

**Analyse der Funktionen der
A Disintegrin und Metalloprotease 10 (ADAM10)
in Leber und Niere und
der Regulation der Proteaseaktivität**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sebastian Wetzel

Kiel, 2016

Erste/r Gutachter/in:	Prof. Dr. Paul Saftig
Zweite/r Gutachter/in:	Prof. Dr. Eric Beitz
Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2016
zum Druck genehmigt:	30.06.2016

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Proteasen.....	1
1.1.1. A Disintegrin und Metalloproteasen (ADAMs).....	2
1.1.2. Katalytische Funktion der ADAM-Proteasen	4
1.1.3. ADAM10.....	5
1.1.4. ADAM10-Knockout Mausmodelle.....	8
1.2. Die Niere	11
1.2.1. Die Bowman'sche Kapsel und der Podozyt.....	11
1.2.2. Podozytäre Erkrankungen	12
1.2.3. Das Podozyten-Nephritis-Modell	13
1.2.4. Interaktion der Podozyten mit der glomerulären Basalmembran	14
1.2.5. Podozytäre Zell-Zell-Kontakte	15
1.2.6. Beitrag des podozytären Zytoskelettes zur Podozytenschädigung.....	17
1.3. Die Leber.....	18
1.3.1. Feinbau der Leber	18
1.3.2. Entwicklung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge.....	19
1.3.3. Die Zellen der Leber	21
1.3.4. Cholestase und Fibrose.....	24
1.4. Regulation von ADAM10.....	26
1.4.1. Die Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase FKBP38	26
1.4.2. Die Kinase MAP3K7	29
1.5. Zielsetzung.....	33
2. Material und Methoden.....	35
2.1. Materialien.....	35
2.1.1. Chemikalien	35

2.1.2.	Standardpuffer	37
2.1.3.	Zellkultur-Medien, Zusätze, Wirkstoffe und Transfektionsreagenzien.....	39
2.1.4.	Zelllinien.....	40
2.1.5.	Vektoren.....	41
2.1.6.	Expressionsplasmide	41
2.1.7.	Mauslinien.....	41
2.1.8.	Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen und Puffer	42
2.1.9.	Größenstandards.....	42
2.1.10.	Primer für Genotypisierungen und Deletions-PCR.....	42
2.1.11.	Klonierungsprimer.....	43
2.1.12.	Primer für die quantitative RT-PCR	44
2.1.13.	Antikörper und Farbstoffe	46
2.1.14.	Kits	47
2.1.15.	Restliche Materialien	48
2.1.16.	Geräte	48
2.2.	Methoden	50
2.2.1.	Tierzucht und -experimente	50
2.2.1.1.	Maushaltung und Genotypisierung	50
2.2.1.2.	Induktion des Nephritis Modells.....	52
2.2.1.3.	Präparation der Tiere und Probenisolation.....	53
2.2.1.4.	Bestimmung der Urinparameter.....	54
2.2.1.5.	Isolation des Blutserums und Bestimmung von Serumparametern	54
2.2.1.6.	Gallengangsplastination	54
2.2.2.	Generierung von Expressionsplasmiden.....	55
2.2.2.1.	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	55
2.2.2.2.	Klonierung von Expressionsplasmiden.....	55
2.2.2.3.	Generierung der FKBP38-Mutante FKBP38(Δ PPI)-myc.....	57
2.2.2.4.	Generierung induzierbarer Konstrukte von FKBP38 und der FKBP38-Mutante.....	58

2.2.2.5.	DNA-Vervielfältigung, Aufreinigung und Sequenzierung.....	58
2.2.3.	Zellkulturexperimente	59
2.2.3.1.	Kultivierung von Säugerzellen	59
2.2.3.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	60
2.2.3.3.	Zellernte	60
2.2.3.4.	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	60
2.2.3.5.	Stabile Transfektion in T-REx Zellen und Expressionsinduktion.....	61
2.2.3.6.	siRNA-vermittelter knockdown von Proteinen	61
2.2.3.7.	Stimulation von BMOL-Zellen.....	62
2.2.3.8.	Anti-Podozyten Nephritis (APN)-Modell in der Podozyten-ähnlichen Zelllinie EPZ.....	62
2.2.3.9.	Adhäsionsassay in der Podozyten-ähnlichen Zelllinie EPZ.....	62
2.2.4.	Interaktions-Screens.....	63
2.2.4.1.	<i>Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System</i>	63
2.2.4.2.	HEK-Screen.....	63
2.2.5.	Probenaufarbeitung und -analyse.....	64
2.2.5.1.	Nachweis der Deletion des ADAM10 Exon 2 auf DNA-Ebene.....	64
2.2.5.2.	Paraffineinbettung von Gewebeproben	65
2.2.5.3.	Immunhistochemie von Gewebsschnitten	65
2.2.5.4.	Anfertigen von Gefrierschnitten	66
2.2.5.5.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	66
2.2.5.6.	Aufarbeitung von Proben für die Immunfluoreszenz	66
2.2.5.7.	Proben-Aufarbeitung für die quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qRT-PCR) ...	67
2.2.5.8.	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qRT-PCR)	68
2.2.5.9.	Aufarbeitung von Proben zur SDS-Gelelektrophorese.....	69
2.2.5.10.	Koimmunpräzipitation	70
2.2.5.11.	Zelloberflächenbiotinylierung.....	71
2.2.5.12.	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	71
2.2.5.13.	Statistische Auswertung	72

3. Ergebnisse.....	73
3.1. Charakterisierung eines ADAM10-Knockouts in Podozyten.....	74
3.1.1. Verifizierung des ADAM10-Knockouts in Podozyten.....	75
3.1.2. Pathologische Untersuchung des ADAM10-Knockout im Glomerulus....	78
3.1.3. Pathologische Untersuchung des ADAM10-Knockouts im Glomerulus nach Induktion einer Nephritis	82
3.1.4. Untersuchungen an einer Podozyten-ähnlichen Zelllinie	87
3.2. Charakterisierung eines Leber-spezifischen ADAM10-Knockouts	98
3.2.1. Verifizierung eines ADAM10-Knockouts in hepatischen Vorläuferzellen einer Alfp-Cre-Linie	98
3.2.2. Charakterisierung der Pathologie des ADAM10-Knockout.....	102
3.2.3. Charakterisierung der Ursache der Nekrosen	107
3.2.4. Charakterisierung des Regenerationsprozesse nach initialer Pathologie	115
3.3. Charakterisierung potentieller Interaktionspartner von ADAM10.....	121
3.3.1. Identifizierung potentieller Interaktionspartner von ADAM10	121
3.3.2. Charakterisierung des potentiellen ADAM10-Interaktionspartners FKBP38	128
3.3.2.1. Untersuchung auf Interaktion und Lokalisation der Interaktion zwischen ADAM10 und FKBP38	128
3.3.2.2. Untersuchung des Effektes einer Interaktion mit FKBP38 auf ADAM10	134
3.3.2.3. Untersuchung einer induzierbaren FKBP38-Überexpressions-Linie	138
3.3.2.4. Untersuchung einer haploiden FKBP38-Knockoutzelllinie	140
3.3.3. Charakterisierung des potentiellen ADAM10-Interaktionspartners MAP3K7	143
3.3.3.1. Untersuchung auf Interaktion und Lokalisation der Interaktion zwischen ADAM10 und MAP3K7	143
3.3.3.2. Untersuchung des Effektes der MAP3K7-Defizienz auf ADAM10	148
3.3.3.3. Untersuchung des Effektes einer MAP3K7-Inhibitor auf ADAM10	152

3.3.3.4.	Untersuchung des Effektes der MAP3K7-Überexpression auf ADAM10	153
.....		
4.	Diskussion	157
4.1.	Untersuchungen zur Rolle von ADAM10 in der Niere.....	157
4.1.1.	Die Funktionsfähigkeit der Podozyten ist von einer ADAM10-Defizienz unbeeinträchtigt	157
4.1.2.	Eine ADAM10-Defizienz wirkt protektiv auf das nephrotische Syndrom	158
4.1.3.	Der APN-Antikörper vermittelt eine Schädigung von EPZ im zellbasierten Modell	161
4.1.4.	Die Morphologieveränderung der EPZ ist unabhängig vom Notch-Signalweg	161
4.1.5.	ADAM10 vermittelt die Podozytenschädigung über die Proteolyse von Adhäsionsmolekülen.....	162
4.1.6.	Der Wnt-Signalweg als möglicher zusätzlicher Mediator der Podozytenschädigung	163
4.1.7.	ADAM10 als therapeutisches Ziel zur Prävention einer Nephritis.....	165
4.2.	Die Bedeutung von ADAM10 in der Leber.....	167
4.2.1.	Leber-spezifische ADAM10-Deletion unter Kontrolle des Alfp-Promotors ..	167
.....		
4.2.2.	Die ADAM10-Defizienz in der Leber führt zu einer Nekrose von Hepatozyten.....	168
4.2.3.	Die Entstehung der Gallengangsstrukturen ist ADAM10-unabhängig ..	168
4.2.4.	Eine Deregulation der Expression von Gallensäuretransportern unter ADAM10-Defizienz bedingt die Nekrose der Hepatozyten.....	170
4.2.5.	Die Regenerationsantwort auf eine Leberschädigung ist von ADAM10 unabhängig	172
4.2.6.	Die Proliferation von Lebervorläuferzellen ist unter ADAM10-Defizienz verstärkt	174
4.2.7.	Therapeutische Möglichkeiten der Modulation der ADAM10-Aktivität in der Leber.....	177
4.3.	Potentielle neue Regulatoren von ADAM10	179

4.3.1.	Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase FKBP38 interagiert mit ADAM10..	179
4.3.2.	Indizien für einen positiven Effekt von FKBP38 auf den Transport von ADAM10 zur Zellmembran	180
4.3.3.	FKBP38 beeinflusst die ADAM10-Aktivität unter Normalbedingungen nicht	182
4.3.4.	Indizien für eine Interaktion der Kinase MAP3K7 mit ADAM10.....	183
4.3.5.	Hinweise auf eine transkriptionelle Regulation von ADAM10 durch MAP3K7.....	184
4.3.6.	Verstärkung der ADAM10-vermittelten APP-Proteolyse unter MAP3K7-Knockdown	185
4.3.7.	Möglichkeiten einer direkten ADAM10-MAP3K7-Interaktion.....	187
4.3.8.	Die ADAM10-Expression und -Aktivität ist von einer MAP3K7-Überexpression unbeeinflusst	188
4.3.9.	Praktische Anwendungsmöglichkeiten der identifizierten Interaktionspartner.....	189
5.	Zusammenfassung.....	191
6.	Summary.....	193
7.	Literaturverzeichnis.....	195
8.	Abbildungsverzeichnis.....	225
9.	Tabellenverzeichnis.....	229
10.	Lebenslauf.....	231
11.	Veröffentlichungen.....	233
12.	Eidesstattliche Erklärung.....	235
13.	Danksagung.....	237

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
ADAM10	A Disintegrin und Metalloprotease 10
ALP	Alkalischen Phosphatase
ALT	Alanin Aminotransferase
APN	anti-Podozyten Nephritis
APP	Amyloides Vorläuferprotein
α SMA	<i>α smooth muscle actin</i>
BMOL	<i>bipotential murine oval liver</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
CDE	Cholin-defiziente, Ethionin-supplementierte (Diät)
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CK19	Cytokeratin19
iCLiP	<i>intramembrane-cleaving proteases</i>
Con47	Connexin-47
CoxIV	Cytochrom C Oxidase Untereinheit IV
Cre	<i>cyclization recombinase</i>
CTF	C-terminales Fragment
CTD	C-terminale Domäne
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidin
ECM	extrazelluläre Matrix
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FKBP	FK506-bindendes Protein
Fn14	fibroblast growth factor-inducible 14
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GBM	glomeruläre Basalmembran
HERG	human ether-a-go-go-related gene

HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HRP	<i>horseradish</i> Peroxidase
HSC	<i>hepatic stellate cell</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN γ	Interferon γ
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin (IL-1 z. B. Interleukin 1)
IL1RA	Interleukin 1 Rezeptor Antagonist
ILK	<i>Integrin-linked</i> Kinase
IP	Immunpräzipitation
LPC	Lebervorläuferzellen
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mdr3	<i>multidrug resistance protein 3</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease (MMP2 z. B. Matrix-Metalloprotease 2)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Mrp2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
NTCP	Natrium-abhängiges Natrium/Taurocholat kotransportierendes Peptid
OATP	organischer Anionen Transporter
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
PDI	Proteindisulfidisomerase
POD	Peroxidase
PPase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RIP	regulierte Intramembranproteolyse
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
SH3	<i>Src-homology 3</i>
α SMA	α <i>smooth muscle actin</i>
Syng3	Synaptogyrin 3
Sys1	SYS1 Golgi-lokalisierte integrale Membranprotein Homolog
TAB	TAK1 bindendes Protein
TfR	Transferrinrezeptor

Timp	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPR-Motiv	<i>tetratricopeptide repeat</i> Motiv
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
UPL	Universal Probe Library
ZO-1	Zona occludens Protein 1

1. Einleitung

Die Proteolyse ist ein wichtiger Bestandteil grundlegender alltäglicher Stoffwechselabläufe. Als irreversible posttranslationale Modifikation von Proteinen vermittelt die Proteolyse die Maturierung von Proteinen aus deren inaktiven Vorläufern (Zymogene), z. B. durch das Abspalten inhibitorischer Bereiche [Morris, 1978; Roghani *et al.*, 1999]. Die Proteolyse ist jedoch auch für extrazelluläre Funktionen essentiell, wie den Aufschluss von Proteinen der Nahrung während der Verdauung [Hildebrandt *et al.*, 2015].

1.1. Proteasen

Proteasen vermitteln die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Sie übernehmen vielfältige intra- und extrazelluläre Aufgaben. Extrazellulär sekretierte Proteasen sind an der Verdauung von Nahrungseiweißen, an der Blutgerinnungskaskade und der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt [Hildebrandt *et al.*, 2015; Goldsack *et al.*, 1998; Reid und Porter, 1981]. Intrazelluläre Proteasen übernehmen Funktionen wie die Abspaltung von Signalpeptiden während der Proteinbiosynthese in das ER, die Bereitstellung von Antigenen durch Abbau zellfremder Bestandteile und den Abbau fehlgefalteter Proteine nach Ubiquitylierung [Ichihara *et al.*, 1984; Thorne *et al.*, 1976; Lecker *et al.*, 2006]. Hinzu kommt die Aktivierung von Proteinen durch deren Freisetzung an der Zelloberfläche oder durch Spaltung eines Zymogens [Mezyk-Kopec *et al.*, 2009; Endres *et al.*, 2003].

Trotz dieser vielseitigen Möglichkeiten kann aufgrund der Topologie des aktiven Zentrums der Protease eine gewisse Substratspezifität gewährleistet werden. Hierbei wird die Proteolyse des Substrates zwischen den Aminosäuren P1 und P1' angenommen [Schechter und Berger, 1967]. Die Spezifität der Protease wird dabei zusätzlich durch die noch weiter N- (P2 und P3) und C-terminal liegenden Aminosäuren (P2' und P3') des Substrates bestimmt. Trotz dieser Peptiderkennungsmotive können Proteasen hinsichtlich ihrer Substrate teilweise redundant wirken. Eine Klassifizierung über die Substrate ist daher schwer möglich.

Stattdessen erfolgt die Einordnung der Proteasen in vier Klassen anhand der Struktur des aktiven Zentrums: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartylproteasen und Metalloproteasen [Rawlings und Barrett, 1993].

1.1.1. A Disintegrin und Metalloproteasen (ADAMs)

A Disintegrin und Metalloproteasen (ADAMs) werden zur Klasse der Metalloproteasen zugeordnet. Zusammen mit der *class PIII snake venom reprolysin*- und der ADAMTS-Familie (A Disintegrin und Metalloprotease mit Thrombospondin Motiv) werden sie laut der Peptidasedatenbank MEROPS als Mitglied der M12B Adamalysine katalogisiert.

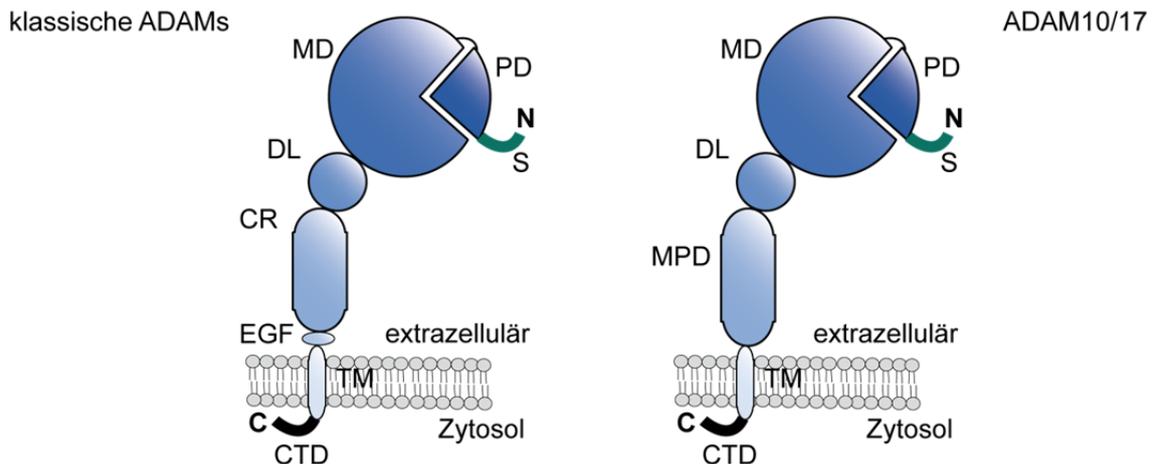


Abb. 1.1.1. Domänenstruktur der ADAM-Proteasen.

Im Gegenteil zu den klassischen ADAMs besitzen ADAM10 und 17 eine Membran-proximale Domäne anstelle der Disintegrin-ähnlichen und EGF-ähnlichen Domäne. **N** = N-Terminus, **C** = C-Terminus, **S** = Signalsequenz, **PD** = Prodomäne, **MD** = Metalloprotease-Domäne, **DL** = Disintegrin-ähnliche Domäne, **CR** = Cystein-reiche Domäne, **EGF** = EGF-ähnliche Domäne, **MPD** = Membran-proximale Domäne, **TM** = Transmembrandomäne, **CTD** = C-terminale Domäne.

Die Funktionalität dieser Typ I-Transmembran-Proteinfamilie wird durch verschiedene Domänen gewährleistet, die im nachfolgenden beginnend beim N-Terminus vorgestellt werden (Abb. 1.1.1.). Am äußersten N-Terminus liegt die Signalsequenz vor, welche als Erkennungssignal für die Passage durch den sekretorischen Transportweg dient. Die darauf folgende Prodomäne dient als Faltungshelfer für die Protease und gewährleistet einen Schutz vor proteolytischem Abbau [Anders *et al.*, 2001; Milla *et al.*, 2006]. Weiterhin dient sie als intramolekularer Inhibitor, um das ADAM-Protein während des Transportes zur Zelloberfläche inaktiv

zu halten. Die Inhibition erfolgt über einen sogenannten *Cystein-switch* Mechanismus, wobei ein einzelnes Cystein der Prodomäne und das Zn^{2+} des aktiven Zentrums einen Komplex bilden, der das katalytische Zentrum blockiert [Loechel *et al.*, 1999; Roghani *et al.*, 1999]. Vor Verlassen des Golgi-Apparates wird die Prodomäne über Proproteinkonvertasen wie Furin und die Proproteinkonvertase 7 abgespalten, bevor das somit aktivierte Protein die Zelloberfläche erreicht [Lum *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 2003]. Über die Mutation der Schnittstelle der Proproteinkonvertase kann die ADAM-Aktivierung unterbunden werden [Anders *et al.*, 2001]. Interessanterweise ist auch eine lösliche, rekombinant hergestellte Prodomäne als spezifischer Inhibitor für die entsprechenden ADAM-Proteasen aktiv [Gonzales *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2008].

Die folgende Metalloproteasedomäne besteht aus einem aktiven Zentrum nach dem Reprolysin-Typ (HEXGHXXGXXHD), gefolgt von einem Methionin-Turn [Bode *et al.*, 1993]. Über die Histidin Reste wird das für die Substratproteolyse essentielle Zn^{2+} stabilisiert. ADAM-Proteasen die kein entsprechendes Zink-Bindemotiv aufweisen sind katalytisch inaktiv. Dies betrifft neun der 22 bekannten humanen ADAMs. Die katalytisch aktiven ADAMs können durch die Mutation des Glutamats im aktiven Zentrum zu Alanin (E/A-Mutante) inaktiviert werden [Howard *et al.*, 2000; Garton *et al.*, 2001; Gough *et al.*, 2004].

Hinsichtlich der Funktion als Adhäsionsmolekül wird ein C-terminal der Metalloproteasedomäne liegender Bereich diskutiert, die Disintegrin-ähnliche Domäne. Obwohl eine Interaktion der isolierten Disintegrin-ähnlichen Domäne mit verschiedenen Integrinen nachgewiesen wurde, stellen Strukturanalysen die Zugänglichkeit dieser Domäne im Molekül in Frage [Tomczuk *et al.*, 2003; Bridges *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006].

Bei den meisten ADAMs folgt eine Cystein-reiche Domäne mit einer hypervariablen Region. Sie liegt dem aktiven Zentrum direkt gegenüber und unterstützt die Bindung des Substrates, wie anhand von ADAM13 und Fibronectin gezeigt werden konnte [Gaultier *et al.*, 2002]. An sie schließt sich die EGF-ähnliche Domäne an. Eine Ausnahme bilden ADAM10 und ADAM17, bei denen keine Sequenzhomologien zu diesen beiden Domänen gefunden wurden [Janes *et al.*, 2005; Takeda, 2009]. Stattdessen wird der entsprechende Molekülbereich als Membran-proximale Domäne (MPD) bezeichnet (Abb. 1.1.1.) [Dusterhoft *et al.*, 2013]. Analog zur

Cystein-reichen Domäne trägt die MPD zur Substraterkennung bei [Lorenzen *et al.*, 2012].

Die auf die Transmembrandomäne folgende C-terminale Domäne (CTD) weist zwischen den Vertretern der Klasse große Unterschiede auf. Hier finden sich verschiedene Motive wieder, wie z. B. Prolin-reiche Regionen zur Interaktion mit *Src-homology 3* (SH3)-Domänen enthaltenden Proteinen, und Phosphorylierungsmotive. Der C-Terminus wird als Regulator der Aktivität und des Transportes der Protease diskutiert [Cao *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004; Saraceno *et al.*, 2014]. Hinsichtlich der Aktivitätsregulation über den C-Terminus wurde die sogenannte *triple membrane-spanning signal* (TMSS)-Hypothese aufgestellt, die z. B. anhand von ADAM17 diskutiert wird [Zhang *et al.*, 2006]. ADAMs können demzufolge über die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors intrazellulär modifiziert und darüber aktiviert werden. Auf diese Weise induzieren sie die extrazelluläre Proteolyse eines Substrates, welches über seinen Rezeptor erneut einen intrazellulären Signalweg aktiviert. Neuere Studien widersprechen dieser Theorie und legen nahe, dass die Aktivierung der ADAMs von der Transmembrandomäne vermittelt wird und somit unabhängig von der CTD ist [Le Gall *et al.*, 2010; Maretzky *et al.*, 2015].

1.1.2. Katalytische Funktion der ADAM-Proteasen

Die katalytisch funktionalen ADAMs vermitteln eine Proteolyse, die auch als *ectodomain shedding* bezeichnet wird. Hierbei werden Transmembranproteine mit einem großen extrazellulären Anteil in Membrannähe proteolysiert, wodurch der extrazelluläre Bereich freigesetzt wird. Durch das *shedding* können Liganden an der Oberfläche freigesetzt werden, die eine auto- oder parakrine Aktivierung über Rezeptoren erlauben, wie es z. B. für den Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder zahlreiche epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) bekannt ist [Black *et al.*, 1997; Sahin *et al.*, 2004]. Auf der anderen Seite kann über die Abspaltung von Liganden an der Zelloberfläche deren Verfügbarkeit reguliert und darüber Signalwege terminiert werden. Auch die Rezeptoren verschiedener Liganden sind Substrat des *ectodomain shedding*, wie z.B. anhand von cMet gezeigt werden konnte [Kopitz *et al.*, 2007; Schelter *et al.*, 2010]. Dabei werden die Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt,

wodurch eine weitere Signalübertragung in das Zellinnere verhindert wird. Die auf diese Weise solubilisierten Rezeptoren können außerdem Liganden abfangen und die Signalweiterleitung reduzieren.

1.1.3. ADAM10

ADAM10 ist ein Mitglied der ADAM-Familie, welches als Proform von ca. 100 kDa in das ER synthetisiert wird. Während des Transportes zur Zelloberfläche wird die ADAM10-Prodomäne im Golgi-Apparat z.B. durch die Proproteinkonvertase Furin entfernt, so dass das mature ADAM10 (etwa 70 kDa) die Zelloberfläche erreicht und dort seine Aktivität vermittelt (Abb. 1.1.2.) [Anders *et al.*, 2001]. Inzwischen wird noch eine zusätzliche Proproteinkonvertase-Schnittstelle zwischen Pro- und Metalloproteasedomäne diskutiert, die ebenfalls zur Aktivierung von ADAM10 beiträgt [Wong *et al.*, 2015]. Interessanterweise ist auch der C-Terminus von ADAM10 für die Metalloprotease-Aktivität bedeutsam. Dieser weist Prolin-haltige Bindestellen für SH3-Domänen enthaltende Proteine auf, über die die Lokalisation der Protease an der Membran beeinflusst werden kann [Wild-Bode *et al.*, 2006]. Im neuronalen System wurde bereits gezeigt, dass das Synapsen-assoziierte Protein 97 (SAP-97) mit der SH3-Bindestelle des ADAM10 C-Terminus interagiert und so dessen Transport zur post-synaptischen Membran vermittelt [Marcello *et al.*, 2007]. Neben der Regulation des Transportes wird die C-terminale Domäne als Modulator der Genexpression diskutiert, da infolge der Proteolyse durch ADAM9 oder ADAM15 ein entsprechendes C-terminales Fragment im Zellkern nachgewiesen werden konnte [Tousseyn *et al.*, 2009].

ADAM10 ist, neben ADAM17, der wichtigste Vertreter der ADAM-Familie. Beide sind im Körper ubiquitär exprimiert und verfügen über ein umfangreiches, teilweise überlappendes Substratspektrum. ADAM10 wird dabei vor allem im Zusammenhang mit der Proteolyse von Adhäsionsmolekülen als konstitutiv aktive Sheddase diskutiert [Hundhausen *et al.*, 2003; Anderegg *et al.*, 2009]. Dennoch werden nicht alle Substrate der einen Protease auch von der anderen proteolysiert. Über Glykosylierungsmuster am Substrat kann dessen Eignung zur Proteolyse durch ADAM10 oder ADAM17 beeinflusst werden, da nicht-glykosylierte Substrate von ADAM10 bevorzugt werden, glykosylierte hingegen von ADAM17 [Minond *et al.*,

2012]. Zudem ist auch eine zum Teil spezifische Inhibition der Vertreter möglich. Auf zellulärer Ebene dienen vor allem die *tissue inhibitor of metalloproteinases* (Timp)s der Hemmung der ADAM-Aktivität durch Bildung eines nicht-kovalenten Komplexes mit der Protease. Während Timp3 alle aktiven ADAMs inhibieren kann, ist Timp1 deutlich spezifischer für ADAM10 [Amour *et al.*, 2000]. Speziell für zellbasierte Experimente liegen inzwischen auch synthetische Inhibitoren (Hydroxamate) vor. GW280264X inhibiert ADAM10 und ADAM17, GI254023X ist dagegen deutlich spezifischer für ADAM10 [Hundhausen *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2005]. Zudem

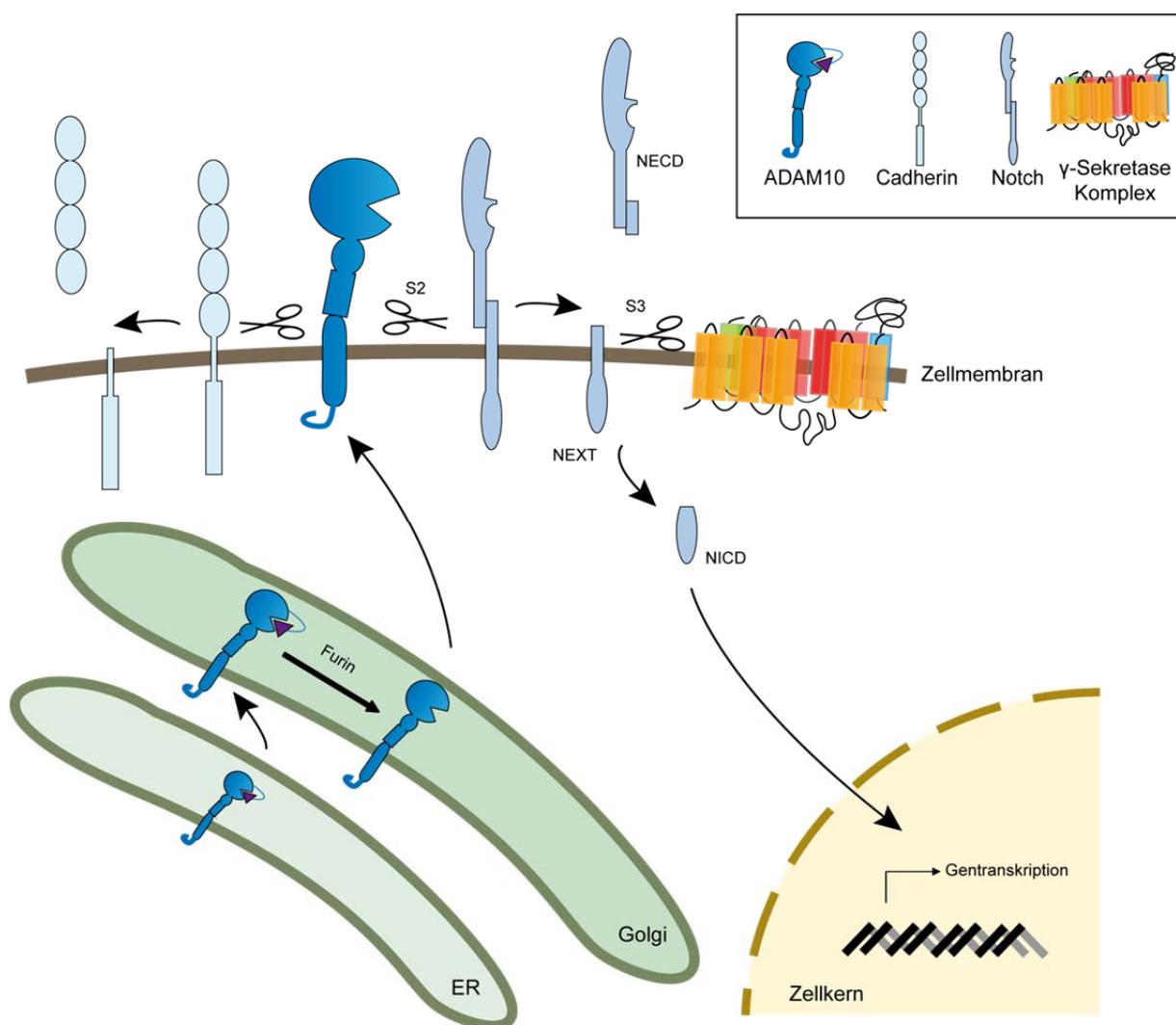


Abb. 1.1.2. Reifung und Aktivität von ADAM10.

ADAM10 wird als inaktive Proform ins ER synthetisiert. Während des Transportes zur Zelloberfläche führt die Furin-medierte proteolytische Abspaltung der Prodomäne zur Aktivierung von ADAM10. An der Zelloberfläche vermittelt ADAM10 das *shedding* von z. B. Adhäsionsmolekülen. Zudem kann das *shedding* eine regulierte Intramembranproteolyse (RIPping) durch den γ-Sekretase-Komplex initiieren (S3-Schnitt für das Substrat Notch). Im Falle der Proteolyse des Notch-Rezeptors resultiert eine intrazelluläre Domäne (NICD), die die Genexpression im Zellkern beeinflusst. NECD = Notch extrazelluläre Domäne, NEXT = *Notch extracellular truncated*, NICD = Notch intrazelluläre Domäne.

steht mit dem Kalzium-Ionophor Ionomycin ein Aktivator der ADAM10-Aktivität zur Verfügung [Hundhausen *et al.*, 2007].

Vor allem für Substrate von ADAM10 wurde das *shedding* als Initiationschritt für eine weitere Proteolyse beschrieben, die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) (Abb. 1.1.2.). Daher gilt ADAM10 bis heute als klassische Initiatorprotease für das „RIPping“. Bekannte Substrate hierfür sind CD44, N-Cadherin, E-Cadherin und Notch [Nagano *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2003; Reiss *et al.*, 2005; Marambaud *et al.*, 2003; Maretzky *et al.*, 2005; Marambaud *et al.*, 2002; van Tetering *et al.*, 2009; De Strooper *et al.*, 1999]. Nach der initialen Proteolyse durch ADAM10 wird der trunkierte membranständige Proteinteil im Zuge des RIPpings durch den γ -Sekretase-Komplex weiter proteolysiert, welcher mit den Presenilinen 1 bzw. 2 Mitglieder der *intramembrane-cleaving proteases* (iCLiP)-Familie enthält [Spasic und Annaert, 2008].

Speziell der Notch-Signalweg ist aufgrund seiner Bedeutung für die Entwicklung als Substrat des ADAM10-initiierten RIPpings interessant. Während seiner Reifung wird der Notch-Rezeptor über eine Furin-abhängige Proteolyse (S1-Schnitt) aktiviert und gelangt als Heterodimer an die Zelloberfläche [Blaumueller *et al.*, 1997]. Nach Bindung eines Liganden aus der Delta- oder Jagged-Familie an den Notch-Rezeptor vermittelt ADAM10 den S2-Schnitt und generiert das Substrat für den S3-Schnitt durch den γ -Sekretase-Komplex (Abb. 1.1.2.) [van Tetering *et al.*, 2009; De Strooper *et al.*, 1999]. Dieser setzt die Notch intrazelluläre Domäne (NICD) frei, die in den Kern importiert wird und dort an den Transkriptionsfaktor CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1; RbpjK) bindet [Schroeter *et al.*, 1998]. Der auf diese Weise gebildete Transkriptionskomplex initiiert die Expression sogenannter Notch-responsiver Gene, wie z. B. die *hairy and enhancer of split* Gene (Hes), welchen eine wichtige Bedeutung bei der Determination des Zellschicksals zukommt [Lecourtois und Schweisguth, 1995; Bailey und Posakony, 1995; Jarriault *et al.*, 1998; Ohtsuka *et al.*, 1999].

Neben dem Einfluss auf die Zelldifferenzierung beeinflusst ADAM10 jedoch auch Prozesse wie die Zellproliferation, beispielsweise über die Proteolyse seiner Substrate Betacellulin, dem epithelialen Wachstumsfaktor EGF und dem Rezeptor cMet [Sahin *et al.*, 2004; Scheltemer *et al.*, 2010].

Eine zu geringe ADAM10-Aktivität kann in verschiedenen Erkrankungen von Nachteil sein, wie anhand der Alzheimer'schen Erkrankung sichtbar wird. Hier stellt ADAM10 die α -Sekretase des amyloiden Vorläuferproteins APP dar, welche wahrscheinlich mit der in Endosomen lokalisierten β -Sekretase Bace1 um das Substrat konkurriert [Marcinkiewicz und Seidah, 2000; Postina *et al.*, 2004]. Nach dem jeweiligen Primärschnitt wird der γ -Sekretase-Komplex aktiv. Während infolge des Bace1-Schnittes $A\beta_{40-42}$ entsteht und zu Plaques aggregiert, schneidet ADAM10 genau in der Sequenz dieses Peptides [Esch *et al.*, 1990]. Damit unterdrückt ADAM10 zum einen die Generierung des $A\beta_{40-42}$ -Fragmentes, zum anderen werden zusätzlich das neurotroph und neuroprotektiv wirkende lösliche sAPP α und das möglicherweise neuroprotektiv wirkende p3-Fragment freigesetzt [Furukawa *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2011].

