.4.2 ADAM10 als Kandidatengen für humane (Krebs-)erkrankungen des hämatopoetischen Systems

Die bis zum heutigen Zeitpunkt durchgeführte Analyse des komplexen Phänotyps der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse soll im Idealfall eine Einstufung als Mausmodell für eine der bekannten humanen, chronischen myeloproliferativen Erkrankungen ermöglichen. Dabei ist jedoch auch bei humanen Patienten nicht immer eine zweifelsfreie Einordnung in einer der bekannten Gruppen myeloproliferativer Erkrankungen möglich. So können auch phänotypische Unterschiede oder von Patient zu Patient die Charakteristika verschiedener Gruppen auftreten. Weiterhin ist für alle chronisch myeloproliferativen Erkrankung stets die Möglichkeit zum Übergang in eine akute Form der Erkrankung

möglich. Hierdurch entstehen zusätzliche Abweichungen zu den typischen chronischen myeloproliferativen Erkrankungen.

Der Vergleich der vorliegenden Daten der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse mit der Differentialdiagnostik der vier bekannten Gruppen chronisch myeloproliferativer Erkrankungen von humanen Patienten soll zeigen welche Gruppe die stärkste Übereinstimmung aufweist. Diese Tabelle stellt damit eine komprimierte Übersicht zum einfachen Vergleich dar und ist nicht als vollständig anzusehen.

Tabelle 5.1: Differentialdiagnostik chronisch myeloproliferativer Krankheiten im Vergleich zu ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen

Parameter	CML	PV	ET	OMF	ADAM10 ^{Mx1-leaky}
Peripheres Blut					
Erythrozyten	n	n bis ↑	n	n	n
Leukozyten	↑	↑	↑	↑	↑
Thrombozyten	n bis ↑	n bis ↑	↑↑	↓ bis ↑	↑
Differentialblutbild					
Segmentkernige	+++	++++	++	+++	+++
Stabkernige	++	+	+	++	++
Metamyelozyten	++	-	-	++	n.u.
Myelozyten	++	-	-	++	++
Promeofozyten	+	-	-	+	n.u.
Blasten	(+)	-	-	(+)	+
Eosinophilie	+	-	-	-	-
Basophilie	+	-	-	-	-
Normoblasten	-	-	-	+	-
Knochenmark					
Myeloopoese	↑↑↑	↑↑	↑	↑ bis ↓	↑↑
Erythropoese	n bis ↓	↑↑↑	↑n	↑ bis ↓	↓
Megakaryozyten	↑	↑↑	↑↑	↑ bis ↓	n.u.
Myelofibrose	n	n	n	+++	n.u.
Weitere Befunde					
Splenomegalie, Lymphadenopathie	++	n	n	+++	+++
Hepatomegalie	+	-	-	+	+
Alkal. Leukozytenphosphatase	↓	n bis ↑	n bis ↑	n bis ↑	n.u.
Philadelphia-Chromosom	+	-	-	-	n.u.
Bcr/Abl Translokation	+	-	-	-	n.u.
erhöhte G-CSF Konz. (Plasma)	+	-	-	+	+
erhöhte TIMP-1 Konz. (Plasma)	n.u.	-	-	+	+

Die Tabelle zeigt eindeutig, dass die ADAM10^{Mx1-leaky} Maus die meisten Übereinstimmungen mit den CML- und den OMF-Patienten besitzt. Für die Einordnung als typisches CML-Mausmodell muss jedoch per Definition die chromosomale Bcr/Abl (bei humanen Patienten (t(9;22)(q34;q11)) – bei Mäusen t(10;2)(40,2cM:21cM)) Translokation vorliegen (Vardiman et al. 2002). Diese Translokation ist für 95% der CML-Fälle verantwortlich. Liegt diese Translokation nicht vor, gilt die CML als atypisch und wird heute in der Regel als undefinierte myeloproliferative Erkrankung klassifiziert (Vardiman et al., 2002).

Die zytogenetische Untersuchung der Chromosomen von myeloiden Zellen des Knochenmarks kann Aufschluss über eine mögliche Translokation geben. Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von CML und OMF ist die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Leukozytenphosphatase in Zellen des Blutes der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse. Die genaue Klassifizierung der vorliegenden chronischen myeloproliferativen Erkrankung in den ADAM10^{Mx1-leaky} Mäusen könnte ein Anhaltspunkt für die Suche nach genetischen Mutationen in betroffenen humanen Patienten darstellen. Für den Fall, dass ADAM10 hauptsächlich die Zellschicksalsentscheidung von Stamm- oder Progenitorzellen des hämatopoetischen Systems beeinflusst, könnte eine verstärkte ADAM10 Expression bzw. Aktivität möglicherweise für die Ausbildung von lymphoproliferativen Erkrankungen verantwortlich sein. Da es schon Berichte von erhöhten ADAM10 Immunreaktivitäten in Lymphoma-Patienten gibt (Wu et al., 1997), wäre es von verstärktem Interesse auch den molekularen Hintergrund dieser Phänotypen in Zukunft zu untersuchen.

Weiterhin könnte nach einer erfolgten Klassifizierung der chronischen myeloproliferativen Erkrankung bekannte und neue Therapieformen an den Mäusen getestet werden.

5.4.3 Ist ADAM10 (weiterhin) ein potentiell therapeutisches Target?

Der außerordentliche Einfluss von ADAM10 auf Hauptsignalwege wie den Notch und den β -Catenin Signalweg, sowie essentielle Stoffwechselwege, z.B. den Lipid- und Retinolmetabolismus zeigen eine Reihe von denkbaren Therapieansätzen aber auch zugleich klare Grenzen auf. So kann schon jetzt anhand der genutzten Mausmodelle gezeigt werden, dass Langzeitbehandlungen mit ADAM10-inhibierenden und vermut-

lich auch aktivierenden Substanzen aufgrund der drastischen Auswirkungen auf die Gewebeentwicklung- und Homöostase nicht durchführbar sind.

Weiterhin geht aus den Ergebnissen hervor, dass ADAM10 nicht wie zunächst angenommen eine rein tumorfördernde Eigenschaft, sondern auch eine tumorsuppressive Rolle einnimmt. Diese kontroverse Funktion konnte zuvor z.B. schon für Komponenten des Notch Signalwegs gezeigt werden (Nicolas et al., 2003, Demehri et al. 2009). So hat sich das bis dahin gültige Bild, das es reine (Proto-) Onkogene gibt, im Laufe der letzten Jahre gewandelt und die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen das dies auch für die Metalloprotease ADAM10 zutrifft. Bei dem Versuch einer therapeutischen Regulation der ADAM10 Aktivität, steht also neben der Validierung der pharmakologischen Spezifität auch die Evaluierung der optimalen Dosis an erster Stelle, um ungewünschte Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Da die jeweilige Stärke der ADAM10 Aktivität von Patient zu Patient stark schwanken könnte, stellt dies eine enorme diagnostische Herausforderung dar.

Darüber hinaus gilt es mit den nun gewonnen Mausmodellen zu überprüfen, ob neben dem eindeutig belegten Einfluss auf die Aktivität des Notch Signalweges auch die Vielzahl der bis jetzt publizierten Substrate von ADAM10 in zellbasierten Systemen eine *in vivo* Relevanz zeigt. Erst kürzlich konnte dies z.B. für den niedrig-affinen IgE Rezeptor (CD23) gezeigt werden (Gibb et al., 2010). Auch die Auswirkungen einer erhöhten ADAM10 Expression *in vivo* sind bis zum heutigen Zeitpunkt, bis auf ein einziges Mausmodell mit einer sehr geringen ADAM10 Überexpression im zentralen Nervensystem (Jorrisen et al., 2010), in keiner Weise untersucht worden.

Abschließend sollte erwähnt werden, dass bis auf wenige Ausnahmen noch keinerlei regulatorische Mechanismen bezüglich der Expression oder Aktivität von ADAM10 bekannt, die einen möglichen alternativen Angriffspunkt für Medikamente darstellen könnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ADAM10 in der Epidermis und in Zellen des hämatopoetischen Systems voraussichtlich nur ein kurzfristiges Zielmolekül für spezifische pharmakologische Substanzen darstellen kann. Aufgrund der Möglichkeit der topischen Applikation und der einfachen molekularen Zugänglichkeit durch die Zelloberflächenexpression von ADAM10, sollten die Anwendung therapeutischer Wirkstoffe für die Regulation der ADAM10 Aktivität speziell in der Epidermis jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

6 Ausblick

Da die Analysen der konditionalen ADAM10 Mäuse in der Haut und im hämatopoetischen System unterschiedlich weit fortgeschritten sind, erfolgt der Ausblick hierfür getrennt voneinander.

Funktion von ADAM10 in der Haut/Epidermis

Die folgenden Punkte sind als mittelfristige Perspektive für die Erforschung der Metalloprotease ADAM10 in der Epidermis anzusehen. Für die molekulare Funktionalität von ADAM10 *in vivo* sind in Zukunft drei grundlegende Fragen zu klären: Welche Auswirkungen hat eine erhöhte ADAM10 Aktivität im Bezug auf die Entwicklung und die Homöostase von unterschiedlichen Geweben? Hierfür ist die Generation von transgenen, optimalerweise auch induzierbar transgenen ADAM10 Mäusen eine Voraussetzung. Induzierbar transgene ADAM10 Mäuse, z.B. unter der Kontrolle eines K14-Promotors, besitzen den Vorteil einer reversiblen Regulierbarkeit der ADAM10 Expression auf zeitlicher Ebene. Die Möglichkeit, diese Expressionssteigerung wieder aufheben zu können, würde ein Modell für die therapeutische Behandlung von Patienten mit einer erhöhten ADAM10 Expression generieren. Durch die Verwendung einer Tamoxifen-induzierbaren ADAM10 Knockout Maus mit einer gleichzeitigen Insertion einer Tetrazyklin-induzierbaren transgenen ADAM10 Maus könnte auch der Fall einer Behandlung eines Patienten mit einer erniedrigten ADAM10 Aktivität simuliert werden. Weiterhin ist zu klären, ob neben der Beeinträchtigung des Notch Signalweges auch noch andere Signalwege oder biochemische Prozesse durch die ADAM10 Defizienz beeinflusst werden. Hierbei bietet sich die Einkreuzung einer NICD-transgenen Maus an, welche schon für eine Reihe von verschiedenen gewebespezifischen und induzierbaren Promotoren existiert. Das NICD stellt dabei das für die weitere Signalgebung essentielle zytoplasmatische Spaltprodukt des Notch-Rezeptors im kanonischen Notch Signalweg dar. Damit könnte ein „rescue“ des Notch Phänotyps erreicht werden und hierdurch bleibende Phänotypen erneut auf ihre molekularen Ursachen untersucht werden. Aufgrund der starken Sequenz- und substratspezifischen Homologie der Metalloprotease ADAM17 in zellbasierten Systemen, sollte in Zukunft gewebespezifische Deletionen sowohl in konditionalen ADAM10 als auch in konditionalen ADAM17 Knockout Mäusen parallel

betrachtet werden. Könnten all diese Ziele erreicht werden, wäre neben einem umfassenden Verständnis der molekularen Funktion von ADAM10 auch die abschließende Evaluation von ADAM10 als potenzielles therapeutisches Target möglich, welche z.Zt. noch einen entschiedenen Bedarf an Sicherung und Erweiterung der bereits gewonnenen Erkenntnisse besitzt.

Funktion von ADAM10 im Hämatopoetischen System

Da die Analyse der ADAM10^{Mx1-Cre-induz} und der ADAM10^{Mx1-leaky} Mäuse im Gegensatz zu den im Vorherigen beschriebenen (induzierbaren) konditionalen ADAM10 Knockout Mäusen der Haut noch in einem präliminären Stadium ist, erfolgt der Ausblick auf die in nächster Zeit auszuführenden Experimente. Zunächst ist die zweifelsfreie Detektion von ADAM10 in der Immunhistochemie/Immunfluoreszenz oder sofern möglich in der Durchflusszytometrie sicherzustellen. Hierdurch kann bestimmt werden, welche Zellpopulation zu welchem Zeitpunkt eine Reduktion der ADAM10 Proteinexpression aufweist. Alle beobachteten Phänotypen können dann anhand dieser Ergebnisse interpretiert werden. Im Weiteren sollte die genaue Klassifizierung der chronisch myeloproliferativen Erkrankung zur Etablierung von möglichen „rescue“ Experimenten bzw. Therapieansätzen im Mausmodell vorangetrieben werden. Hierbei könnten dann mögliche Erkenntnisse über den genauen molekularen Mechanismus des beobachteten Phänotyps einfließen und zur Erforschung neuartiger Therapieansätze führen. Ein wichtiger Schritt wäre hierbei die Durchführung von Knochenmarkstranplantationen, um einen möglichen Einfluss des Stromas auf die Entstehung der chronisch myeloproliferativen Erkrankung zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Eine mögliche Bedeutung der Disintegrin und Metalloproteinase ADAM10 wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit für die Regulation zahlreicher essentieller Signalwege der Morphogenese und Homöostase der Haut diskutiert. Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von ADAM10 in der Epidermis *in vivo* erfolgte die selektive Deaktivierung von ADAM10 während der embryonalen Morphogenese und nachfolgend auch in der adulten Haut. Dabei führt die epidermale Deletion von ADAM10 unter Kontrolle des K14-Promotors zu einer perinatalen Letalität der Mäuse. Die Mäuse wiesen dabei eine Barrierestörung und ein Fehlen der Talgdrüsen auf. Eine Reduktion des *stratum spinosum* ohne Unterschiede im Bezug auf Proliferation und Apoptose der Keratinozyten zeigte, dass der Verlust von ADAM10 zu einer frühzeitigen Maturierung der spinalen Keratinozyten führte. Die wenigen überlebenden K14-ADAM10-deletierten Mäuse mit einer postnatalen Defizienz von ADAM10, zeigten einen bleibenden Haarverlust, missgeformte Vibrissae, epidermale Hyperproliferation und Zystenbildung, eine Atrophie des Thymus und eine starke Zunahme der Expression des Keratinozyten-entstammenden Zytokins *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), welches auf eine nicht zell-autonome Multi-Organ Krankheit durch eine gestörte Hautbarriere hinweist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der beobachtete Phänotyp eine starke Ähnlichkeit mit den Phänotypen vergleichbarer Notch-defizienter Mausmodelle aufweist und somit auf eine Beeinträchtigung des Notch-Signalweges hinweist. Dabei konnten tatsächlich eine starke Reduktion der signalaktiven intrazellulären Notch Spaltfragmente und der hiermit verbundenen Notch Signalgebung gefunden werden. Die vorliegende Daten bestätigen die Bedeutung von ADAM10 als hauptsächliche Sheddase für den S2-Schnitt aller Notch-Rezeptoren *in vivo* und damit die Funktion von ADAM10 als einen zentralen Regulator der Hautentwicklung und –homöostase.

Nachfolgend wurde ein induzierbar konditionales ADAM10 Knockout Mausmodell unter der Kontrolle des K5-Promotors etabliert, welches die Analyse von ADAM10 in der adulten Haut ohne vorherige Entwicklungsdefekte ermöglicht. Andauernde ADAM10 Defizienz führt auch in diesen Tieren zu bleibender Alopezie, epidermaler Zystenbildung, einer Reduktion des subkutanen adipösen Fettgewebes, Hyperpro-

liferation der basalen Keratinozyten und Hyperkeratose. Dies ist das erste beschriebene Modell einer induzierbaren konditionellen ADAM10 Knockout Maus und eröffnet damit die Möglichkeit der Anwendung von Experimenten zur *in vivo* Pharmakologie durch Inhibition der ADAM10 Aktivität zur Behandlung von verschiedenen ADAM10-assoziierten Hautkrankheiten.

Im Weiteren konnte ein induzierbar konditionales ADAM10 Knockout Mausmodell unter der Kontrolle des Mx1-Promotors etabliert werden, welches die Deletion von ADAM10 vorrangig in Interferon-sensitiven Zellen des hämatopoetischen Systems ermöglichte. Proteinexpressionsanalysen bestätigten eine Reduktion der ADAM10 Expression in Geweben der Milz, der Leber und des Knochenmarks und ermöglichen nachfolgende Experimente zur Analyse der Bedeutung von ADAM10 bei der Homöostase der genannten Organe. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine fortwährende Deletion von ADAM10 in diesem System zur Ausbildung einer chronisch myeloproliferativen Krankheit führt, welche dem klinischen Phänotyp von humanen Patienten mit einer Osteomyelofibrose ähnelt. Dieser Phänotyp kann durch eine Granulozytose des Knochenmarks, bei gleichzeitiger Reduktion von unreifen Erythrozyten und Lymphozyten; einer extramedullären Hämatopoese der Milz, die zu einer ausgeprägten Splenomegalie führt, sowie einer Lymphopenie, Granulozytose und Thrombozytose des peripheren Blutes charakterisiert werden. Dementsprechend wurden erhöhte Plasmakonzentration von G-CSF (einem bekannten klinischen Marker für myeloproliferative Krankheiten) detektiert. Außerdem konnten durch eine Array-basierte Expressionsanalyse von Zytokinen mit nachfolgenden ELISA-Verifizierung ein Erhöhung der TIMP-1 und Interleukin-16 Konzentration gemessen werden, welche möglicherweise eine Rolle dieser Proteine als klinische Marker für die Entstehung von chronisch myeloproliferativen Krankheiten anzeigt. Hiermit konnte zum ersten Mal *in vivo* eine essentielle Funktion für ADAM10 bei Zellschicksalsentscheidungen im Zuge der Homöostase des hämatopoetischen Systems gezeigt werden. Daher könnte dieses Mausmodell als ein vielversprechendes klinisches Mausmodell zur Analyse und Behandlung von chronisch myeloproliferativen Krankheiten dienen.

8 Summary

The disintegrin and metalloproteinase ADAM10 has been implicated in the regulation of several key signaling pathways that determine skin morphogenesis and homeostasis. To address the *in vivo* relevance of ADAM10 in the epidermis ADAM10 was selectively disrupted during skin morphogenesis and in adult skin. K14-Cre driven epidermal ADAM10 deletion leads to perinatal lethality of the mice. These mice are characterized by barrier impairment, and absence of sebaceous glands. A reduction of spinous layers in the ADAM10-deleted skin, which is not associated with differences in either proliferation or apoptosis, indicates that loss of ADAM10 triggers a premature differentiation of spinous keratinocytes. The few surviving K14-ADAM10-deleted mice and mice in which ADAM10 was deleted postnatally showed loss of hair, misformed vibrissae, epidermal hyperproliferation and cyst formation, thymic atrophy and upregulation of the cytokine *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), thus indicating non cell-autonomous multi-organ disease due to a compromised barrier. Together, these phenotypes closely resemble Notch pathway loss-of-function phenotypes in skin, demonstrating that ADAM10 interferes with Notch signaling. Notch processing was indeed strongly reduced resulting in decreased levels of signaling-competent Notch intracellular domain fragment and functional Notch signaling. The data identify ADAM10 as the major Site-2 processing enzyme for Notch in the epidermis *in vivo*, and thus as a central regulator of skin development and maintenance.

Additionally an inducible conditional ADAM10 Knockout mouse model under the control of the Keratin5-Promoter was established permitting the analysis of ADAM10 in adult skin without developmental defects. Prolonged ADAM10 deficiency in adult skin led to ultimate alopecia, epidermal cyst formation, reduction of subcutaneous adipose fat tissue, hyperproliferation of basal keratinocytes and hyperkeratinisation. This is the first described model of an inducible conditional ADAM10 Knockout mouse model and will give the opportunity to apply *in vivo* pharmacology research. Thereby possible side-effects due to therapeutical inhibition of ADAM10 activity could be determined.