1.1.4. ADAM10-Knockout Mausmodelle

Untersuchungen von Protein-Mutanten oder -defizienzen im Tiermodell ermöglichen die Identifikation des Expressionsmusters, sowie der Bedeutung des Proteins für den Organismus. Daher sind mausbasierte *loss-of-function* Modelle auch zur Analyse der Metalloprotease ADAM10 wertvoll. Die Literatur enthält zahlreiche Beispiele für die Verifizierung von ADAM10-Substraten im Mausmodell, sowie die Analyse der Folgen einer ADAM10-Defizienz in verschiedenen Organen (Tab. 1.1.1.).

Tab. 1.1.1. ADAM10-Knockout Mausmodelle.

ADAM10-Knockout	Beschreibung
Keimbahndeletion [Hartmann <i>et al.</i> , 2002]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pränatale Letalität (Embryonaltag E9,5) ▪ Notch-Knockout Phänotyp [Huppert <i>et al.</i>, 2000; Krebs <i>et al.</i>, 2000] ▪ Fehlbildungen des zentralen Nervensystems, des kardiovaskulären Systems und der Somiten

Tab. 1.1.1. ADAM10-Knockout Mausmodelle.

ADAM10-Knockout	Beschreibung
konditionaler KO unter Nestin-Promotor [Jorissen <i>et al.</i> , 2010]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ perinatale Letalität ▪ verfrühte Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Störung des Notch-Signalweges) ▪ Reduktion des Ganglienhügels, Risse im Neocortex und Störung der Gesamtarchitektur des Gehirns ▪ ADAM10-abhängige Proteolyse von APP
konditionaler KO unter CamKII-Promotor [Prox <i>et al.</i> , 2013] [Altmeppen <i>et al.</i> , 2015] [Kuhn <i>et al.</i> , 2016]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ frühe postnatale Letalität (innerhalb von drei Wochen) ▪ Veränderung der <i>spine</i>-Morphologie (reduziertes <i>shedding</i> von N-Cadherin, APP, Nectin-1) ▪ Störungen im Hippocampusnetzwerk, Synapsendefekte ▪ schlechtere Lern- und neuromotorische Fähigkeit ▪ Identifikation weiterer Substrate (Prion Protein, ...)
konditionaler KO unter Keratin14-Promotor [Weber <i>et al.</i> , 2011]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ perinatale Letalität ▪ vorzeitige Differenzierung epidermaler Vorläuferzellen, anhaltende Hyperproliferation adulter Epidermiszellen (Störung des Notch-Signalweges) ▪ Zystenbildung, Haarverlust, epidermale Hyperproliferation ▪ Störung der Integrität der Hautbarriere, Wasserverlust ▪ Multi-Organ-Erkrankung
induzierbarer, konditionaler KO unter Mx1-Promotor [Yoda <i>et al.</i> , 2011] [Weber <i>et al.</i> , 2013]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ myeloproliferative Erkrankung (letal nach 20 Wochen) ▪ erhöhte Serumwerte des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors G-CSF ▪ Granulopoese und Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen (Verschiebung der Zellpopulationen)
konditionaler KO unter CK19-Promotor [Gibb <i>et al.</i> , 2010]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Entwicklungsdefekt der B-Zellen der gesamten marginalen Zone (Störung des Notch2-Signalweges) ▪ ADAM10-abhängige Proteolyse von CD23
konditionaler KO unter Lck-Promotor [Tian <i>et al.</i> , 2008]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Defekt der T-Zell-Entwicklung (Störung des Notch-Signalweges)

Tab. 1.1.1. ADAM10-Knockout Mausmodelle.

ADAM10-Knockout	Beschreibung
konditionaler KO unter Tie2-Promotor [Zhang et al., 2010] [Glomski et al., 2011] [Zhao et al., 2014]	<ul style="list-style-type: none">▪ pränatale Letalität (Embryonaltag E10,5) bzw. gesteigerte Letalität ab Alter von 10 Wochen▪ Fehlbildungen des kardiovaskulären Systems, Knochenfehlbildung durch Störung der Osteoklastogenese (Störung des Notch-Signalweges)
konditionaler KO unter Villin-Promotor [Tsai et al., 2014]	<ul style="list-style-type: none">▪ perinatale Letalität▪ verringerte Proliferation intestinaler Vorläuferzellen, Zunahme sekretorischer Zellen (Paneth-Zellen, enteroendokrine Zellen) (Störung des Notch-Signalweges)▪ Veränderung der intestinalen Morphologie
konditionaler KO unter Hoxb7-Promotor [Guo et al., 2015]	<ul style="list-style-type: none">▪ verringerte Differenzierung zu Aquaporin-haltigen Zellen am Sammelrohr (Störung des Notch-Signalweges)▪ Hydronephrose
Induzierbarer, konditionaler KO unter Pax7-Promotor [Mizuno et al., 2015]	<ul style="list-style-type: none">▪ Verlust muskulärer Satellitenzellen (Myoblasten) durch Differenzierungsstörung (Störung des Notch-Signalweges)▪ Verlust der Muskelregeneration nach Verletzung

Anhand der vorgestellten Modelle unter ADAM10-Defizienz wird deutlich, dass besonders die ADAM10-abhängige Notch-Proteolyse im engen Zusammenhang mit verschiedenen Entwicklungsdefekten steht, die zur Funktionsbeeinträchtigung der jeweiligen Organe führen können.

1.2. Die Niere

Die Niere ist das wichtigste Exkretionsorgan des menschlichen Körpers. Ihre Hauptfunktion ist die Ausscheidung von wasserlöslichen Substanzen und harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten, wie Harnstoff, über den Harn. Dazu enthält die Niere ca. 1,4 Millionen Nephrone, die kleinste funktionellen Einheit der Niere [Benninghoff, 1993; Schmidt und Thews, 1995; Hildebrandt *et al.*, 2015].

Durch kontinuierliche Filtration des Blutes im Nierenkörperchen wird der Primärharn gebildet. Die Filtrationsbarriere ist dabei eng genug, um Blutzellen zurückzuhalten, niedermolekulare Stoffe wie Harnstoff, Salze oder Glukose gehen dagegen mit in den Primärharn über.

1.2.1. Die Bowman'sche Kapsel und der Podozyt

Die Primärfiltration erfolgt im Nierenkörperchen, welches aus einem fein verästelten Kapillarnetz (Glomerulus) und der umgebenden Bowman'schen Kapsel besteht. Das Endothel der Kapillaren ist gefenstert (60 nm Durchmesser) und unterstützt so die Filtration. Neben der endothelialen negativ-geladenen Glykokalyx werden vor allem Filamentstrukturen in den *fenestrae* diskutiert, die zur Größen- und Ladungsselektion der Filtrationsbarriere beitragen [Rostgaard und Qvortrup, 1997; Haraldsson *et al.*, 2008]. Die Kapillaren werden von Podozyten umschlossen, der inneren Schicht der Bowman'schen Kapsel.

Der Zellkörper des hoch spezialisierten Podozyten ist in das Lumen der Bowman'schen Kapsel gerichtet. Von ihm geht eine Vielzahl an Fußfortsätzen ab, die auf der glomerulären Basalmembran (GBM) aufliegen. Untereinander sind die Fußfortsätze über intensive Zell-Zell-Kontakte verbunden, die sogenannte Schlitzmembran. Über die Schlitzmembran können niedermolekulare Stoffe zum Zweck der Primärfiltration passieren [Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Zur Verankerung der Fußfortsätze an der GBM und an den Nachbarzellen, exprimiert der Podozyt ein breites Spektrum verschiedener Adhäsionsmolekülen an seiner Oberfläche. Störungen dieser Verankerungen können zu morphologischen

Veränderungen des Podozyten führen, die dessen Funktionsfähigkeit beeinträchtigen.

1.2.2. Podozytäre Erkrankungen

Der Podozyt selbst wird als wichtiges Element während der Nierenschädigung angesehen, da Mutationen Podozyten-exprimierter Proteine häufig das Ausbilden einer funktionellen Filtrationsbarriere behindern [Laakkonen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003; Michaud *et al.*, 2003].

Neben dem Auftreten von Mutationen und weiteren Faktoren wie Toxinen und hämodynamischen Schädigungen, ist die Antikörper-vermittelte Glomerulonephritis eine Möglichkeit der Schädigung der Filtrationsbarriere. Hierbei lagern sich Immunkomplexe an die Basalmembran an, die entweder sekundäre Ablagerungen aufgrund von Inflammationen in anderen Organen (Lupus Nephritis) darstellen oder Teil eine Autoimmunreaktion gegen Oberflächenantigene der Podozyten sind (membranöse Glomerulonephritis) [Trouw *et al.*, 2004; Kerjaschki und Farquhar, 1983; Perkinson *et al.*, 1985]. Die Immunkomplexe vermitteln eine Immunantwort gegen die Podozyten, die zur Umstrukturierung des podozytären Zytoskelettes führt und sich auf die Fußfortsätze auswirkt [Shirato *et al.*, 1996; Saleem *et al.*, 2002]. Diese werden abgeflacht und breiter (*foot process effacement*), wodurch die ursprünglich umfangreiche Verzahnung reduziert wird. Dies geht einher mit dem Verlust der Integrität der Schlitzmembran und führt zu einer Proteinurie [Murphy *et al.*, 1979]. Ein starker Proteinverlust über den Urin führt zu einer Hypoproteinämie, wodurch die Osmolarität des Blutes sinkt. Infolgedessen wird im Gewebe vermehrt Flüssigkeit in Form von Ödemen abgelagert. Diese finalen Symptome werden unter dem Begriff „nephrotisches Syndrom“ zusammengefasst.

Lösen sich die geschädigten Podozyten sogar von der GBM ab (Podozytopenie), kann dies die Ausstülpung des Kapillarnetzes zum parietalen Blatt und eine anschließende Vernarbung einleiten, die Glomerulosklerose [Wang *et al.*, 2015; Kretzler *et al.*, 1994; Kriz *et al.*, 1994; Matovinović, 2009]. Interessanterweise wurde die Aktivierung des Notch-Signalweges mit der Entwicklung einer Glomerulosklerose in Verbindung gebracht. Während die Notch-Aktivität essentiell für die Entwicklung

des Podozyten ist, wird sie im adulten Lebewesen still gelegt [Cheng und Kopan, 2005; Lasagni *et al.*, 2010]. Wird Notch im adulten Lebewesen aktiviert, werden die Podozyten apoptotisch und lösen sich von der Basalmembran. Übereinstimmend damit wurde eine Zunahme der aktiven Notch-Spezies NICD bei der Glomerulosklerose nachgewiesen [Niranjan *et al.*, 2008].

Auch der Wnt-Signalweg ist für die Entwicklung des Glomerulus bedeutend, im adulten Zustand jedoch kaum aktiv [Iglesias *et al.*, 2007]. In Abwesenheit von Liganden der Wnt-Familie wird der intrazelluläre Signalmediator β -Catenin durch Phosphorylierung zum proteasomalen Abbau markiert [Liu *et al.*, 2002]. Bindet dagegen ein Wnt-Ligand an seinen Rezeptor Frizzled wird der Phosphorylierungskomplex aufgelöst und β -Catenin stabilisiert [Kim *et al.*, 2013]. β -Catenin lokalisiert in den Zellkern und bildet einen Transkriptionskomplex aus, der die Expression klassischer Wnt-spezifischer Gene wie dem Zellzyklusregulator CyclinD1 (*Ccnd1*) und dem Wnt-Regulator Axin2 (*Axin2*) reguliert [Kramps *et al.*, 2002; Hoffmans *et al.*, 2005; Stadel und Basler, 2005; Tetsu und McCormick, 1999; Jho *et al.*, 2002]. Über den Einfluss der Wnt-responsiven Gene auf die Zellmotilität, Apoptose und Differenzierung bewirken Eingriffe in die Aktivität des Wnt-Signalweges eine erhöhte Prädisposition von Mauspodozyten gegenüber Schädigungen [Kato *et al.*, 2011].

1.2.3. Das Podozyten-Nephritis-Modell

Zum besseren Verständnis der Veränderungen der Filtrationsbarriere während der Nephritis entstanden verschiedenen Modellsysteme, die alle zur direkten Schädigung des Podozyten entwickelt wurden.

Ein häufig untersuchtes Modell ist die Heymann-Nephritis, bei der eine Autoimmunisierung gegen Extrakte proximaler Rattentubuli erfolgt [Heymann *et al.*, 1959]. Jedoch wird das wichtige Zielmolekül Megalin nicht vom Menschen exprimiert, weswegen die Erkenntnisse nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind [Farquhar *et al.*, 1995].

Ein vielversprechendes Modell ist die Applikation von polyklonalen Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle von Podozyten (anti-Podozyten Nephritis Model; APN-Modell), wodurch die Situation einer Autoimmunerkrankung nachgestellt werden

kann. Die Antikörper reichern sich an den Pseudopodien der Podozyten an und vermitteln deren Schädigung, was eine Nephritis zur Folge hat [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Interessanterweise zeigte die Studie von Meyer-Schwesinger *et al.* anhand von Komplement C3-defizienten Mäusen, dass die Schädigung unabhängig vom Komplementsystem erfolgen kann. Stattdessen wurde von den Autoren eine Schädigung über die Aktivität von T-Zellen diskutiert, da sich diese im Glomerulus anreicherten und durch abgelagerte IgG1-Antikörper aktiviert werden können. Übereinstimmend dazu wurde auch für weitere Modelle eine Abhängigkeit der Podozyten-Schädigung von T-Zellen gezeigt [Spicer *et al.*, 2007; Bao *et al.*, 2009].

1.2.4. Interaktion der Podozyten mit der glomerulären Basalmembran

Podozyten-Schädigungen beeinträchtigen die Zellmorphologie und die Funktionalität der Schlitzmembran, weswegen im Rahmen einer Nephritis insbesondere Auswirkungen auf die podozytären Adhäsionsmoleküle von Bedeutung sind.

Die Adhäsion des Podozyten an die glomeruläre Basalmembran (GBM) erfolgt über $\alpha\beta 1$ -Integrin, welches an die Ketten von Collagen IV, Lamininen und Nidogen binden kann (Abb. 1.2.1.) [Wu *et al.*, 1995; Kawano *et al.*, 2001]. Der Kontakt der GBM mit $\alpha\beta 1$ -Integrin initiiert die lokale Akkumulation des Integrins und darüber die Ausbildung der typischen fokalen Adhäsionen. Zudem induziert die Interaktion die Rekrutierung der Adapterproteine Talin, Vinculin und Paxillin zu den intrazellulären Bereichen des $\alpha\beta 1$ -Integrin [Plopper und Ingber, 1993]. Diese interagieren entweder direkt mit dem Aktinzytoskelett oder indirekt über α Actinin-4. Die große Bedeutung dieses Adhäsionsmoleküls für den Podozyten wird an $\alpha 3$ -Integrin Knockout Mäusen deutlich, in denen die Podozyten keine normalen Fußfortsätze ausbilden konnten [Kreidberg *et al.*, 1996]. Eine zweite Ebene der Verankerung erfolgt über $\alpha\beta$ -Dystroglykan, das vor allem mit Lamininen interagiert. Intrazellulär erfolgt die Verankerung zum Zytoskelett über das Adapterprotein Utrophin [Ervasti und Campbell, 1993; James *et al.*, 1996; Raats *et al.*, 2000].

Beide Oberflächenmoleküle vermitteln die Verbindung zwischen der GBM und dem Zytoskelett des Podozyten. Über diese Verbindungen kann der Podozyt Änderungen der Basalmembran wahrnehmen und auf diese reagieren.

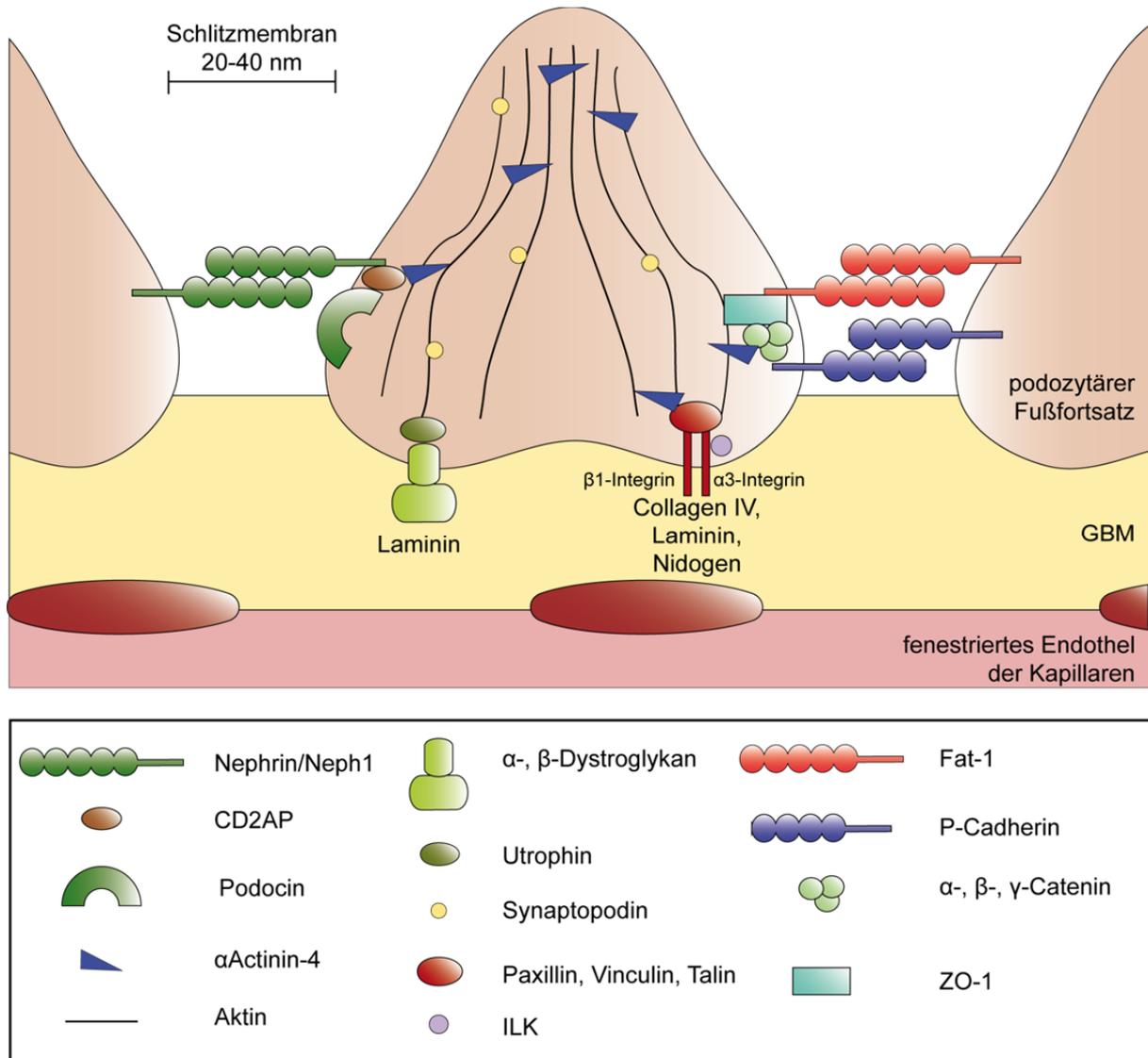


Abb. 1.2.1. Aufbau der podozytären Fußfortsätze.

Die Filtrationsbarriere besteht aus dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten. Die Verankerung der Podozyten an der GBM erfolgt über Dystroglykane und Integrine der Fußfortsätze. Die Schlitzmembran zwischen den Podozyten wird durch die Interaktion von Oberflächenmolekülen, wie Nephrin, Neph-1, Fat-1 und P-Cadherin, mit dem benachbarten Fußfortsatz gebildet. Die Adhäsionsmoleküle sind über verschiedene Adapterproteine an das Zytoskelett verankert. GBM = glomeruläre Basalmembran, CD2AP = CD2-assoziiertes Protein, ILK = *Integrin-linked* Kinase, ZO-1 = Zona occludens Protein 1. Abbildung basierend auf [Mukerji et al., 2007].

1.2.5. Podozytäre Zell-Zell-Kontakte

Die Fußfortsätze der Podozyten bilden untereinander Kontakte über verschiedene Zelladhäsionsmoleküle aus. Auf diese Weise entsteht die sogenannte Schlitzmembran, welche Poren mit einer Größe von 20-40 nm aufweist und somit

eine wichtige Größenlimitation bei der Filtration darstellt (Abb. 1.2.1.) [Rodewald und Karnovsky, 1974].

Ein wichtiger Bestandteil der Schlitzmembran ist das 280 kDa große Transmembranprotein Nephrin. Es gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und weist mehrere N-Glykosylierungen auf, welche essentiell für die korrekte Faltung und den Transport zur Zellmembran sind [Yan *et al.*, 2002]. Dort liegt Nephrin in *lipid rafts* konzentriert vor und übt einen strukturgebenden Effekt auf die Schlitzmembran aus [Holzman *et al.*, 1999; Simons *et al.*, 2001]. Nephrin-Knockout Mäuse weisen daher *foot process effacement* und Proteinurie auf [Putala *et al.*, 2001].

Podocin, ein 42 kDa großes Protein aus der Stomatin-Familie, wird Podozyten-spezifisch exprimiert und ist ebenfalls an der Schlitzmembran lokalisiert. Podocin akkumuliert in den *lipid rafts* und rekrutiert vermutlich über seinen C-Terminus Nephrin und CD2AP zu diesen Bereichen der Zellmembran [Schwarz *et al.*, 2001]. Die Deletion von Podocin in Mäusen führt zur frühen postnatalen Letalität, da die Assemblierung der Schlitzmembran gestört ist [Roselli *et al.*, 2004].

NEPH-1 ist eine weitere Komponente der Schlitzmembran, die mit dem C-Terminus von Podocin interagiert [Sellin *et al.*, 2003]. Über die Bindung an Nephrin trägt NEPH1 ebenfalls zur Stabilität der Schlitzmembran bei [Liu *et al.*, 2003].

Das CD2-assoziierte Protein (CD2AP) ist ein zytosolisches Adapterprotein, welches vor allem an den Fußfortsätzen der Podozyten vorliegt [Kirsch *et al.*, 1999]. An der Zellmembran interagiert es mit Nephrin und Podocin [Schwarz *et al.*, 2001; Shih *et al.*, 2001]. Über den C-Terminus von CD2AP erfolgt die Verankerung am Zytoskelett direkt oder über das Aktin-bindenden Synaptopodin [Lehtonen *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2006].

Fat-1 und P-Cadherin sind Mitglieder der Cadherin-Familie, die an der Schlitzmembran lokalisiert Zell-Zell-Kontakten vermitteln. Für das 516 kDa große Fat-1 liegen Hinweise vor, dass der C-Terminus mit dem zytosolischen Adapterprotein Zona occludens Protein 1 (ZO-1) interagiert [Inoue *et al.*, 2001]. Das 120 kDa große P-Cadherin vermittelt eine homophile Interaktion zwischen Nachbarfußfortsätzen und trägt vermutlich zur Ausbildung der Reißverschluss-ähnlichen Strukturen der Schlitzmembran bei. C-terminal vermittelt ein Komplex aus

α -, β - und γ -Catenin die Interaktion mit dem Zytoskelett über die Adapterproteine ZO-1 oder α Actinin-4 [Reiser *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 1997].

1.2.6. Beitrag des podozytären Zytoskelettes zur Podozytenschädigung

Neben der Verankerung der Podozyten an der GBM leistet auch deren Form einen wichtigen Beitrag zur Funktionalität der Filtrationsbarriere, weswegen auch das Zytoskelett der Podozyten von großer Bedeutung ist.

Infolge von Podozytenschädigungen vermitteln Änderungen des Zytoskelettes das *foot process effacement*. Anhand eines chemisch induzierten Podozytenschadens wurde vor allem für die Aktinfilamente einen großer Beitrag zum *foot process effacement* gezeigt [Kerjaschki, 1978]. Diese werden über *dense bodies* stabilisiert, in denen beispielsweise α Actinin-4 nachgewiesen werden konnte [Kerjaschki, 1978; Shirato *et al.*, 1996]. α Actinin-4 vermittelt die Bündelung der Aktinfilamente, so dass sich funktionsbeeinträchtigende Mutationen auf die Integrität des Zytoskelettes und die mechanischen Eigenschaften des Podozyten auswirken [Kaplan *et al.*, 2000]. Daran wird deutlich, dass auch Zytoskelett-bindende Proteine von großer Bedeutung für die Filamentdynamik während des *foot process effacement* sein können.

Zusammenfassend tragen verschiedene ADAM10-Substrate zum Erhalt der Funktionalität der Filtrationsbarriere bei. Der Notch-, aber auch der Wnt-Signalweg regulieren das empfindliche Zellgleichgewicht der Filtrationsbarriere über Apoptose und Differenzierung. Doch vor allem Adhäsionsmoleküle wie Cadherine spielen eine wichtige Rolle, da sie die Schlitzmembran ausbilden.

1.3. Die Leber

Die Leber ist ein Organ, das lebenswichtige Funktionen übernimmt, wie die Synthese und Speicherung von Glykogen, den Harnstoffmetabolismus und die Detoxifikation durch Biotransformation zu weniger toxischen, wasserlöslichen Stoffen [Malarkey *et al.*, 2005; Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Im menschlichen Körper liegt zudem eine Gallenblase vor, in der Gallensäuren bis zur Abgabe an den Intestinaltrakt gespeichert werden.

Die Besonderheit der Leber ist, dass sie nach einer Schädigung zu einer umfangreichen Regenerationsantwort fähig ist. Tatsächlich kann die Leber sogar den Verlust einzelner Leberlappen tolerieren und durch regenerative Prozesse die Ausgangszellmasse wiederherstellen [Higgins und Anderson, 1931; Tannuri *et al.*, 2007; Michalopoulos, 2007]. Die Regeneration des Gewebes erfolgt durch die Proliferation von Hepatozyten [Rhim *et al.*, 1994; Katayama *et al.*, 2001]. Ist die Hepatozyten-Proliferation dagegen gestört, werden Vorläuferzellen zur Proliferation angeregt und differenzieren anschließend zu den spezialisierten Zellen der Leber [Espanol-Suner *et al.*, 2012]. Eine große Bedeutung wird dabei insbesondere dem Notch-Signalweg zugeordnet, dessen Aktivierung auch in der Leber sowohl das Zellwachstum als auch die Differenzierung initiieren kann [Kohler *et al.*, 2004].

1.3.1. Feinbau der Leber

Die kleinste funktionelle Einheit der Leber ist das sogenannte Leberläppchen, das hexagonal um eine Zentralvene angeordnet ist (Abb. 1.3.1.). Zum Rand hin ist das Leberläppchen durch Portaltriaden abgegrenzt, eine Gefäßstruktur, die eine Portalvene, einen Gallengang und eine hepatische Arterie umfasst [Krishna, 2013]. Das Blut zur Versorgung der Leberzellen fließt von der Portalvene und der hepatischen Arterie über die Sinusoide zur efferenten Zentralvene.

Das Endothel der Sinusoide des Leberläppchens ist fenestriert, wodurch Blutplasmabestandteile leicht in den angrenzenden Disse'schen Raum übergehen können (Abb. 1.3.1.). Der Disse'sche Raum besteht aus Collagen Typ III-reichem Bindegewebe, sowie einigen leberspezifischen Zelltypen, wie Itozellen [Krishna,

2013]. Angrenzend an den Disse'schen Raum werden die Sinusoide von einer einzelligen Schicht von Hepatozyten umschlossen, der Hauptzellpopulation der Leber. Die basolateralen Oberfläche ist zum Sinusoid hin lokalisiert und ermöglicht den Austausch von endokrinen Faktoren und Nährstoffen mit dem Blutplasma im Disse'schen Raum. Zwischen benachbarten Hepatozyten bilden sich feine Gallekanälchen, welche den Abtransport der von Hepatozyten sekretierten Gallensäuren über den Hering'schen Kanal zum Gallengang hin vermitteln. Die Gallengänge sind durch die Cholangiozyten begrenzt und leiten die Gallensäuren zur Speicherung in die Gallenblase ab [Si-Tayeb *et al.*, 2010; Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012].

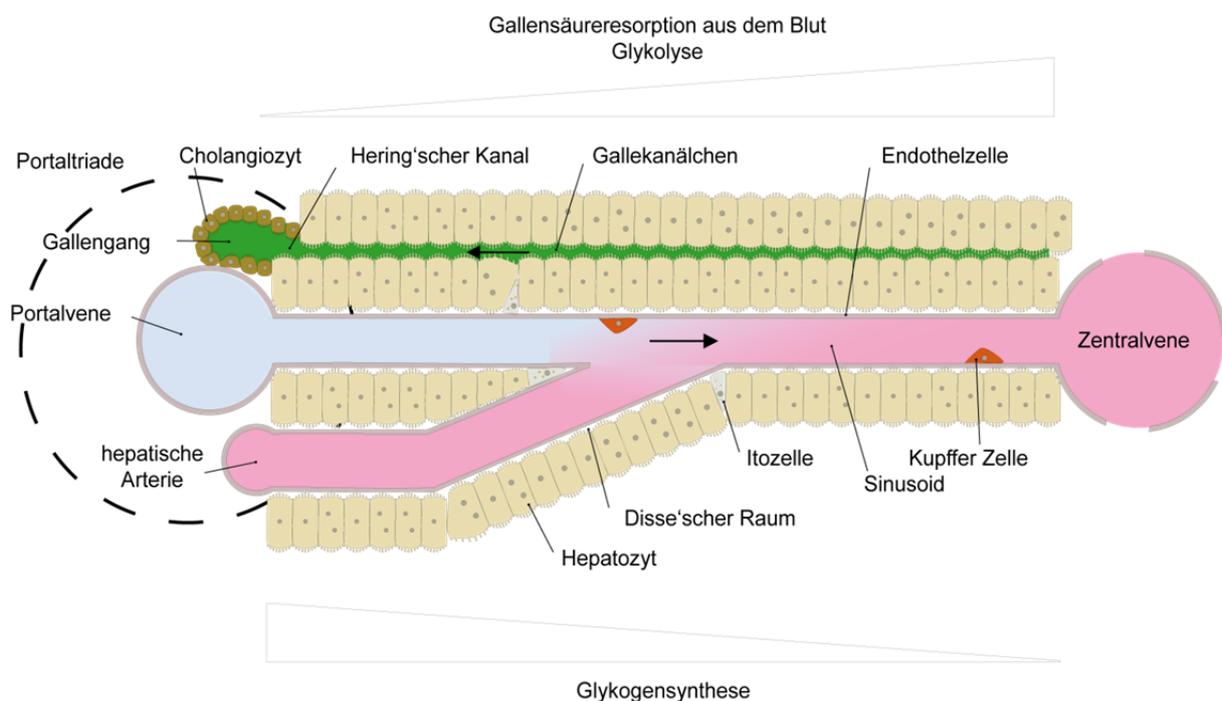


Abb. 1.3.1. Aufbau eines Leberläppchens (Ausschnitt).

Die Portaltriaden sind hexagonal um eine Zentralvene angeordnet. Der Ausschnitt zwischen einer dieser Portaltriaden und der Zentralvene ist dargestellt. Der Blutfluss von der Portaltriade zur Zentralvene erfolgt über Sinusoide, um welche die Hepatozyten angeordnet sind. Aufgrund des Blutflusses im Leberläppchen entstehen Versorgungsgradienten. Abhängig von der Position der Hepatozyten entlang des Gradienten resultieren daraus verschiedene Hauptfunktionen wie Glykogensynthese und Resorption von Gallensäuren. Hepatozyten sekretieren Gallensäuren in die Gallekanälchen, die über die Cholangiozyten-begrenzten Gallengänge abtransportiert werden. Abbildung basierend auf [Frevert *et al.*, 2005].

1.3.2. Entwicklung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge

Die Leber entwickelt sich aus dem ventralen Endoderm. Das kardialen Mesoderm und das *Septum transversum mesenchyme* versorgen die Leberanlage mit

Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) und *bone morphogenetic protein* (BMP) [Rossi *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2011; Zong und Stanger, 2012]. FGF und BMP initiieren dann die Expression leberspezifischer Proteine wie Albumin ab Embryonaltag E8. Auf diese Weise werden hepatische Vorläuferzellen festgelegt, die Hepatoblasten, was als erster Nachweis der Differenzierung gilt [Gualdi *et al.*, 1996]. Für die weitere Entwicklung der Hepatoblasten sind vor allem endotheliale Zellen der sich entwickelnden Sinusoide wichtig, als deren Quelle ebenfalls das *Septum transversum mesenchyme* angesehen wird [Matsumoto *et al.*, 2001]. Sie stellen beispielsweise Wnt-Liganden zur Verfügung, welche essentiell für die weitere Proliferation der Hepatoblasten sind [Matsumoto *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008].

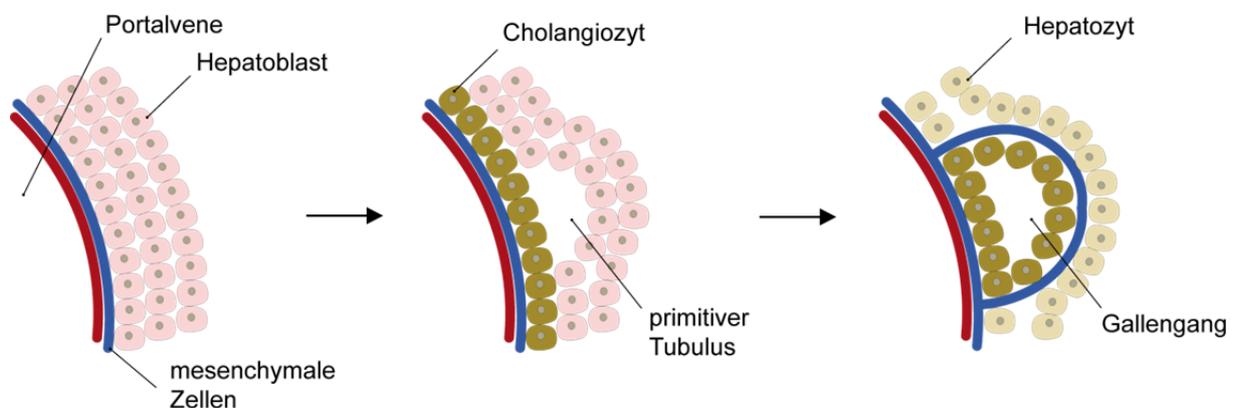


Abb. 1.3.2. Entstehung der Gallengänge.

Die mesenchymalen Zellen um die Portalvene exprimieren Jagged-1 und initiieren darüber die Aktivierung des Notch2-Rezeptors auf den angrenzenden Hepatoblasten. Das Signal bewirkt die Differenzierung zu Cholangiozyten, die dann in einer Einzelzellschicht um die Portalvene vorliegen. Bereits vor der Geburt bilden sich primitive tubuläre Strukturen. Nach der Geburt umschließen die mesenchymalen Zellen den Tubulus und induzieren die Differenzierung der eingeschlossenen Hepatoblasten zu Cholangiozyten, um den Gallengang abzuschließen. Zellen außerhalb der Gallengangsanlage differenzieren zu Hepatozyten. Abbildung basierend auf [Zong und Stanger, 2012].

Die Differenzierung der Hepatoblasten hängt von ihrer Position im Gewebe ab. Zellen in der periportalen Region differenzieren eher zu Cholangiozyten, die übrigen zu Hepatozyten [Lemaigre, 2003]. Grundlegend hierfür ist ein von den periportalen Regionen ausgehender Gradient an Liganden für verschiedene Signalwege, wie TGF β , Notch, Wnt und FGF, welche als Initiatoren der Gallengangsbildung beschrieben wurden [Decaens *et al.*, 2008; Clotman *et al.*, 2005; Zong *et al.*, 2009]. Das periportale Mesenchym stellt dabei z. B. den Notch-Liganden Jagged-1 zur Verfügung (Abb. 1.3.2.) [Hofmann *et al.*, 2010]. Der Notch2-abhängige Signalweg induziert die Entstehung einer einzelligen Schicht von Cholangiozyten um die

Portalvene [Kodama *et al.*, 2004; Sparks *et al.*, 2010; Jeliaskova *et al.*, 2013]. Aus der Anlage entwickeln sich pränatal primitive Tubulärstrukturen die von Cholangiozyten und zum Parenchym hin von Hepatoblasten umgeben sind. Nach der Geburt umschließt das periportale Mesenchym die tubulären Anlagen und initiiert die Differenzierung der Hepatoblasten der ehemals parenchymalen Seite zu Cholangiozyten. Cholangiozyten, die nicht in Gallengänge integriert wurden, gehen während dieser Ausweitung des portalen Mesenchyms verloren [Zong *et al.*, 2009].