Furthermore it was possible to establish an inducible conditional ADAM10 Knockout mouse model under the control of the Mx1-Promotor allowing disruption of ADAM10

activity preferentially in interferon-sensitive cells of the hematopoietic system. Protein expression analysis could confirm a reduction of ADAM10 expression in tissues of the spleen, the liver and the bone marrow disposing subsequent experiments for the impact of ADAM10 concerning the homeostasis of these organs. Additionally it was shown that prolonged deletion of ADAM10 led to a chronic myeloproliferative disorder resembling the phenotype of human patients suffering from *Osteomyelofibrosis (OMF)*. This phenotype was characterized by myeloid expansion, loss of erythrocytes and lymphocytes from the bone marrow; granulocytic infiltration of multiple organs; extramedullary hematopoiesis of the spleen leading to a pronounced splenomegaly as well as lymphopenia, granulocytosis and thrombocytosis in the peripheral blood. Consequently plasma levels of G-CSF (a well-known clinical marker of myeloproliferative disorders) were increased. Moreover an array-based protein expression analysis of cytokines with subsequent ELISA-validation could confirm upregulation of TIMP-1 and Interleukin-16, indicating both as potentially new clinical markers for the manifestation of chronic myeloproliferative disorders in mice and possibly also man. Thus ADAM10 could be confirmed to play an essential role for cell-fate decisions among the homeostasis of the hematopoietic system *in vivo* for the first time. Therefore the presented ADAM10-deficient mice may serve as an interesting mouse model for the analysis and treatment of chronic myeloproliferative disorders.

9 Literaturverzeichnis

Adam-Klages, S., et al., *Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity*. Immunol Res, 2005. **33**(2): p. 149-66.

Akashi, K., et al., *Lymphoid development from hematopoietic stem cells*. Int J Hematol, 1999. **69**(4): p. 217-26.

Akiyama, T.E., et al., *Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2607-19.

Alexandroff, A.B. and K.E. Harman, *Blistering skin disorders: an evidence-based update. Conference report*. Br J Dermatol, 2009. **160**(3): p. 502-4.

Allinson, T.M., et al., *The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein*. Eur J Biochem, 2004. **271**(12): p. 2539-47.

Allsopp, R.C., et al., *Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo*. Exp Cell Res, 1995. **220**(1): p. 194-200.

Alter, B.P., et al., *Cancer in dyskeratosis congenita*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6549-57.

Ambler, C.A. and F.M. Watt, *Expression of Notch pathway genes in mammalian epidermis and modulation by beta-catenin*. Dev Dyn, 2007. **236**(6): p. 1595-601.

Amirghofran, Z., et al., *Evaluation of CD44 and CD44v6 in colorectal carcinoma patients: soluble forms in relation to tumor tissue expression and metastasis*. J Gastrointest Cancer, 2008. **39**(1-4): p. 73-8.

Amour, A., et al., *Inhibition of the metalloproteinase domain of mouse TACE*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **878**: p. 728-31.

Amour, A., et al., *The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3*. FEBS Lett, 2000. **473**(3): p. 275-9.

- Andereg, U., et al., *ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(6): p. 1471-82.
- Anders, A., et al., *Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases*. FASEB J, 2001. **15**(10): p. 1837-9.
- Andre, M., et al., *Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS*. Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1437-49.
- Annaert, W. and B. De Strooper, *A cell biological perspective on Alzheimer's disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 25-51.
- Arduise, C., et al., *Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7002-13.
- Arribas, J., J.J. Bech-Serra, and B. Santiago-Josefat, *ADAMs, cell migration and cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 57-68.
- Arruda, A.P., et al., *Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 683-94.
- Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M.E. Fortini, *Notch signaling*. Science, 1995. **268**(5208): p. 225-32.
- Asai, M., et al., *Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(1): p. 231-5.
- Asakura, M., et al., *Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 35-40.
- Axelson, H., *The Notch signaling cascade in neuroblastoma: role of the basic helix-loop-helix proteins HASH-1 and HES-1*. Cancer Lett, 2004. **204**(2): p. 171-8.
- Bagby, G.J., et al., *Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis*. J Infect Dis, 1991. **163**(1): p. 83-8.

Bakkers, J., et al., *Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm*. Dev Cell, 2002. **2**(5): p. 617-27.

Bandyopadhyay, S., et al., *Interleukin-1alpha stimulates non-amyloidogenic pathway by alpha-secretase (ADAM-10 and ADAM-17) cleavage of APP in human astrocytic cells involving p38 MAP kinase*. J Neurosci Res, 2006. **84**(1): p. 106-18

Barton, B.E., *IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation*. Immunol Res, 2001. **23**(1): p. 41-58.

Becam, I., et al., *A role of receptor notch in ligand cis-inhibition in Drosophila*. Curr Biol, 2010. **20**(6): p. 554-60.

Bech-Serra, J.J., et al., *Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(13): p. 5086-95.

Becker, J.W., et al., *Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme*. Protein Sci, 1995. **4**(10): p. 1966-76.

Behrens, J., *Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 1999. **18**(1): p. 15-30.

Bennani-Baiti, N. and M.P. Davis, *Cytokines and cancer anorexia cachexia syndrome*. Am J Hosp Palliat Care, 2008. **25**(5): p. 407-11.

Binczek, E., et al., *Obesity resistance of the stearyl-CoA desaturase-deficient (scd1^{-/-}) mouse results from disruption of the epidermal lipid barrier and adaptive thermoregulation*. Biol Chem, 2007. **388**(4): p. 405-18.

Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1198**(1): p. 11-26

Blair, A., et al., *Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3104-12.

Blanpain, C. and E. Fuchs, *Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(3): p. 207-17.

Blanpain, C., et al., *Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 3022-35.

Blanpain, C., et al., *Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche*. Cell, 2004. **118**(5): p. 635-48.

Blaumueller, C.M., et al., *Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane*. Cell, 1997. **90**(2): p. 281-91.

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

Blundell, T.L., *Metalloproteinase superfamilies and drug design*. Nat Struct Biol, 1994. **1**(2): p. 73-5.

Bode, W., F.X. Gomis-Ruth, and W. Stockler, *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, 1993. **331**(1-2): p. 134-40.

Bodey, B., et al., *Intrathymic non-lymphatic hematopoiesis during mammalian ontogenesis*. In Vivo, 1998. **12**(6): p. 599-618.

Bohm, B.B., et al., *Homeostatic effects of the metalloproteinase disintegrin ADAM15 in degenerative cartilage remodeling*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1100-9.

Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.

Borradori, L. and A. Sonnenberg, *Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(4): p. 411-8.

Bourd-Boittin, K., et al., *CX3CL1/fractalkine shedding by human hepatic stellate cells: contribution to chronic inflammation in the liver*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8A): p. 1526-35.

Bradford, G.B., et al., *Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment*. Exp Hematol, 1997. **25**(5): p. 445-53.

Braun, K.M., et al., *Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis*. Development, 2003. **130**(21): p. 5241-55.

Breathnach, A.S., *Branched cells in the epidermis: an overview*. J Invest Dermatol, 1980. **75**(1): p. 6-11.

Briot, A., et al., *Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome*. J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 1135-47.

Brou, C., et al., *A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 207-16

Butler, G.S. and C.M. Overall, *Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics*. Biochemistry, 2009. **48**(46): p. 10830-45.

Byrne, C., M. Tainsky, and E. Fuchs, *Programming gene expression in developing epidermis*. Development, 1994. **120**(9): p. 2369-83.

Candi, E., et al., *Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1037-47.

Castellanos, A., et al., *Regulation of erythropoiesis by the neuronal transmembrane protein Lrfrn2*. Exp Hematol, 2007. **35**(5): p. 724-34.

Chalaris et al., *Intestinal inflammation and regeneration are orchestrated by the Disintegrin Metalloprotease ADAM17*, J Exp Med, 2010. *Article in press*

Cheshier, S.H., et al., *In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3120-5.

Christensen, J.L. and I.L. Weissman, *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14541-6.

Chuong, C.M. and A. Noveen, *Phenotypic determination of epithelial appendages: genes, developmental pathways, and evolution*. J Investig Dermatol Symp Proc, 1999. **4**(3): p. 307-11.

Clayton, E., et al., *A single type of progenitor cell maintains normal epidermis*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 185-9.

Collins, C.A. and F.M. Watt, *Dynamic regulation of retinoic acid-binding proteins in developing, adult and neoplastic skin reveals roles for beta-catenin and Notch signalling*. Dev Biol, 2008. **324**(1): p. 55-67.

Conlon, R.A., A.G. Reaume, and J. Rossant, *Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites*. Development, 1995. **121**(5): p. 1533-45.

Conrad, D.H., et al., *CD23: an overlooked regulator of allergic disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2007. **7**(5): p. 331-7.

Contag, P.R., et al., *Bioluminescent indicators in living mammals*. Nat Med, 1998. **4**(2): p. 245-7.

Cotsarelis, G., T.T. Sun, and R.M. Lavker, *Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1329-37.

Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2387-92.

Crawford, H.C., et al., *ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(20): p. 2288-99.

Cumberbatch, M., et al., *Langerhans cell migration*. Clin Exp Dermatol, 2000. **25**(5): p. 413-8.

Dassule, H.R., et al., *Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth*. Development, 2000. **127**(22): p. 4775-85.

de Haan, G. and G. Van Zant, *Intrinsic and extrinsic control of hemopoietic stem cell numbers: mapping of a stem cell gene*. J Exp Med, 1997. **186**(4): p. 529-36.