Der Mangel an den oben genannten Signalen für die Cholangiozyten-spezifische Entwicklung führt zur Differenzierung der Hepatoblasten zu Hepatozyten [Zong und Stanger, 2012].

1.3.3. Die Zellen der Leber

Der meist hexagonale, häufig polyploide Hepatozyt ist die häufigste Zelle der Leber und übernimmt deren klassischen Funktionen wie Detoxifikation, Harnstoffmetabolismus und Glukose- und Glykogen-Stoffwechsel [Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Eine weitere wichtige Bedeutung kommt dem Hepatozyt hinsichtlich des Gallensäure-Metabolismus zu, da er Gallensäuren aus dem Blut resorbiert, aber auch selbst synthetisiert und an die Gallekanälchen abgibt [Davis *et al.*, 1983; Dawson und Oelkers, 1995]. Daher ist sowohl die basolaterale, als auch die kanalikuläre Zelloberfläche durch Mikrovilli vergrößert. Zur Aufnahme der Gallensäuren aus dem Blut besitzen die Hepatozyten verschiedene Transporter (Abb. 1.3.3.). Diese umfassen Proteine der Familie der Natrium-abhängigen multispezifischen organischen Anionen Transporter (OATP) und das Natrium-abhängige Natrium/Taurocholot kotransportierende Peptid (NTCP), welches den Hauptanteil der Resorption übernimmt [Kullak-Ublick *et al.*, 1994; Zimmerli *et al.*, 1989; Hagenbuch *et al.*, 1991]. Die kanalikuläre Sekretion von Gallensäuren erfolgt vor allem über die *bile salt export pump* (BSEP) [Gerloff *et al.*, 1998]. Akkumulieren Gallensäuren in Hepatozyten, werden nukleäre Hormonrezeptoren aktiviert, wie der Farnesoid X Rezeptors (FXR) und der Retinoid X Rezeptor (RXR). Diese verringern die Expression der Resorptionstransporter, verstärken aber die Expression des Sekretionstransporters BSEP [Denson *et al.*, 2001; Ananthanarayanan *et al.*, 2001]. Der Hepatozyt sekretiert weitere Bestandteile der Galle wie z. B. Glutathion-

Konjugate über das *multidrug resistance-associated protein 2* (Mrp2) und biliäre Phospholipide über das *multidrug resistance protein 3* (Mdr3) [Jedlitschky *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 1993]. Gallensäuren können zudem über einen alternativen basolateralen Rücktransport über die Transporter Mrp3 und Mrp4 wieder ins Blut abgegeben werden [Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006].

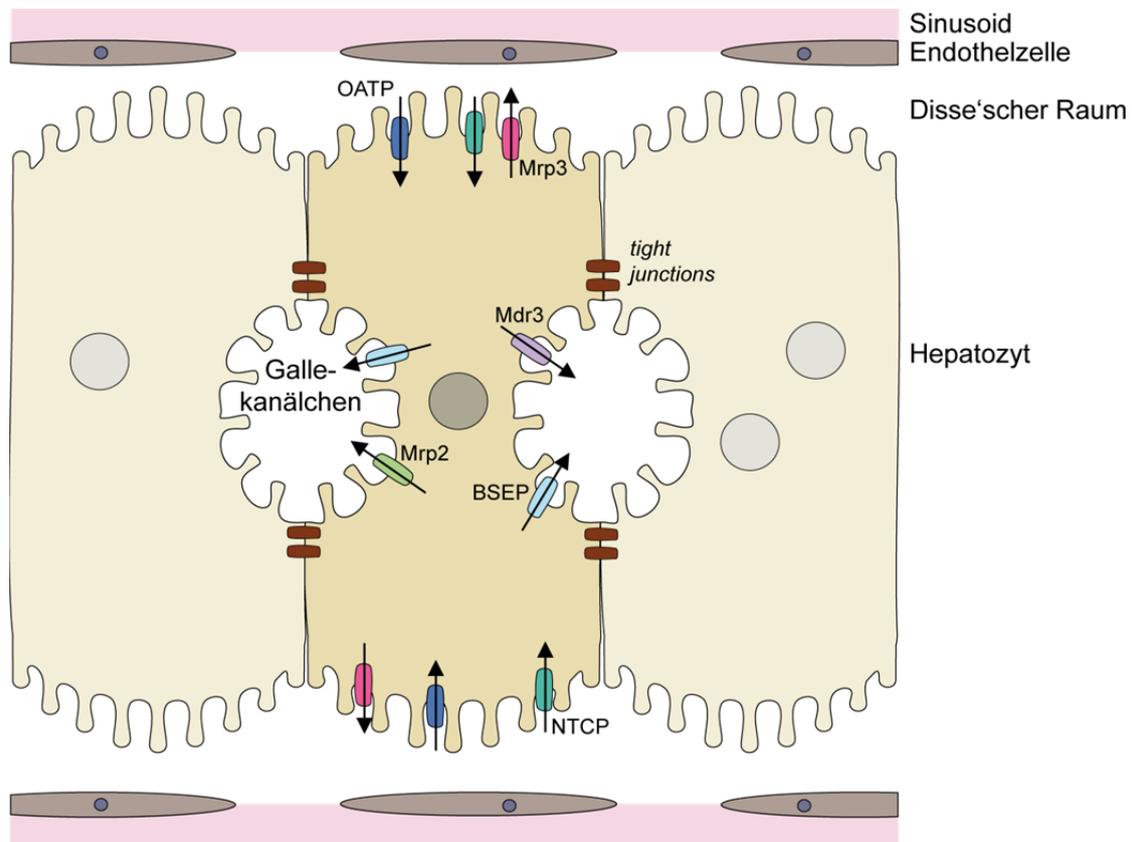


Abb. 1.3.3. Lokalisation von Gallensäuretransportern am Hepatozyten.

Über die basolateral gelegenen Transporter OATP und NTCP erfolgt die Resorption der Gallensäuren aus dem Blut. An der apikalen Membran bewirken BSEP, Mrp2 und Mdr3 die Sekretion der resorbierten oder neu synthetisierten Gallensäuren aus dem Hepatozyten in die Gallekanälchen. Abbildung basierend auf [Jonker *et al.*, 2009].

Cholangiozyten sind kubische Zellen, die die Gallengänge begrenzen. Untereinander sind sie über *tight junctions* verbunden, wobei apikale Mikrovilli in das Gallengangslumen gerichtet sind [Ishii *et al.*, 1989]. Sie tragen über absorptive und sekretorische Prozesse zur Gallenproduktion bei und regulieren z. B. den Gallenfluss und den pH der Gallensäure vor allem durch die Sekretion von Bikarbonat [Strazzabosco *et al.*, 1997].

Kupffer-Zellen sind sehr langlebige, Leber-residente Makrophagen, die in den Sinusoiden vorliegen [Bouwens *et al.*, 1986]. Eine Schädigung des Gewebes, z. B.

nach partieller Hepatektomie, induziert die Vermehrung der Kupffer-Zellen über lokale Proliferation [Widmann und Fahimi, 1975].

Itozellen (*hepatic stellate cell*, HSC) liegen im inaktiven Zustand im Disse'schen Raum der periportalen Bereichen vor und dienen als Vitamin A- Speicher [Hendriks *et al.*, 1985]. Die Aktivierung der Itozellen erfolgt über das von aktivierten Kupfferzellen sekretierte TGF β [Hellerbrand *et al.*, 1999]. TGF β verstärkt die Proliferation der Itozellen, wurde aber auch als Mediator deren Transdifferenzierung zu Myofibroblasten beschrieben [Pinzani *et al.*, 1989; Dooley *et al.*, 2003]. Bei der Transdifferenzierung verlieren die Itozellen ihre Vitamin A-Speicher unter gleichzeitiger Induktion der Expression des Myofibroblasten-typischen α *smooth muscle actin* (α SMA) [Minato *et al.*, 1983; Friedman *et al.*, 1993]. Die Myofibroblasten regenerieren dann die extrazelluläre Matrix (ECM) durch Synthese von z. B. Collagen I, III-VI, Fibronectin und Laminin [Knittel *et al.*, 1996; Inagaki *et al.*, 2001]. Im Zuge der Transdifferenzierung zu den Myofibroblasten wird außerdem das Proteolyse-Gleichgewicht im Gewebe verändert. Die Expression verschiedener Matrixmetalloproteasen wird reguliert und der Matrixmetalloprotease-Inhibitor Timp1 verstärkt exprimiert [Arthur *et al.*, 1992; Han *et al.*, 2007; Arthur *et al.*, 1998; Knittel *et al.*, 1999]. Eine chronische Aktivierung der Myofibroblasten kann die Umstrukturierung zu einer Collagen-I-haltigen ECM vermitteln und die Entstehung einer Leberfibrose begünstigen [Milani *et al.*, 1994].

Die bipotentialen Lebervorläuferzellen (LPC) exprimieren Cholangiozyten-Oberflächenantigene wie Cytokeratin 19 (CK19), aber auch den spezifischen Marker Trop2 [Schmelzer *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008; de Boer *et al.*, 1999; van Eyken *et al.*, 1987; Okabe *et al.*, 2009]. Die Herkunft der LPC wird in den Hering'schen Kanälen vermutet, wo Hepatozyten des Leberparenchyms auf Cholangiozyten des Gallengangs treffen [Theise *et al.*, 1999]. Gegenwärtig wird diskutiert, ob LPC erst infolge einer Schädigung auftreten oder auch in gesunden Lebern nachweisbar sind [Karaca *et al.*, 2014; Huch *et al.*, 2013]. *Lineage-tracing* Studien deuten auf die Entstehung von LPC durch Dedifferenzierung geschädigter Hepatozyten [Tarlow *et al.*, 2014].

LPC vermitteln die Gewebsregeneration nach schweren und chronischen Leberschäden unter parallelem Proliferations-Arrest der Hepatozyten [Katayama *et al.*, 2001; Viebahn und Yeoh, 2008; Espanol-Suner *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2015]. Die

Aktivierung und Proliferation von LPC sind dabei von verschiedenen Signalen abhängig, wie dem Fibroblasten Wachstumsfaktor 7 (FGF7) über den Rezeptor FGFR2b, dem TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) über Fn14 und dem hepatozytären Wachstumsfaktor HGF über den Rezeptor cMet [Takase *et al.*, 2013; Bird *et al.*, 2013; Ishikawa *et al.*, 2012]. Die LPC können anschließend zu Cholangiozyten und Hepatozyten differenzieren [Shin *et al.*, 2011]. Die Entscheidung über die Differenzierungsrichtung erfolgt analog zu den Hepatoblasten Notch-abhängig [Boulter *et al.*, 2012].

1.3.4. Cholestase und Fibrose

Die Leber vermittelt die Entgiftung toxischer Substanzen durch Biotransformation. Gleichzeitig bedeutet dies eine starke Belastung der Leber, falls der Abtransport schädlicher Endprodukte gestört ist. Insbesondere Störungen des Abtransportes von Gallensäuren können schwerwiegende Schädigung verursachen. Tatsächlich kann eine erhöhte Konzentration von Gallensäuren die Nekrose von Hepatozyten induzieren [Woolbright *et al.*, 2015]. Eine Aufstauung der Gallensäuren im Gewebe wird als Cholestase bezeichnet. Als klassischer klinischer Marker des gestörten Galleabflusses gilt der Anstieg der Alkalischen Phosphatase (ALP) im Serum [DiMarino *et al.*, 2010]. Das Aufstauen der Gallensäuren kann dabei durch Okklusion der Gallengänge (z. B. durch Tumoren) oder aufgrund einer Fehlbildungen der Galleableitenden Gallekanäle bedingt sein (z. B. Alagille-Syndrom) [Kodama *et al.*, 2004; Libbrecht *et al.*, 2005].

Gallensäuren können aber auch im Gewebe akkumulieren, wenn deren Sekretion in die Gallekanälchen gestört ist. Beispielsweise führt der Defekt des Hepatozytentransporters BSEP zur reduzierten Sekretion von Gallensalzen [Strautnieks *et al.*, 1998; Hirschfield *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001b]. Mutationen des Sekretionstransporter Mdr3 wurden mit einer Schädigung des biliären Systems und Cholangitis in Verbindung gebracht [Deleuze *et al.*, 1996; de Vree *et al.*, 1998; Mauad *et al.*, 1994]. Über Mdr3 und BSEP exportieren die Hepatozyten zudem Endprodukte der Biotransformation toxischer Stoffe, weswegen Mutationen der beiden Gene mit einer Prädisposition zur Medikamenten-induzierten Cholestase in Verbindung gebracht werden [Lang *et al.*, 2007].

Unter dauerhaften Schädigung des Gewebes setzen Immunzellen wie Makrophagen bzw. Kupffer-Zellen TGF β frei, worüber die Transdifferenzierung von Itozellen zu Myofibroblasten induziert wird [Hellerbrand *et al.*, 1999]. Die Myofibroblasten bauen die während der Regeneration aufgelockerte ECM wieder auf. Eine anhaltende Aktivierung der Myofibroblasten führt zur Produktion von Narbengewebe, akkumuliert dieses, spricht man von einer Fibrose [Knittel *et al.*, 1996; Inagaki *et al.*, 2001]. Während der Fibrose wird die ECM des Disse'schen Raums zu einer festeren, Protease-resistenteren ECM umstrukturiert (Kapillarisierung) [Milani *et al.*, 1994]. Die Kapillarisierung geht mit dem Verlust der Fenestrierung des sinusoidalen Endothels und der Reduktion hepatozytärer Mikrovilli einher, wodurch die metabolische Aktivität der Hepatozyten beeinträchtigt wird [McGuire *et al.*, 1992; Schaffner und Poper, 1963].

1.4. Regulation von ADAM10

Die Metalloprotease ADAM10 besitzt ein umfangreiches Substratspektrum. Über die Aktivierung des Notch-Signalweges reguliert ADAM10 entwicklungsrelevante Proliferations- und Differenzierungsprozesse [van Tetering *et al.*, 2009]. Weiterhin proteolysiert ADAM10 Adhäsionsmoleküle (Cadherin-Familie) und Proformen von Chemokinen (CXCL16) und Wachstumsfaktoren (Betacellulin) [Reiss *et al.*, 2005; Abel *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004]. Zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen die Proteolyse der Substrate von ADAM dereguliert ist (z. B. die APP-Proteolyse während der Alzheimer'schen Erkrankung), ist die Modulation der Enzym-Aktivität ein möglicher therapeutischer Ansatz [O'Brien und Wong, 2011]. Ein großes Problem hierbei ist jedoch, dass die klassischen ADAM10-Aktivatoren und -Inhibitoren direkt auf die Protease wirken und keine Unterscheidung anhand des Substrates ermöglichen. Beim Einsatz dieser Wirkstoffe besteht daher ein hohes Risiko, dass abseits des eigentlichen therapeutischen Zieles Nebenwirkungen durch die Beeinflussung der Proteolyse weiterer Substrate auftreten. Aus diesem Grund sind insbesondere Interaktionspartner von ADAM10 von klinischem Interesse, die im Idealfall eine substratspezifische Modulation der ADAM10-Aktivität vermitteln können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden daher die folgenden Kandidaten untersucht, die über einen *Screen* nach Interaktionspartnern identifiziert wurden.

1.4.1. Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase FKBP38

Zusammen mit Parvulinen und Cyclophilinen wird die Proteinfamilie der FK506-bindenden Proteine (FKBP) den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen zugeordnet [Rahfeld *et al.*, 1994; Handschumacher *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 1989]. Die wichtigste Funktion dieser Proteinfamilie ist die als Faltungshelfer durch die Vermittlung der Isomerisierung von Peptid-Prolyl-Bindungen. Darüber können FKBP Einfluss auf den Transport der Proteine und die Assemblierung funktioneller Komplexen haben [Walker *et al.*, 2007; Ni *et al.*, 2010]. Die einzelnen Vertreter können zusätzlich noch weitere Funktionen übernehmen, wie beispielsweise als Chemoattraktant oder als Koregulator der Phosphatase Calcineurin, von Ionenkanälen und Steroidrezeptoren [Xu *et al.*, 1992; Liu *et al.*,

1991; Steiner *et al.*, 1992; Timerman *et al.*, 1993; Lopez *et al.*, 2015; Denny *et al.*, 2000; Wochnik *et al.*, 2005; Galat, 1993]

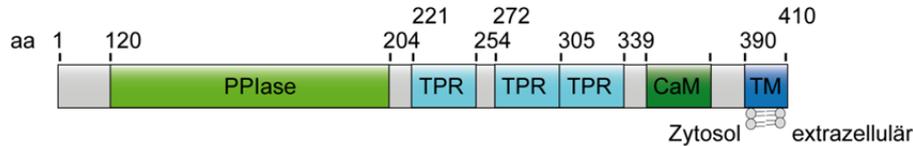
Basierend auf Sequenzhomologien zu FKBP12, dem am besten charakterisierten Vertreter der FKBP-Familie, konnten 16 humane Vertreter identifiziert werden. Obwohl alle Vertreter mindestens eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Domäne (PPIase-Domäne) besitzen, ist diese bei einigen Vertretern katalytisch inaktiv [Nakajima *et al.*, 2006]. Da die Katalysereaktion der einzelnen Vertreter mitunter sehr langsam erfolgt, wird die Bindung des Inhibitors Tacrolimus (FK506) an das aktive Zentrum als prinzipieller Nachweis der Aktivität verwendet und zur Unterscheidung in aktive und inaktive FKBP herangezogen [Harding *et al.*, 1989; Standaert *et al.*, 1990; Laenger *et al.*, 2009; Carver *et al.*, 1998]. Strukturell ist FK506 ein Übergangszustandsanalogon zur Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung und wirkt daher als kompetitiver, reversibler Inhibitor des aktiven Zentrums der PPIase-Domäne [Rosen *et al.*, 1990].

Während für die meisten FKBP die Abgrenzung zwischen aktiv oder inaktiv relativ deutlich ist, bildet das FK506-bindende Protein 38 (FKBP 38) eine Ausnahme. FKBP38 wurde initial als inaktiv beschrieben, jedoch liegen inzwischen Hinweise vor, dass eine Aktivierung über die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin erfolgt [Lam *et al.*, 1995; Edlich *et al.*, 2005; Maestre-Martinez *et al.*, 2010; Maestre-Martinez *et al.*, 2006]. Die Bildung des Komplexes mit FKBP38 erfolgt über eine Calmodulin-Bindestelle nahe des C-Terminus (Abb. 1.4.1. A). Neben der N-terminal gelegenen PPIase-Domäne besitzt FKBP38 noch drei *tetratricopeptide repeat*-Motive (TPR-Motive), welche als klassisches Protein-Protein-Interaktionsmotiv gelten [Lam *et al.*, 1995]. TPR-Motiven wird insbesondere bei Proteinen mit Chaperon-Aktivität eine wichtige Bedeutung bei der Vermittlung der Interaktion mit dem Substrat zugeschrieben [Blatch und Lassle, 1999].

FKBP38 (Genname: *fkbp8*) wurde nach seinem berechneten Molekulargewicht von 38 kDa benannt, wird in der Gelelektrophorese allerdings bei ca. 55 kDa detektiert [Lam *et al.*, 1995]. Über die C-terminale Transmembrandomäne liegt das Protein an der äußeren mitochondrialen oder ER-Membran verankert vor und weist mit dem N-Terminus in das Zytosol [Edlich *et al.*, 2005; Shirane und Nakayama, 2003; Bulgakov *et al.*, 2004]. Die PPIase-Domäne ist damit im Zytosol lokalisiert und vermittelt dort die Aktivität von FKBP38 als Faltungshelfer. Über eine PPIase-

vermittelte Faltung schließlich kann z. B. der weitere Transport des jeweiligen Substrates in der Zelle beeinflusst werden [Walker *et al.*, 2007; Banasavadi-Siddegowda *et al.*, 2011].

A



B

ADAM10-CTD (aa694-748): GFIKICS VHT **PSSNPKL** **PPPKLPL** **PGTL** **KRRRPPQ** **PIQ** **Q** **QRQR** **PRES** YQMGHMRR

Abb. 1.4.1. Aufbau von FKBP38 und Sequenz des potentiellen Substrates ADAM10.

(A) Domänen-Aufbau von humanem FKBP38. (B) Potentielle Substratstellen der PPlase in der ADAM10 C-terminalen Domäne. Generell liegt eine Präferenz der FKBP für Leu-Pro- oder Phe-Pro-Bindungen vor. Aufgrund der Topologie beider Proteine an der Membran ist die PPlase-Domäne dem C-Terminus von ADAM10 zugewandt. Gelb = präferierte X-Pro-Bindung, orange = mögliche X-Pro-Bindung. PPlase = Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Domäne, TPR = *tetratricopeptide repeat*-Motiv, CaM = Calmodulinbindestelle, TM = Transmembrandomäne, CTD = C-terminale Domäne. Die Darstellung der Domänenstruktur des humanen FKBP38 basiert auf dem Eintrag Q14318, die Sequenz der ADAM10-CTD entstammt dem Eintrag O14672 von www.uniprot.org.

In Bezug auf ADAM10 ist vor allem das Potential als Interaktionspartner von Transmembranproteinen interessant. Tatsächlich wurde bereits eine Interaktion von FKBP38 mit den Presenilinen 1 und 2 identifiziert [Wang *et al.*, 2005]. Zudem ist FKBP38 als Regulator der Aktivität des Ionenkanals *Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 6* (TRPC6) beschrieben [Lopez *et al.*, 2015].

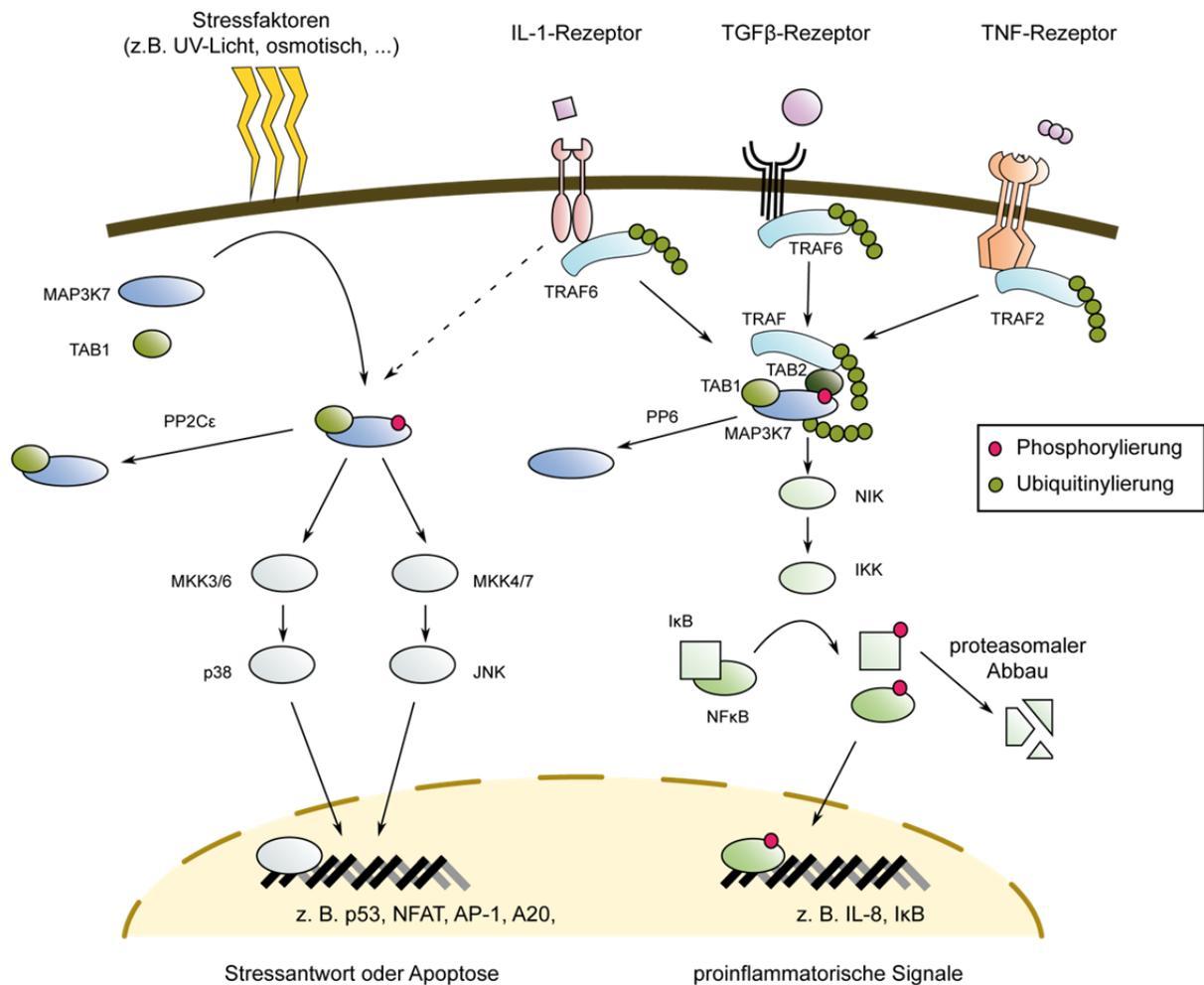
Hinsichtlich der Topologie, liegt das aktive Zentrum von FKBP38 zur zytosolische Domäne von ADAM10 orientiert vor. Damit könnte FKBP38 die Faltung des ADAM10 C-Terminus beeinflussen, der mehrere Proline enthält (Abb. 1.4.1. B). Mögliche strukturelle Änderungen hier könnten sich auch auf die übrigen Domänen von ADAM10 auswirken. Zudem könnte die korrekte Faltung des C-Terminus für Transport-vermittelnde Proteine wie SAP-97 bedeutsam sein [Marcello *et al.*, 2007]. Nach gegenwärtiger Literaturlage ist FKBP38 nicht an der Zelloberfläche beschrieben. Eine Interaktion mit maturem ADAM10 erscheint daher unwahrscheinlich.

1.4.2. Die Kinase MAP3K7

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind in Form einer Kinasekaskade angeordnet, die durch einen anfänglichen Stimulus, z. B. Mitogene, Zytokine oder Stress, in Gang gesetzt wird. Die Stimuli werden über Zelloberflächenrezeptoren auf eine Reihe einander nachgeschalteter Kinasen übertragen. Das Signal wird final in den Zellkern weitergeleitet, in dem über die Regulation der Gen-Expression z. B. die Apoptose, die Differenzierung oder der Zellzyklus beeinflusst wird [Schwabe *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2001; Keshet und Seger, 2010].

Eine der MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3K) ist die 1995 von Yamaguchi entdeckte, ca. 60 kDa schwere MAP3K7, welche auch als TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) bezeichnet wird [Yamaguchi *et al.*, 1995]. Die Kinase wurde intrazellulär, hauptsächlich mit zytosolischer Lokalisation nachgewiesen [Jiang *et al.*, 2002]. Der N-Terminus von MAP3K7 besteht aus einem regulatorischen, vermutlich inhibitorisch wirkenden Motiv, mit dem TAK1-bindende Proteine interagieren können. An dieses Motiv schließt sich die Kinase-Domäne an. Die Aktivierung der Kinase erfolgt über Stimuli wie TGF- β , IL-1 und TNF [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1995; Takaesu *et al.*, 2003]. Studien mit der katalytisch inaktiven Mutante K63W zeigten, dass im Zuge der Aktivierung der Kinase eine Autophosphorylierung des Ser-192 stattfindet [Kishimoto *et al.*, 2000]. Bei der Autophosphorylierung spielt die Assoziation des TAK1-bindenden Proteins 1 (TAB1) mit MAP3K7 eine entscheidende Rolle [Shibuya *et al.*, 1996; Sakurai *et al.*, 2000; Inagaki *et al.*, 2008]. Als Inhibitoren der Kinase wurden Celastrol und (5Z)-7-Oxozeaenol identifiziert [Sethi *et al.*, 2007; Idris *et al.*, 2009; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003]. Die Funktion des C-terminalen Bereiches des Proteins konnte bislang nicht geklärt werden [Yamaguchi *et al.*, 1995].

Nach Aktivierung des TGF- β -, TNF- oder des IL-1-Rezeptors vermitteln Adapterproteine der TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor-Familie (TRAF) die Signalweiterleitung zu MAP3K7 (Abb. 1.4.2. A) [Cao *et al.*, 1996; Takaesu *et al.*, 2000; Takaesu *et al.*, 2003; Silverman und Maniatis, 2001]. Die Stimulation von Zellen mit IL-1 oder TGF- β initiiert die Ausbildung des TRAF6-regulierten IKK Aktivator Komplexes 1 (TRIKA 1), in dem TRAF6 durch K63-Ubiquitylierung

A**B**

ADAM10-CTD (aa694-748): GFIKICS VHTPSSNPKL PPPKPLPGT L KRRRPPQPIQ QPQRQRPRES YQMGHMRR

Abb. 1.4.2. MAP3K7-Signalwege und Sequenz des potentiellen Substrates ADAM10.

(A) Die Kinase MAP3K7 kann über Stresssignale oder verschiedene Zytokine aktiviert werden. Stresssignale und potentiell auch die Stimulation mit IL-1 führen zur Aktivierung der Kinasekaskaden hin zu p38 und JNK. Die Aktivierung erfolgt hier durch Autophosphorylierung der Kinase, die durch die Proteinphosphatase PP2Cε terminiert wird. Über diesen Signalweg werden eine Stressantwort oder die Apoptose reguliert. Zytokine dagegen bewirken eine TRAF-abhängige Aktivierung der MAP3K7 durch Ubiquitylierung. Die Proteinphosphatase PP6 wird als Signalterminator beschrieben. Die Zytokine bewirken eine Initiation des NFκB-Signalweges der final proinflammatorische Signale aktiviert. Abbildung basierend auf [Grabbe *et al.*, 2011; Ajibade *et al.*, 2013]. (B) Potentielle Substratstellen der Serin-/Threonin-Kinase MAP3K7 in der ADAM10 C-terminalen Domäne. Aufgrund der Lokalisation der MAP3K7 im Zytosol steht sie potentiell nur mit dem C-Terminus von ADAM10 in Kontakt. Die Sequenz der ADAM10-CTD entstammt dem Eintrag O14672 von www.uniprot.org, die Präferenz der Kinase wurde www.phosphosite.org entnommen. Gelb = präferierte Phosphorylierungsstelle, orange = mögliche Phosphorylierungsstelle. CTD = C-terminale Domäne.

aktiviert wird. Anschließend erfolgt die Rekrutierung des TRIKA 2-Komplexes, bestehend aus MAP3K7, TAB1 und TAB2, zum aktiven TRAF6-Komplex [Wang *et*

al., 2001a]. TAB2 vermittelt dabei die Bindung an das Rezeptorkomplex-assoziierte TRAF6, wodurch die Aktivierung von MAP3K7 erfolgen kann [Takaesu *et al.*, 2000; Takaesu *et al.*, 2001]. Analog zur Interaktion mit TRAF6 bewirkt die Stimulation mit TNF eine Rekrutierung von MAP3K7 zu TRAF2 [Li *et al.*, 2009]. Die TRAFs vermitteln dann die Polyubiquitinylierung von MAP3K7 am Lysin K158, die der aktivierenden Autophosphorylierung vorausgeht [Fan *et al.*, 2010]. Die spätere Inaktivierung von MAP3K7 erfolgt durch Abspaltung der Autophosphorylierung. In diesem Zusammenhang wurde die TAB2-vermittelte Rekrutierung der Proteinphosphatase 6 (PP6) nachgewiesen [Broglie *et al.*, 2010].

Im Rahmen des IL-1-, TNF- und TGF- β -Signalweges initiiert MAP3K7 den NF κ B-Signalweg durch Phosphorylierung der NF κ B-induzierenden Kinase (NIK) [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Takaesu *et al.*, 2003; Gingery *et al.*, 2008]. Die NIK vermittelt über die Phosphorylierung der I κ B-Kinase (IKK), die Translokation von Proteinen der NF κ B-Familie (z. B. p65) in den Zellkern. Dort wird die Transkription spezifischer responsiver Gene, z. B. proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 (*Cxcl8*) oder negativer Regulatoren wie I κ B α (*Nfkbia*), induziert [Kunsch *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1993]. Eine Phosphorylierung von NF κ B verstärkt den transkriptionellen Effekt [Viatour *et al.*, 2005].

Stresssignale wie UV-Licht, Hitzeschock und osmotischer Stress, aber auch die Stimulation mit IL-1 vermitteln eine MAP3K7-abhängige Aktivierung von p38 und JNK [Wang *et al.*, 2001a]. Die Signale induzieren die Autophosphorylierung von MAP3K7 im Komplex mit TAB1 [Inagaki *et al.*, 2008]. MAP3K7 aktiviert die Mitogen Kinase Kinase 4 und 7 (MKK4, MKK7), welche die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) phosphorylieren, bzw. MKK3 und MKK6, die p38 phosphorylieren [Yamaguchi *et al.*, 1995; Fanger *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 1996b]. JNK reguliert die Transkription verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie dem Aktivator Protein-1 (AP1), dem Tumorsuppressor p53 und dem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen 4 (NFAT4) [Weston und Davis, 2002]. Hierüber werden Überlebenssignale induziert oder die Apoptose initiiert [Tournier *et al.*, 2000]. Die Aktivierung von p38 führt zur gesteigerten Expression von z. B. AP1 (antiapoptotisch, Zellzyklusregulator) und A20 (negativer Regulator des NF κ B-Signalweges) [Ferreiro *et al.*, 2010]. Auf diese Weise beeinflusst p38 das Zellwachstum, die Differenzierung und das Überleben, aber auch die Induktion der Apoptose [Zarubin und Han, 2005]. Die

Dephosphorylierung von MAP3K7 durch die Proteinphosphatase 2C ϵ (PP2C ϵ) inaktiviert die Kinase [Li *et al.*, 2003].

Neben der großen Bedeutung für die Immunantwort und die Apoptoseinitiation ist MAP3K7 insbesondere an Differenzierungsprozessen der Gefäßen und der Haut beteiligt [Sato *et al.*, 2005; Jadrich *et al.*, 2006; Omori *et al.*, 2006; Sayama *et al.*, 2006].

Interessanterweise wurde für ein eng verwandtes Mitglied der ADAM-Familie, ADAM17, bereits eine Regulation des Transportes und der Aktivität durch verschiedene Kinasen beschrieben, die auf eine direkte Phosphorylierung der zytosolischen Domäne zurück geht [Soond *et al.*, 2005; Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2011; Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Xu und Derynck, 2010]. Daher ist auch eine physiologisch relevante Phosphorylierung der ADAM10 C-terminalen Domäne durch MAP3K7 denkbar (Abb. 1.4.2. B).

1.5. Zielsetzung

Das erste Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Funktion der „A Disintegrin und Metalloprotease 10“ (ADAM10) in verschiedenen Organen. Aufgrund der embryonalen Letalität eines kompletten ADAM10-Knockouts, wurden hierzu organspezifische Knockout-Mausmodelle für eine Zellpopulation der Niere (Podozyten) bzw. der Leber (Lebervorläuferzellen, Hepatozyten und Cholangiozyten) generiert. Durch den Vergleich zwischen Kontroll- und Knockout-Tieren sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der Protease im jeweiligen Organ gezogen werden.

Das zweite Ziel der Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung potentieller Interaktionspartner von ADAM10, um die Regulation der Enzymaktivität besser zu verstehen. Hierzu wurden die Kandidatenproteine FKBP38 und MAP3K7 aus vorangegangenen Interaktions-Screens ausgewählt und einer genaueren Untersuchung unterzogen. Mit Hilfe der Überexpression oder des siRNA-vermittelten Knockdowns der Kandidatenproteine, sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der Interaktion für ADAM10 gezogen werden. Insbesondere sollten daraus Erkenntnisse gewonnen werden, inwiefern die ADAM10-Aktivität durch diese Proteine reguliert werden kann.