- De Luca, A., et al., The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol*, 2008. **214**(3): p. 559-67.
- De Strooper, B., et al., A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 1999. **398**(6727): p. 518-22.
- De Wever, O., et al., *Soluble cadherins as cancer biomarkers*. *Clin Exp Metastasis*, 2007. **24**(8): p. 685-97.
- Dellambra, E., et al., *Stratifin, a keratinocyte specific 14-3-3 protein, harbors a pleckstrin homology (PH) domain and enhances protein kinase C activity*. *J Cell Sci*, 1995. **108 (Pt 11)**: p. 3569-79.
- Demehri, S. and R. Kopan, *Notch signaling in bulge stem cells is not required for selection of hair follicle fate*. *Development*, 2009b. **136**(6): p. 891-6.
- Demehri, S., A. Turkoz, and R. Kopan, *Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(1): p. 55-66.
- Demehri, S., et al., *Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity*. *PLoS Biol*, 2008. **6**(5): p. e123.
- Diamond, I., et al., *Conditional gene expression in the epidermis of transgenic mice using the tetracycline-regulated transactivators tTA and rTA linked to the keratin 5 promoter*. *J Invest Dermatol*, 2000. **115**(5): p. 788-94.
- Dierker, T., et al., *Heparan sulfate-modulated, metalloprotease-mediated sonic hedgehog release from producing cells*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(12): p. 8013-22.
- Dittmer, A., et al., *Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(18): p. 3053-65.
- Doedens, J.R., R.M. Mahimkar, and R.A. Black, *TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **308**(2): p. 331-8.

D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster, *The many facets of Notch ligands*. *Oncogene*, 2008. **27**(38): p. 5148-67.

Dumortier, A., et al., *Atopic dermatitis-like disease and associated lethal myeloproliferative disorder arise from loss of notch signaling in the murine skin*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9258.

Dyczynska, E., et al., *Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(1): p. 436-44.

Earp, H.S., et al., *Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research*. *Breast Cancer Res Treat*, 1995. **35**(1): p. 115-32.

Eckert, R.L., et al., *S100 proteins in the epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**(1): p. 23-33.

Edwards, D.R., M.M. Handsley, and C.J. Pennington, *The ADAM metalloproteinases*. *Mol Aspects Med*, 2008. **29**(5): p. 258-89.

Eichenauer, D.A., et al., *ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 332-8.

Endres, K., et al., *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*, 2003. **270**(11): p. 2386-93.

Ernfors, P., *Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(8): p. 1397-407.

Escrevente, C., et al., *Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(6): p. 905-13.

Esselens, C.W., et al., *Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17*. *Biol Chem*, 2008. **389**(8): p. 1075-84.

Estrach, S., et al., *Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis*. *Development*, 2006. **133**(22): p. 4427-38.

- Estrach, S., et al., *Role of the Notch ligand Delta1 in embryonic and adult mouse epidermis*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(4): p. 825-32.
- Eto, K., et al., *Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17804-10.
- Evans, J.P., *Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization*. Bioessays, 2001. **23**(7): p. 628-39.
- Fahrenholz, F., F. Tippmann, and K. Endres, *Retinoids as a perspective in treatment of Alzheimer's disease*. Neurodegener Dis, 2010. **7**(1-3): p. 190-2.
- Feil, R., et al., *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10887-90.
- Fischer, A. and M. Gessler, *Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4583-96.
- Fischer, O.M., et al., *EGFR signal transactivation in cancer cells*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1203-8.
- Fogel, M., et al., *L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas*. Lancet, 2003. **362**(9387): p. 869-75.
- Foley, K.P., M.W. Leonard, and J.D. Engel, *Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction*. Trends Genet, 1993. **9**(11): p. 380-5.
- Fourie, A.M., et al., *Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30469-77.
- Fuchs, E. and S. Raghavan, *Getting under the skin of epidermal morphogenesis*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 199-209.
- Fuchs, E., *Scratching the surface of skin development*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 834-42.

Galichet, A., M. Weibel, and C.W. Heizmann, *Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(1): p. 1-5.

Garrett-Sinha, L.A., et al., A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31384-90.

Gat, U., et al., De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. Cell, 1998. **95**(5): p. 605-14.

Gat, U., et al., *De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin*. Cell, 1998. **95**(5): p. 605-14.

Gavert, N., et al., *L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers*. J Cell Biol, 2005. **168**(4): p. 633-42.

Ge, W., et al., *Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation*. J Neurosci Res, 2002. **69**(6): p. 848-60.

Geiger, J.M., M. Baudin, and J.H. Saurat, Teratogenic risk with etretinate and acitretin treatment. Dermatology, 1994. **189**(2): p. 109-16.

Geiger, J.M., Retinoids and sebaceous gland activity. Dermatology, 1995. **191**(4): p. 305-10.

Gibb, D.R., et al., *ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo*. J Exp Med, 2010. **207**(3): p. 623-35.

Goldstein, J.L., *Laskers for 2001: knockout mice and test-tube babies*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1079-80.

Gomis-Ruth, F.X., *Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases*. Mol Biotechnol, 2003. **24**(2): p. 157-202.

Gordon, W.R., et al., *Effects of S1 cleavage on the structure, surface export, and signaling activity of human Notch1 and Notch2*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6613.

Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.

Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.

Green, H., K. Easley, and S. Iuchi, *Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15625-30.

Griffith, J.K., et al., *Structure and function of the class C tetracycline/H⁺ antiporter: three independent groups of phenotypes are conferred by TetA (C)*. Mol Membr Biol, 1994. **11**(4): p. 271-7.

Gudjonsson, J.E., et al., *Mouse models of psoriasis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(6): p. 1292-308.

Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, 1996. **84**(3): p. 345-57.

Hafner, M., et al., *Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein*. Genesis, 2004. **38**(4): p. 176-81.

Han, G., et al., *A role for TGFbeta signaling in the pathogenesis of psoriasis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 371-7.

Han, H., et al., *Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision*. Int Immunol, 2002. **14**(6): p. 637-45.

Hardman, M.J., et al., *Patterned acquisition of skin barrier function during development*. Development, 1998. **125**(8): p. 1541-52.

Harris, B., I. Pereira, and E. Parkin, *Targeting ADAMI0 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein*. Brain Res, 2009. **1296**: p. 203-15.

Hart, S., et al., *GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways*. Biol Chem, 2005. **386**(9): p. 845-55.

Hartmann, D., et al., *The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(21): p. 2615-24.

Hasler, R., et al., *Genetic control of global gene expression levels in the intestinal mucosa: a human twin study*. Physiol Genomics, 2009. **38**(1): p. 73-9.

Hass, M.R., et al., *Presenilin: RIP and beyond*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(2): p. 201-10.

Hattori, M., M. Osterfield, and J.G. Flanagan, *Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent*. Science, 2000. **289**(5483): p. 1360-5.

Hawley, S.H., et al., *Disruption of BMP signals in embryonic Xenopus ectoderm leads to direct neural induction*. Genes Dev, 1995. **9**(23): p. 2923-35.

He, R. and R.S. Geha, *Thymic stromal lymphopoietin*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 13-24.

Heinonen, K.M. and C. Perreault, *Development and functional properties of thymic and extrathymic T lymphocytes*. Crit Rev Immunol, 2008. **28**(5): p. 441-66.

Hess, J., et al., *The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1531-9.

Hietanen, S., et al., *Anti-proliferative effect of retinoids and interferon-alpha-2a on vaginal cell lines derived from squamous intra-epithelial lesions*. Int J Cancer, 1998. **78**(3): p. 338-45.

Hikita, A., et al., *Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36846-55.

Hillen, W. and C. Berens, *Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 345-69.

Hinrichs, W., et al., *Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance*. Science, 1994. **264**(5157): p. 418-20.

Hirasawa, N., et al., *Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: establishment of a modified allergic*

dermatitis model in mouse ear lobes by application of 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate: putative involvement of thymic stromal lymphopoietin and roles of histamine. J Pharmacol Sci, 2009. **110**(3): p. 245-50.

Hooper, N.M., *Families of zinc metalloproteases.* FEBS Lett, 1994. **354**(1): p. 1-6.

Horiuchi, K., et al., *Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock.* J Immunol, 2007b. **179**(5): p. 2686-9.

Horiuchi, K., et al., *Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5614-24.

Horiuchi, K., et al., *Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 176-88.

Horsley, V., et al., *Blimp1 defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland.* Cell, 2006. **126**(3): p. 597-609.

Hsieh, P.P., et al., *The role of Janus Kinase 2 V617F mutation in extramedullary hematopoiesis of the spleen in neoplastic myeloid disorders.* Mod Pathol, 2007. **20**(9): p. 929-35.

Huang, Y., et al., *gamma-secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-gamma.* Cell Prolif, 2010. **43**(2): p. 147-56.

Huelsken, J., et al., *beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin.* Cell, 2001. **105**(4): p. 533-45.

Hug, H., et al., *Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3065-79.

Huguenin, M., et al., *The metalloprotease mepribeta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion.* PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2153.

Huissoon, A.P., et al., *Increased expression of CD23 in rheumatoid synovitis.* Scand J Rheumatol, 2000. **29**(3): p. 154-9.

Hundhausen, C., et al., *Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8064-72.

Hundhausen, C., et al., *The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1186-95.

Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, *HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway*. J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 237-55.

Izumi, Y., et al., *A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor*. EMBO J, 1998. **17**(24): p. 7260-72.

Jackson, B., et al., *Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium and ultraviolet irradiation*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(5): p. 1062-70.

Jackson, L.F., et al., *Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2704-16.

Jacobsen, T.L., et al., *Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in Drosophila*. Development, 1998. **125**(22): p. 4531-40.

Jameson, J. and W.L. Havran, *Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 114-22.

Janes, P.W., et al., *Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans*. Cell, 2005. **123**(2): p. 291-304.

Janssen, O., et al., *CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule?* Cell Death Differ, 2003. **10**(11): p. 1215-25.