2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

1,10-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Seakem
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Aprotinin	Appllichem
Blue Mercox II Resin	Ladd Industries
bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Roth
Catalyst	Ladd Industries
DABCO	Calbiochem
Dinatrium-Hydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Drop-out Mix	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Roth
EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Fisher Scientific
Fluoromount G™	eBioscience
Glukose	Roth
Glycerol (87%)	Roth
Hefe nitrogen base w/o AS	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Roth
HEPES	BDH
Isopropanol	Roth

Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Kristallviolett	Applichem
Leupeptin	Applichem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Mowiol	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (NP-40)	Calbiochem
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Pepstatin	Applichem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Rotiphorese® Gel 30	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth
Tissue-Tek O.C.T.™ Compound	Sysmex
Tris	Roth
Triton-X100	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton	Sigma-Aldrich
Tween-20	Roth

2.1.2. Standardpuffer

1 x Tank Blot Puffer	25 mM Tris / HCl pH 8,3 0,2 M Glycin 20 % (v/v) Methanol
10 x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
10 x SDS-Gelelektrophoresepuffer	0,25 M Tris ungepuffert 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS
5 x Lämmli-Probenpuffer	625 mM Tris / HCl pH 6,8 5 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerol 500 mM DTT Spuren Bromphenolblau
50 x TAE-Puffer	2 M Tris / HCl pH 8,0 5,5 % (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA
ADAM10-Lysepuffer	5 mM Tris / HCl pH 7,4 1 mM EGTA 250 mM Saccharose 1 % (v/v) Triton X-100 2 x conc. Protease-Inhibitor
Biotinylierungslysepuffer	50 mM Tris / HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 0,1 % (w/v) SDS 1 x conc. Protease-Inhibitor

EBC-Lysepuffer	50 mM Tris / HCl pH 7,4 120 mM NaCl 0,5 % (v/v) Nonidet P-40 (NP-40) 1 x conc. Protease-Inhibitor
Hefe-Mangelmediumplatten	6,7 g/l Hefe nitrogen base w/o AS 2 g/l Drop-out Mix 20 g/l Glukose 20 g/l Agar-Agar
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7,0
PBS-CM	1x PBS 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂
Quenching-Lösung	50 mM Tris / HCl pH 8,0 in PBS-CM
RIPA-Puffer	50 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Nonidet P-40 (NP-40) 0,5 mM Natriumdesoxycholat 50 mM NaF 10 mg/l Aprotinin 10 mg/l Leupeptin 5 mg/l Pepstatin 1 mM PMSF 10 mM 1,10-Phenathrolin 1 mM Na ₃ VO ₄

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Stripping-Puffer	0,2 M Glycin pH 2,2 0,1 % (w/v) SDS 1 % (V/V) Tween-20
TBS/T	2,5 mM Tris / HCl pH 7,4 0,27 mM KCl 13,7 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween-20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris / HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS

2.1.3. Zellkultur-Medien, Zusätze, Wirkstoffe und Transfektionsreagenzien

ADAM10 Murine Stealth RNAi™	Life-Technologies
DAPT	Sigma-Aldrich
DMSO	Roth
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
EGF (murin)	Immunotools
FCS	Biochrom
GI254023X	Iris Biotech
Glutamin	Sigma-Aldrich
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies
HEPES	Life Technologies
HGF (murin)	Peprtech
Hygromycin	Invivogen
IGF-II (human)	Immunotools
Insulin (human)	Sigma-Aldrich
Interferin	HISS Diagnostics

Interferon γ	Peprotech
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Life Technologies
Negative Control Medium GC Duplex	Life-Technologies
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies
Polyethylenimin PEI _{max}	Polyscience
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)	Life Technologies
siGENOME™ Control Pool	GE Lifesciences
siGENOME™ Human MAP3K7 siRNA	GE Lifesciences
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich
TWEAK (human)	Peprotech
Williams E Medium	Sigma-Aldrich

2.1.4. Zelllinien

prokaryotische und Hefezelllinien		
<i>E. coli XL1-blue</i>	Bakterienzellen	Agilent Technologies
NMY51	Hefe-Reporterstamm	Dualsystems
Säugerzelllinien		
BMOL	murine Lebervorläuferzellen	[Tirnitz-Parker <i>et al.</i> , 2007]
EPZ	Undifferenzierte, murine Podozyten-ähnliche Zellen	[Schiwek <i>et al.</i> , 2004]
HeLa	immortalisierte Cervixkarzinom-Zellen	DMSZ
MEF ADAM10 ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten von ADAM10-Knockout-Mäusen	[Hartmann <i>et al.</i> , 2002]
MEF ADAM10 ^{+/+}	murine embryonale Fibroblasten von ADAM10-Wildtyp-Mäusen	[Hartmann <i>et al.</i> , 2002]
Flp-In™ 293 T-REx™ (T-REx)	zur stabil-Transfektion geeignete HEK-Zelllinie	Thermo Fisher
HAP1	Immortalisierte Fibroblasten-ähnliche Zelllinie: Kontrolle und FKBP38-Knockout ($\Delta f k b p 8$)	Horizon

2.1.5. Vektoren

pPR3-N NubG-X	Dual Membrane Systems
pcDNA3.1+	Life Technologies
pcDNA4/TO	Life Technologies
pcDNA5/FRT/TO	Life Technologies
pFrog3	modifizierter pcDNA3.1-Vektor [Gunther <i>et al.</i> , 1998]
peGFP-N1	Clontech Laboratories

2.1.6. Expressionsplasmide

hADAM10-Flag3 / pcDNA4/TO	während der Doktorarbeit kloniert
hMAP3K7-myc / pcDNA3.1 +	während der Doktorarbeit kloniert
mADAM10 / pcDNA 3.1 +	[Reiss <i>et al.</i> , 2005]
mADAM10 / pPR3-N NubG-X	[Prox <i>et al.</i> , 2012]
mFKBP38-myc / pcDNA5/FRT/TO	während der Doktorarbeit kloniert
mFKBP38-myc / pFrog3	während der Doktorarbeit kloniert
mFKBP38(Δ PPI)-myc / pcDNA5/FRT/TO	während der Doktorarbeit kloniert
mFKBP38(Δ PPI)-myc / pFrog3	während der Doktorarbeit kloniert

2.1.7. Mauslinien

ADAM10 flox/flox	129P2-Adam10tm2Psa/Ph	[Jorissen <i>et al.</i> , 2010]
Alfp-Cre	B6.Tg(Alb1-cre)7Gsc/Cnrm	[Kellendonk <i>et al.</i> , 2000]
Podo-Cre	B6.Cg-Tg(NPHS2-cre)295Lbh/J	[Moeller <i>et al.</i> , 2003]
Rosa-Stop-eYFP	6.129X1-Gt(ROSA)26 Sortm1(EYFP)Cos/J	[Srinivas <i>et al.</i> , 2001]

2.1.8. Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen und Puffer

10x BamHI-Puffer	Thermo Fisher Scientific
10x Puffer R	Thermo Fisher Scientific
HindIII (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
BamHI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
XhoI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
10x T4-DNA-Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific
6x Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
Dream Taq Polymerase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
Phusion High-Fidelity Polymerase (2 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
Hot Start Phusion Polymerase II (2 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
5x Phusion HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific
2 mM dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific

2.1.9. Größenstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

2.1.10. Primer für Genotypisierungen und Deletions-PCR

Tab. 2.1.1. Genotypisierungsprimer und Primer für Deletions-PCR.

PCR-Name	Primer (5' → 3')
ADAM10 Deletions-PCR	5' TACAACCATGCCAGCTTTTTAGT 5' GCCGATGTGCCAGATGAGTG
ADAM10-lox Genotypisierung	5' ATGGATTGCCCTTTTATGTATTTA 5' GCCGATGTGCCAGATGAGTG
Aflp-Cre Genotypisierung	5' CGAGTGATGAGGTTTCGCAAG 5' TGAGTGAACGAACCTGGTCG

Tab. 2.1.1. Genotypisierungsprimer und Primer für Deletions-PCR.

Globin-PCR	5' CCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG 5' CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG
Podo-Cre Genotypisierung	5' GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG 5' GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG
Rosa-Stop-eYFP Genotypisierung	5' AAGACCGCGAAGAGTTTGTG 5' AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
tTA Genotypisierung	5' CGCTGTGGGGCATTCTTACTTTAG 5' CATGTCCAGATCGAAATCGTC
tetO-Cre Genotypisierung	5' GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC 5' GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT

2.1.11. Klonierungsprimer

Tab. 2.1.2. Klonierungsprimer.

Im Falle eines eingebrachten myc-tags ist dessen Sequenz unterstrichen.

Name	Primer (5' → 3')	Zielvektor
ADAM10 (human)	5' GTCGTCAAGCTTATGGTGTGCTGAGAGTGTTA- ATTCTGC 5' GACGACCTCGAGGCGTCTCATGTGTCCC	pcDNA4/TO
FKBP38 (murin)	5' TGGTGGAAGCTTATGGCGTCTTGGGCTGAGCCC 5' TACTACGGATCCGTTCCCTGGCAGCAATGACCA- CAG	pFrog
FKBP38 (murin)	5' TGGTGGAAGCTTATGGCGTCTTGGGCTGAGCCC 5' TACTACGGATCCTCACAGATCCTCTTCTGAGATG- <u>AGTTTTTGTTCGTTCCCTGGCAGCAATGACCAC</u>	pcDNA5/ FRT/TO
FKBP38Δ (murin)	5' P-CTTGAGTGGGCGGCTAGAG 5' P-GATGGACCCGACCTGGAG	Mutagenese (Δ PPI)
MAP3K7 (human)	5' TGGTGGAAGCTTATGGCGTCTTGGGCTGAGCCC 5' TAGTAGCTCGAGCAGATCCTCTTCTGAGATGAG- <u>TTTTTGTTCGTTCCCTGGCAGCAATGACCAC</u>	pcDNA3.1

2.1.12. Primer für die quantitative RT-PCR

Tab. 2.1.3. QRT-PCR-Primer.

Gen	Spezies	Primer (5' → 3')	UPL-Sonde
ADAM10	human	5' ATATTACGGAACACGAGAAGCTG 5' TCAATCGCTTTAACATGACTGG	61
ADAM17	human	5' CCTTTCTGCGAGAGGGAAC 5' CACCTTGCAGGAGTTGTCAGT	78
APP	human	5' TTGCCCGAGATCCTGTAAA 5' TACTTGTCAACGGCATCAGG	66
Bace1	human	5' TTCATCAACGGCTCCAAC 5' CTCCAGGGAGTCGTCAGG	45
GAPDH	human	5' AGCCACATCGCTCAGACAC 5' GCCCAATACGACCAATCC	60
Hes1	human	5' GAAGCACCTCCGGAACCT 5' GTCACCTCGTTCATGCACTC	60
Hey1	human	5' CATA CGGCAGGAGGGAAAG 5' GCATCTAGTCCTTCAATGATGCT	29
Hey2	human	5' CCCGCCCTTGTCAGTATC 5' TTGTTTGTTCCTACTGCTGGT	73
MAP3K7	human	5' AACTCCATCCCAATGGCTTA 5' TTGGGCACGGTGCTAGAG	47
Notch1	human	5' CGGGGCTAACAAAGATATGC 5' CACCTTGGCGGTCTCGTA	52
ADAM10	murin	5' GGAAGAAATGCAAGCTGAA 5' CTGTACAGCAGGGTCCTTGAC	38
ADAM17	murin	5' TGTGGTTATTTAAATGCAGATAGTGA 5' TCACTCGACGAACAACTCTTC	38
Axin2	murin	5' GAGAGTGAGCGGCAGAGC 5' CGGCTGACTCGTTCTCCT	96
BSEP	murin	5' AGTGGCTGCTTTTGGTGGT 5' CAGCGCTGAGCAAACATAAG	10
CyclinD1	murin	5' TTTCTTTCCAGAGTCATCAAGTGT 5' TGA CTCCAGAAGGGCTTCAA	72
Fibronectin	murin	5' CGGAGAGAGTGCCCCTACTA 5' CGATATTGGTGAATCGCAGA	52
Hes1	murin	5' TGCCAGCATGATATAATGGAGAA 5' CCATGATAGGCTTTGATGACTTT	20

Tab. 2.1.3. QRT-PCR-Primer.

Hey1	murin	5' CATGAAGAGAGCTCACCCAGA 5' GAACACAGAGCCGAACTCAA	17
Hey2	murin	5' GTGGGGAGCGAGAACAATTA 5' GTTGTCGGTGAATTGGACCT	104
Jagged-1	murin	5' TGGCCGAGGTCCTACACTT 5' GCCTTTTCAATTATGCTATCAGG	22
Mdr2	murin	5' TTGAACTAGGCAGCATCAGC 5' AACAGTGTCAACAGGCCAATTA	13
Mrp2	murin	5' CAAATCCAATTCTCTACCTATGCAC 5' GCCTGCAGTGTGGATCA	92
Mrp3	murin	5' TCCGAAACTACGCACCAGAT 5' CTCATTTGCATTTTGCAAGG	79
Notch1	murin	5' CTGGACCCCATGGACATC 5' AGGATGACTGCACACATTGC	80
Notch2	murin	5' TGCCTGTTTGACAACCTTTGAGT 5' GTGGTCTGCACAGTATTTGTCAT	6
Oatp1b2	murin	5' CCCGTGACTAATCCAACAACA 5' GCTTCTCAGAGACCATAGAAAACC	51
Radixin	murin	5' ACCGAAACCCAGAAGAATGA 5' AGCTTGGGCTAATTCTGAACTC	1
RbpjK	murin	5' AGTCTTACGGAAARGAAAAACGA 5' CCAACCACTGCCATAAGAT	63
Tiam1	murin	5' GGAATATTTGATGACACTGTTCCA 5' GGTGGACACTGGGTAAGACC	7
Tubulin1a	murin	5' CTGGAACCCACGGTCATC 5' GTGGCCACGAGCATAGTTATT	88
β -Enolase	murin	5' CAGATCTTGCAGGCAATCC 5' CCGCCGTTGATCACATTA	98

2.1.13. Antikörper und Farbstoffe

Tab. 2.1.4. Primäre Antikörper, Farbstoffe und die eingesetzten Verdünnungen.

IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie, Kan. = Kaninchen, MS. = Meerschweinchen.

Ziel	Herkunft	Western Blot	IF/IHC	Nr.	Firma
ADAM10	Kan.	1:1000	1:100	GTX63486	GeneTex
Aktin	Kan.	1:2000	-	A2066	Sigma-Aldrich
APP	Kan.	1:5000	-	A8717	Sigma-Aldrich
CK19	Maus	-	1:500	Tromalll	DSHB
cMet	Maus	1:1000	-	#3127	Cell Signaling
CoxIV	Kan.	1:2000	-	Ab16056	Abcam
DAPI	-	-	5 µg/ml	32670	Sigma-Aldrich
ERK	Kan.	1:1000	-	#4695	Cell Signaling
FKBP38	Ziege	1:400	1:40	AF3580	R&D Systems
Flag	Maus	1:1000	-	F1804	Sigma Aldrich
GAPDH	Kan.	1:1000	-	Sc-25778	Santa Cruz
GFP	Kan.	1:1000	-	11814460001	Roche
GFP	Kan.	-	1:1000	Ab6556	Abcam
Gr1/Ly6G	Ratte	-	1:400	14-5931	eBioscience
Hoechst 33342		-	1:5000	H1399	Thermo Fisher
KDEL	Maus	-	1:300	ADI-SPA-827	Enzo
Ki67	Kan.	-	1:400	12202	Cell Signaling
Mitotracker (CMTM-Ros)	-	-	100 mM	M-7510	Life Technologies
Myc	Ziege	-	1:500	GTX30518	GeneTex
Myc	Maus	1:2500	1:500	#2276	Cell Signaling
N-Cadherin	Maus	1:2500	1:250	610921	BD Bioscience
Nephrin	MS.	-	1:100	BP5030	Acris
P-cMet	Kan.	1:1000	-	#3077	Cell Signaling
PDI	Kan.	1:500	-	Sc-20132	Santa Cruz
p-ERK	Kan.	1:1000	-	#4370	Cell Signaling

Tab. 2.1.4. Primäre Antikörper und Farbstoffe und die eingesetzten Verdünnungen.

Ziel	Herkunft	Western Blot	IF/IHC	Nr.	Firma
Synaptopodin	Kan.	-	1:100	Sc-50459	Santa Cruz
Transferrinrez.	Kan.	1:1000	-	Ab84036	Abcam
α Actinin4	Kan.	1:1000	1:100	0042-05	ImmunoGlobe
α SMA	Maus	-	1:400	M0851	Dako

Tab. 2.1.5. Sekundäre Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen.

VD = Verdünnung, IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie.

Ziel	Herkunft	VD	Nr.	Firma
IHC/IF				
Kaninchen (Alexa®488)	Esel	1:300	A21206	Thermo Fisher
Maus (Alexa®594)	Esel	1:300	A21203	Thermo Fisher
Ratte (Alexa®488)	Esel	1:200	712-546-153	Jackson ImmunoRes.
Ziege (Alexa®647)	Esel	1:300	A21447	Thermo Fisher
Western Blot				
Kaninchen (POD)	Ziege	1:15000	112-035-143	Dianova
Maus (POD)	Schaf	1:15000	525-035-062	Dianova
Meerschweinchen (POD)	Esel	1:15000	706-166-148	Dianova
Ziege (POD)	Kan.	1:15000	111-035-144	Dianova

2.1.14. Kits

DirectPCR® Lysis Reagent Tail-Kit	Peqlab
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
High Pure PCR Product Purification Kit	Thermo Fisher Scientific
Lumigen® ECL Ultra (TMA-6)	Lumigen Inc.
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific

PureYield™ Plasmid Midiprep Kit	Promega
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
Total Bile Acids Assay Kit	Diazyme
Universal Probe Library (UPL), murin	Roche
VECTASTAIN Elite ABC Kit	Biozol
Flp-In™ T-REx™ Core Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.15. Restliche Materialien

cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Dynabeads® Protein G	Life Technologies
High Capacity Streptavidin Agarose	Thermo Fisher Scientific
Ketamin	HFW
Normales Pferdeserum	Vector Laboratories
NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gele	Life Technologies
Pierce™ Protein G Agarose	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K, rekombinant, PCR grade	Roche
Rompun	Bayer
Multistix® 10SG	Siemens

2.1.16. Geräte

96Well-Platten Lesegerät	Synergy HT	BioTek
Agarosegel Kammer	Modell H5	Bethesda Research Laboratories
Chemilumineszenzdetektor	ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare
Digitalkamera	SC30	Olympus
Elektroporator	Gene Pulser™ Pulse Controller™	BioRad
ELISA-Plattenlesegerät	EL808	Biotek
Feinwaage	Kern 770	Kern
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss

Heizschüttler	Mixer® Comfort	Eppendorf
Hochgeschwindigkeits-schüttler	Vortex Genie	Bender & Hobein
Homogenisator	Precellys® 24	VWR
Inkubator	HERAcell® 240	Heraeus
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	FV1000	Olympus
Kühlzentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA
PCR-Cycler	Gene Amp ® PCR System 2400	Perkin-Elmer
pH-Meter	Digital pH-Meter 646	Krick
Plattenlesegerät	Bio-Plex® 200	BioRad
qRT-PCR Cycler	Light Cycler ®480 II	Roche
Rollenmischer	Rollenmischer RM5	CAT
SDS-Gelelektrophorese Kammern	MiniProteanII™ XCell SureLock™ Mini Cell	BioRad Life Technologies
Spannungsquelle	Power Pac 200 bzw. 300	BioRad
Stereomikroskop	CKX41	Olympus
Sterilbank	VFR1606	danLAF
Teststreifenlesegerät	Reflotron® Plus	Roche Bioscience
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson
UV-Detektor	Gel Jet Imager UV System	Intas
UV-Tisch	Reprostar	Lamag
Waage	L420P	Sartorius
Wasserbad	1083	GFL
Wasserreinigungsanlage	MiiliQ® Plus	Millipore
Western Blot Kammer	Criterion™ Blotter	BioRad

2.2. Methoden

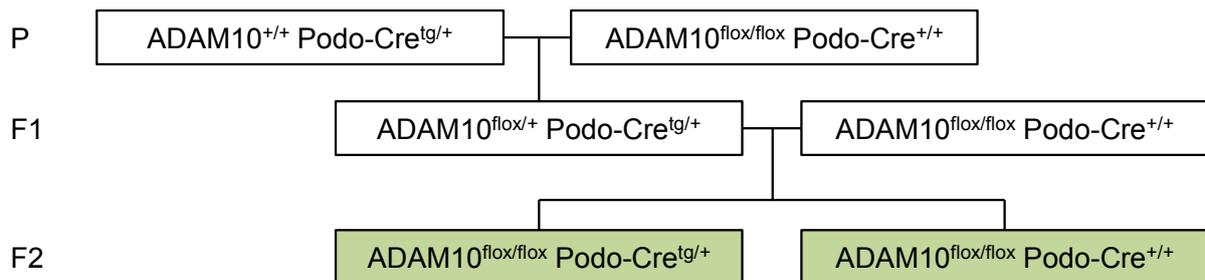
2.2.1. Tierzucht und -experimente

2.2.1.1. Maushaltung und Genotypisierung

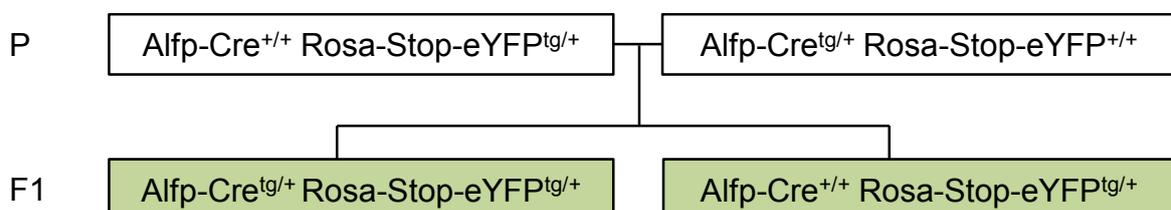
Die Tierhaltung erfolgte entsprechend der Richtlinien des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein. Die Tiere waren in einer IVC-Käfighaltung (*isolated ventilated cage*) bei 22°C unter kontrollierter Hygienebedingungen (SPF, *specified pathogen free*) untergebracht. Die Tiere unterlagen einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und erhielten Standardfutter der Firma Ssniff und Wasser ad libitum.

Die Tiere wurden im Alter von drei Wochen entwöhnt und frühestens im Alter von zehn Wochen miteinander verpaart. Dabei wurde nach folgenden Verpaarungsschemata vorgegangen. Farblich hervorgehobene Mäuse wurden zur Analyse verwendet.

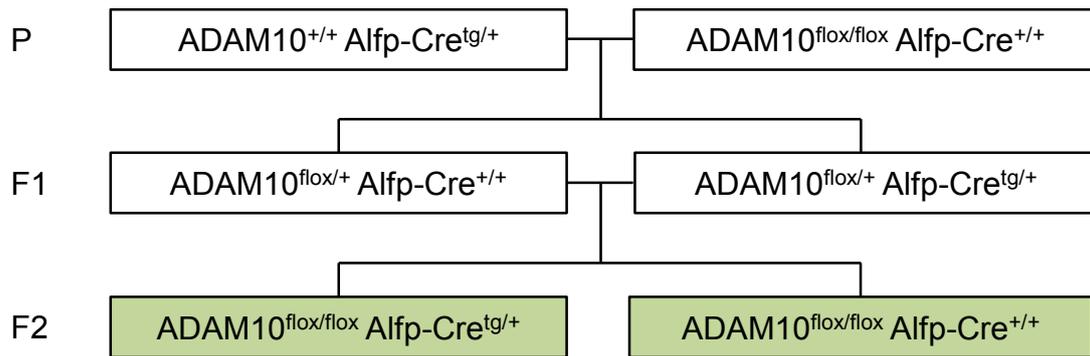
ADAM10^{flox/flox} Podo-Cre^{tg/+} Mäuse



Cre-Reportermause: Rosa-Stop-eYFP^{tg/+} Alfp-Cre^{tg/+} Mäuse



ADAM10^{flox/flox} Alfp-Cre^{tg/+} Mäuse



Zur Genotypisierung der Mäuse wurden im Alter von 3-4 Wochen Schwanzbiopsien genommen. Die DNA wurde nach dem Protokoll des DirectPCR® Lysis Reagent Tail-Kits aufgereinigt und Genotypisierungs-PCRs entsprechend der erwarteten Transgene nach nachfolgenden Protokollen durchgeführt. Die PCR-Proben wurden anschließend in einem 2 % Agarosegel mit 333 ng/ml Ethidiumbromid bei 120 V für 25 min aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Als Größenstandard diente der GeneRuler 100 bp Plus.

Tab. 2.2.1. Pipettierschemata der Genotypisierungs-PCRs.

	lox	Podo-Cre	Alfp-Cre	Rosa-Stop-eYFP
DNA-Probe	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
10 x Dream Taq Puffer	5 µl	5 µl	3 µl	3 µl
2 mM dNTP-Mix	5 µl	5 µl	3 µl	3 µl
Primer, jeweils	1 µl	2,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Dream Taq Pol.	0,5 µl	0,75 µl	0,2 µl	0,2 µl
Wasser	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 30 µl	ad 30 µl

Tab. 2.2.2. PCR-Protokolle der Genotypisierungs-PCRs.

	Lox			Podo-Cre			Alfp-Cre	
Initiale Denaturierung	5 ‘	95 °C	30 x	3 ‘	94 °C	30 x	2 ‘	95 °C
Denaturierung	30 “	95 °C		45 “	94 °C		30 “	95 °C
Anlagerung	30 “	56 °C		45 “	51 °C		30 “	56 °C
Verlängerung	30 “	72 °C		1 ‘	72 °C		30 “	72 °C
finale Verlängerung	3 ‘	72 °C		8 ‘	72 °C		10 ‘	72 °C
Ende	∞	10 °C		∞	10 °C		∞	4 °C

Tab. 2.2.2. PCR-Protokolle der Genotypisierungs-PCRs.

	Rosa-Stop-eYFP	
Initiale Denaturierung	2 ‘	95 °C
Denaturierung	30 “	95 °C
Anlagerung	30 “	57 °C
Verlängerung	30 “	72 °C
finale Verlängerung	10 ‘	72 °C
Ende	∞	4 °C

2.2.1.2. Induktion des Nephritis Modells

Die Untersuchung der transgenen Tiere der Podo-Cre-Linie unter Krankheitsbedingungen erfolgte durch Dr. Catherine Meyer-Schwesinger (Abteilung für Innere Medizin, Nephrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Tierversuchsantrag Nr. 13/002). Die zur Induktion der Erkrankung verwendeten Antikörper wurden durch Fällung der IgG-Fraktion aus dem Schafserum, vor und nach der Immunisierung mit Podozyten, gewonnen [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Die Nephritis wurde durch einmalige intraperitoneale Injektion von 250 µl APN-Antikörper ausgelöst. Als Kontrolle diente die Injektion von präimmun-Antikörpern.

Zur nicht-invasiven Untersuchung des Fortschreitens der Nephritis wurde der Urin der Tiere gesammelt. Hierzu wurden die Mäuse 5-6 h in einem metabolischen Käfig unter freiem Zugang zu Wasser gehalten. Die Urinproben wurden bis zur Verwendung auf -20 °C gelagert.

14 Tage nach der Behandlung der Tiere zur Induktion der Nephritis wurden diese zur weiteren Untersuchung präpariert.

2.2.1.3. Präparation der Tiere und Probenisolation

Die transgenen Mäuse der Alfp-Cre-Linie wurden mittels intraperitonealer Injektion von 10 mg/ml Ketamin, 6 mg/ml Rompun in PBS euthanasiert. Danach wurden sie einer finalen Blutentnahme unterzogen. Anschließend wurden die Mäuse über die rechte Herzkammer mit eiskaltem PBS perfundiert und Leber, Milz und die Nieren entnommen. Ein Teil der Gewebeproben wurde einer Paraffineinbettung unterzogen. Die übrigen Proben wurden schockgefroren und auf -80 °C gelagert.

Die transgenen Mäuse der Podo-Cre-Linie wurden mittels einer Isofluran Begasungsanlage unter ständiger O₂-Zufuhr euthanasiert. Danach wurden die Tiere über die Aorta mit PBS und mit Magnetbeads in PBS perfundiert. Die Magnetbeads (450 µm) wurden so gewählt, dass sie sich im Kapillarkonvolut der Glomeruli anreichern. Die Nieren wurden entnommen und die Nierenkapsel entfernt. Etwa 1,5 Nieren dienen der Anreicherung von Glomeruli aus dem Gewebe. Das übrige Material wurde zum Teil für Histologie aufbereitet und zum anderen Teil schockgefroren und auf -80 °C gelagert.

Zur Gewinnung der Glomeruli wurden die Nieren grob zerkleinert, in 1 mg/ml Collagenase, 100 U/ml DNase in HBSS aufgenommen und 35 min bei 37 °C unter Schütteln bei 1200 rpm verdaut. Nach dem Verdau wurde unvollständig aufgeschlossenes Material durch das Passagieren über ein 100 µM Sieb abgetrennt. Das Zellmaterial aus dem Filtrat wurde 5 min bei 200 x g und 4 °C pelletiert und mehrfach in HBSS gewaschen. Hierbei erfolgte die Sedimentation über ein Magnetfeld, so dass Glomeruli-fremde Zellen abgereichert wurden. Die Qualität der Präparation wurde mikroskopisch überprüft und die sedimentierten Probe (5 min, 210 x g, 4 °C) auf -80 °C gelagert.

2.2.1.4. Bestimmung der Urinparameter

Die Untersuchung des abgenommenen Urins auf Proteinurie erfolgte über zwei unabhängige Methoden. Zum einen erfolgte die grobe Bestimmung des Albumingehalts im Urin mittels Multstix 10 SG Teststreifen nach Herstellerprotokoll.

Zur genaueren Bestimmung der Proteinurie wurden die Albumin- und Creatinin-Werte im Urin bestimmt. Die Ermittlung der Albuminwerte erfolgte nach Herstellerangaben des Mouse Albumin ELISA Quantitation Set (Bethyl). Die Messung erfolgte in einem ELISA-Plattenlesegerät bei 450 nm. Die Creatinin-Werte wurden nach klinischer Standardmethode für Patienten ermittelt.

2.2.1.5. Isolation des Blutserums und Bestimmung von Serumparametern

Entnommenes Blut wurde in heparinisierte Röhrchen (25 U Heparin/ ml Blut) überführt. Nach Sedimentation der Blutzellen (10 min, 2000 x g, Raumtemperatur) wurde das Serum abgenommen und auf -20 °C gelagert.

Die Bestimmung der Serumkonzentration der Alanin-Transaminase und der alkalischen Phosphatase erfolgte über Reflotron® Teststreifen an einem Reflotron® Plus System. Die Serumwerte des löslichen cMet-Rezeptors (scMet) wurden über einen Bio-Plex® *mouse array* mit einem Bio-Plex® 200-System bestimmt. Die Bestimmung der Gallensäuren im Serum erfolgte mit Hilfe des Total Bile Acids Assay Kits (Diazyme) nach Herstellerangaben. Die Messung erfolgte in einem 96Well-Platten Lesegerät bei 405 nm.

2.2.1.6. Gallengangsplastination

Zur Visualisierung der Gallengänge wurden die Mäuse mit 10 mg/ml Ketamin, 6 mg/ml Rompun in PBS euthanasiert. Der Hauptgallengang wurde dargestellt und die Gallengänge über diesen mit PBS gewaschen. Eine Lösung von 10 % (w/v) Catalyst in Liquid Mercox II wurde über den Hauptgallengang injiziert und

dieser dann verschlossen. Die Lösung wurde 10 min zur Polymerisation belassen. Danach wurde die Leber entnommen und das umgebende Gewebe mit 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS, 0,3 mg/ml Proteinase K in 100 mM Tris-HCl pH 8,5 verdaut. Die plastinierten Gallengangsbäume wurden in Wasser gewaschen, anschließend getrocknet und schließlich mit einem Mikroskop visualisiert.

2.2.2. Generierung von Expressionsplasmiden

2.2.2.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

E. coli XL1-blue wurden in einer Übernackkultur in LB-Medium mit 20 µg/ml Tetracyclin angezogen. Am nächsten Tag wurde ein 1 l Ansatzes mit der Vorkultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5-0,6 kultiviert. Die Zellen wurden 15 min bei 2400 x g, 4 °C pelletiert und mehrfach mit eiskaltem, bidestilliertem Wasser und anschließend mit 10 % (v/v) Glycerol gewaschen. Die Zellpellets wurden in 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert, aliquotiert und bis zur Verwendung auf -80 °C gelagert.

2.2.2.2. Klonierung von Expressionsplasmiden

Zur Identifikation der potentiellen Interaktionspartner von ADAM10 über den *HEK-Screen* (Vergleiche Abschnitt 2.2.4.2.) wurde im Zuge der Arbeit ein humanes ADAM10-Expressionsplasmid generiert. Da im Rahmen des Screens eine Präzipitation nötig war, wurde hierzu ein C-terminaler dreifacher Flag-*tag* angefügt (hADAM10-Flag₃). Das PCR-Produkt wurde über einen Restriktionsverdau in den pcDNA4/TO-Vektor integriert.

Zur Untersuchung eines möglichen Effektes auf ADAM10 wurde murines FKBP38 in einen modifizierten pcDNA3.1-Vektor kloniert (pFrog3). Humanes MAP3K7 wurde in den pcDNA3.1-Vektor integriert Da zu Beginn der Untersuchung kein spezifischer Antikörper gegen FKBP38 und hMAP3K7 vorlag, wurde zum Nachweis der Proteine ein C-terminaler myc-*tag* angebracht (FKBP38-myc bzw. hMAP3K7-myc).

Tab. 2.2.3. Pipettierschema der Klonierungs-PCRs.

DNA-Probe	0,5 µl
5 x Phusion Puffer HF	10 µl
2 mM dNTP-Mix	5 µl
Primer, jeweils	2,5 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
Wasser	<i>ad</i> 50 µl

Tab. 2.2.4. PCR-Protokolle der Klonierungs-PCRs.

	hADAM10- Flag ₃			FKBP38-myc			hMAP3K7- myc	
Initiale Denaturierung	30 "	98 °C	30 x	30 "	98 °C	30 x	30 "	98 °C
Denaturierung	15 "	98 °C		15 "	98 °C		15 "	98 °C
Anlagerung	30 "	66 °C		30 "	68 °C		30 "	52 °C
Verlängerung	1 '	72 °C		35 "	72 °C		55 "	72 °C
finale Verlängerung	10 '	72 °C		10 '	72 °C		10 '	72 °C
Ende	∞	10 °C		∞	10 °C		∞	10 °C

Die entsprechende DNA wurde initial mit einer PCR amplifiziert, wobei die gewünschten Restriktionsschnittstellen über die Primer eingefügt wurden. Die DNA für hADAM10 und FKBP38 wurde aus Vektoren amplifiziert. Die hMAP3K7-DNA wurde über eine cDNA-Synthese aus HeLa-Zellen gewonnen.

Die PCR-Amplikons wurden in einem 2 % Agarosegel mit 333 ng/ml Ethidiumbromid aufgereinigt und der Zielvektor und das PCR-Amplikon danach für 2 h bei 37 °C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Nach erneuter Aufreinigung der Fragmente über das High Pure PCR Product Purification Kit wurden diese 1 h bei Raumtemperatur ligiert. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde die Ligase anschließend für 20 min bei 65 °C von der DNA abgelöst.

Tab. 2.2.5. Pipettierschema der Ligasereaktion.

Vektor	50-100 ng
Amplikon	2:1 bis 4:1 Verhältnis zum Vektor
10 x T4 DNA-Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl

1 µl der ligierten Konstrukte wurden per Elektroporation bei 2,5 kV in elektrokompetente *E. coli XL1-blue* transformiert. Die Zellen wurden 30 min in LB-Medium inkubiert und zur Selektion positiver Transformanden anschließend auf Antibiotikum-versetzten Agar-Platten bei 37 °C kultiviert.