Jaubert, J., J. Cheng, and J.A. Segre, *Ectopic expression of kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier*. Development, 2003. **130**(12): p. 2767-77.

Jongeneel, C.V., J. Bouvier, and A. Bairoch, *A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases*. FEBS Lett, 1989. **242**(2): p. 211-4.

- Jorissen, E., et al., *The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex*. J Neurosci, 2010. 30(14): p. 4833-44.
- Karanu, F.N., et al., *The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2000. 192(9): p. 1365-72.
- Kellendonk, C., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486*. Nucleic Acids Res, 1996. 24(8): p. 1404-11.
- Kim, Y.W., et al., *Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease*. Blood, 2008. 112(12): p. 4628-38.
- Kirkin, V., et al., *The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells*. Cell Death Differ, 2007. 14(9): p. 1678-87.
- Kirwan, M. and I. Dokal, *Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1792(4): p. 371-9.
- Kistner, A., et al., *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): p. 10933-8.
- Kitamoto, T., et al., *Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis: analysis of Notch gene expression in Notch3-deficient mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 331(4): p. 1154-62.
- Klessner, J.L., et al., *EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2*. Mol Biol Cell, 2009. 20(1): p. 328-37.
- Knust, E. and J.A. Campos-Ortega, *The molecular genetics of early neurogenesis in Drosophila melanogaster*. Bioessays, 1989. 11(4): p. 95-100.
- Ko, S.Y., et al., *Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2007. 245(1-2): p. 33-43.
- Koch, U., et al., *Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment*. J Exp Med, 2008. 205(11): p. 2515-23.
- Kojro, E., et al., *Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(10): p. 5815-20.

- Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
- Koster, M.I. and D.R. Roop, *Mechanisms regulating epithelial stratification*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 93-113.
- Koster, M.I., et al., *p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007b. **104**(9): p. 3255-60.
- Koster, M.I., et al., *p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program*. Genes Dev, 2004. **18**(2): p. 126-31.
- Koster, M.I., et al., *Tap63alpha induces AP-2gamma as an early event in epidermal morphogenesis*. Dev Biol, 2006. **289**(1): p. 253-61.
- Kovall, R.A., *More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5099-109.
- Kuhn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
- Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- Lai, E.C., *Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins*. EMBO Rep, 2002. **3**(9): p. 840-5.
- Lakso, M., et al., *Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6232-6.
- Lammich, S., et al., *Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3922-7.
- Lammich, S., et al., *Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 15753-60.
- Lavabre-Bertrand, T., et al., *[The liver and myeloproliferative syndromes]*. Gastroenterol Clin Biol, 2002. **26**(2): p. 136-45.

- LaVoie, M.J. and D.J. Selkoe, *The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34427-37.
- Lawrence, H.J., et al., *The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis*. Stem Cells, 1996. **14**(3): p. 281-91.
- Le, N., et al., *The effect of beta-estradiol, progesterone and testosterone on the production of human leukocyte derived interferons*. J Biol Regul Homeost Agents, 1988. **2**(4): p. 199-204.
- Le, Y. and B. Sauer, *Conditional gene knockout using cre recombinase*. Methods Mol Biol, 2000. **136**: p. 477-85.
- Lee, C.S. and K. Li, *A review of acitretin for the treatment of psoriasis*. Expert Opin Drug Saf, 2009. **8**(6): p. 769-79.
- Lee, H. and D. Kimelman, *A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish*. Dev Cell, 2002. **2**(5): p. 607-16.
- Lee, J., et al., *Bi-compartmental communication contributes to the opposite proliferative behavior of Notch1-deficient hair follicle and epidermal keratinocytes*. Development, 2007b. **134**(15): p. 2795-806.
- Lee, K.H., et al., *Association of extracellular cleavage of E-cadherin mediated by MMP-7 with HGF-induced in vitro invasion in human stomach cancer cells*. Eur Surg Res, 2007. **39**(4): p. 208-15.
- Lee, S.B., et al., *ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(3): p. 763-73.
- Lemieux, G.A., et al., *The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14836-44.
- Lenox, L.E., et al., *Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling*. Exp Hematol, 2009. **37**(5): p. 549-58.

- Leonard, J.D., F. Lin, and M.E. Milla, *Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch*. *Biochem J*, 2005. **387**(Pt 3): p. 797-805.
- Levitan, D. and I. Greenwald, *Effects of SEL-12 presenilin on LIN-12 localization and function in Caenorhabditis elegans*. *Development*, 1998. **125**(18): p. 3599-606.
- Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(10): p. 743-55.
- Li, Y. and N.E. Baker, *The roles of cis-inactivation by Notch ligands and of neuralized during eye and bristle patterning in Drosophila*. *BMC Dev Biol*, 2004. **4**: p. 5.
- Linkermann, A., et al., *Considering Fas ligand as a target for therapy*. *Expert Opin Ther Targets*, 2005. **9**(1): p. 119-34.
- Liu, X., et al., *Partial maintenance of taurocholate uptake by adult rat hepatocytes cultured in a collagen sandwich configuration*. *Pharm Res*, 1998. **15**(10): p. 1533-9.
- Logeat, F., et al., *The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 8108-12.
- Lopardo, T., et al., *Claudin-1 is a p63 target gene with a crucial role in epithelial development*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2715.
- Loser, K. and S. Beissert, *Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity*. *Adv Dermatol*, 2007. **23**: p. 307-33.
- Lowin, B., et al., *Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways*. *Nature*, 1994. **370**(6491): p. 650-2.
- Lu, P., M. Barad, and P.D. Vize, *Xenopus p63 expression in early ectoderm and neurectoderm*. *Mech Dev*, 2001. **102**(1-2): p. 275-8.
- Maillard, I., et al., *Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(4): p. 356-66.
- Makrilia, N., et al., *Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(10): p. 1023-37.

- Mancia, F. and L. Shapiro, *ADAM and Eph: how Ephrin-signaling cells become detached*. Cell, 2005. **123**(2): p. 185-7.
- Mansuy, I.M. and H. Bujard, *Tetracycline-regulated gene expression in the brain*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(5): p. 593-6.
- Marambaud, P., et al., *A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations*. Cell, 2003. **114**(5): p. 635-45.
- Marambaud, P., et al., *A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions*. EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1948-56.
- Marcello, E., et al., *An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2010. **285**(14): p. 10376-84.
- Marcello, E., et al., *Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity*. J Neurosci, 2007. **27**(7): p. 1682-91.
- Marcinkiewicz, M. and N.G. Seidah, *Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain*. J Neurochem, 2000. **75**(5): p. 2133-43.
- Maretzky, T., et al., *ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9182-7.
- Maretzky, T., et al., *ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(7): p. 1737-46.
- Maretzky, T., et al., *LI is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth*. Mol Cell Biol, 2005b. **25**(20): p. 9040-53.

Martinez Arias, A., V. Zecchini, and K. Brennan, *CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development?* *Curr Opin Genet Dev*, 2002. **12**(5): p. 524-33.

Matsuno, O., T. Kumamoto, and Y. Higuchi, *ADAM8 in allergy*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008. **7**(2): p. 108-12.

Matthews, B.W., et al., *Three-dimensional structure of thermolysin*. *Nat New Biol*, 1972. **238**(80): p. 37-41.

Mayer, G., et al., *The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(4): p. 2373-84.

M'Boneko, V. and H.J. Merker, *Development and morphology of the periderm of mouse embryos (days 9-12 of gestation)*. *Acta Anat (Basel)*, 1988. **133**(4): p. 325-36.

McCulloch, D.R., et al., *Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 314-23.

McDonell, M.W., M.N. Simon, and F.W. Studier, *Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels*. *J Mol Biol*, 1977. **110**(1): p. 119-46.

McGrath, J.A., et al., *Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa*. *Nat Genet*, 1995. **11**(1): p. 83-6.

McKerrow, J.H., *Human fibroblast collagenase contains an amino acid sequence homologous to the zinc-binding site of Serratia protease*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(13): p. 5943.

McMillan, J.R., M. Akiyama, and H. Shimizu, *Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions*. *J Dermatol Sci*, 2003. **31**(3): p. 169-77.

- Meng, J.F., C. McFall, and L.J. Rosenwasser, *Polymorphism R62W results in resistance of CD23 to enzymatic cleavage in cultured cells*. Genes Immun, 2007. **8**(3): p. 215-23.
- Merritt, B., C.N. Burkhardt, and D.S. Morrell, *Use of isotretinoin for acne vulgaris*. Pediatr Ann, 2009. **38**(6): p. 311-20.
- Metz, M. and M. Maurer, *Innate immunity and allergy in the skin*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 687-93.
- Milanezi, F., S. Carvalho, and F.C. Schmitt, *EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy*. Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(4): p. 417-34.
- Miller, C.L. and C.J. Eaves, *Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13648-53.
- Mills, A.A., et al., *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 708-13.
- Miniati, D., et al., *Constitutively active endothelial Notch4 causes lung arteriovenous shunts in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **298**(2): p. L169-77.
- Missero, C., et al., *Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5451-5.
- Mochizuki, S. and Y. Okada, *ADAMs in cancer cell proliferation and progression*. Cancer Sci, 2007. **98**(5): p. 621-8.
- Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
- Morasso, M.I., N.G. Markova, and T.D. Sargent, *Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 2): p. 1879-87.

Mori, S., et al., *PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 46029-34.

Moriyama, M., et al., *Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development*. Dev Cell, 2008. **14**(4): p. 594-604.

Morley, J.E., D.R. Thomas, and M.M. Wilson, *Cachexia: pathophysiology and clinical relevance*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(4): p. 735-43.

Morrison, C.J., et al., *Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(5): p. 645-53.

Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.

Morrison, S.J., et al., *Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential*. Immunity, 1996b. **5**(3): p. 207-16.

Morrison, S.J., et al., *The aging of hematopoietic stem cells*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1011-6.

Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, *The biology of hematopoietic stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 35-71.

Mukhopadhyay, M., et al., *Dkk2 plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium*. Development, 2006. **133**(11): p. 2149-54.

Muller, E.J., et al., *Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?* J Invest Dermatol, 2008. **128**(3): p. 501-16.

Muller-Sieburg, C.E. and R. Riblet, *Genetic control of the frequency of hematopoietic stem cells in mice: mapping of a candidate locus to chromosome 1*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1141-50.

Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.

- Mumm, J.S. and R. Kopan, *Notch signaling: from the outside in*. Dev Biol, 2000. **228**(2): p. 151-65.
- Mumm, J.S., et al., *A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 197-206.
- Murai, T., et al., *Epidermal growth factor-regulated activation of Rac GTPase enhances CD44 cleavage by metalloproteinase disintegrin ADAM10*. Biochem J, 2006. **395**(1): p. 65-71.
- Murphy, G., *The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 929-41.
- Muskavitch, M.A., *Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice*. Dev Biol, 1994. **166**(2): p. 415-30.
- Nagano, O., et al., *Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation*. J Cell Biol, 2004. **165**(6): p. 893-902.
- Najy, A.J., K.C. Day, and M.L. Day, *The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18393-401.
- Nazzaro, V., et al., *Expression of integrins in junctional and dystrophic epidermolysis bullosa*. J Invest Dermatol, 1990. **95**(1): p. 60-4.
- Nguyen, B.C., et al., *Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation*. Genes Dev, 2006. **20**(8): p. 1028-42.
- Nickoloff, B.J., et al., *Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma*. Cell Death Differ, 2002. **9**(8): p. 842-55.
- Nicolaides, K.H., et al., *Erythroblastosis and reticulocytosis in anemic fetuses*. Am J Obstet Gynecol, 1988. **159**(5): p. 1063-5.
- Nicolas, M., et al., *Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 416-21.

- Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
- Nunan, J. and D.H. Small, *Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases*. FEBS Lett, 2000. **483**(1): p. 6-10.
- Nye, J.S. and R. Kopan, *Developmental signaling. Vertebrate ligands for Notch*. Curr Biol, 1995. **5**(9): p. 966-9.
- Nye, J.S., *Developmental signaling: notch signals Kuz it's cleaved*. Curr Biol, 1997. **7**(11): p. R716-20.
- Oh, S.T., et al., *Overexpression of ADAM 10 and ADAM 12 in lesional psoriatic skin*. Br J Dermatol, 2008. **158**(6): p. 1371-3.
- Oh, S.T., et al., *The disintegrin-metalloproteinases ADAM 10, 12 and 17 are upregulated in invading peripheral tumor cells of basal cell carcinomas*. J Cutan Pathol, 2009. **36**(4): p. 395-401.
- Okuyama, R., et al., *High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 551-62.
- Okuyama, R., H. Tagami, and S. Aiba, *Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases*. J Dermatol Sci, 2008. **49**(3): p. 187-94.
- Orban, P.C., D. Chui, and J.D. Marth, *Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6861-5.
- Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
- Osorio, K.M., et al., *Runx1 modulates developmental, but not injury-driven, hair follicle stem cell activation*. Development, 2008. **135**(6): p. 1059-68.
- Pan, D. and G.M. Rubin, *Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis*. Cell, 1997. **90**(2): p. 271-80.

Pan, Y., et al., *gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis*. Dev Cell, 2004. 7(5): p. 731-43.

Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. J Natl Cancer Inst, 1971. 46(2): p. 411-22.

Parkin, E.T., et al., Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor-alpha. Biochemistry, 2002. 41(15): p. 4972-81.

Paschos, K.A., D. Canovas, and N.C. Bird, *The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis*. Cell Signal, 2009. 21(5): p. 665-74.

Passegue, E., E.F. Wagner, and I.L. Weissman, JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. Cell, 2004. 119(3): p. 431-43.

Payet, M.E., E.C. Woodward, and D.H. Conrad, *Humoral response suppression observed with CD23 transgenics*. J Immunol, 1999. 163(1): p. 217-23.

Pearnton, D.J., Y. Yang, and D. Dhouailly, *Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(10): p. 3714-9.

Peduto, L., et al., *Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer*. Cancer Res, 2005. 65(20): p. 9312-9.

Pellegrini, G., et al., *p63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(6): p. 3156-61.

Perl, A.K., et al., *Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(16): p. 10482-7.

Peschon, J.J., et al., *An essential role for ectodomain shedding in mammalian development*. Science, 1998. 282(5392): p. 1281-4.

- Poghosyan, Z., et al., *Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4999-5007.
- Postina, R., et al., *A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1456-64.
- Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 884-8.
- Prinzen, C., et al., *Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1522-4.
- Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
- Quesnelle, K.M., A.L. Boehm, and J.R. Grandis, *STAT-mediated EGFR signaling in cancer*. J Cell Biochem, 2007. **102**(2): p. 311-9.
- Radoja, N., et al., *Homeobox gene Dlx3 is regulated by p63 during ectoderm development: relevance in the pathogenesis of ectodermal dysplasias*. Development, 2007. **134**(1): p. 13-8.
- Rajewsky, K., *Early and late B-cell development in the mouse*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(2): p. 171-6.
- Rangarajan, A., et al., *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation*. EMBO J, 2001. **20**(13): p. 3427-36.
- Reddy, P., et al., *Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14608-14.
- Reiss, K., et al., *ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling*. EMBO J, 2005. **24**(4): p. 742-52.
- Reiss, K., et al., *Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 21735-44.

- Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
- Reya, T., R. Okamura, and R. Grosschedl, *Control of lymphocyte differentiation by the LEF-1/TCF family of transcription factors*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 133-40.
- Reynolds, A.B. and R.H. Carnahan, *Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(6): p. 657-63.
- Rhee, H., L. Polak, and E. Fuchs, *Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles*. Science, 2006. **312**(5782): p. 1946-9.
- Ribbens, C., et al., *Increased synovial fluid levels of soluble CD23 are associated with an erosive status in rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol, 2000. **120**(1): p. 194-9.
- Rigopoulos, D., G. Larios, and A.D. Katsambas, *The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies*. Clin Dermatol, 2010. **28**(1): p. 24-30.
- Rivella, S., *Ineffective erythropoiesis and thalasseмии*. Curr Opin Hematol, 2009. **16**(3): p. 187-94.
- Romani, N., B.E. Clausen, and P. Stoitzner, *Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 120-41.
- Romano, R.A., B. Birkaya, and S. Sinha, *A functional enhancer of keratin14 is a direct transcriptional target of deltaNp63*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(5): p. 1175-86.
- Rooke, J., et al., *KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis*. Science, 1996. **273**(5279): p. 1227-31.
- Roop, D., *Defects in the barrier*. Science, 1995. **267**(5197): p. 474-5.
- Roos, T.C., et al., *Retinoid metabolism in the skin*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(2): p. 315-33.

Rottinger, E., et al., *Nemo-like kinase (NLK) acts downstream of Notch/Delta signalling to downregulate TCF during mesoderm induction in the sea urchin embryo*. Development, 2006. **133**(21): p. 4341-53.

Sahin, U., et al., *Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands*. J Cell Biol, 2004. **164**(5): p. 769-79.

Sanalkumar, R., S.B. Dhanesh, and J. James, *Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates*. Cell Mol Life Sci, 2010.

Sauer, B. and N. Henderson, *Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(1): p. 147-61.

Saurat, J.H., Retinoids and psoriasis: novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. J Am Acad Dermatol, 1999. 41(3 Pt 2): p. S2-6.

Saxena, M.T., et al., *Murine notch homologs (NI-4) undergo presenilin-dependent proteolysis*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40268-73.

Schafer, B., et al., *Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47929-38.

Schirrmeister, W., et al., *Ectodomain shedding of E-cadherin and c-Met is induced by Helicobacter pylori infection*. Exp Cell Res, 2009. **315**(20): p. 3500-8.

Schon, M.P., *Animal models of psoriasis: a critical appraisal*. Exp Dermatol, 2008. **17**(8): p. 703-12.

Schonig, K., et al., *Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(23): p. e134.

Schonig, K., et al., *Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(23): p. e134.

Schroeder, A., F. Fahrenholz, and U. Schmitt, *Effect of a dominant-negative form of ADAM10 in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2009. **16**(2): p. 309-14.

Schulte, M., et al., *ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 1040-9.

Schulz, B., et al., *ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin*. Circ Res, 2008. **102**(10): p. 1192-201.

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

Segre, J., *Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 776-82.

Segre, J.A., C. Bauer, and E. Fuchs, *Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 356-60.

Shin, M., H. Nagai, and G. Sheng, *Notch mediates Wnt and BMP signals in the early separation of smooth muscle progenitors and blood/endothelial common progenitors*. Development, 2009. **136**(4): p. 595-603.

Shiozaki, H., et al., *E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells*. Cancer, 1996. **77**(8 Suppl): p. 1605-13.

Sinha, S., et al., *Defining the regulatory factors required for epidermal gene expression*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2543-55.

Six, E., et al., *The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7638-43.

Smart, I.H., *Variation in the plane of cell cleavage during the process of stratification in the mouse epidermis*. Br J Dermatol, 1970. **82**(3): p. 276-82.

Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. **241**(4861): p. 58-62.

Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 98-104.

Sprinzak, D., et al., *Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states*. Nature, 2010. **465**(7294): p. 86-90.

Stacheli, P., et al., *Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus*. Cell, 1986. **44**(1): p. 147-58.

Sternlicht, M.D. and S.W. Sunnarborg, *The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. **13**(2): p. 181-94.

Stocker, W. and W. Bode, *Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(3): p. 383-90.

Stocker, W., et al., *Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases*. Eur J Biochem, 1993. **214**(1): p. 215-31.

Stoeck, A., et al., *A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44*. Biochem J, 2006. **393**(Pt 3): p. 609-18.