2.2.2.3. Generierung der FKBP38-Mutante FKBP38(ΔPPI)-myc

Um die Bedeutung der Aktivität von FKBP38 auf eine potentielle Interaktion und deren Effekt auf ADAM10 zu untersuchen, wurde aus dem ursprünglichen FKBP38-myc-Konstrukt eine Mutante generiert, in der die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Domäne deletiert wurde (FKBP38(ΔPPI)-myc). Hierzu wurde eine gerichtete Deletion nach dem Protokoll der *Phusion site-directed mutagenesis* durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung über ein 2 % Agarosegel mit 333 ng/ml Ethidiumbromid direkt in *E. coli XL1-blue* transformiert und zur Selektion auf eine Agar-Platte überführt.

Tab. 2.2.6. Pipettierschema der Mutagenese-PCR.

DNA-Probe	1 µl
5 x Phusion Puffer HF	10 µl
2 mM dNTP-Mix	5 µl
Primer, jeweils	2,5 µl
Hot Start Phusion Polymerase II	0,5 µl
Wasser	ad 50 µl

Tab. 2.2.7. PCR-Protokoll der Mutagenese-PCR.

	FKBP38(ΔPPI)-myc	
Initiale Denaturierung	30 "	98 °C
Denaturierung	10 "	98 °C
Anlagerung	30 "	67 °C
Verlängerung	3 ' 30 "	72 °C
finale Verlängerung	10 '	72 °C
Ende	∞	10 °C

25 x

2.2.2.4. Generierung induzierbarer Konstrukte von FKBP38 und der FKBP38-Mutante

FKBP38 und die PPI-defiziente Mutante wurden in das Plasmid pcDNA5.1frt/TO kloniert. Über die Applikation von Doxycyclin kann die Expression des kodierten Proteins von diesem Plasmid induziert werden, wobei nicht-induzierte Zellen als interne Kontrolle dienen (Vergleiche Abschnitt 2.2.3.5.).

Nach der Klonierungs-PCR wurde mit der Restriktion, Ligation und Transformation der Konstrukte wie unter Abschnitt 2.2.2.2. beschriebenen fortgeföhren.

Tab. 2.2.8. Pipettierschema der Klonierungs-PCR der induzierbaren Konstrukte.

DNA-Probe	0,5 µl
5 x Phusion Puffer HF	10 µl
2 mM dNTP-Mix	5 µl
Primer, jeweils	2,5 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
Wasser	ad 50 µl

Tab. 2.2.9. PCR-Protokoll der Klonierung induzierbarer Konstrukte

	FKBP38-myc		FKBP38(ΔPPI)-myc	
Initiale Denaturierung	30 "	98 °C	30 "	98 °C
Denaturierung	15 "	98 °C	15 "	98 °C
Anlagerung	30 "	66 °C	30 "	66 °C
Verlängerung	35 "	72 °C	30 "	72 °C
finale Verlängerung	10 '	72 °C	10 '	72 °C
Ende	∞	10 °C	∞	10 °C

2.2.2.5. DNA-Vervielfältigung, Aufreinigung und Sequenzierung

Zur Vervielfältigung der DNA der Expressionsplasmide wurden 5 ml bzw. 150 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit Einzelklonen von den Agar-Platten angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37 °C unter ständiger Bewegung kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte und Isolation der

DNA entsprechend der Herstellerprotokolle der verwendeten DNA Aufreinigungskits (GeneJET Plasmid Miniprep Kit bzw. PureYield™ Plasmid Midiprep Kit).

Die Überprüfung der korrekten Sequenz der generierten Expressionsvektoren erfolgte mittels einer Sanger-Sequenzierung durch die Firma GATC.

2.2.3. Zellkulturexperimente

2.2.3.1. Kultivierung von Säugerzellen

EPZ-Zellen (undifferenzierte, murine Podozyten-ähnliche Zelllinie) wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptidin, 1 mM Natriumpyruvat und 15 mM HEPES kultiviert. Durch die Wahl der Kulturbedingungen mit 33 °C und 5 % CO₂ unter Zugabe von 10 U/ml Interferon γ wurden die EPZ im undifferenzierte Zustand erhalten. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend durch Trypsinierung abgelöst und auf neue Zellkulturflaschen ausgesät. Zur Differenzierung der EPZ wurden die Kulturbedingungen auf 37 °C und 7,4 % CO₂ ohne Interferon γ geändert. Die Zellen wurden vor der experimentellen Verwendung über mindestens 2 Wochen kultiviert und ab diesem Zeitpunkt maximal bis zu einer Konfluenz von 80-90% belassen. Zudem erfolgte alle 48-72 h ein Mediumwechsel. Ebenso wurden die ausdifferenzierten EPZ behandelt.

BMOL Zellen (*bipotential murine oval liver*) wurden in William's E Medium mit 2 % FCS, 2 mM Glutamine, 15 ng/ml IGF-II, 10 ng/ml EGF, 5 μ g/ml Insulin bis zu 90 %-iger Konfluenz angezogen. HAP1-Zellen wurden in IMDM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptidin bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Die übrigen Zelllinien (MEFs, HeLa, HEK, Flp-In™ 293 T-REx™) wurden in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptidin bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Die Kulturbedingungen waren jeweils 37 °C und 7,4 % CO₂. Zur Passagierung wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst und neu ausgesät.

2.2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurden diese als Aliquots eingefroren. Dazu wurde eine konfluente Zellkulturschale trypsinisiert und die abgelösten Zellen in Medium abgenommen. Nach Sedimentation der Zellen bei 210 x g und Raumtemperatur für 5 min wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen (DMEM + 20 % FCS und 1 % Penicillin/Streptidin + 10% DMSO) und auf -80 °C eingefroren. Nach 48 h erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Zur Reaktivierung eingefrorener Zellaliquots wurden diese zügig aufgetaut und dem jeweiligen Standardkulturmedium gewaschen. Die Zellen auf Platten ausgesät und vor der experimentellen Verwendung mindestens drei Mal passagiert.

2.2.3.3. Zellernte

Zur Zellernte wurde das Medium auf den Zellschalen verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Zellschabers bei 4 °C von den Zellschalen abgelöst, in Reagiergefäße überführt und 10 min, 900 x g bei 4 °C sedimentiert. Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung auf -20 °C gelagert.

2.2.3.4. Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Um die Effekte der Überexpression ausgewählter Proteine zu untersuchen, wurden die entsprechenden Konstrukte transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte 24 h nachdem die Zellen ausgesät wurden. In einem Reagiergefäß wurden 4 µg Plasmid-DNA in pures DMEM-Medium gegeben. Durch Zugabe des Transfektionsreagenzes (1 mg/ml Polyethylenimin; 3 µl / µg DNA im Ansatz) wurde die Ausbildung des Transfektionskomplexes für 20 min bei Raumtemperatur initiiert. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben, nach 7-8 h erfolgte ein Mediumwechsel um toxischen Langzeiteffekten des Transfektionsreagenzes vorzubeugen. Die Zellen wurden bis zur Ernte (je nach Fragestellung nach weiteren 48-72 h) unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Angleichung der transfizierten

DNA-Mengen an z.B. eine Doppeltransfektion erfolgte die Kotransfektion eines Leervektors (pcDNA3.1).

2.2.3.5. Stabile Transfektion in T-REx Zellen und Expressionsinduktion

Die Untersuchung der Proteine erfolgte zum Teil in der Flp-In™ 293 T-REx™ Zelllinie (T-REx, Zelllinie geeignet zur Expression von Proteinen vom Flp-In™-Vektor). Um Schwankungen der Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Experimenten auszuschließen, wurde in diesen eine stabile Transfektion eines Doxycyclin induzierbaren Expressionsplasmids durchgeführt (Flp-In™ T-REx™ Core Kit, Thermo Fisher Scientific). Dazu wurden analog der transienten Transfektion vorgegangen, jedoch 10 µg des entsprechenden Konstruktes transfiziert. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe geeigneter Antibiotika (100 µg/ml Hygromycin) unter Standardbedingung kultiviert, um über den Selektionsdruck nicht transfizierte Zellen abzutöten. Um die Überexpression der kodierten Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Dann wurde die Expression des Konstruktes durch Zugabe von 10 µg/ml Doxycyclin zum Medium für 24-48 h induziert und die Zellen danach zur weiteren Analyse geerntet. Nicht induzierte Zellen dienten als Kontrolle, da sie über den identischen Genpool wie die induzierten Zellen verfügten.

2.2.3.6. siRNA-vermittelter knockdown von Proteinen

Zur Abschätzung der Funktion der untersuchten Proteine (murines ADAM10 in BMOL-Zellen, humanes MAP3K7 und humanes FKBP38 in HeLa-Zellen) wurden nicht nur Überexpressionsstudien durchgeführt, sondern auch *knockdown*-Studien. Hierzu wurde auf einen siRNA-vermittelten *knockdown* der das Protein kodierenden mRNA zurückgegriffen. Dazu wurde ein Transfektionsansatz aus 50 pmol der gerichteten bzw. Kontroll-siRNA und 5 µl Transfektionsreagenz (Interferin) in purem DMEM vorbereitet und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz in die Schalen gegeben und die Zellen darauf ausgesät.

Nach 48 h wurde die siRNA-Transfektion wiederholt. 96 h nach der ersten siRNA-Transfektion wurden die Zellen zur weiteren Analyse geerntet.

2.2.3.7. Stimulation von BMOL-Zellen

Zur Untersuchung der Funktion von ADAM10 in BMOL-Zellen erfolgte ein siRNA-vermittelter *ADAM10-knockdown*. 72 h nach der ersten Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Hungermedium (William's E Medium mit 0,5 % FCS, 1 mM Glutamine, 7,5 ng/ml IGF-II, 5 ng/ml EGF, 2.5 µg/ml Insulin) kultiviert. Die Zellen wurden 15 min mit 20 ng/ml HGF bzw. 50 ng/ml TWEAK in Hungermedium stimuliert und anschließend geerntet.

2.2.3.8. Anti-Podozyten Nephritis (APN)-Modell in der Podozyten-ähnlichen Zelllinie EPZ

Zur Untersuchung der EPZ-Zelllinie im APN-Modell wurden die Zellen bis zur Konfluenz von 70 % kultiviert. Die Zellen wurden 24 h mit der jeweils angegebenen Mengen präimmun- bzw. APN-Antikörper behandelt und anschließend geerntet. Um den Beitrag von ADAM10 zur podozytäre Schädigung zu analysieren wurde über den gesamten Zeitraum der APN-Stimulation eine mit 2 µM GI254023X versetzte Kontrollprobe mitgeführt. Falls angegeben, wurde zur besseren Darstellung ADAM10-generierter Fragmente über das gesamte Experiment 1 µM des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT zugegeben. Als Postivkontrolle der Proteolyse diente eine Stimulation von ADAM10 mit 5 µM Ionomycin 30 min vor der Ernte.

2.2.3.9. Adhäsionsassay in der Podozyten-ähnlichen Zelllinie EPZ

Die EPZ-Zellen wurden mittels Trypsinierung abgelöst und zur Regeneration der Oberflächen-exprimierten Moleküle anschließend 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. $3 \cdot 10^4$ Zellen wurden pro Well einer 96 Well-Platte ausgesät und über den Zeitraum von 24 h mit den angegebenen Mengen an APN- bzw. präimmun-

Antikörper und DMSO bzw. GI254023X unter Standardbedingungen behandelt. 23 h nach Aussaat der Zellen wurde Kontrollproben mit 5 μ M Ionomycin behandelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 50 μ l Kristallviolett-Lösung (0,5 % (w/v) Kristallviolett in 20 % (v/v) Methanol) je Well für 5 min bei Raumtemperatur gefärbt. Durch mehrmaliges Waschen mit PBS wurden nicht adhärierende Zellen entfernt. Über Nacht erfolgte die Lyse in 100 % Isopropanol bei Raumtemperatur. Die Messung der adhärierenden Zellen erfolgte durch Bestimmung der Extinktion bei 562 nm (6 Replikate je Behandlung).

2.2.4. Interaktions-Screens

2.2.4.1. *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System*

Der *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-Screen* wurde durch Dr. Johannes Prox (AG Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Murines ADAM10 lag C-terminal mit einer Cub-LexA-VP16 Kasette fusioniert in einem Hefe-Expressionsvektor (pTMBV4) vor und wurde als bait-Protein eingesetzt. Die Expression des *bait*-Konstruktes in NMY51 Hefe wurde über die Herstellerkontrollen Nubl und NubG überprüft. Die Hefe wurde zusätzlich mit einer N-terminal NubG-fusionierten murinen Hirn-cDNA-Datenbank (MoBiTek) transfiziert. Die verschiedene Hefetransformanden wurden 3-5 Tage bei 30 °C auf Mangelmedium hinsichtlich der Expression (Leu- und Trp-Mangelmedium) und der Interaktion (Leu-, Trp- und His-Mangelmedium) überprüft [Prox, 2012]. Die DNA aus positiven Klonen wurden isoliert und sequenziert. Zur Bestätigung des *Screens* wurden die positiven Klone gezielt in Einzeltests auf Expression und Interaktion in NMY51 überprüft.

2.2.4.2. HEK-Screen

Der HEK-Screen auf Interaktionspartner von ADAM10 wurde Dr. Stefanie Jäger (Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco, USA) wie vorher beschrieben durchgeführt [Jager *et al.*, 2012]. ADAM10

wurde hierzu mit einem dreifachen C-terminalen Flag-*tag* kloniert und in HEK-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Proben einer Affinitätsreinigung über den Flag-*tag* unterzogen. Die Proteinproben wurden an einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer analysiert. Anschließend erfolgte eine bioinformatische Wichtung der identifizierten Proteine als möglicher Interaktionspartner von ADAM10 über die Berechnung des *MiST*-Scores (*Mass Spectrometry Interaction Statistics*) [Jager *et al.*, 2012].

2.2.5. Probenaufarbeitung und -analyse

2.2.5.1. Nachweis der Deletion des ADAM10 Exon 2 auf DNA-Ebene

Die DNA der Gewebeproben wurde entsprechend des Protokolls des DirectPCR® Lysis Reagent Tail-Kits aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA einer Deletions-PCRs unterzogen. Die PCR-Proben wurden in einem 2 % Agarosegel mit 333 ng/ml Ethidiumbromid bei 120 V für 20 min aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Als Größenstandard diente der GeneRuler 1 kb.

Tab. 2.2.10. Pipettierschema der Deletions-PCR.

DNA-Probe	1 µl
10 x Dream Taq Puffer	5 µl
2 mM dNTP-Mix	5 µl
Primer, jeweils	1 µl
Dream Taq Polymerase	0,5 µl
Wasser	<i>ad</i> 50 µl

Tab. 2.2.11. PCR-Protokoll der Deletions-PCR.

Initiale Denaturierung	2 ‘	95 °C	30 x
Denaturierung	30 “	95 °C	
Anlagerung	30 “	61 °C	
Verlängerung	3 ‘	72 °C	
finale Verlängerung	10 ‘	72 °C	
Ende	∞	10 °C	

2.2.5.2. Paraffineinbettung von Gewebeproben

Zur Paraffineinbettung wurden die Gewebeproben über Nacht in 4 % Formaldehyd in PBS bei 4 °C fixiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach mehrfachem Waschen mit bidestilliertem Wasser wurden die fixierten Proben über Nacht in 50 % Ethanol inkubiert. Dann wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Xylol überführt. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Proben in Paraffin, welches am nächsten Tag erneuert wurde. Die Proben wurden in Paraffinblöcke gegossen und nach dem Aushärten bis zur Verwendung für die Immunhistochemie bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.3. Immunhistochemie von Gewebsschnitten

Zur Immunhistochemie wurden 4 µm Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt und anschließend entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Mittels eines Citrat- (10 mM Zitronensäure, 0,05 % Tween-20, pH 6,0) oder eines EDTA-Puffers (1 mM EDTA, 0,05 % Tween-20, pH 8,0) wurde eine Antigendemaskierung vorgenommen, um den Verlust von Antigenen aufgrund der Vernetzung durch das Fixativs zu reduzieren.

Hämatoylin-Eosin-, Siriusrot- und PAS-Färbungen (Periodic Acid-Schiff Färbung) wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Zur Anfärbung spezifischer Marker und Proteine in den Gewebsschnitten wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Der Färbung entsprechend des DAB-Färbekits (VECTASTAIN Elite ABC Kit) erfolgte über biotinylierte Sekundärantikörper unter Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Alternativ wurden sekundäre Fluoreszenzantikörper eingesetzt und Zellkerne mit Hoechst 33342 gegengefärbt.

Nekrotische Regionen wurden aus zehn unabhängigen Bildern pro Tier (10-fache Vergrößerung) mittels der Software ImageJ quantifiziert.

2.2.5.4. Anfertigen von Gefrierschnitten

Zur Färbung von Nierenschnitten gegen ADAM10 wurden die Nierenproben in Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T.™ Compound) bei -80 °C eingefroren.

5 µm dicke Schnitte der Proben wurden luftgetrocknet und mit 4 % PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Proben mit 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung 7 min permeabilisiert. Die Gewebsschnitte wurden 30 min in 5 % normalem Pferdeserum, 0,05 % Triton X-100 in PBS (Blockierlösung) blockiert und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in Blockierlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung inkubiert. Die Zellkerne des Präparats wurden 5 min mit draq5 gegengefärbt und das Präparat in Fluoromount G eingebettet. Bis zur Dokumentation an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) wurden die Proben auf 4 °C gelagert.

2.2.5.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Analyse von Gewebeproben mittels Elektronenmikroskopie erfolgte durch Dr. Renate Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Deutschland). Das entnommene Gewebe wurde in 6 % Glutardialdehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 fixiert, mit 2 % OsO₄ nachfixiert und in Araldite eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat gefärbt und mit Bleicitrat kontrastiert. Die Gewebsschnitte wurden an einem EM900 Zeiss Elektronenmikroskop visualisiert.

2.2.5.6. Aufarbeitung von Proben für die Immunfluoreszenz

Zur Darstellung endogener und überexprimierter Proteine mittels Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Entsprechend des Experimentes wurden die Zellen dann transfiziert und zur gewünschten Konfluenz kultiviert oder mit Antikörpern oder Wirkstoffen behandelt.

Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und in 4 % PFA in PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach mehreren Waschschritten in PBS folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,2 % Saponin in PBS für 5 min. Die Permeabilisierung wurde mit 0,12 % Glycin, 0,2 % Saponin in PBS für 10 min gestoppt und die Zellen 2 h mit 10 % FCS, 0,2 % Saponin in PBS geblockt. Die Deckgläschen wurden über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C mit den primär-Antikörpern in der Blockierlösung inkubiert (Vergleiche Abschnitt 2.1.13., Tab. 2.1.4.). Es folgten fünf Waschschrritte in 0,2 % Saponin in PBS und die Inkubation mit dem Farbstoff-gekoppelten sekundär-Antikörper in der Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur (Vergleiche Abschnitt 2.1.13., Tab. 2.1.5.). Eine Färbung mit Mitotracker erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls. Nach weiteren vier Waschschrritten in 0,2 % Saponin in PBS und zwei Waschschrritten in bidestilliertem Wasser wurden die Proben in 17 % Mowiol 4-88, 20 mg/ml 1,4-diaza-bicyclo-[2,2,2]-octane (DABCO), 5 µg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), 33 % (v/v) Glycerin in PBS eingebettet und bis zur Dokumentation an einem konfokalen Mikroskop (FV1000) oder einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) auf 4 °C gelagert.

2.2.5.7. Proben-Aufarbeitung für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse von Proben mittels qRT-PCR wurde die mRNA aus den Proben nach dem Protokoll des NucleoSpin RNA Plus Kits von Macherey-Nagel isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten mRNA UV-spektrometrisch bestimmt und eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Hierzu diente die optische Kontrolle auf Abbau der mRNA im 1% Agarosegel, sowie der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ($A_{260}/A_{280} > 1,9$). Die RNA wurde auf -80 °C gelagert.

Zur cDNA Synthese wurde die mRNA nach folgender Reihenfolge und Pipettierschema eingesetzt. Nach der Zugabe von Wasser wurden die Proben gemischt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Zugabe der dNTPs erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 37 °C. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte für 1 h bei 45 °C gefolgt von 10 min bei 70 °C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Verwendung auf -20 °C.

RNA	0,1-5 µg
Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
Wasser	ad 12 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
Ribolock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTPs	2 µl
RevertAid Reverse Transkriptase	1 µl

2.2.5.8. Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung einer spezifischen cDNA-Menge wurde das Universal Probe Library (UPL)-System verwendet. Die verwendeten spezifischen Primer, sowie die zugehörigen Sonden sind im Materialteil aufgeführt (Tab. 2.1.3.). Der Pipettieransatz pro Probe setzt sich wie nachfolgend aufgeführt zusammen.

cDNA	0,5 µl
2x LightCycler 480 Probes Master	5,0 µl
UPL-Sonde	0,1 µl
100 µM Primer, jeweils	0,03 µl
Wasser	ad. 10 µl

Die Proben wurden als technische Duplikate angesetzt und die Fluoreszenz bei 465-510 nm über folgendes Temperaturprotokoll verfolgt.

Tab. 2.2.12. QRT-PCR-Protokoll.

	Zeit	Temperatur	Gradient	
Vortemperierung	10 ‘	95 °C	4,8 °C/s	x 45 x
Vervielfältigung	10 “	95 °C	4,8 °C/s	
	30 “	60 °C	2,5 °C/s	
Kühlung	30 “	40 °C	2,5 °C/s	

Die Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die Zykluszahl abgetragen und der C_p -Wert bestimmt, die Zyklusnummer des Umkehrpunktes der Kurve. Der C_p -Wert wurde über die technischen Duplikate gemittelt und anschließend auf die Ladekontrolle normiert ($C_{p,n}$). Anhand einer mitgeführten Eichreihe wurde die

Primereffizienz (PE) bestimmt und Fehler bei der Beurteilung der RNA-Menge ([RNA]) durch unterschiedliche Effektivitäten bei der Amplifikation über folgende Formel herausgerechnet.

$$[RNA] = PE^{(-C_{p,n})}$$

Anschließend wurden die gemittelten Daten der biologischen Replikate als Vielfaches der Kontrolle abgetragen.

2.2.5.9. Aufarbeitung von Proben zur SDS-Gelelektrophorese

Die Proben der transgenen Mäuse der Alfp-Cre-Linie wurden in RIPA-Puffer aufgenommen und mit 3-4 Keramikkügelchen versetzt. Die Proben wurden in einem Precellys homogenisiert (2x 30 s 6000 rpm, 30 s Pause). Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden unlösliche Bestandteile 15 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Für die Überstände wurden die Proteinkonzentrationen entsprechend des BCA-Assay-Protokolls (Pierce) bestimmt. Die Proben wurden auf 1x Lämmli-Probenpuffer eingestellt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur Verwendung für den Western Blot wurden die Proben bei -20°C gelagert.

BMOL-Zellen wurden direkt in der Zellkulturschale mit PBS gewaschen und für 15 min in RIPA-Puffer inkubiert. Danach wurde das Material abgeschabt, in ein Reagiergefäß überführt und kurz gemischt. Unlösliche Probenbestandteile wurden 10 min bei 16000 x g pelletiert und ab der Proteinkonzentrationsbestimmung wie beschrieben fortgefahren.

Die übrigen Proben wurden in ADAM10-Lysepuffer resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert unter erneutem Resuspendieren nach 30 min. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurden diese 10 min bei 16000 x g (Zentrifuge) pelletiert. Ab der Konzentrationsbestimmung wurde wie gewohnt fortgefahren.

2.2.5.10. Koimmunpräzipitation

Zur Überprüfung der Interaktion von Protein wurden die Zellen entsprechend der experimentellen Anforderungen transfiziert und nach 72 h einer Immunpräzipitation unterzogen. Die Zellpellets wurden hierzu in 450 µl EBC-Lysepuffer aufgenommen und zwei Mal 10 s Ultraschall behandelt (Duty Cycle 90 %, Micro Tip Limit 5). Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert und danach erneut sonifiziert. Die erhaltenen Lysate wurden für 10 min bei 16000 x g von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt und die Proteinkonzentration der Proben über einen BCA-Assays (Pierce) bestimmt. Gleiche Proteinmengen der Proben (maximal 50 µl des Lysates) dienten als Lysatfraktion und wurden auf 1x Lämmli-Probenpuffer eingestellt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Gleiche Proteinmengen der Proben (maximal 400 µl des Lysates) wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt. Zum Auswaschen potentieller unspezifischer Bindungen an das Trägermaterial wurden die Proben mindestens 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler mit vorgeblockten Agarose-*Beads* (5 % BSA in EBC-Lysepuffer) inkubiert. Danach wurden die *Beads* entweder mittels eines magnetischen Feldes (*Dynabeads*) oder durch 10 min Zentrifugation bei 300 x g (*Sepharose-Beads*) sedimentiert und die Überstände in neue Reagiergefäße überführt. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Proben mit 1,5 µl des entsprechenden Immunpräzipitationsantikörpers (außer Kontrolle ohne Antikörper) bei 4 °C im Überkopfschüttler. Am nächsten Tag wurden vorgeblockte *Beads* zu den Proben zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Die *Beads* wurden wie bereits beschrieben sedimentiert und die Überstände verworfen. Das Trägermaterial wurde anschließend in mehreren Schritten mit mindestens dem 50-fachen Volumen an EBC-Lysepuffer gewaschen und in 50 µl 1x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte 20 min bei 70 °C eluiert. Die Proben wurden bis zur Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel auf -20 °C gelagert.

2.2.5.11. Zelloberflächenbiotinylierung

Zur Biotinylierung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellschalen auf Eis abgekühlt und mit PBS-CM gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 mg/ml Biotin in PBS-CM überschichtet und 30 min bei 4 °C inkubiert. Durch Zugabe von eiskalter Quenching-Lösung für 10 min bei 4 °C wurde die Biotinylierung abgestoppt. Nach drei Waschschritten mit PBS-CM wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in 500 µl Biotinylierungslysepuffer aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden zwei Mal 10 s sonifiziert (Duty Cycle 90 %, Micro Tip Limit 5), 30 min auf Eis inkubiert und danach erneut sonifiziert. Die Proben wurden für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes über einen BCA-Assay bestimmt (Pierce). 50 µg der Proben wurden auf 1x Lämmli-Probenpuffer eingestellt und 5 min bei 95 °C denaturiert (=Lysatfraktion).

Streptavidin-*Beads* wurden in Biotinylierungslysepuffer gewaschen. Gleiche Proteinmengen der restlichen Proben wurden mit je 75 µl Streptavidin-*Beads* versetzt und 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde in mehreren Schritten mit mindestens dem 25-fachen Volumen des Trägermaterials gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden 20 min bei 60 °C in 1x Lämmli-Probenpuffer von den Streptavidin-*Beads* eluiert und bis zur Verwendung auf -20 °C gelagert.

2.2.5.12. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die aufgearbeiteten Proteinproben wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel bei 100 V unter Raumtemperatur aufgetrennt. Als Standard wurde ein 10 %-iges Trenngel verwendet, eine Darstellung von APP erfolgte nach Auftrennung in einem NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gele. Zur Bestimmung der Proteinmasse diente ein Größenstandard (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*).

Anschließend wurden die Proteine über das *Tank-Blot*-Verfahren bei 0,8 A und 4°C für 2 h auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (APP: 0,25 A, 2 h). Die Membranen wurden danach für 2 h in Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS/T) geblockt und über Nacht mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper

(Vergleiche Abschnitt 2.1.13., Tab. 2.1.4.) unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBS/T gewaschen und für eine Stunde mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert (Vergleiche Abschnitt 2.1.13., Tab. 2.1.5.). Die Membran wurde erneut gewaschen und danach unter Verwendung eines Chemilumineszenzdetektionskits (Lumigen® ECL Ultra) entwickelt. Die Detektion erfolgte über eine ImageQuant LAS 4000 Kamera. Eine Quantifizierung der Western Blot Signale erfolgte durch Bestimmung der mittleren Schwärzung über die ImageJ-Software.

2.2.5.13. Statistische Auswertung

Zur grafischen Darstellung der qRT-PCR-Ergebnisse und der Quantifizierungen der Western Blots wurden die Mittelwerte bestimmt und im Balkendiagramm abgetragen. Sofern nicht anders angegeben wurde die Streuung der Werte als Standardabweichung angegeben.

Zur statistischen Auswertung wurden die Datensets paarweise einem t-Test unterzogen. Falls die Daten nicht normal verteilt waren oder nicht über gleiche Varianzen verfügten, wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

In den vergangenen Jahren wurden viele Versuche unternommen, die Funktion und die Bedeutung der Metalloprotease ADAM10 zu entschlüsseln. Ein Problem hierbei liegt jedoch in der wichtigen Rolle von ADAM10 als Initiatorprotease des Notch-Signalweges während der Entwicklung, was bei klassischen ADAM10-Knockout Mäusen zur pränatalen Letalität führt [Hartmann *et al.*, 2002]. Aus diesem Grund wurden verschiedene konditionale ADAM10-Knockout-Mäuse generiert, die vor allem die Analyse der phänotypischen Auswirkung auf einzelne Organe ermöglichen [Jorissen *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2011; Yoda *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2013; Prox *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014]. Bisher wurde jedoch die Bedeutung der ADAM10-Aktivität für die Niere und die Leber nicht untersucht. Daher wurden während dieser Doktorarbeit konditionelle ADAM10-Knockout Mäuse für beide Organe generiert und näher untersucht.

Zum besseren Verständnis phänotypischer Folgen der ADAM10-Defizienz war es nötig, die Funktion der Protease zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang konnten vor allem über zellbasierte Ansätze verschiedene ADAM10 Substrate, wie z. B. das amyloide Vorläuferprotein (APP) und N-Cadherin, identifiziert werden [Lammich *et al.*, 1999; Reiss *et al.*, 2005]. Insbesondere Studien, bei denen eine Manipulation der ADAM10-Expression im Gehirn erfolgte, zeigten zudem die physiologische Relevanz der Proteolyse dieser Moleküle durch ADAM10. So konnten im Gehirn neben dem Notch-Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der Entwicklung spielt, unter anderem auch das Amyloide Vorläufer Protein (APP) und das Prion Protein (PrP^C) als Substrat für ADAM10 identifiziert werden [Jorissen *et al.*, 2010; Altmepfen *et al.*, 2015]. Hierdurch wird deutlich, dass ADAM10 viele potentielle Oberflächenmoleküle und Signalwege beeinflussen kann. Damit scheint auch eine gerichtete Regulation der ADAM10-Aktivität in Bezug auf bestimmte Substrate physiologisch notwendig zu sein. Aus diesem Grund war die Identifikation und Charakterisierung putativer Interaktionspartner bzw. Regulatoren von ADAM10 von Interesse und ist ebenfalls Teil dieser Doktorarbeit.

3.1. Charakterisierung eines ADAM10-Knockouts in Podozyten

Die Niere ist ein wichtiges Exkretionsorgan, deren Funktionsfähigkeit infolge von Erkrankungen beeinträchtigt sein kann. Insbesondere der Podozyt, dem eine essentielle Rolle bei der Filtration des Primärharns zu Teil wird, ist ein empfindliches Ziel solcher Erkrankungen. Anhand der Überexpression der Notch intrazellulären Domäne (NICD) wurde bereits gezeigt, dass podozytäre Schädigungen v. a. durch eine erhöhte Notch-Aktivität verursacht werden können [Niranjan *et al.*, 2008]. Der Notch-Signalweg wird nach der Aktivierung durch Ligandenbindung mittels einer ADAM10-medierte Proteolyse initiiert [van Tetering *et al.*, 2009; De Strooper *et al.*, 1999; Jarriault *et al.*, 1998]. Damit ergibt sich eine mögliche Bedeutung von ADAM10 in der Entstehung podozytärer Erkrankungen.

Infolge einer direkten Schädigung des Podozyten kann das sogenannte *foot process effacement* eingeleitet werden. Hierbei verformen sich die Fußfortsätze und der gesamte Zellkörper des Podozyten, wodurch die Eigenschaften der gesamten Filtrationsbarriere verändert werden. Auf diese Weise können auch größere Serumoleküle wie Proteine über die Barriere in den Harn gelangen (Proteinurie). Final können die Umstrukturierungen der Zelle sogar zum Ablösen des Podozyten von der Basalmembran führen. Das morphologischen Veränderungen des Podozyten werden durch die Umorganisation des Zytoskelettes vermittelt [Shirato *et al.*, 1996]. Bekannte Ursache hierfür sind beispielsweise die funktionelle Beeinträchtigung von Aktin-bindenden Proteinen oder von Adhäsionsproteinen, die den Kontakt zu benachbarten Podozyten oder zur glomerulären Basalmembran herstellen [Dandapani *et al.*, 2007; Kos *et al.*, 2003; Kestila *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 2004]. Im Rahmen der zellulären Veränderungen ist es zudem notwendig, weitere Adhäsionsmoleküle zu lösen, die für die Verbindung der Zellen untereinander und zur glomerulären Basalmembran sorgen. Da ADAM10 auch viele Adhäsionsmoleküle, z. B. CD44 und Mitglieder der Cadherin-Familie, spaltet, liegt hier ein weiterer möglicher Mechanismus vor, auf den die Protease einen Einfluss haben könnte [Pan *et al.*, 2012; Reiss *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2006]. Diese beiden Ansätze geben Anlass, die Bedeutung von ADAM10 im Podozyten näher zu untersuchen.

3.1.1. Verifizierung des ADAM10-Knockouts in Podozyten

Zur Untersuchung der Bedeutung von ADAM10 in Podozyten wurde eine Mauslinie generiert, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Podocin-Promotors exprimiert. Der Podocin-Promotor ist spezifisch in Podozyten ab Embryonaltag E8,5 aktiv [Moeller *et al.*, 2003]. Die Cre-Rekombinase sollte durch ihre Aktivität eine Deletion des geflochtenen ADAM10 Exon 2 verursachen, wodurch kein funktionelles ADAM10 mehr gebildet werden kann.

Ein generelles Problem bei der Untersuchung der Tiere auf Veränderungen im Podozyten besteht darin, dass Podozyten nur eine vergleichsweise kleine Zellpopulation in der Niere darstellen. Damit besteht ein starker Signalhintergrund durch die umgebenden glomerulären Zellen (parietale Zellen, Endothelzellen, mesangiale Zellen) und die übrigen Zellen der Niere (tubuläre Zellen, Zellen des Sammelrohrs, interstitielle Zellen), in denen keine ADAM10-Deletion ausgelöst wird. Aus diesem Grund wurden für die Analysen Glomeruli isoliert, wodurch der Anteil der Podozyten in der Probe deutlich erhöht und der Signalhintergrund reduziert werden konnte. Auf diesem Wege konnten auch Unterschiede in dieser kleinen Zellpopulation visualisiert werden.

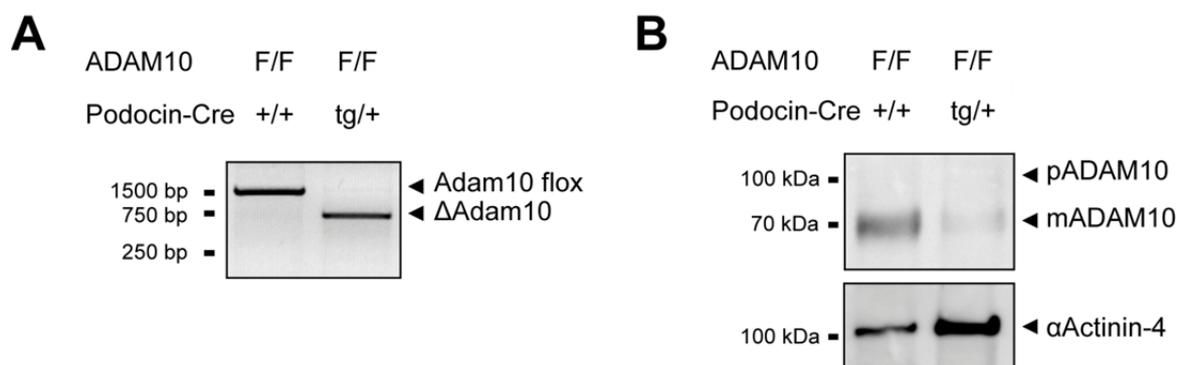


Abb. 3.1.1. Verifizierung der ADAM10-Deletion in isolierten Glomeruli.

(A) Die PCR zum Nachweis der ADAM10-Deletion in Glomerulus-Proben lieferte ein Signal bei 2000 bp für das geflochte Allel (Adam10 flox) und ein Signal bei 700 bp für das Allel nach Rekombination (Δ Adam10). (B) Zum Nachweis der ADAM10-Deletion auf Proteinebene wurde im Western Blot gegen ADAM10 gefärbt und die Beladung über den Podozytenmarker α Actinin-4 verglichen. F = gefloxtes Allel, + = Wildtyp-Allel, tg = Transgen, pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10.

Zuerst wurde eine ADAM10-Deletions-PCR durchgeführt, um die Funktionalität der Cre-medierten Rekombination zu überprüfen. Die PCR ist so angelegt, dass die

Primer eine Region um das zu deletierende ADAM10 Exon 2 amplifizieren. Kommt es zur Deletion des Exons, entsteht ein verkürztes Amplikon von ca. 700 bp. Die PCR auf DNA-Proben aus isolierten Glomeruli zeigte ausschließlich in der Cre-Rekombinase positiven Proben ein Signal bei 700 bp, welches einer erfolgreichen Deletion entspricht (Abb.3.1.1. A). Die Cre-Rekombinase negative Kontrollprobe dagegen zeigte nur das Signal, das für das gefloxt vorliegende Allel (ca. 2000 bp) erwartet wird. Interessanterweise konnte dieses Signal in den Cre-Rekombinase-exprimierenden Proben nicht detektiert werden, was für eine quantitative Deletion des ADAM10 Exon 2 auf DNA-Ebene spricht. Ein Nachweis der DNA-Deletion allein ist jedoch nicht ausreichend, um die Funktionalität des Knockouts zu beurteilen.

Daher wurde eine Western Blot Analyse von Glomeruli-Lysaten der Tiere gegen ADAM10 durchgeführt (Abb. 3.1.1. B). Die ADAM10-Proform (ca. 100 kDa) war in den Glomeruli-Extrakten generell nur sehr schwach detektierbar. Für die mature ADAM10-Form (ca. 70 kDa) konnte in den Cre-Rekombinase positiven Tieren eine deutliche Reduktion auf ein schwaches Restsignal gezeigt werden. Als Ladekontrolle diente das Integrin- und Zytoskelett-bindenden α Actinin-4, welches in Podozyten essentiell für die Adhäsion an die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist [Dandapani *et al.*, 2007]. Für α Actinin-4 lag eine Zunahme der Signalintensität in den Cre-Rekombinase positiven Tieren vor. Infolge potentieller ADAM10-abhängiger Schädigungen könnte es in den Glomeruli zur Umorganisation des Zytoskelettes und einer damit verbundenen Veränderungen der α Actinin-4-Expression kommen. Da diese Möglichkeit die qualitative Bewertung des Knockouts erschwert, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen ADAM10 in Gewebsschnitten durchgeführt. Mit dieser wurde auch überprüft, ob das übrige ADAM10-Signal von anderen Zellen des Glomerulus oder einer unvollständigen Reduktion in den Podozyten stammte.

Gewebeschnitte von Cre-Rekombinase positiven und negativen Tieren wurden für die Immunfluoreszenzanalyse gegen ADAM10 und das Aktin-assoziierte Protein Synaptopodin, welches in der Niere spezifisch nur in Podozyten exprimiert wird, gefärbt (Abb. 3.1.2.). Der Podozytenmarker Synaptopodin konnte im gesamten Glomerulus der ADAM10-Knockout und Kontrolltiere detektiert werden. Das Färbung lieferte hierbei ein Signal, dass linear durch den gesamten Glomerulus verlief, und entspricht der zwischen den Podozyten ausgebildeten Schlitzmembran. In den Kontrolltieren zeigte die Kofärbung gegen ADAM10 ein deutliches Signal im

gesamten Glomerulus. Dieses überlagerte fast vollständig mit dem Synaptopodin-Signal und wies daher auf die Expression von ADAM10 in der Podozytenmembran hin. Zusätzlich konnte ADAM10 vereinzelt in Synaptopodin negativen Regionen in Glomerulus-Nähe nachgewiesen werden, wobei es sich um benachbarte Zellen, wie z. B. die Epithelzellen tubulärer Strukturen, handelte. Im Cre-Rekombinase positiven ADAM10-Knockout Tier dagegen war das ADAM10-Signal im Glomerulus fast komplett auf das Hintergrundsignal reduziert. Für Synaptopodin konnte entsprechend keine sichtbare Kofärbung mit ADAM10 detektiert werden. In Synaptopodin negativen Bereichen war weiterhin ein schwaches ADAM10-Signal detektierbar.

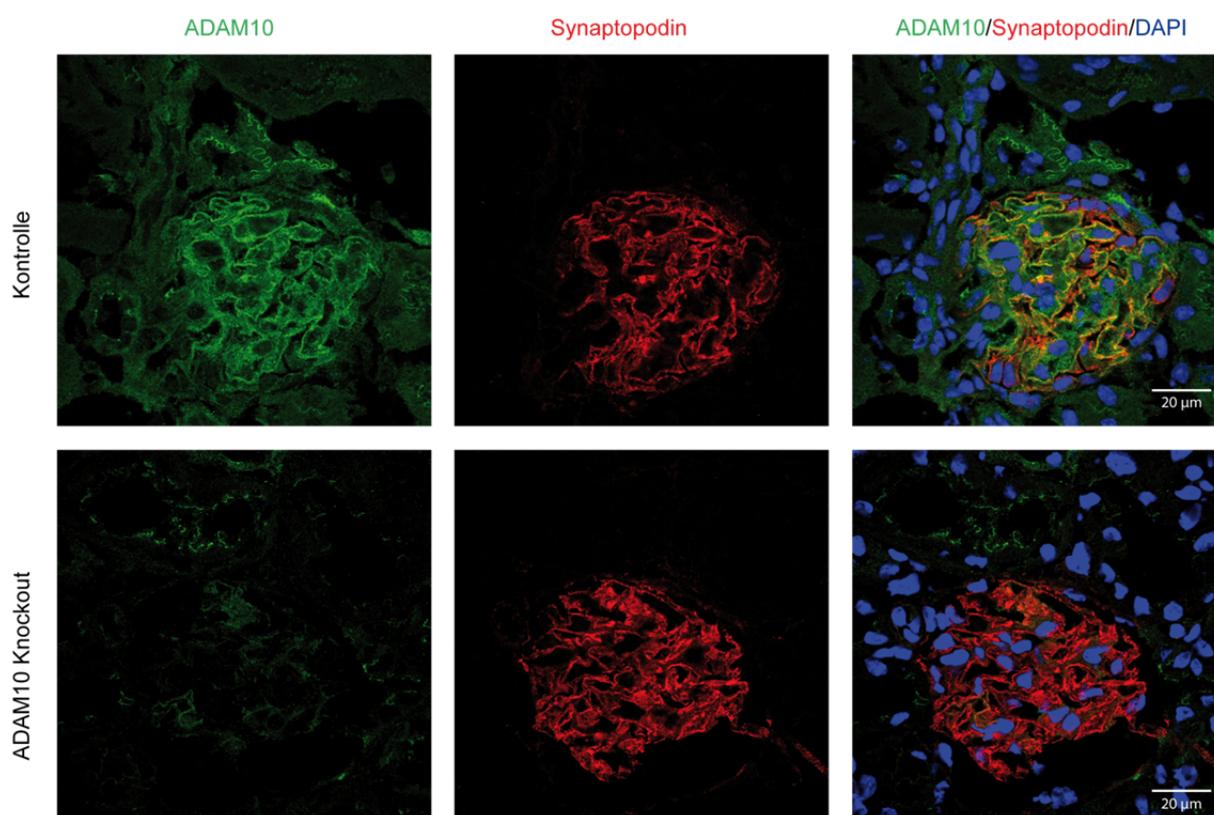


Abb. 3.1.2. Nachweis der ADAM10-Deletion in Immunfluoreszenzanalysen.

Zur Überprüfung der ADAM10-Reduktion wurden Kryoschnitte der Nieren von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren angefertigt. Diese wurden anschließend gegen ADAM10 und zum Nachweis der Zellpopulation gegen den Podozytenmarker Synaptopodin gefärbt. Zellkerne wurden über DAPI-Färbung visualisiert. Maßstabsbalken = 20 µm.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen darauf hin, dass die Knockout-Strategie zu einer deutlichen Reduktion von ADAM10 spezifisch in den Podozyten führte, weswegen diese Tiere zur weiteren Untersuchung verwendet wurden.

3.1.2. Pathologische Untersuchung des ADAM10-Knockout im Glomerulus

Nach dem Nachweis der Funktionalität des Podozyten-spezifischen ADAM10-Knockouts wurde die Bedeutung der Protease in Podozyten überprüft. Im Zusammenhang zu podozytären Erkrankungen ist vor allem das ADAM10-Substrat Notch interessant. Während in gesunden adulten Podozyten keine Notch-Aktivität nachgewiesen werden konnte, führt die Aktivierung zur Podozytenschädigung und klassischen Symptomen einer Nephritis, wie z.B. Proteinurie [Lasagni *et al.*, 2010; Niranjan *et al.*, 2008]. Daher erfolgte die Analyse der Mauslinie unter besonderer Betrachtung allgemeiner klinischer Parameter, die zur Charakterisierung einer Nephritis herangezogen werden, und den damit einhergehenden morphologischen Veränderungen. Hierbei wurde immer zwischen Männchen und Weibchen unterschieden, um Fehlinterpretationen der klinischen Parameter durch beispielsweise Hormon-bedingte Einflüsse zu vermeiden.

Ein typisches klinisches Symptom der fortschreitenden Nephritis ist eine Gewichtszunahme aufgrund von Wasseransammlungen in der Bauchhöhle, einer sogenannten Aszites. Dieser Parameter bietet sich besonders an, da die Messung des Gewichtes nicht-invasiv erfolgt. Das Körpergewicht der ADAM10-Knockout Mäuse gegen die Kontrollen wurde über einen Zeitraum von einem halben Jahr auf Auffälligkeiten überprüft (Abb. 3.1.3. A.). Alle Gruppen legten im beobachteten Zeitraum an Gewicht zu, bei den Männchen erfolgte die Gewichtszunahme schneller. Zwischen den Kontroll- und den ADAM10-Knockout Gruppen konnten jedoch keine Unterschiede des Körpergewichts festgestellt werden.

Ein weiterer wichtiger nicht-invasiver Parameter zur Detektion einer Nephritis ist der Proteingehalt im Urin. Werden Podozyten geschädigt, unterliegt deren Aktinskelett Umstrukturierungen. Die Veränderungen wirken sich auch auf die Pseudopodien der Podozyten aus, die dadurch flacher und breiter erscheinen (*foot process effacement*) [Shirato *et al.*, 1996; Matovinović, 2009]. Im schwersten Fall bewirken die Veränderungen sogar das Ablösen der Podozyten von der Basalmembran. Infolge der Umstrukturierungen entstehen Lücken in der Blut-Harn-Barriere, die normalerweise den Übergang von Proteinen in den Harn verhindert. Daher wurde eine genauere Bestimmung des Grades der Proteinurie mittels eines ELISA

durchgeführt. Hierzu wurden die Konzentrationen an Creatinin, welches mit einer konstanten Rate vom Blut in den Urin abgegeben wird, und Albumin im Urin bestimmt. Albumin ist ein klassisches Serumprotein, das nur im Falle einer Schädigung der Filtrationsbarriere in den Urin gelangen kann. Der Quotient aus Albumin und Creatinin gibt daher Aufschluss über das Ausmaß der Proteinurie. In beiden Tiergruppen wurden Albumin/Creatinin-Quotienten ermittelt, die deutlich unter den für eine Proteinurie erwarteten Werten lagen (Abb. 3.1.3. B) [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Der Albumin/Creatinin-Quotient lieferte keine Hinweise auf das Vorliegen einer Proteinurie in einer der beiden Gruppen. Zudem wurden keine signifikanten Unterschiede des Albumin/Creatinin-Quotienten zwischen den beiden Gruppen deutlich.

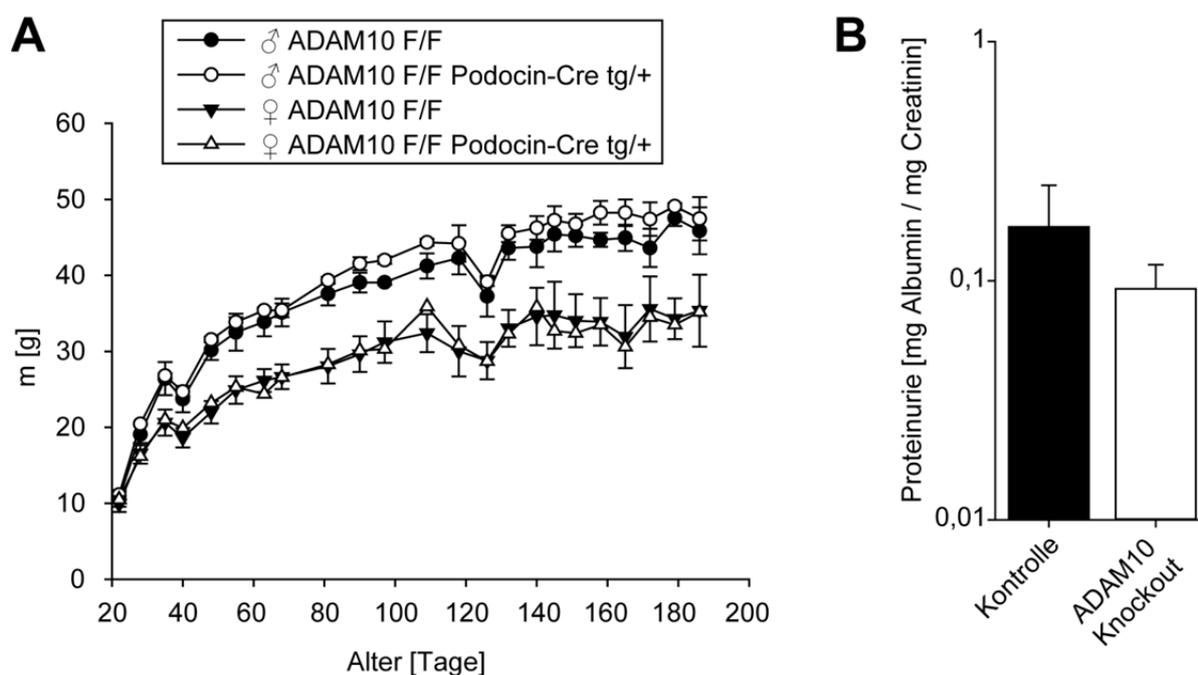


Abb. 3.1.3. Analyse nicht-invasiver Nephritis-relevanter Parameter im ADAM10-Knockout.

(A) Zur Untersuchung auf Nephritis-bedingte Flüssigkeitseinlagerungen wurde das Körpergewicht von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tiere über den Zeitraum von einem halben Jahr verfolgt (n = 2-7). Hierzu wurden die Tiere in Männchen- und Weibchengruppen unterteilt, um Hormon-bedingte Schwankungen in der Gruppe auszuschließen. (B) Zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere wurde ein ELISA gegen Albumin und Creatinin durchgeführt und der Quotient als Maß der Proteinurie abgetragen. Repräsentativ werden hier Kontroll- bzw. ADAM10-Knockout Tiere einer Männchengruppe dargestellt (n = 3). F = gefloxtes Allel, + = Wildtyp-Allel, tg = Transgen.

Obwohl die klinischen Parameter nicht auffällig waren, kann darüber nicht ausgeschlossen werden, dass es zu kleineren Schädigungen der Podozyten gekommen ist. Diese könnten eine Prädisposition gegenüber einem späteren schädigenden Stimulus bedeuten. Daher wurden einige Mäuse im Alter von zehn

Wochen zur weiteren Untersuchung präpariert. Makroskopisch waren zwischen den Nieren von ADAM10-Knockout Tieren und den Kontrollen keine Unterschiede erkennbar (Daten nicht gezeigt). Daher wurden als nächstes Gewebsschnitte

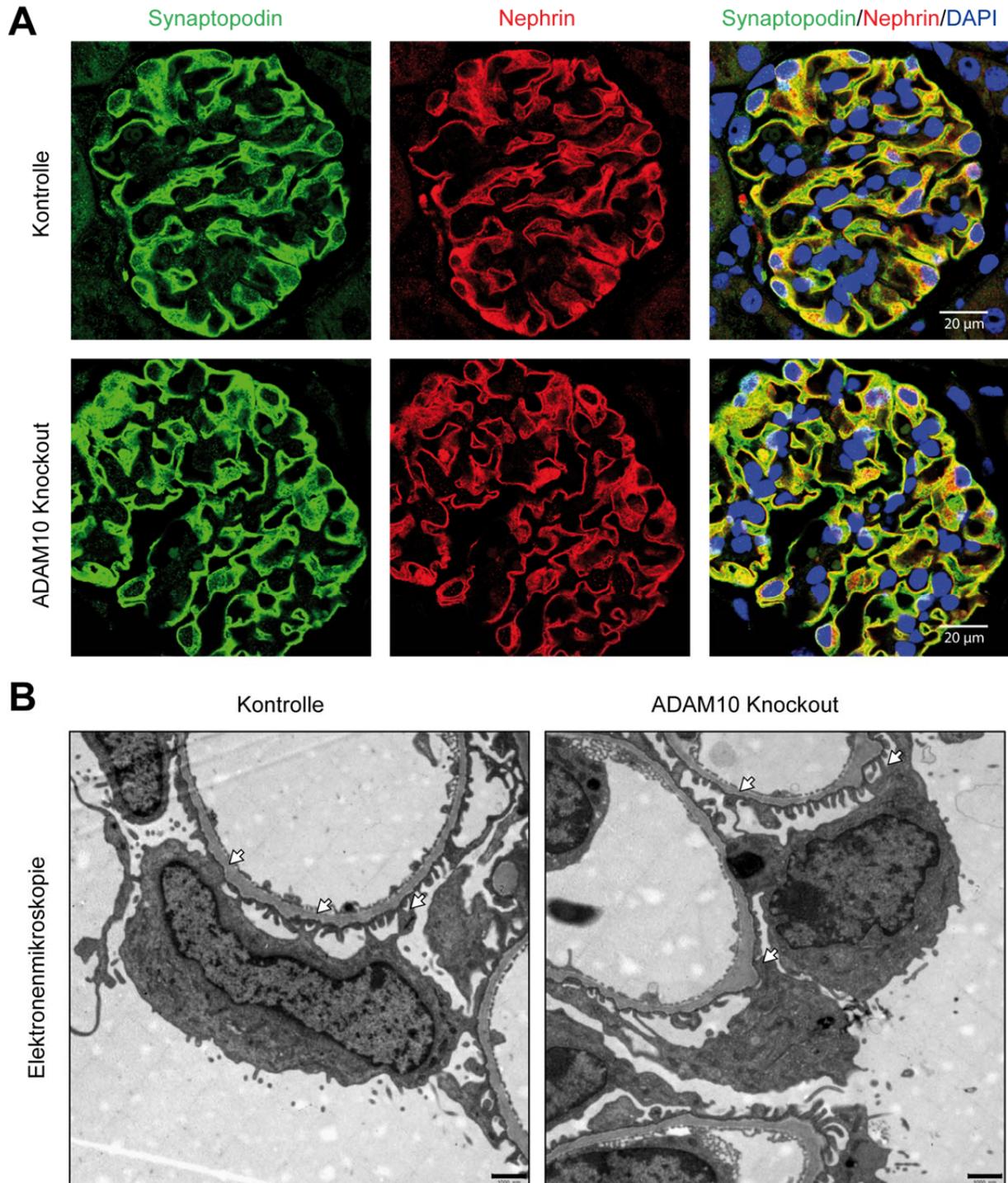


Abb. 3.1.4. Untersuchungen der Schlitzmembran im podozytären ADAM10-Knockout.

(A) Zur Überprüfung von Schädigungen der Schlitzmembran wurden Nieren-Paraffinschnitte von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren gegen die Podozytenmarker Nephrin und Synaptopodin gefärbt. Eine DAPI-Färbung diente der Visualisierung der Zellkerne. Maßstabsbalken = 20 µm. (B) Die Überprüfung auf mögliche Unterschiede auf die Podozytenmorphologie und die podozytären Fußfortsätze (Pfeile) erfolgte mittels Elektronenmikroskopie. Maßstabsbalken = 1 µm.

angefertigt und gegen podozytäre Markerproteine angefärbt. Auf diesem Weg kann die Schlitzmembran dargestellt und auf eventuelle Schädigungen überprüft werden, die durch Unterbrechungen der gefärbten Struktur deutlich würden. Die Färbung der Gewebsschnitte gegen das Aktin-bindende Synaptopodin und Nephrin, ein Zell-Zell-Kontakt vermittelndes Podozyten-Oberflächenprotein, zeigte eine kolokalisierende Färbung der Proteine über den gesamten Glomerulus (Abb. 3.1.4. A) [Mundel *et al.*, 1997; Simons *et al.*, 2001]. Über die Podozyten-Färbung konnte keine offensichtliche Schädigung der Schlitzmembran in den ADAM10-Knockout Tieren festgestellt werden.

Eine direkte Schädigung von Podozyten äußert sich morphologisch im *foot process effacement*, weswegen Nierenproben beider Tiergruppen elektronenmikroskopisch untersucht wurden (Abb. 3.1.4. B). Die Pseudopodien der Podozyten der ADAM10-Knockout Tiere und der Kontrollen waren deutlich voneinander unterscheidbar und hinsichtlich ihrer Form gleich ausgeprägt. Keine der Proben wies Anzeichen eines *foot process effacement* auf.

Wie bereits beschrieben wurde, ist ADAM10 auch eine wichtige Sheddase verschiedener Adhäsionsmoleküle. Daher wurde die Ultrastrukturanalyse zusätzlich herangezogen, um eine mögliche Auswirkung einer ADAM10-Defizienz auf die Zell-Zell-Kontaktstellen zu überprüfen. Eine verringerte Prozessierung der Adhäsionsmoleküle könnte zu einer Vergrößerung oder Vermehrung der Kontaktflächen der podozytären Fußfortsätze zur Basalmembran und zu anderen Fußfortsätzen führen, da mehr funktionelle Adhäsionsmoleküle verfügbar wären. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten jedoch zwischen beiden Gruppen eine vergleichbare Ausprägung der Kontaktflächen zum Gefäß-Endothel (Abb. 3.1.4. B, Pfeile). Zusammenfassend besteht somit kein Hinweis auf einen Einfluss des ADAM10-Expressionslevels auf die Morphologie des Podozyten oder eine Prädisposition zu einer Nephritis.

3.1.3. Pathologische Untersuchung des ADAM10-Knockouts im Glomerulus nach Induktion einer Nephritis

Die bisherigen Untersuchungen des ADAM10-Knockouts in Podozyten gaben keine Hinweise auf eine klinische Relevanz der Protease ADAM10 im Zusammenhang mit der Entstehung einer podozytären Erkrankung. Da jedoch bereits die Schädigung von Podozyten mit verstärkter Notch-Aktivität in Verbindung gebracht wurde, ist die Beteiligung der Notch-Initiatorprotease ADAM10 während der Entwicklung einer Nephritis denkbar [Niranjan *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wurden die Mäuse in Kooperation mit Dr. Catherine Meyer-Schwesinger (Abteilung für Innere Medizin, Nephrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in einem Erkrankungsmodell untersucht, bei dem eine Nephritis (anti-Podozyten Nephritis Model; APN-Modell) induziert wird (Abb. 3.1.5. A).

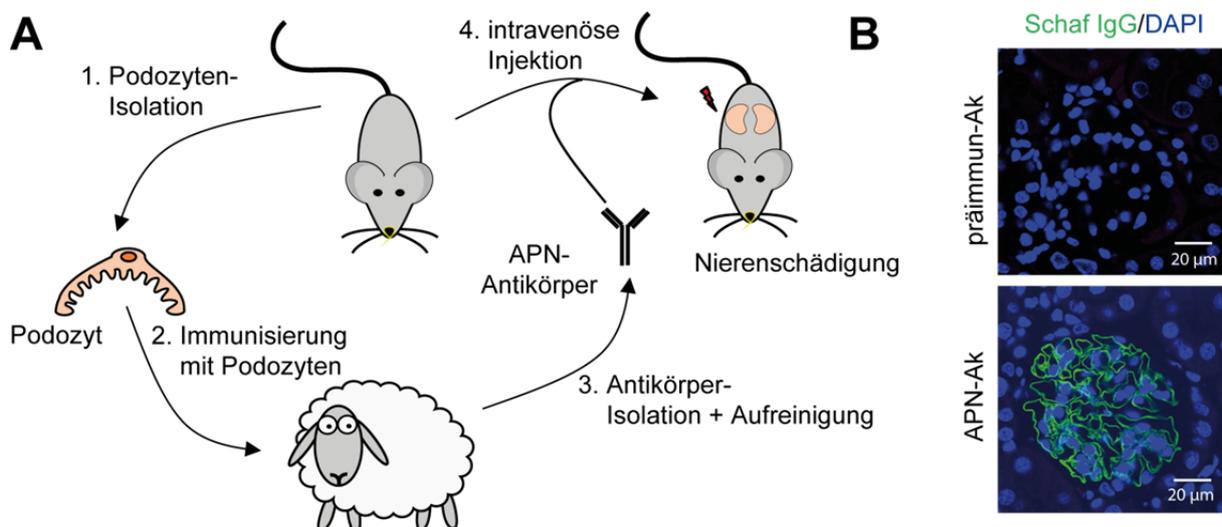


Abb. 3.1.5. Podozytenschädigung über das anti-Podozyten Nephritis-Modell (APN-Modell).

(A) Zur Herstellung des APN-Antikörpers werden Schafe mit isolierten Mauspodozyten immunisiert (1-2). Anschließend wird der Antikörper über eine IgG-Fällung aus dem Serum aufgereinigt (3). Über die intravenöse Injektion des APN-Antikörpers in Mäuse wird eine Immunantwort gegen die Podozyten ausgelöst, die zu deren Schädigung führt (4) [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. (B) Nachweis der Bindung des APN-Antikörpers an die Oberflächenantigene der Podozyten im Glomerulus. Gegen Podozyten-Antigene gerichtete Antikörper wurden über eine Immunfluoreszenzfärbung der Nieren-Paraffinschnitten gegen Schaf-IgG visualisiert. Für den präimmun-Antikörper wurde keine Bindung an die Podozyten nachgewiesen. Ak = Antikörper. Maßstabsbalken = 20 µm.

Der verwendete APN-Antikörper wurde durch Immunisierung von Schafen mit isolierten Mauspodozyten generiert. Zur Aufreinigung der Antikörper wurde die IgG-Fraktion (im Weiteren als APN-Antikörper bezeichnet) aus dem Serum gefällt. Der

polyklonale APN-Antikörper wurde zehn Wochen alten Mäusen intravenös injiziert und die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Die Antikörper binden dann an Podozytenantigene und lösen über eine Immunantwort die Schädigung der Podozyten und der Filtrationsbarriere aus [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Mit diesem Modell kann die Schädigung der Podozyten und der glomerulären Basalmembran durch Ablagerung von Immunkomplexen nachgestellt werden, wie sie als Auslöser der membranösen Nephropathie beschrieben wird [Glassock, 2010].

Zunächst wurden Wildtyp-Tiere mit APN-Antikörper behandelt, um dessen Funktionalität zu überprüfen. Zum Nachweis der erfolgreichen Behandlung mit dem APN-Antikörper, wurde dessen Bindung an die Podozyten von Wildtyp-Mäusen mittels einer Färbung von Gewebsschnitten gegen Schafantikörper visualisiert (Abb. 3.1.5. B). Die auf diese Weise gefärbten Strukturen entsprachen der Färbung von podozytären Markerproteinen wie Synaptopodin und Nephrin (Vergleiche Abschnitt 3.1.2., Abb. 3.1.4. A). Die Bindung des APN-Antikörpers war dabei nicht nur lokal, sondern erfolgte über die Filtrationsbarriere des gesamten Glomerulus. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung mit analog aufgereinigtem Schafserum vor der Immunisierung mit Podozyten (präimmun-Antikörper). Nach dessen Injektion konnten keine Anreicherung des präimmun-Antikörpers an der Filtrationsbarriere des Glomerulus detektiert werden.

Nachdem die Bindung des APN-Antikörpers an die Maus-Podozyten gezeigt wurde, wurde als nächstes überprüft, ob auch eine Schädigung der Podozyten vorliegt. Hierzu wurden die Kryoschnitte der Nieren von Wildtypmäusen gegen ADAM10 und das Podozyten-Markerprotein Nephrin gefärbt (Abb. 3.1.6.). Hinsichtlich der Nephrin-Färbung traten deutliche Unterschiede zwischen den mit präimmun-Antikörper und den mit APN-Antikörper behandelten Proben auf. Die Darstellung der Podozyten über den Marker Nephrin nach präimmun-Antikörper-Behandlung der Mäuse lieferte eine lineare Färbung im gesamten Glomerulus, was eine intakte Schlitzmembran bedeutet (Vergleiche Abschnitt 3.1.2., Abb. 3.1.4. A). Nach APN-Antikörper-Behandlung wies die Podozytenfärbung dagegen Unterbrechungen und Verdickungen auf (Pfeile). Diese Auffälligkeiten sind wahrscheinlich auf den Verlust der Integrität der Schlitzmembran und damit der Filtrationsbarriere zurückzuführen. Die Nephrin-Färbung wies damit auf eine erfolgreiche Induktion eines Nierenschadens unter den gewählten Bedingungen hin. Weiterhin konnte in der

Immunfluoreszenz nach der Behandlung mit dem APN-Antikörper eine deutlich erhöhte Intensität der ADAM10-Färbung nachgewiesen werden. Diese Beobachtung weist auf eine potentiell gesteigerte Expression und daher auf eine mögliche Beteiligung der Protease bei der Entwicklung einer Nephritis hin.

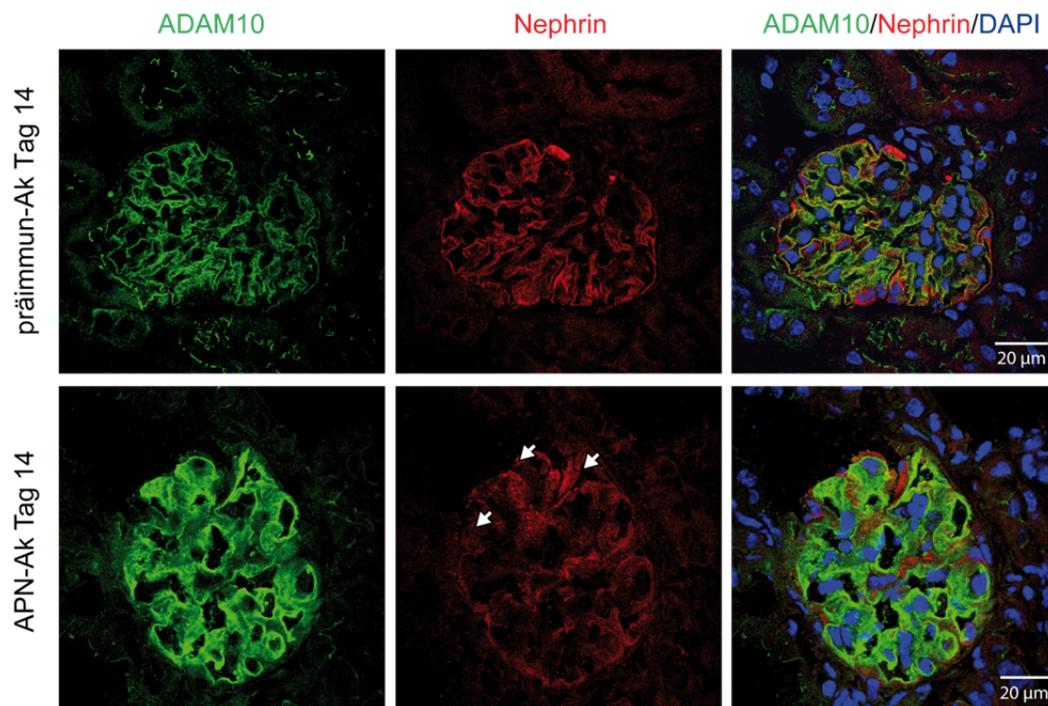


Abb. 3.1.6. Effekt der Schädigung der Filtrationsbarriere auf ADAM10.

Wildtyptiere wurden 14 Tage mit präimmun-Antikörper oder APN-Antikörper behandelt. Anschließend wurden Kryoschnitte der Nieren angefertigt und Schädigungen der Schlitzmembran über die Färbung der Podozyten gegen Nephrin qualitativ kontrolliert (Pfeile). Zusätzlich wurde ein Einfluss der Schädigung der Filtrationsbarriere auf die ADAM10-Expression über die Färbung gegen ADAM10 überprüft. Ak = Antikörper. Maßstabsbalken = 20 µm.

Aufgrund dieser initialen Beobachtung wurden Kontroll- und ADAM10-Knockout Tiere in Hinsicht auf die Entstehung einer Nephritis nach Behandlung mit APN-Antikörper untersucht. Da die Behandlung eine Schädigung der Schlitzmembran auslöste, wurden zuerst die Podozyten untersucht. Hierzu wurde eine Färbung gegen das Aktin-bindende α Actinin-4 und Nephrin durchgeführt und auf die bereits beschriebenen Auffälligkeiten infolge von Schädigungen untersucht. Der Podozytenmarker α Actinin-4 zeigte in den Kontrolltieren häufige Unterbrechungen der gefärbten Schlitzmembran (Abb. 3.1.7. A). Nur noch wenige Stellen des Glomerulus zeigten die klar definierte Podozytenfärbung einer intakten Schlitzmembran. Die Färbung gegen das Podozyten-Adhäsionsmolekül Nephrin war in den Kontrolltieren nur sehr schwach detektierbar. Die Verteilung des Signals war dabei nicht linear im Glomerulus verteilt, sondern granulär (Pfeile). Dies liegt

möglicherweise an der bereits beobachteten Internalisierung von Nephrin infolge podozytärer Schädigung [Doublie et al., 2001; Wernerson et al., 2003]. In den ADAM10-Knockout Tieren dagegen zeigte eine Färbung gegen die Podozyten-

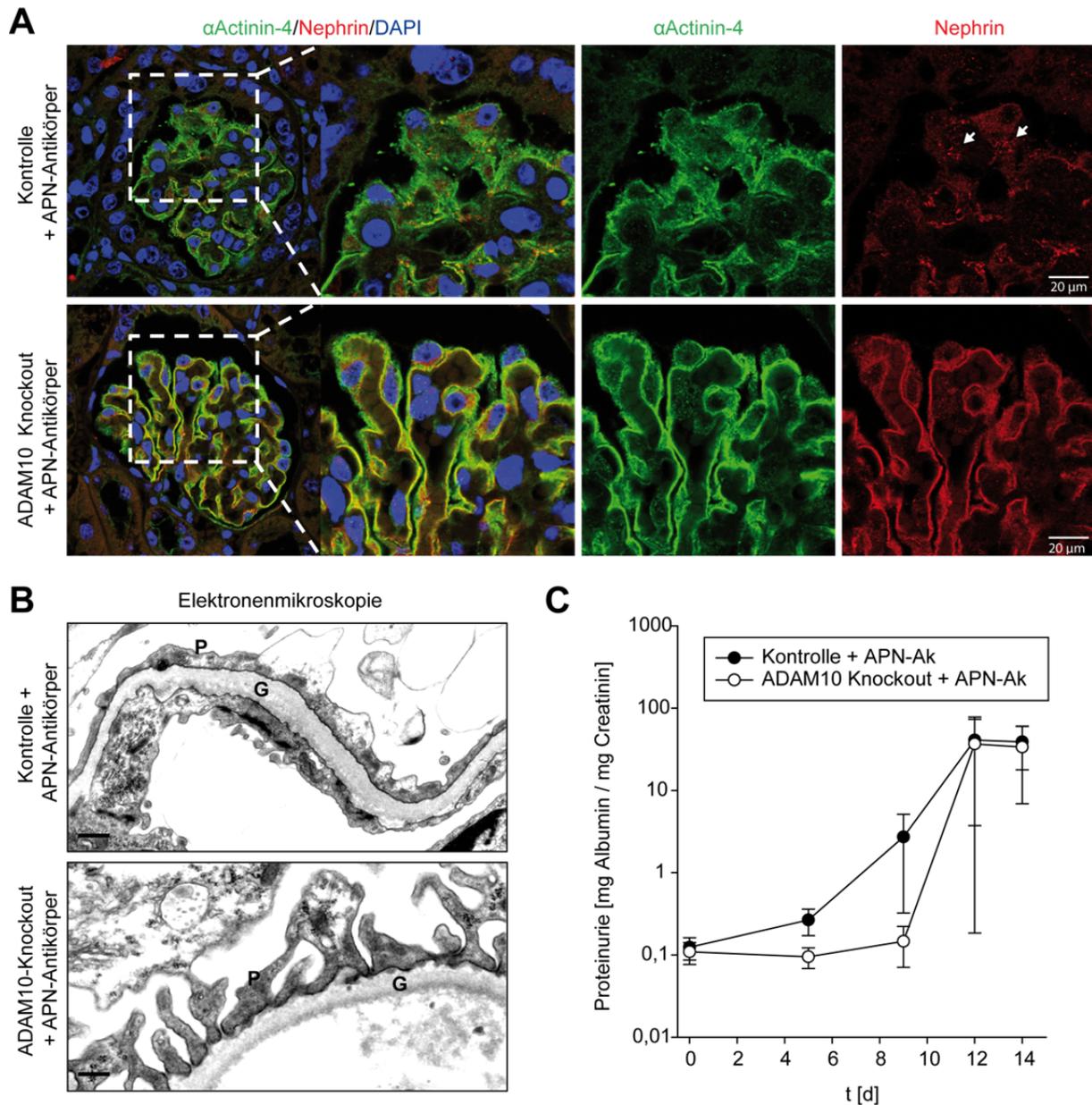


Abb. 3.1.7. Analyse der Schlitzmembran nach Podozytenschädigung im ADAM10-Knockout.