Stokes, D.L., *Desmosomes from a structural perspective*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(5): p. 565-71.

Struhl, G. and I. Greenwald, *Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 522-5.

Suda, T., et al., *Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3806-13.

Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.

Swiatek, P.J., et al., *Notch1 is essential for postimplantation development in mice*. Genes Dev, 1994. **8**(6): p. 707-19.

Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 349-54.

Takacs-Vellai, K., et al., *Transcriptional control of Notch signaling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in C. elegans*. Dev Biol, 2007. **302**(2): p. 661-9.

Takeda, S., et al., *Crystal structures of VAPI reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold*. EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2388-96.

Takeichi, M., *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator*. Science, 1991. **251**(5000): p. 1451-5.

Tanaka, M., et al., *ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41950-9.

Tanaka, M., et al., *Fas ligand in human serum*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 317-22.

Tian, L., et al., *ADAM10 is essential for proteolytic activation of Notch during thymocyte development*. Int Immunol, 2008. **20**(9): p. 1181-7.

Till, J.E., *Radiosensitivity and chromosome numbers in strain L mouse cells in tissue culture*. Radiat Res, 1961. **15**: p. 400-9.

Ting, S.B., et al., *A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice*. Science, 2005. **308**(5720): p. 411-3.

Tippmann, F., et al., *Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1643-54.

Tolia, A., L. Chavez-Gutierrez, and B. De Strooper, *Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(37): p. 27633-42.

Tomita, S., et al., *Conditional disruption of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene leads to loss of target gene induction by the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(10): p. 1674-81.

Tothova, Z. and D.G. Gilliland, *FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(2): p. 140-52.

- Tousseyn, T., et al., *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, 2009. **284**(17): p. 11738-47.
- Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: an updated review of its biology*. Crit Care Med, 1993. **21**(10 Suppl): p. S415-22.
- Tumbar, T., et al., *Defining the epithelial stem cell niche in skin*. Science, 2004. **303**(5656): p. 359-63.
- Tunggal, J.A., et al., *E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1146-56.
- Turhan, A.G., et al., *Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1995. **85**(8): p. 2154-61.
- Turksen, K. and T.C. Troy, *Overexpression of the calcium sensing receptor accelerates epidermal differentiation and permeability barrier formation in vivo*. Mech Dev, 2003. **120**(6): p. 733-44.
- Urlinger, S., et al., *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7963-8.
- Urs, S., et al., *Soluble forms of the Notch ligands Delta1 and Jagged1 promote in vivo tumorigenicity in NIH3T3 fibroblasts with distinct phenotypes*. Am J Pathol, 2008. **173**(3): p. 865-78.
- van de Kerkhof, P.C., Update on retinoid therapy of psoriasis in: an update on the use of retinoids in dermatology. Dermatol Ther, 2006. 19(5): p. 252-63.
- Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
- Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.

- Varnum-Finney, B., et al., *Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1278-81.
- Vauclair, S., et al., *Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by Notch1 signaling via the regulation of vitamin A metabolism*. Dev Cell, 2007. **13**(2): p. 242-53.
- Vauclair, S., et al., *Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis*. Dev Biol, 2005. **284**(1): p. 184-93.
- Vaziri, H., et al., *Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9857-60.
- Viatour, P., et al., *Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(4): p. 416-28.
- Vidal, F., et al., *Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia*. Nat Genet, 1995. **10**(2): p. 229-34.
- Vied, C. and D. Kalderon, *Hedgehog-stimulated stem cells depend on non-canonical activity of the Notch co-activator Mastermind*. Development, 2009. **136**(13): p. 2177-86.
- Vijayasaradhi, S. and A.N. Houghton, *Melanoma and melanocytes: pigmentation, tumor progression, and the immune response to cancer*. Adv Pharmacol, 1995. **32**: p. 343-74.
- Vooijs, M., et al., *Ectodomain shedding and intramembrane cleavage of mammalian Notch proteins is not regulated through oligomerization*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50864-73.
- Vooijs, M., et al., *Mapping the consequence of Notch1 proteolysis in vivo with NIP-CRE*. Development, 2007. **134**(3): p. 535-44.
- Wagers, A.J., J.L. Christensen, and I.L. Weissman, *Cell fate determination from stem cells*. Gene Ther, 2002. **9**(10): p. 606-12.
- Waikel, R.L., et al., *Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells*. Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 165-8.

- Walkley, C.R., et al., Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*, 2007. **129**(6): p. 1081-95.
- Warren, C.M. and R. Landgraf, *Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control*. *Cell Signal*, 2006. **18**(7): p. 923-33.
- Watt, F.M., Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J*, 2002. **21**(15): p. 3919-26.
- Watt, F.M., S. Estrach, and C.A. Ambler, *Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 171-9.
- Webster, N.J., et al., *Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: no role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. **130**(1-2): p. 161-9.
- Weinmaster, G., *The ins and outs of notch signaling*. *Mol Cell Neurosci*, 1997. **9**(2): p. 91-102.
- Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 157-68.
- Wen, C., M.M. Metzstein, and I. Greenwald, *SUP-17, a Caenorhabditis elegans ADAM protein related to Drosophila KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling*. *Development*, 1997. **124**(23): p. 4759-67.
- Weskamp, G., et al., *ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1293-8.
- Westfall, M.D., et al., *The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(7): p. 2264-76.
- Whitlock, C.A., et al., *Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule*. *Cell*, 1987. **48**(6): p. 1009-21.

Wild-Bode, C., et al., *A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23824-9.

Wilhelmsen, K., S.H. Litjens, and A. Sonnenberg, *Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(8): p. 2877-86.

Wilson, A., H.R. MacDonald, and F. Radtke, *Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus*. J Exp Med, 2001b. **194**(7): p. 1003-12.

Wilson, C., et al., *Cells within the bulge region of mouse hair follicle transiently proliferate during early anagen: heterogeneity and functional differences of various hair cycles*. Differentiation, 1994. **55**(2): p. 127-36.

Wilson, S.I., et al., *The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 325-30.

Wolff, K., *The langerhans cell*. Curr Probl Dermatol, 1972. **4**: p. 79-145.

Wolfsberg, T.G., et al., *The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10783-7.

Wollscheid, B., et al., *Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 378-86.

Wong, Y., et al., *Imaging features of focal intrahepatic extramedullary haematopoiesis*. Br J Radiol, 1999. **72**(861): p. 906-10.

Wu, E., P.I. Croucher, and N. McKie, *Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(2): p. 437-42.

Xu, D., C. Sharma, and M.E. Hemler, *Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein*. FASEB J, 2009. **23**(11): p. 3674-81.

Yamamoto, A., J.J. Lucas, and R. Hen, *Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease*. *Cell*, 2000. **101**(1): p. 57-66.

Yamazaki, K., et al., *Assignment of a disintegrin and metalloproteinase domain 10 (Adam10) gene to mouse chromosome 9*. *Genomics*, 1997. **46**(3): p. 528-9.

Yan, Y., K. Shirakabe, and Z. Werb, *The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(2): p. 221-6.

Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. *Mol Cell*, 1998. **2**(3): p. 305-16.

Yasue, A., et al., *Cloning and expression of the chick p63 gene*. *Mech Dev*, 2001. **100**(1): p. 105-8.

Yavari, R., et al., *Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(7): p. 1161-7.

Yokozeiki, T., et al., *Meltrin beta (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi apparatus: fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells*. *Genes Cells*, 2007. **12**(3): p. 329-43.

Yoshimura, T., et al., *ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in Helicobacter pylori-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(3): p. 332-40.

Yu, P., et al., *Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23*. *Nature*, 1994. **369**(6483): p. 753-6.

Yu, Z., et al., *The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4*. *Dev Biol*, 2006. **299**(1): p. 122-36.

Yuki, T., et al., *Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function*. *Exp Dermatol*, 2007. **16**(4): p. 324-30.

Zeng, C., et al., *Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the Drosophila sensory organ lineage*. *Genes Dev*, 1998. **12**(8): p. 1086-91.

Zhang, X.P., et al., *Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(13): p. 7345-50.

Zheng, Y., et al., *Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17)*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42898-906.

Zouboulis, C.C., et al., *The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne*. *Dermatology*, 1998. **196**(1): p. 21-31.

10 Abbildungsverzeichnis

Bild 1.1: Der kanonische Notch Signalweg (entnommen aus Kopan und Hagan 2009)	28
Bild 1.2: Transaktivierung von EGF-Rezeptoren (entnommen aus Prenzel et al., 1999)	30
Bild 1.3: Schematischer Aufbau der Haut und der Epidermis (entnommen aus Fuchs und Raghavan, 2002)	36
Bild 1.4: Haarzyklus in adulten Mäusen (entnommen aus Blanpain und Fuchs, 2007)	43
Bild 1.5: Die Hämatopoese des Knochenmarks (entnommen aus Passegue et al., 2003)	45
Bild 3.1: Standardisierte Präparation von muriner Rückenhaul	79
Bild 3.2: Präparation und Einbettung von murinen Rückenhaulproben für Kryoschnitte	80
Bild 3.3: Präparation und Einbettung von murinen Rückenhaulproben für Paraffinschnitte	80
Bild 3.4: Verpaarungsschema für dem konditionalem Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis	83
Bild 3.5: Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in Interferon-sensitiven Zellen des Hämatopoetischen Systems	84
Bild 3.6: Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in der murinen Epidermis	84
Bild 3.7: Verpaarungs-Schema für den induzierbar konditionalen Knockout von ADAM10 in Zellen mit aktivem hCMV Promotor	85
Bild 4.1: Genotypisierung-PCR zur Detektion der Keimbahntransmission des mutierten Genlokus des Exon 2 von ADAM10	97
Bild 4.2: Genotypisierung-PCR für die Zucht konditionaler ADAM10 Knockout Mäuse	98
Bild 4.3: Genotypisierung-PCR zur Identifikation epidermaler ADAM10 Knockout Mäuse	99
Bild 4.4: PCR und RT-PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon2 von ADAM10	100
Bild 4.5: Testung des anti-murinen ADAM10 Antikörper (Pineda) an murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	101
Bild 4.6: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM10 aus epidermalem Gewebe	102
Bild 4.7: Gewichtsanalyse von prä-, peri und postnatalen ADAM10^{flox/flox} K14-Cre Mäusen und Kontrollen	105
Bild 4.8: Größenvergleich und allgemeine Morphologie	105
Bild 4.9: Makroskopische Detailaufnahmen der konditionalen ADAM10 Knockout Mäuse und Kontrolltiere.	106
Bild 4.10: Makroskopische Aufnahme von Thymus (A) und Milz (B) mit dem Binokular	107
Bild 4.11: Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes und des Hämatokritgehalts von P0 Mäusen	108
Bild 4.12: Analyse des Gewichtsverlustes von P0-Mäusen bei einer Umgebungstemperatur von 37°C	109
Bild 4.13: Analyse der Integrität der Outside-in Barriere	109