(A) Die Färbung der Nieren-Paraffinschnitte gegen die Podozytenmarker Nephrin und Synaptopodin ermöglicht die Darstellung von Schädigungen der Schlitzmembran in Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren 14 Tage nach Behandlung mit dem APN-Antikörper. Eine granuläre Nephrin-Färbung tritt infolge von Nephrin-Internalisierung auf (Pfeile). Zellkerne wurden über DAPI angefärbt. Repräsentative Aufnahmen sind dargestellt (n = 12-19). Maßstabsbalken = 20 μ m. (B) Die Fußfortsätze der Podozyten wurden mittels Elektronenmikroskopie auf *foot process effacement* untersucht. Maßstabsbalken = 1 μ m. (C) Mittels ELISA-Untersuchung des Urins der Tiere auf Albumin und Creatinin wurde der Grad der Proteinurie in den Tieren bestimmt, um darüber die Funktionalität der Filtrationsbarriere zu beurteilen. Repräsentativ wird hier eine Männchengruppe dargestellt (n = 6-7). Der Standardfehler ist als Fehlerbalken abgetragen. Ak = Antikörper, G = glomeruläre Basalmembran, P = Podozyten-Fußfortsätze.

Marker Nephrin und α Actinin-4 keine offensichtlichen Zeichen der Schädigung der Schlitzmembran. Die gefärbten Strukturen waren für beide Marker über den gesamten Glomerulus ununterbrochen intakt. Somit ergab die Immunfluoreszenzanalyse erste Indizien, dass eine ADAM10-Defizienz die Induktion einer Podozytenschädigung durch den APN-Antikörper unterdrücken kann.

Für einen genaueren Blick auf den Podozyten wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung angeschlossen (Abb. 3.1.7. B). Ein Vergleich der Kontroll- und ADAM10-Knockout Tiere zeigte deutliche Unterschiede in der Morphologie der Fußfortsätze der Podozyten. Die podozytären Fußfortsätze in den ADAM10-Knockout Tieren waren relativ schmal und deutlich voneinander abzugrenzen. Die Fußfortsätze der Kontrolltiere wirkten hinsichtlich ihrer Form deutlich abgeflacht und ermöglichten keine Unterscheidung zwischen einzelnen Fortsätzen mehr. Die glomeruläre Basalmembran der Kontrollgruppe war leicht angeschwollen. Die Analyse deutete auf eine Schädigung der Blut-Harn-Barriere der Kontrollen hin, während die ADAM10-Knockout Tiere eine gesunde Filtrationsbarriere aufwiesen. Zusammen mit den Aussagen der Färbung der Schlitzmembran durch Visualisierung von Podozyten-Markerproteinen ergibt sich der Hinweis, dass die Funktionsfähigkeit der Glomeruli in den Kontrolltieren gestört sein könnte. Die Defizienz von ADAM10 könnte dagegen diese Schädigung verhindern.

Aufgrund des Hinweises auf eine Schädigung der Filtrationsbarriere im APN-Modell wurde deren Funktionsfähigkeit in den Tieren über die Beurteilung der Proteinurie überprüft. Hierzu wurde für eine Gruppe von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren über die Zeit von der Induktion der Nephritis bis zur Präparation der Tiere Urin gesammelt und der Proteingehalt im Urin per ELISA bestimmt (Abb. 3.1.7. C). Beide Gruppen entwickelten nach der Behandlung mit dem APN-Antikörper eine Proteinurie. Bei den Kontrolltieren war bereits nach 9 Tagen ein deutlich erhöhter Albumin/Creatinin-Quotient zu detektieren. Dieser stieg bis Tag 12 an und verblieb dann auf dem Maximalwert der Messreihe. Die ADAM10-Knockout Tiere dagegen zeigten in den ersten Tagen nach der APN-Behandlung keine Anzeichen einer gestörten Harnfiltration. Die Werte lagen bis einschließlich Tag neun in der Größenordnung des gesunden Zustandes (Tag 0). Erst ab Tag 12 konnte in den Tieren eine beginnende Proteinurie detektiert werden, die schnell anstieg aber unter

den Werten der Kontrolltiere lag. Die ADAM10-Knockout Tiere zeigten also ein späteres Einsetzen der Proteinurie.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse aus den Tieren eine Bedeutung von ADAM10 für das Fortschreiten podozytärer Schädigungen. Um mögliche molekulare Erklärungen für diese Beobachtungen zu finden, wurde auf die Podozyten-ähnliche Zelllinie EPZ zurückgegriffen. Durch Nutzung dieser Zelllinie bietet sich zudem die Möglichkeit, die Limitationen der Probenmenge des aus Tieren isolierten Materials zu umgehen.

3.1.4. Untersuchungen an einer Podozyten-ähnlichen Zelllinie

Die Untersuchung von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren zeigte, dass die Defizienz von ADAM10 eine Schädigung von Podozyten und der Blut-Harn-Barriere abmildern kann. Um die involvierten molekularen Prozesse genauer untersuchen zu können, wurden die weiterführenden Experimente in einem zellbasierten System durchgeführt. Dabei wurde auf eine Podozyten-ähnliche Zelllinie (EPZ) zurückgegriffen, die im undifferenzierten Zustand über eine begrenzte Zeit kultiviert werden kann ohne die Podozyten-typischen Eigenschaften zu verlieren [Schiwek *et al.*, 2004]. Für die Modellversuche wurden die Zellen differenziert, wodurch sie maturaen Podozyten sehr ähnlich sind (Vergleiche Abschnitt 2.2.3.1.).

Als erstes wurde überprüft, ob der zur Induktion im Tiermodell eingesetzte APN-Antikörper auch eine Veränderung der EPZ in der Zellkultur hervorrufen können. Dazu wurden die Zellen ausgesät und über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des APN-Antikörpers inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mikroskopisch analysiert, um zum *foot process effacement* analoge morphologische Veränderungen, wie die Reduktion der Anzahl an unterscheidbaren Pseudopodien, festzustellen (Abb. 3.1.8.). Steigende Antikörper-Konzentrationen bewirkten Änderungen der Zellmorphologie und der Zelldichte, die auf eine Schädigung der Zellen hindeutet. Bereits bei der Behandlung mit 0,1 % APN-Antikörper zeigten einzelne Zellen eine weniger gestreckte Form als unbehandelte Zellen (Abb. 3.1.8., Pfeilspitzen). Zeitgleich war die Anzahl der mit dem Auge sichtbaren Pseudopodien nach APN-Antikörper-Behandlung besonders in Zellen mit wenigen Zell-Zell-

Kontaktstellen reduziert (Abb. 3.1.8., Pfeile). Da ein Verlust von Kontaktstellen final zur Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale führt, wurde die Konfluenz der Zellen beurteilt. Die Zellkonfluenz war nach Behandlung mit 0,1 % APN-Antikörper reduziert. Die Erhöhung der Antikörperkonzentration auf 0,25 % und 0,5 % (Abb. 3.1.8. bzw. Daten nicht gezeigt) verstärkte die beschriebenen Effekte und führte zu einer noch deutlicheren Ablösung der Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass der APN-Antikörper im Vergleich zu unbehandelten Zellen (0% APN-Antikörper) auch in den EPZ eine Schädigung auslösen kann.

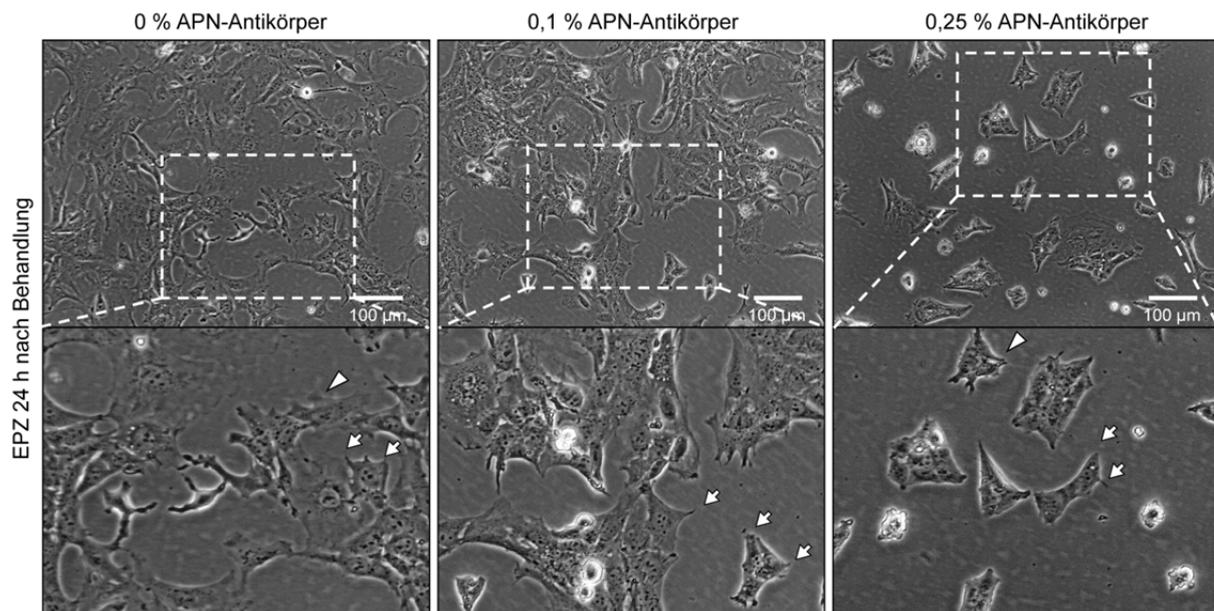


Abb. 3.1.8. Induktion einer Schädigung der EPZ-Zelllinie durch das APN-Model.

EPZ wurden über 24 h mit den angegebenen Mengen an APN-Antikörper behandelt und anschließend mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht (n = 2). Podozytäre Pseudopodien lagen nach APN-Antikörper-Behandlung reduziert vor (Pfeile), die Zellen wiesen zum Teil eine weniger gestreckte Morphologie auf (Pfeilspitzen). Maßstabsbalken = 100 µm.

Die EPZ Zellen wurden zunächst nach 24 h Inkubation mit dem APN-Antikörper gegen ADAM10 gefärbt. Damit sollte überprüft werden, ob in den EPZ ein Anstieg der ADAM10-Expression erfolgt, wie er im Tiermodell sichtbar war. Interessanterweise zeigte die Behandlung der EPZ keine eindeutige Veränderung des Expressionslevels von ADAM10 (Abb. 3.1.9. A). Um dennoch der Möglichkeit einer verstärkten ADAM10-Aktivität nachzugehen, wurden potentiell relevante Substrate untersucht. Hierbei wurden vor allem auch Adhäsionsmoleküle betrachtet, da diese zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale beitragen könnten. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit geeigneter Antikörper gegen podozytäre Adhäsionsmoleküle, erfolgte die Untersuchung gegen die relativ verbreitet

exprimierten Substrate Amyloides Vorläuferprotein (APP) und N-Cadherin. Die Färbung gegen APP zeigte eine leichte Zunahme der immaturren Vollängen-Form (APP FL, ca. 115 kDa) nach APN-Induktion. Das durch ADAM10-Proteolyse generierte APP C-terminale Fragment C83 (APP CTF C83) zeigte dagegen eine geringe Abnahme. Die Untersuchung der Proteolyse von N-Cadherin zeigte einen deutlich stärkeren Unterschied nach der Induktion des Podozytenschadens. Im Western Blot war eine deutliche Reduktion der N-Cadherin Vollängen-Formen (N-Cadherin FL) nach APN-Behandlung nachweisbar. Zeitgleich konnte das C-terminale Fragment von N-Cadherin deutlich stärker detektiert werden.

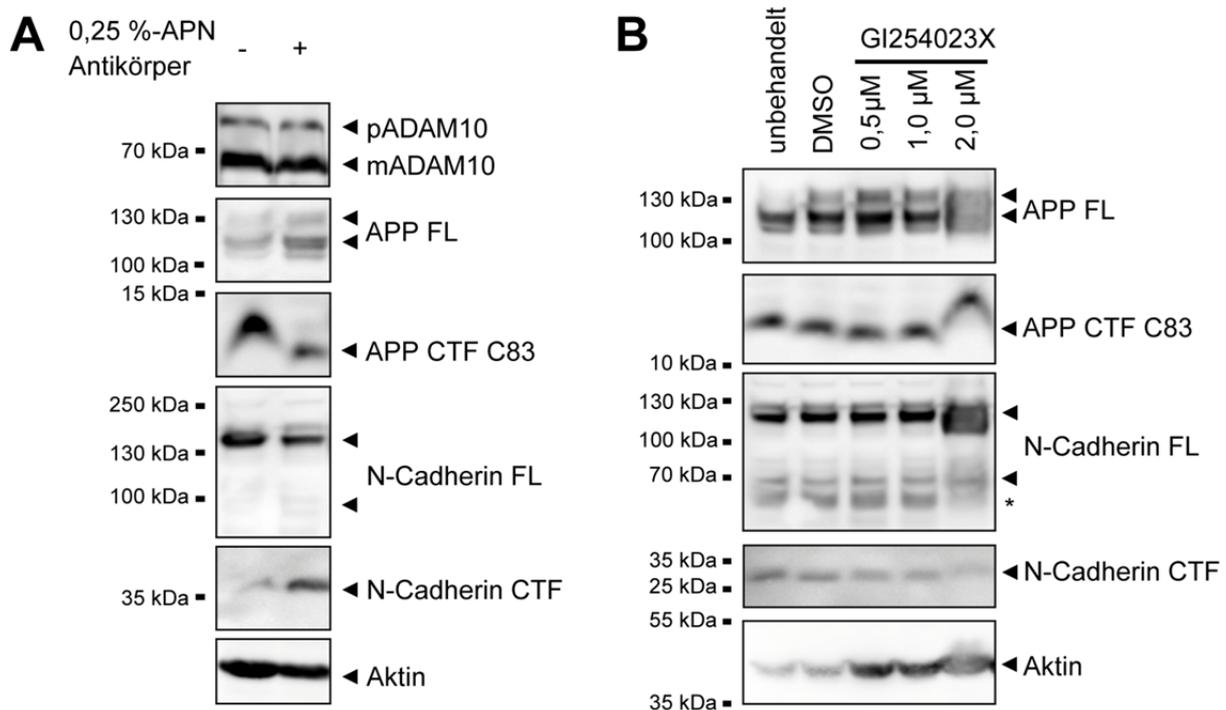


Abb. 3.1.9. Expression von ADAM10 und dessen Substraten nach Schädigung der EPZ.

(A) EPZ wurden 24 h mit einer geeigneten Konzentration APN-Antikörper behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Proben mittels Western Blot gegen ADAM10 und dessen bekannte Substrate APP und N-Cadherin auf Veränderungen untersucht. Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Um für weitere zellbasierte Versuche die ADAM10-Aktivität zu blockieren, wurden EPZ mit steigenden Konzentrationen des ADAM10-Inhibitors GI254023X behandelt und die Lysate auf *shedding*-Produkte von APP und N-Cadherin untersucht. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, FL = Volllänge, CTF = C-terminales Fragment, * = unspezifisches Signal.

Um in weiteren Versuchen die Rolle von ADAM10 im Prozess der podozytären Schädigung untersuchen zu können, wurden Möglichkeiten getestet, dessen Aktivität zu reduzieren. Die siRNA-vermittelte Herunterregulation der *Adam10*-mRNA war aufgrund geringer Transfektionseffizienzen unzureichend (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf den ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X zurückgegriffen

[Ludwig *et al.*, 2005]. Es wurde eine GI254023X Konzentrationsreihe aufgestellt und die Effizienz der Inhibition des ADAM10-vermittelten *sheddings* untersucht. Hierbei wurde gegen die bereits auf den EPZ nachgewiesenen Substrate APP und N-Cadherin getestet (Abb. 3.1.9. B). Die Inhibition von ADAM10 durch GI254023X bewirkte keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der APP-Vollängen-Spezies und des APP CTF C83. N-Cadherin zeigte in dem gleichen Versuch bei 2 μ M GI254023X eine deutliche Zunahme der Vollängenform (N-Cadherin FL) und eine Reduktion des CTF. Aufgrund dieser Beobachtung wurde für weiterführende Experimente mit den EPZ 2 μ M GI254023X zur Inhibition der ADAM10-Aktivität verwendet.

Neben den bereits betrachteten Substraten APP und N-Cadherin ist auch der Notch-Rezeptor in vielen Organen ein relevantes Schlüssel-molekül. Viele phänotypische Beobachtungen des ADAM10-Knockouts können auf eine Notch-bedingte Entwicklungsstörung zurückgeführt werden [Hartmann *et al.*, 2002; Jorissen *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2011]. Da die Notch-Aktivität zudem in Verbindung zu podozytärer Erkrankungen beschrieben ist [Niranjan *et al.*, 2008], wurde der Notch-Signalweg auch nach APN-Antikörper-Behandlung in den EPZ untersucht. Hierzu wurde eine quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) gegen den Notch-Rezeptor und verschiedene Notch-responsive Gene durchgeführt (Abb. 3.1.10.). Die beiden untersuchten Notch-Rezeptoren *Notch1* und *Notch2* zeigten einen Anstieg der mRNA-Expression nach APN-Behandlung im Vergleich zu den DMSO behandelten Kontrollzellen. Für *Notch1* war dieser Anstieg signifikant, konnte jedoch durch Inhibition von ADAM10 nicht wieder gesenkt werden. Die Expression von *Notch2* dagegen zeigte zwar nur eine Tendenz zur Zunahme, konnte jedoch durch GI254023X wieder auf das Ausgangswert reduziert werden. Durch eine Erhöhung der Expression der Rezeptoren besteht auch die Möglichkeit der Beeinflussung der Notch-responsiven Gene. Daher wurden die mRNA-Proben gegen die klassischen Notch-responsiven Gene *Hes1*, *Hes5*, *Hey1* und *Hey2* getestet. *Hes5* zeigte dabei nur geringe Werte, die im Signalhintergrund lagen (Daten nicht gezeigt). Die *Hes1*-Expression lag nach APN-Behandlung immer noch auf dem Basalwert und unterlag auch keinen Änderungen unter GI254023X-Zugabe. *Hey1* dagegen lag infolge der APN-Behandlung signifikant erhöht vor. Die Zugabe des ADAM10-Inhibitors ermöglichte eine leichte Reduktion dieser Erhöhung, die Werte lagen aber immer noch signifikant über der Basalexpression. *Hey2* dagegen lag nach APN-Behandlung

unabhängig von der ADAM10-Inhibition signifikant reduziert vor. Es konnte somit nur für das Notch-responsive Gen *Hey1* eine Erhöhung detektiert werden, wie sie aufgrund der Literaturlage infolge erhöhter Notch-Aktivität erwartet würde. Für die weiteren Analysen des Einflusses von ADAM10 auf die Entwicklung der Nephritis wurde vor allem das Adhäsionsmolekül N-Cadherin betrachtet.

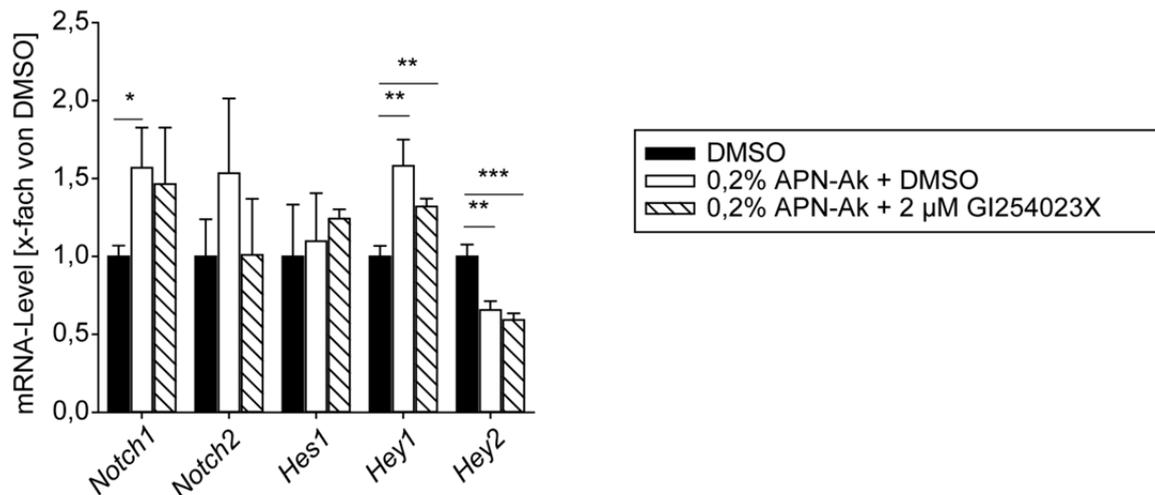


Abb. 3.1.10. Notch-Aktivität in der EPZ-Zelllinie nach deren Schädigung.

Die Proben wurden über 24 h wie angegeben behandelt (4 technische Replikate, $n = 2$) und anschließend für eine qRT-PCR auf verschiedene Notch-Rezeptoren und Notch-responsive Gene aufbereitet. Der Beitrag von ADAM10 wurde über den spezifischen Inhibitor GI254023X analysiert. Die dargestellten Werte sind auf Tubulin normalisiert und als Vielfaches der DMSO-Kontrolle dargestellt. Ak = Antikörper. Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die bisherigen Befunde aus der EPZ-Zelllinie deuten auf eine mögliche Induktion der Proteolyse von Zelladhäsionsmolekülen wie N-Cadherin als Ursache des Ablösens der Zellen von der Zellkulturschale infolge der Behandlung mit dem APN-Antikörper. Aus diesem Grund wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt, in dem insbesondere die Beteiligung von ADAM10 an der Zellablösung untersucht wurde (Abb. 3.1.11.). Hierzu wurden die nach Abschluss der APN-Behandlung noch adhärierenden Zellen mittels Kristallviolett gefärbt (Vergleiche Abschnitt 2.2.3.9.). Die Behandlung der EPZ mit präimmun-Antikörper zeigte den gleichen Grad an Adhäsion wie die komplett unbehandelten Zellen (Abb. 3.1.11. B). Für das Experiment wurde die Konzentration an APN-Antikörper so gewählt, dass sich ein Großteil der Zellen von der Zellkulturschale ablöst. Die Inkubation mit dem APN-Antikörper (0,2 % APN-Antikörper + DMSO) führte zu einer signifikanten Reduktion der adhärierenden Zellen auf die Hälfte der mit präimmun-Antikörper behandelten Zellen gemessen am Kristallviolett-Signal. Mikroskopisch zeigten sich neben der deutlichen Verringerung

der Anzahl der anhaftenden Zellen die bereits beschriebene Reduktion der Pseudopodien und die Änderung der Zellform (Abb. 3.1.11. A, Vergleiche

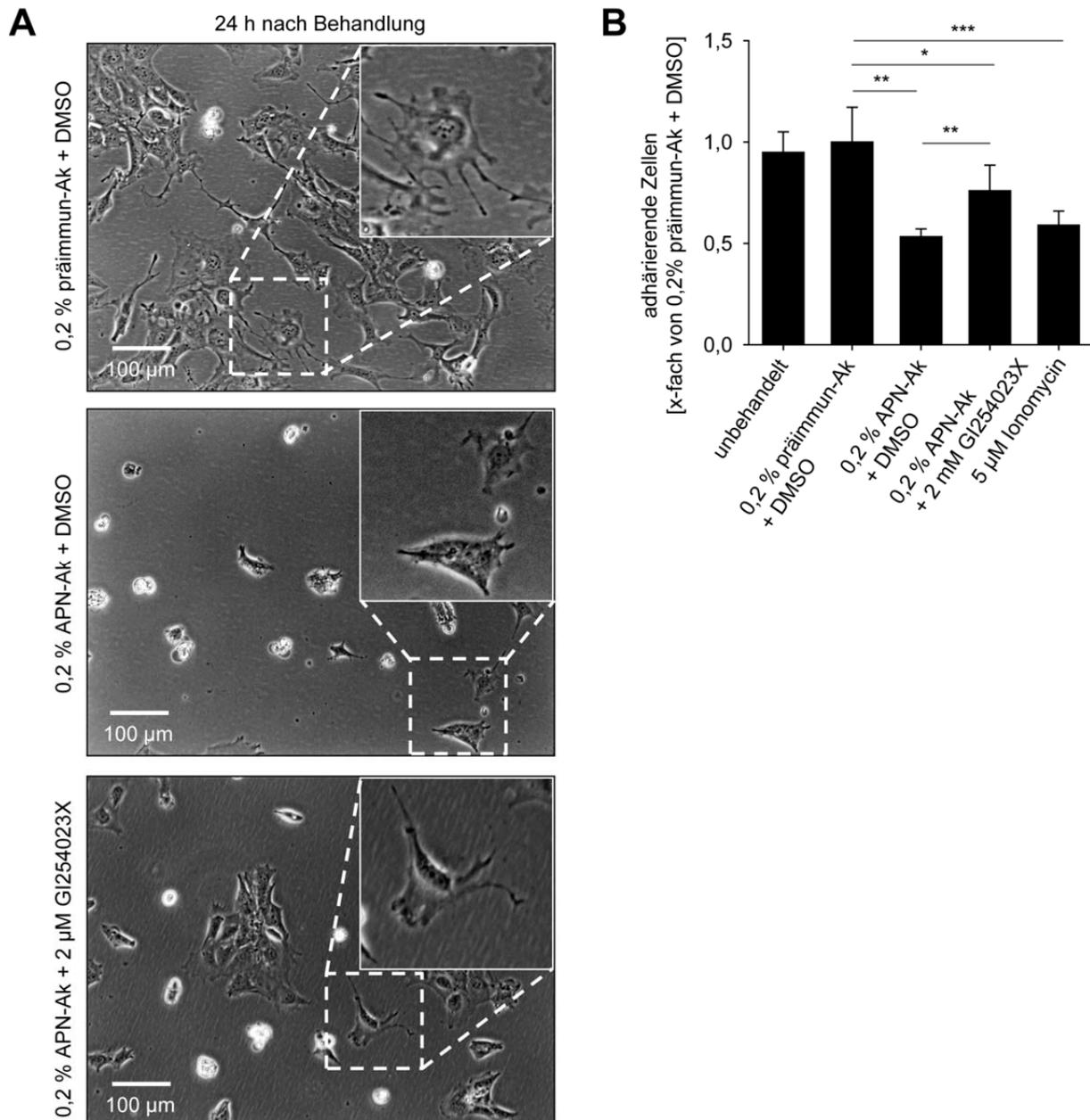


Abb. 3.1.11. Zelladhäsion der EPZ -Zelllinie nach deren Schädigung.

(A) EPZ wurden über 24 h mit präimmun- bzw. APN-Antikörper inkubiert und die Zellmorphologie mikroskopisch bewertet. Zur besseren Beurteilung der Anzahl der Pseudopodien wurde eine Vergrößerung repräsentativer Zellen dargestellt. Über die parallele Behandlung mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X wurde der Beitrag von ADAM10 zu den beobachteten Effekten bestimmt. (B) Zur Quantifizierung der Adhäsion wurden EPZ über 24 h mit präimmun- bzw. APN-Antikörper behandelt und der Zellkulturüberstand verworfen. Die noch adhärenenden Zellen wurden mittels Kristallviolett gefärbt, die Färbung quantifiziert und auf die präimmun-Antikörper behandelten Proben normalisiert (n = 3). Die Behandlung mit dem ADAM10-Aktivator Ionomycin (30 min) und die unbehandelten Proben dienten als Kontrolle des Assays. Die Inkubation mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X diente der Beurteilung des Beitrags von ADAM10 zum Ablösen der Zellen. Ak = Antikörper. Signifikanzen: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Abb. 3.1.8.). Als Positivkontrolle der Induktion von ADAM10 wurden EPZ-Zellen für 1 h mit Ionomycin vorbehandelt. Auf diese Weise sollte die ADAM10-Aktivität induziert werden und zum *shedding* von Adhäsionsmolekülen führen. Die Behandlung mit Ionomycin bewirkte eine Reduktion der Zelladhäsion auf 60 % gemessen an der Kristallviolett-Färbung.

Zum Nachweis, dass der APN-Antikörper einen ADAM10-abhängigen Effekt auf die Proteolyse von Adhäsionsmolekülen vermittelt, wurde eine weitere Probengruppe neben dem APN-Antikörper mit GI254023X behandelt (Abb. 3.1.11.). Auf diese Weise behandelte Zellen (0,2 % APN-Antikörper + 2 μ M GI254023X) zeigten immer noch eine signifikante Reduktion der Adhäsion im Vergleich zu den präimmun-Antikörper behandelten Proben. Jedoch war der Anteil adhätierender Zellen nur auf etwa 75 % reduziert und gegenüber den APN-Antikörper behandelten Proben ohne den ADAM10-Inhibitor signifikant erhöht. Die mikroskopische Untersuchung zeigte zudem deutlich ausgeprägtere Pseudopodien der EPZ infolge der Induktion der Schädigung neben dem ADAM10-Inhibitor (Abb. 3.1.11. A, siehe Vergrößerung). Das Ablösen der Zellen konnte durch die Inhibition von ADAM10 reduziert werden, was auf die Beteiligung einer ADAM10-mediierter Proteolyse bei der APN-Antikörper-vermittelten Schädigung hindeutet. Die Aussagen aus dem Adhäsionsassay und die Vorbefunde hinsichtlich erster Substratanalysen deuten dabei auf die Proteolyse von Zelladhäsionsmolekülen.

Aus diesem Grund wurde die Prozessierung des ADAM10-Substrates N-Cadherin über einen Zeitraum von 24 h nach Behandlung mit dem APN-Antikörper verfolgt. Als Kontrolle dienten präimmun-Antikörper behandelte Zellen, sowie mit GI254023X vorbehandelte Zellen zur ADAM10 Inhibition über den Zeitraum des Experimentes (Abb. 3.1.12.). Es konnte keine Zunahme der Expression der Proform oder der maturen Form von ADAM10 nach APN-Behandlung detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich nach APN-Behandlung über die Zeit eine leichte Abnahme der Vollängen-Formen des ADAM10-Substrates N-Cadherin unter gleichzeitiger Zunahme des N-Cadherin CTF. Die Zugabe des ADAM10-Inhibitors GI254023X konnte diesen Effekt umkehren. Hier konnte das N-Cadherin CTF nach 24 h im Vergleich zu allen anderen APN-Antikörper-behandelten Proben schwächer nachgewiesen werden. Die Vollängen-Formen von N-Cadherin neben der Behandlung mit GI254023X entsprachen etwa den Banden nach 0 h APN-

Behandlung. Diese Beobachtungen weisen auf die Beteiligung von ADAM10 an der Generierung des N-Cadherin CTF in EPZ nach der APN-vermittelten podozytären Schädigung hin.

Die mit präimmun-Antikörper inkubierten Proben zeigten nach 24 h eine stärkere Signalintensität des N-Cadherin CTF als die 0 h APN behandelten Proben. Jedoch konnten auch die Volllängenformen von N-Cadherin in den präimmun-Antikörper behandelten Proben stärker nachgewiesen werden. Dieser Effekt war zudem nicht in allen Experimenten sichtbar und ist möglicherweise auf Abweichungen der Zelldichte zurückzuführen. Nur Antikörper nach der Immunisierung mit Podozyten führten zu einer Veränderung der Prozessierung und wie bereits gezeigt zum Ablösen der Zellen, wodurch die Spezifität des APN-Antikörpers gezeigt werden kann.

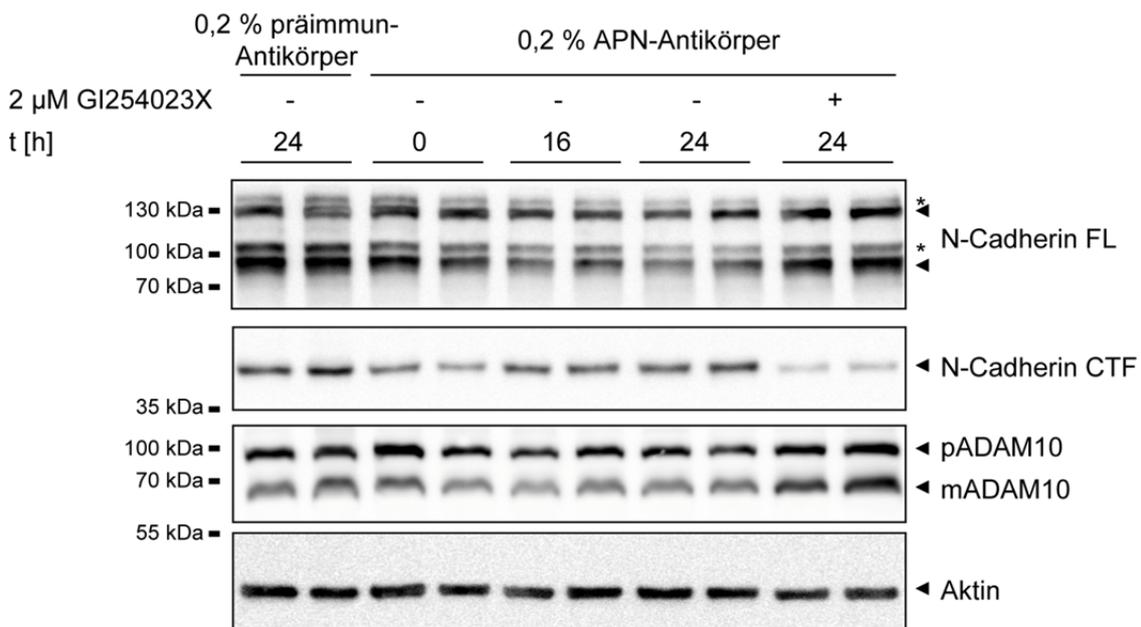


Abb. 3.1.12. Analyse des N-Cadherin-*shedding* nach Schädigung der EPZ.