Bild 4.14: Toluidin-Blau Färbung der Rückenhautproben von P0 Mäusen (A) und Quantifizierung der Dicke von Epidermis der Rückenhaut (B)	111
Bild 4.15: Elektronenmikroskopie von Rückenhautproben	112
Bild 4.16: Toluidin-Blau Färbung (A) der Rückenhautproben von P18 alten Mäusen und Quantifizierung der Dicke von Epidermis der Rückenhaut (B)	114
Bild 4.17: PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon2 von ADAM10	115
Bild 4.18: Toluidin-Blau Färbung des Thymus von P18 alten Mäusen	116
Bild 4.19: Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P0 Mäusen	118
Bild 4.20: Proteinexpressionsanalyse von Keratin 10 aus epidermalen Geweben	118
Bild 4.21: Fluoreszenz-basierte Detektion (A) und Quantifizierung (B) apoptotischer Zellen (TUNEL) in der Epidermis von Rückenhautproben von P0-Mäusen	119
Bild 4.22: Fluoreszenz-basierte Detektion (A) und Quantifizierung (B) der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung auf Rückenhautproben von P0 Mäusen.	120
Bild 4.23: Untersuchung der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung auf Rückenhautproben von P18 Mäusen.	121
Bild 4.24: Giemsa Färbung auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P18 alten Mäusen	122
Bild 4.25: Immunhistochemische Färbung von B-Lymphozyten auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P18 alten Mäusen	122
Bild 4.26: Lichtmikroskopische Aufnahme einer primären Keratinozytenzellkultur	123
Bild 4.27: 6-Tägige Analyse der proliferative Kapazität von murinen Keratinozyten	124
Bild 4.28: Koloniebildungs-Experiment mit Keratinozyten P0 alter Mäuse	125
Bild 4.29: Microarray-Analyse zeigt die 50 am stärksten regulierten Gene	126
Bild 4.30: Auswertung des ELISA zur Quantifizierung der Plasmakonzentration von TSLP in epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen	128
Bild 4.31: Proteinexpressionsanalyse von proteolytischen Notch1-Rezeptor Fragmenten (NEXT und NICD) aus epidermalem Gewebe	130
Bild 4.32: Testung der anti-murinen ADAM17 Antikörper (Pineda) an murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	132
Bild 4.33: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM17 aus epidermalem Geweben	132
Bild 4.34: Relative Expressionslevel von direkten Notch1-Rezeptor Zielgenen	133
Bild 4.35: Analyse der epidermalen Lipidverteilung in P0 alten Mäuse durch Nilrot Färbung	134
Bild 4.36: Proteinexpressionsanalyse von murinem E-Cadherin aus epidermalem Geweben	136
Bild 4.37: Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten von Rückenhautproben von P0 Mäusen	137
Bild 4.38: Genotypisierungs-PCR zur Identifikation induzierbarer epidermaler ADAM10 Knockout Mäuse	138
Bild 4.39: PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon2 von ADAM10	139
Bild 4.40: Fotografische Dokumentation des Fellverlustes von ADAM10^{Epi-induz}-Mäusen.	140

Bild 4.41: Hyperkeratose in induzierbaren epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen	141
Bild 4.42: Makroskopische Aufnahme von Thymus (A) und Milz (B) mit dem Binokular	141
Bild 4.43: H&E Färbung (A) Quantifizierung der Dicke von Epidermis der Rückenhaul (B) von Rückenhaulproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen	143
Bild 4.44: Giemsa Färbung auf Paraffinschnitten von Rückenhaulproben von induzierbaren epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen	144
Bild 4.45: Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten von Rückenhaulproben von ADAM10^{Epi-induz} Mäusen	145
Bild 4.46: Untersuchung der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung auf Rückenhaulproben von induzierbaren epidermalen Knockout Mäusen.	146
Bild 4.47: Immunhistochemische Färbung von B-Lymphozyten auf Paraffinschnitten von Rückenhaulproben von induzierbar epidermalen ADAM10 Knockout Mäusen	147
Bild 4.48: PCR zur Detektion der genomischen Deletion des Exon2 von ADAM10 in induzierbaren ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	150
Bild 4.49: RT-PCR Analyse zur Detektion der ADAM10 (A10) mRNA Expression in der Leber und der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	151
Bild 4.50: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM10 in der murinen Milz, Leber und des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	152
Bild 4.51: Analyse der CD23-Oberflächenexpression auf B-Lymphozyten der Milz (A) und des Blutes (B)	153
Bild 4.52: Kultur und Differenzierung von Makrophagenvorläuferzellen des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	154
Bild 4.53: Bestimmung der Gesamtzellzahl des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem automatischen CASY® Zellzählgerät	156
Bild 4.54: Durchflusszytometrie von Zellen des Knochenmarks induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	158
Bild 4.55: Analyse der genomischen (A) und proteomischen (B) ADAM10 Deletion im Knochenmark induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	159
Bild 1.56: Makroskopische Aufnahme von Milz (A) und Lymphknoten (B) induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem Binokular	160
Bild 4.57: Bestimmung der Gesamtzellzahl von Milz (A) und Lymphknoten induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem automatischen CASY® Zellzählgerät	161

Bild 4.58: Durchflusszytometrie von Leukozyten und Erythrozyten der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	162
Bild 4.59: Durchflusszytometrie von Leukozyten in den Lymphknoten der Beine induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	163
Bild 4.60: Immunhistochemische Färbungen von B-Lymphozyten und proliferierenden Zellen (Ki67 positiv) auf Paraffinschnitten der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	164
Bild 4.61: Immunhistochemische Färbungen von B-Lymphozyten und proliferierenden Zellen (Ki67 positiv) auf Paraffinschnitten der Lymphknoten induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	165
Bild 4.62: <i>Periodic Schiff Acid</i> (PAS) Reaktion auf Paraffinschnitten der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	166
Bild 4.63: Analyse der genomischen (A) und proteomischen (B) ADAM10 Deletion in der Milz induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	167
Bild 4.64: Makroskopische Aufnahme der Leber induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem Binokular	169
Bild 4.65: H&E (A,A'), Giemsa Färbung (C, C') und PAS Reaktion (E, E'), sowie immunhistochemischer Nachweis von proliferierender Zellen (Ki67 positiv – B, B') und B-Lymphozyten (D, D') auf Paraffinschnitten der Leber induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	170
Bild 4.66: Proteinexpressionsanalyse von murinem ADAM10 in der Leber induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems.	171
Bild 4.67: Makroskopische Aufnahme von Hautläsionen induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems mit dem Binokular	172
Bild 4.68: H&E Färbung von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	173
Bild 4.69: Giemsa Färbung auf Paraffinschnitten von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	174
Bild 4.70: Immunhistochemische Färbung von B-Lymphozyten auf Paraffinschnitten von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	175
Bild 4.71: Untersuchung der proliferativen Charakteristik von basalen Keratinozyten durch Ki67-Färbung Paraffinschnitten von Hautproben induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	176
Bild 4.72: Blutbild induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	177
Bild 4.73: Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen induzierbarer ADAM10 Knockout Mäuse des hämatopoetischen Systems	178

Bild 4.74: Vergleich der Konzentrationen von 42 verschiedenen Zytokinen im Plasma von induzierbaren ADAM10 Knockout Mäusen des hämatopoetischen Systems und Kontrollen	179
Bild 4.75: G-CSF und TIMP-1 ELISA von Plasmaproben von induzierbaren ADAM10 Knockout Mäusen des hämatopoetischen Systems	179
Bild 4.76: <i>In Vivo</i> Imaging von induzierbar transgenen Luziferase Mäusen unter Kontrolle des hCMV Promotors	182
Bild 5.1: Modell zur Funktionsanalyse von ADAM10 bei der Morphogenese und Homöostase der murinen Epidermis	192
Bild 5.2: Beeinflussung der Hämatopoese durch eine gestörte stromale Mikroumgebung im Knochenmark Notch Signaling defizienter Mäuse (entnommen aus Kim et al, 2008)	206

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Antikörper und Antikörperkonjugate	53
Tabelle 3.2: Verteilung der Genotypen der epidermalen Knockout-Mäuse und Kontrollen an P0 und P21.	104
Tabelle 4.3: Zusammenfassung der mindestens 2-fach regulierte Gene, dessen Überexpression mit Hyperproliferation, Hyperkeratinisierung und Wundheilung in Zusammenhang stehen.	127
Tabelle 4.4: Zusammenfassung regulierter Gene, die eine wichtige Rolle im Lipid- (A) und Retinolmetabolismus (B) einnehmen.	128
Tabelle 5.1: Differentialdiagnostik chronisch myeloproliferativer Krankheiten im Vergleich zu ADAM10^{Mxl-leaky} Mäusen	217