Die Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum mit APN-Antikörper behandelt und im Western Blot gegen ADAM10 und N-Cadherin gefärbt (n = 4). Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität der Effekte dienten die Behandlung mit präimmun-Antikörper bzw. die Inhibition von ADAM10 mit 2 μ M GI254023X über den Zeitraum des Experimentes. Zur besseren Detektierbarkeit des N-Cadherin CTF wurden die Zellen während des gesamten Experimentes mit 1 μ M des γ -Sekretase Inhibitors DAPT behandelt. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, FL = Volllänge, CTF = C-terminales Fragment, * = unspezifisches Signal.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Veränderung der ADAM10-abhängigen Proteolyse von N-Cadherin auch einen Einfluss auf dessen Oberflächenexpression und damit dessen Funktion als Adhäsionsmolekül haben kann. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenz in EPZ gegen N-Cadherin durchgeführt (Abb. 3.1.13.). In

unbehandelten Zellen konnte ein ungleichmäßiges Signal an der Zelloberfläche detektiert werden. Das Signal war über weite Teile der Zelloberfläche nur schwach vorhanden, jedoch an Zell-Zell-Kontaktstellen besonders stark detektierbar. Dies ist ein Indiz für eine Beteiligung von N-Cadherin an der Adhäsion von Podozyten untereinander. Die Zugabe des ADAM10-Aktivators Ionomycin sollte die Prozessierung von N-Cadherin verstärken und so die Oberflächenexpression senken

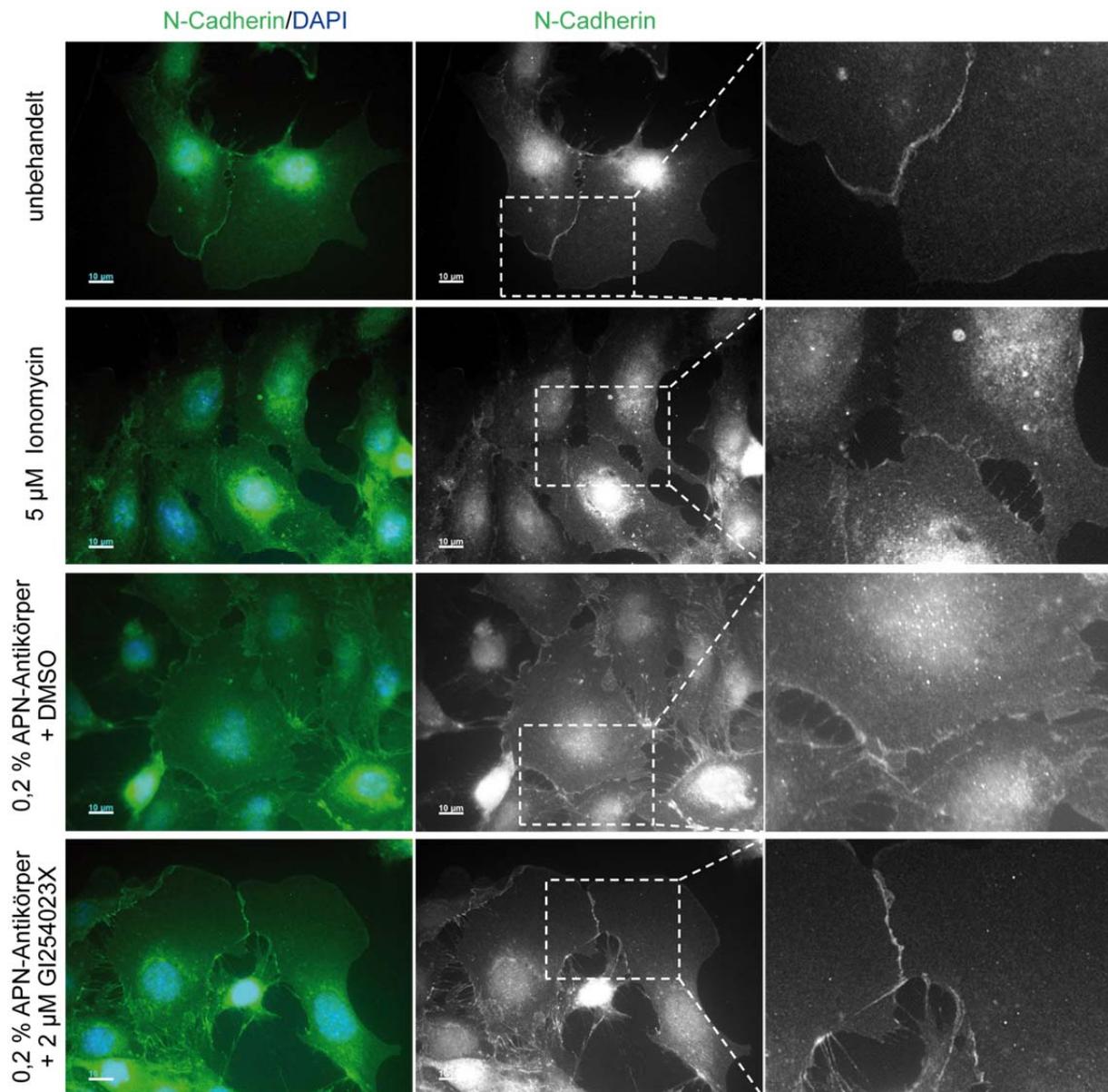


Abb. 3.1.13. Immunfluoreszenzanalyse des N-Cadherin-*shedding* nach Schädigung der EPZ .

Die Zellen wurden über 24 h wie angegeben behandelt (Ionomycin 30 min) und anschließend gegen N-Cadherin gefärbt. Zellkerne wurden über DAPI angefärbt. Unbehandelte Zellen und Ionomycin-Behandlung dienten als Kontrolle für Basal- bzw. induziertes *shedding* durch ADAM10. Der ADAM10-Inhibitor GI254023X dient der Visualisierung des Beitrags von ADAM10 zu den beobachteten Effekten. Maßstabsbalken = 10 µm.

[Reiss *et al.*, 2005]. Tatsächlich bewirkte eine halbstündige Behandlung mit Ionomycin einen Rückgang der Färbung in Bezug auf die gesamte Zelle. Der vorher prominente Unterschied der Intensität zwischen den Zell-Zell-Kontakten und den kontaktfreien Regionen war deutlich reduziert.

Als nächstes wurden APN-behandelte Zellen auf N-Cadherin-Färbung untersucht. Infolge der APN-Behandlung wurden hier die Unterschiede zwischen Kontakt- und kontaktfreien Regionen der Zelloberfläche reduziert, so dass die Situation den Ionomycin-behandelten Proben ähnelte. Dennoch war in beiden Regionen noch eine Färbung sichtbar. Der Effekt der APN-Behandlung fiel damit weniger stark aus, als der von Ionomycin. Eine APN-Behandlung neben dem Inhibitor GI254023X zeigte dagegen eher das Bild, wie es auch für die unbehandelten Zellen repräsentativ war. Die Färbung gegen N-Cadherin war ungleichmäßig an der Zelloberfläche verteilt und besonders an Zell-Zell-Kontakten intensiv nachweisbar. Der ADAM10-Inhibitor konnte in diesem Experiment die vom APN-Antikörper ausgelöste Reduktion der N-Cadherin-Expression an der Zelloberfläche verhindern. Damit weisen auch die Immunfluoreszenzanalysen auf eine APN-vermittelte N-Cadherin-Proteolyse an der Zelloberfläche durch ADAM10 hin.

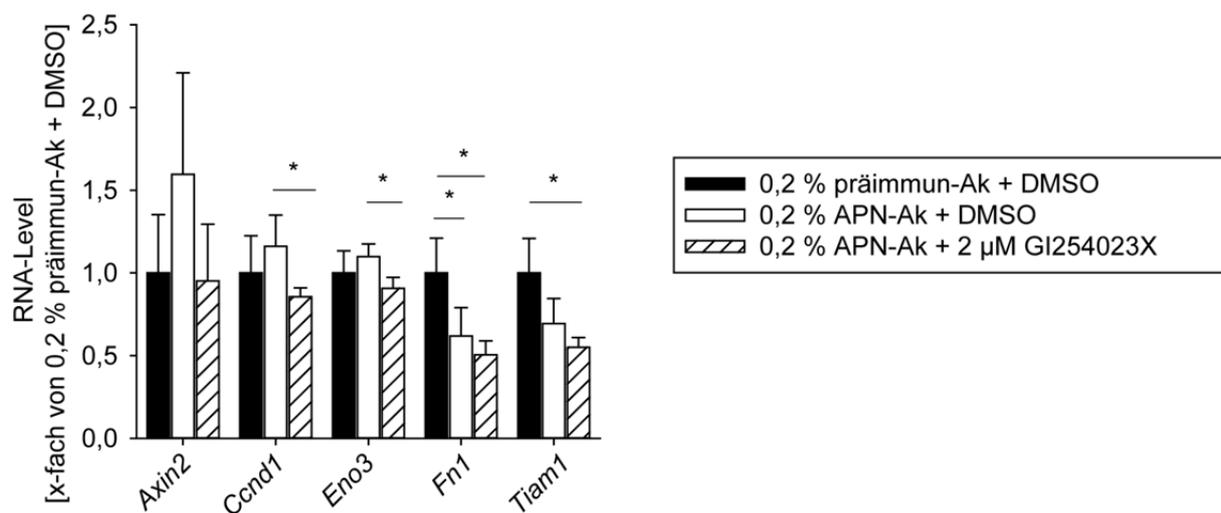


Abb. 3.1.14. Aktivität des Wnt-Signalweges in EPZ nach deren Schädigung.

EPZ wurden über 24 h wie angegeben behandelt (4 technische Replikate) und anschließend für eine qRT-PCR auf verschiedene Wnt-responsive Gene aufbereitet. Über den spezifischen Inhibitor GI254023X wurde der Beitrag von ADAM10 dargestellt. Die Werte sind auf Tubulin normalisiert und als Vielfaches der DMSO-Kontrolle abgetragen. Ak = Antikörper. Signifikanz: * $p < 0,05$.

Die mögliche Rolle von N-Cadherin ist jedoch nicht auf seine Funktion als Adhäsionsmolekül beschränkt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass β -Catenin an

dessen C-Terminus bindet und die Überexpression von Vollängen-N-Cadherin den Wnt-Signalweg hemmt [Xu *et al.*, 2002; Shoval *et al.*, 2007]. Somit könnte eine Verringerung von Oberflächen-N-Cadherin durch APN-Antikörper induziertes *shedding* auch eine Aktivierung des Wnt-Signalweges bewirken. Eine Verstärkung der Aktivität des Wnt-Signalweges konnte bereits in einer podozytären Erkrankungen mit Proteinurie gezeigt werden [Dai *et al.*, 2009]. Die verstärkte Aktivität des Wnt-Signalweges reduzierte dabei auch die Expression des Zell-Zell-Kontakt vermittelnden Nephrins und bietet damit eine weitere Möglichkeit, das Ablösen von Podozyten von der Basalmembran zu erklären. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden die Glomeruliprüfungen mittels qRT-PCR auf verschiedene *Wnt-downstream* Gene analysiert (Abb. 3.1.14.). Für *Axin2*, CyclinD1 (*Ccnd1*) und β -Enolase (*Eno3*) konnte ein leichter Anstieg der mRNA-Expression nach APN-Behandlung festgestellt werden, der jedoch keine Signifikanz erreichte. Die Inhibition der ADAM10-Aktivität mittels GI254023X neben der APN-Behandlung ermöglichte die Reduktion der erhöhten Werte bis mindestens zum Basallevel und erreichte mit Ausnahme von *Axin2* Signifikanz. Während diese Gene auf eine verstärkte Aktivität des Wnt-Signalweges hinweisen, zeigten Fibronectin (*Fn1*) und *Tiam1* eine signifikante Reduktion neben APN-Antikörper, die jedoch nicht durch GI254023X auf das Ausgangslevel zurückgeführt werden konnte. Es ist somit keine eindeutige Aussage bezüglich der Beeinflussung des Wnt-Signalweges möglich, da sich die mRNA-Level nicht einheitlich verhielten. Für einige der untersuchten mRNAs konnte eine verstärkte Expression nach APN-Behandlung in Abhängigkeit von der ADAM10-Aktivität nachgewiesen werden. Andere Zielgene waren herunterreguliert, waren dabei jedoch von der ADAM10-Aktivität unabhängig.

3.2. Charakterisierung eines Leber-spezifischen ADAM10-Knockouts

Die Leber ist ein wichtiges Organ des Körpers, welches beispielsweise die Bildung von Galle zur Unterstützung der Verdauung, die Speicherung von Kohlenhydraten als Glykogen und die Entgiftung toxischer Substanzen übernimmt. Um diese Funktionen dauerhaft sicherzustellen, verfügt das Lebergewebe über ausgeprägte Reparatur- und Regenerationsmechanismen. Leichte Schädigungen der Leber können durch die Proliferation von Hepatozyten entgegnet werden [Rhim *et al.*, 1994]. Eine chronische Schädigung, die gleichzeitig die Proliferation der Hepatozyten beeinträchtigen, führt zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen der Leber [Dabeva und Shafritz, 1993; Viebahn und Yeoh, 2008; Espanol-Suner *et al.*, 2012]. Insbesondere den Notch-responsiven Genen kommt eine große Bedeutung bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen zu [Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2004]. Da der Notch-Signalweg vor allem über eine ADAM10-vermittelte Proteolyse initiiert wird [van Tetering *et al.*, 2009; De Strooper *et al.*, 1999; Jarriault *et al.*, 1998], war die Charakterisierung der Funktion von ADAM10 auf die Leber interessant. Daher wurden konditionelle Leber-spezifische ADAM10-Knockout Mäuse generiert.

3.2.1. Verifizierung eines ADAM10-Knockouts in hepatischen Vorläuferzellen einer Alfp-Cre-Linie

Zur Deletion von ADAM10 in der Leber wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch einen kombinierten Promotor aus dem Albumin *regulatory element* und dem α -Etoprotein *enhancer* (Alfp) reguliert. Dieser Promotor wird spezifisch in Hepatoblasten ab Tag E9,5 aktiviert und sollte daher eine Deletion von ADAM10 in allen von Hepatoblasten abstammenden Zellen ermöglichen [Kellendonk *et al.*, 2000]. Damit sollte ADAM10 in der adulten Leber in den Leber Vorläuferzellen (LPC), den Cholangiozyten und den Hepatozyten reduziert vorliegen. Die Analyse der Knockout-Mauslinie wurde im Zuge eines Kooperationsprojektes mit Miryam Müller (AG Schmidt-Arras, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Deutschland) durchgeführt.

Zur Kontrolle des Expressionsmusters der Cre-Rekombinase wurde ein Rosa-STOP-eYFP-Konstrukt in eine Alfp-Cre-Linie eingekreuzt. Wird die Cre-Rekombinase exprimiert, erfolgt die Deletion einer Stopsequenz, wodurch das dahinter gelegene eYFP exprimiert wird. Damit ist nachvollziehbar, in welchen Zellen der verwendete Promotor zur Expression der Cre-Rekombinase führt.

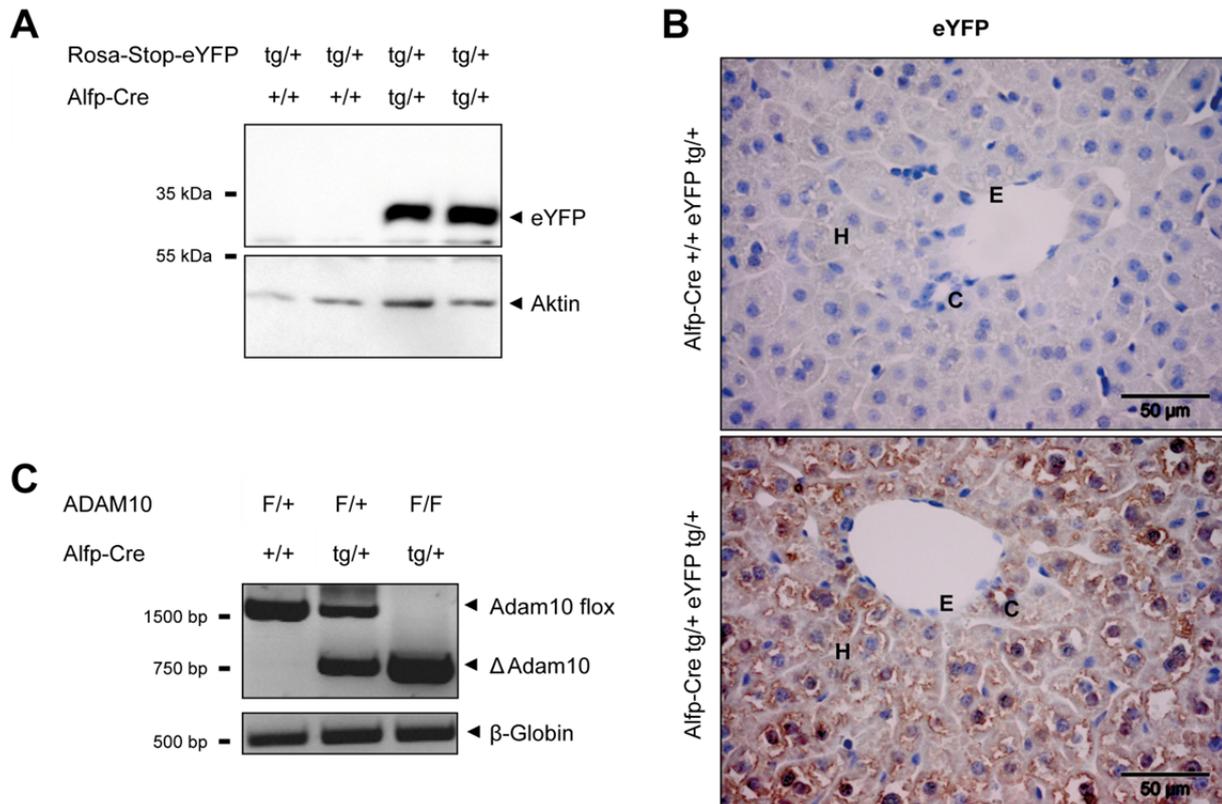


Abb. 3.2.1. Aktivität der Cre-Rekombinase in Leberproben der Alfp-Cre-Linie.

(A-B) Infolge von Cre-Rekombinase-Aktivität erfolgt die Expression von eYFP im Rosa-Stop-eYFP-Stamm. Zur Überprüfung der Expression von eYFP wurde das Protein im Western Blot von Leberproben vier Wochen alter Tiere (A) und durch Färbung in Paraffinschnitten dargestellt (B). Maßstabsbalken = 50 µm. C = Cholangiozyten, E = Endothelzellen, H = Hepatozyten. (C) Der Nachweis der Aktivität der Cre-Rekombinase in den Tieren mit gefloxtem ADAM10 erfolgte über eine geeignete Deletions-PCR. Das deletierte Allel liefert ein Signal bei 700 bp (Δ Adam10), das gefloxtete Allel bei 2000 bp (Adam10 flox). β -Globin diente als Ladekontrolle. F = gefloxtes Allel, + = Wildtyp-Allel, tg = Transgen.

Zunächst wurden Organlysate von Alfp-Cre^{+/-} Rosa-Stop-eYFP^{+/-} Tieren und den entsprechenden Kontrolltieren auf die Expression von eYFP untersucht. Der Western Blot zeigte eine deutliche eYFP-Expression in den Proben der Cre-Rekombinase exprimierenden Tiere (Abb. 3.2.1. A). Ohne Expression der Cre-Rekombinase konnte kein eYFP nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten ausschließlich in Leberlysaten ein eYFP-Signal, in zur Kontrolle herangezogenen Milz- und Nierenlysaten dagegen wurde keine Cre-Rekombinase-Aktivität nachgewiesen

(Daten nicht gezeigt). Die Expression der Cre-Rekombinase erfolgte somit Leber-spezifisch. Eine immunhistologische eYFP-Färbung zeigte ein deutliches Signal in Leber-Gewebsschnitten Cre-Rekombinase positiver Tiere (Abb. 3.2.1. B). Dabei wiesen sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten eine positive Färbung gegen eYFP auf. Die um das Blutgefäß gelegenen Endothelzellen dagegen wurden nicht angefärbt. Die Färbung zeigt damit, wie von Kellendonk beschrieben, dass der Alfp-Promotor ausschließlich in Zellen aktiv ist, die von Hepatoblasten abstammen [Kellendonk *et al.*, 2000]. Analog der Ergebnisse aus den Western Blot Analysen konnte in Cre-Rekombinase negativen Tieren auch über die Gewebefärbung kein eYFP nachgewiesen werden.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Knockout-Strategie die Induktion einer ADAM10-Defizienz ermöglicht. Hierzu wurde die bereits vorgestellte ADAM10-Deletions-PCR auf Leber-Totalgewebe durchgeführt. Tiere ohne Cre-Rekombinase Expression zeigten nur das Signal, welches im Fall des gefloxt vorliegenden ADAM10-Allels zu erwarten ist (ca. 2000 bp, Abb. 3.2.1. C). Wurde die Cre-Rekombinase exprimiert und lag das ADAM10-Allel homozygot gefloxt vor, konnte ausschließlich das Signal des deletierten ADAM10 Exon2 (700 bp) detektiert werden. Nicht rekombiniertes ADAM10 konnte nicht mehr detektiert werden, weswegen von einer vollständigen Deletion des ADAM10 Exon 2 ausgegangen werden kann. Tiere die hinsichtlich des geflochten ADAM10-Allels heterozygot waren und die Cre-Rekombinase exprimierten, zeigten neben dem Signale des deletierten ADAM10 Exon 2 noch eine weitere Bande. Diese wies eine ähnliche Größe wie das geflochte, nicht rekombinierte Allel auf und entspricht daher wahrscheinlich dem Wildtyp-Allel.

Nach dem Nachweis der ADAM10-Deletion auf DNA-Ebene, sollte als nächstes die Transkription von ADAM10 mit Hilfe einer quantitativen *Real-Time*-PCR untersucht werden. Diese zeigte eine signifikante Reduktion der *Adam10*-mRNA in vier Wochen alten Tieren auf ca. 55% des Niveaus der Kontrolltiere (Abb. 3.2.2. A). Auch in 15 Wochen alten Tieren war die *Adam10*-mRNA-Menge im Knockout deutlich reduziert, die Reduktion erreichte hier aber keine Signifikanz.

Anschließend wurde die ADAM10-Proteinexpression im Lebertotallysat mit Hilfe eines Western Blots überprüft (Abb. 3.2.2. B). In den Alfp-Cre exprimierenden Tieren konnte im Alter von vier und 15 Wochen eine deutliche Reduktion der immaturren ADAM10-Proform (ca. 100 kDa) detektiert werden. Matures ADAM10 konnte

dagegen auch in den Knockout-Tieren noch nachgewiesen werden und war im Vergleich zu den Kontrolltieren nur sehr schwach reduziert. Die schwächere Reduktion der muren ADAM10-Form kann hierbei verschiedene Gründe haben. Eine Möglichkeit ist, dass es infolge der ADAM10-Deletion zu Veränderungen im Gewebe kommt. Dadurch könnten vermehrt nicht-parenchymale Zellen auftreten, in denen keine *Alfp*-Promotor induzierte ADAM10-Deletion vorliegt. Hierbei könnte es sich zum Beispiel um einwandernde Zellen des Immunsystems handeln. Da für die Untersuchungen im Western Blot Lebertotallysat verwendet wurde, kann an dieser Stelle keine Unterscheidung zwischen den enthaltenen Zellen getroffen werden.

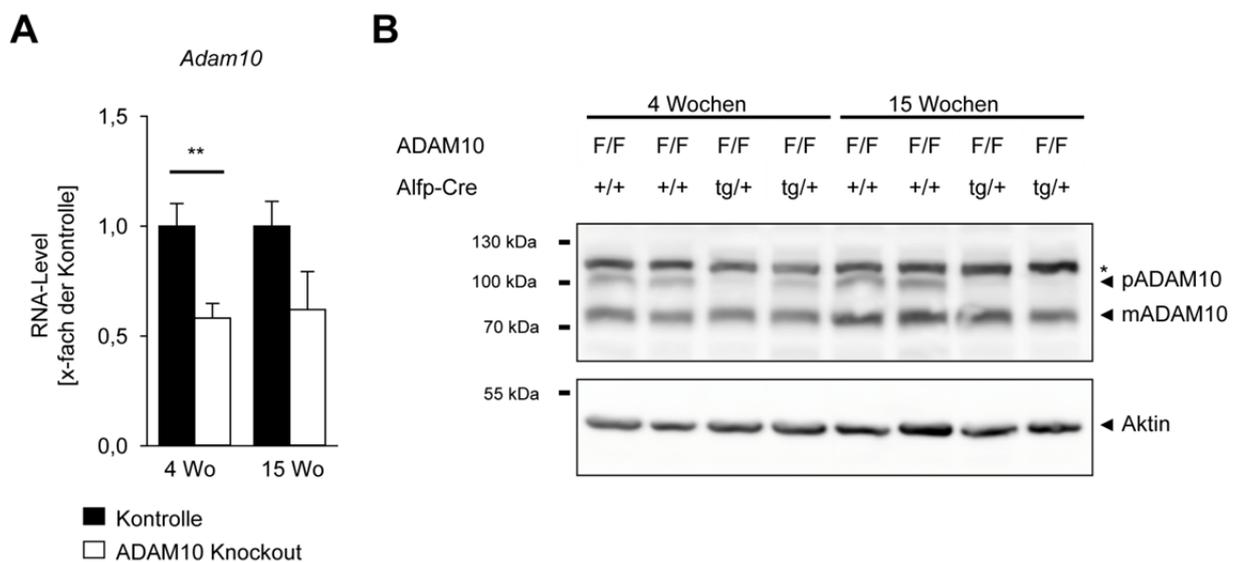


Abb. 3.2.2. Reduktion von ADAM10 in der Leber *Alfp-Cre* transgener Tiere.

(A) Zur Überprüfung der mRNA-Level von *Adam10* in den Leberproben von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren wurde eine qRT-PCR zu zwei verschiedenen Alterszeitpunkten durchgeführt (n = 4-5). Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und als Vielfaches der Kontrolltiere abgetragen. (B) Die Untersuchung der Reduktion von ADAM10 auf Proteinebene erfolgte über einen Western Blot. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Wo = Wochen, F = gefloxtes Allel, + = Wildtyp-Allel, tg = Transgen, pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, * = unspezifisches Signal. Signifikanz: ** p < 0,01.

Die verwendete Knockout-Strategie ermöglichte eine effiziente Reduktion von ADAM10 auf DNA- und mRNA-Ebene, sowie eine deutliche Reduktion der Proform von ADAM10, weswegen basierend auf diesen Tieren weitere Analysen durchgeführt wurden.

3.2.2. Charakterisierung der Pathologie des ADAM10-Knockout

Um den Effekt einer ADAM10-Deletion auf die Leber der Tiere zu untersuchen, erfolgte zuerst eine allgemeine Überprüfung der Tiere auf Auffälligkeiten. Bereits bei der Präparation fiel vor allem bei den vier Wochen alten ADAM10-Knockout Tieren eine deutlich vergrößerte Leber auf. Die Leber wies zudem ungewöhnliche, weiße Stellen auf (siehe Pfeile Abb. 3.2.3. A). In 33 Wochen alten Tieren war die Leber zudem auffällig verhärtet. Das Lebergewicht war in vier Wochen alten Tieren signifikant etwa 30 % erhöht, glich sich aber in 15 Wochen alten Tieren zunehmend an (Abb. 3.2.3. B). Neben der vergrößerten Leber konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren auch eine signifikante Vergrößerung der Milz nachgewiesen werden (Abb. 3.2.3. A-B). In 15 Wochen alten Tieren erreichte die Milz etwa das doppelte Gewicht im Vergleich zu den Kontrollproben (Daten nicht gezeigt).

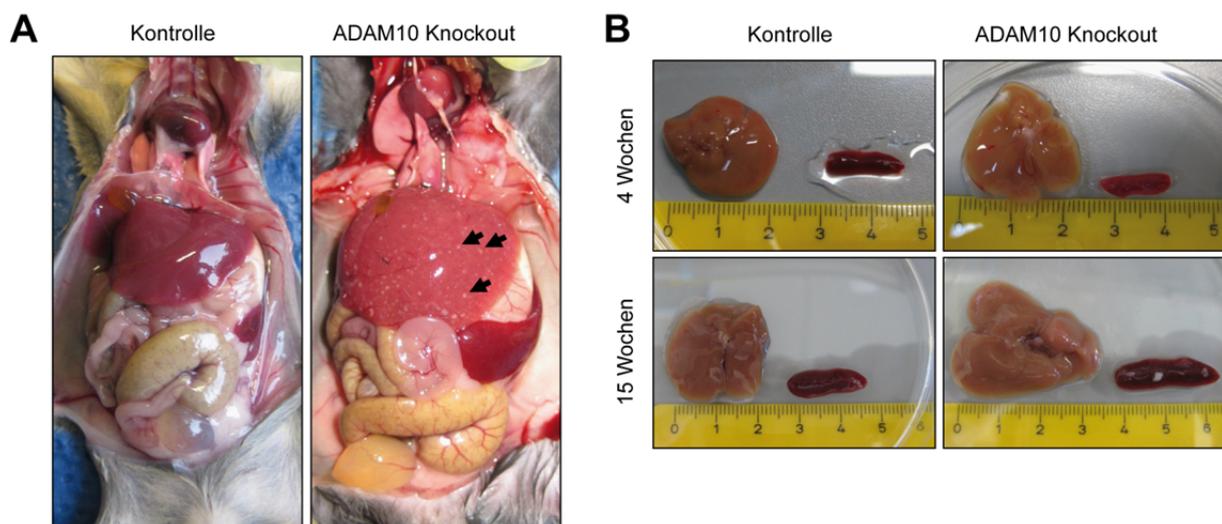


Abb. 3.2.3. Lebermakroskopie im ADAM10-Knockout.

(A) Bei der makroskopischen Untersuchung der inneren Organe im Alter von vier Wochen konnten helle Stellen (Pfeile) im Gewebe der ADAM10-Knockout Tiere festgestellt werden. (B) Der Vergleich der Masse und der Größe von Leber und Milz zeigte eine Vergrößerung beider Organe im ADAM10-Knockout (n = 4-16).

Um die Herkunft der weißen Stellen auf der Leber zu überprüfen wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gewebsschnitten der Leber durchgeführt (Abb. 3.2.4. A-B). Die HE-Färbung zeigte vor allem in den vier Wochen alten Knockout-Tieren das häufige Auftreten abgestorbener Hepatozyten, welche als schwächer angefärbte Regionen sichtbar sind. In den Schnitten der Kontrolltiere waren solche Bereiche dagegen nicht nachweisbar. Die elektronenmikroskopische

Untersuchung der Hepatozyten dieser Bereiche legte nahe, dass die enthaltenen Zellen durch Nekrose abgestorben sind (Abb. 3.2.4. C). In 15 Wochen alten Tieren waren die nekrotischen Regionen im Vergleich zu vier Wochen alten Tieren zwar deutlich reduziert, aber im Vergleich zu den Kontrolltieren immer noch signifikant erhöht (Abb. 3.2.4. A-B).

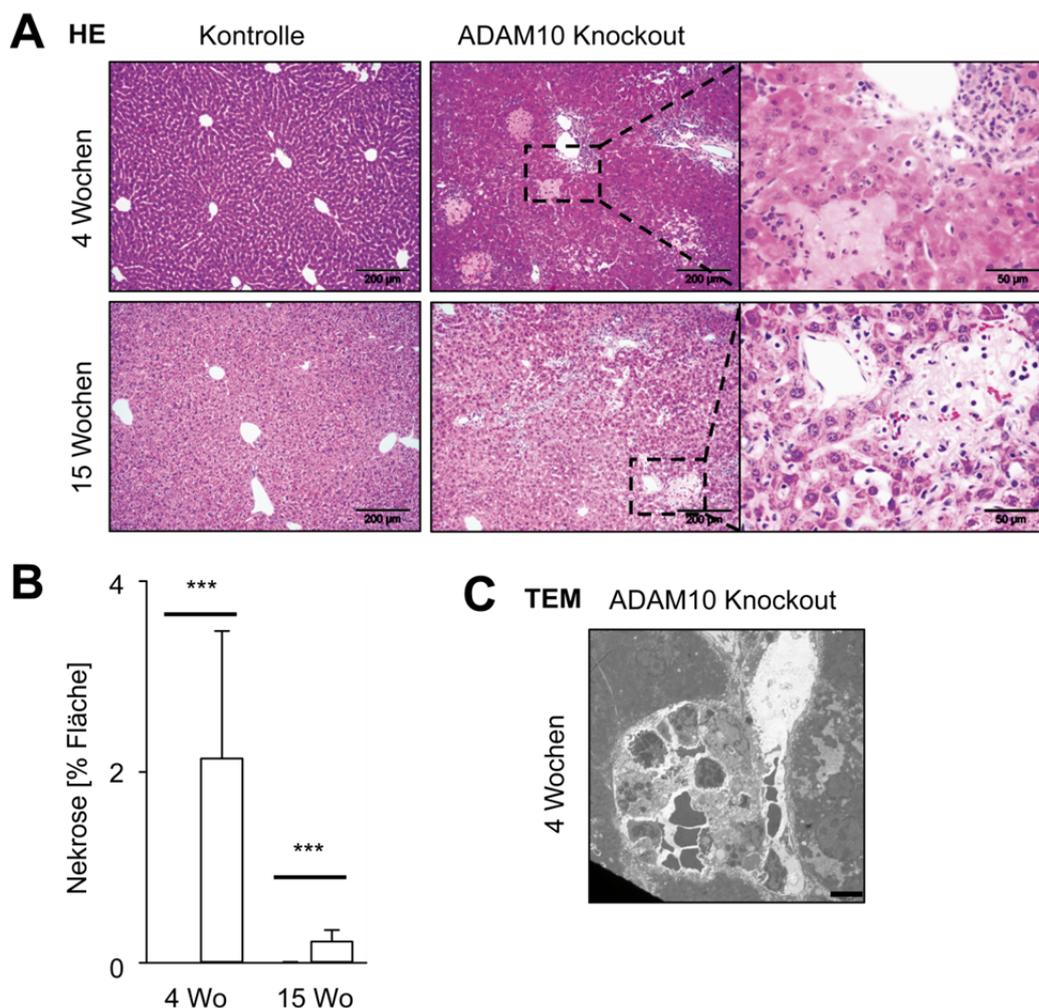


Abb. 3.2.4. Lebern der ADAM10-Knockout Mäuse weisen Nekrosen auf.

(A-B) Eine HE-Färbung von Gewebsschnitten paraffinierter Lebern von Kontroll- und ADAM10-Knockout Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten diente der strukturellen Beurteilung des Gewebes. ADAM10-Knockout Tiere zeigen ab dem Alter von vier Wochen schwächer angefärbte Bereiche im Gewebe (Nekrosen) (A). (B) Die Quantifizierung dieser nekrotischen Regionen zeigte dies am umfangreichsten in vier Wochen alten Tieren ($n = 4-16$). Maßstabsbalken = 200 μm bzw. 50 μm . (C) Ultrastrukturanalyse der nekrotischen Hepatozyten. Maßstabsbalken = 5 μm . HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Wo = Wochen, TEM = Transmissions-Elektronenmikroskopie. Signifikanzen: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Aufgrund der Beobachtung nekrotischer Regionen im Gewebe wurden klassische, klinisch-relevante Leberfunktionswerte im Serum der Tiere untersucht. Eine Schädigung von Leberzellen führt zur Freisetzung Leberzell-spezifische Proteine wie

der Alanin Aminotransferase (ALT), wodurch diese im Blut messbar wird. Da auch die Gallengangs-umschließenden Cholangiozyten von der Knockout-Strategie betroffen sind, wurde zudem die Alkalische Phosphatase (ALP) im Serum überprüft. Ist der Gallenabfluss beeinträchtigt, liegt der Serum-ALP-Wert erhöht vor [DiMarino *et al.*, 2010]. Über beide Proteine kann damit eine Aussage zum Zustand der Leber getroffen werden. Interessanterweise waren die ALT-Werte im ADAM10-Knockout erhöht und unterstützen damit die Beobachtung nekrotischer Hepatozyten (Abb. 3.2.5. A). Die Erhöhung der ALP-Werte im ADAM10-Knockout deutet auf eine Deregulation des Gallenabflusses als deren Ursache.

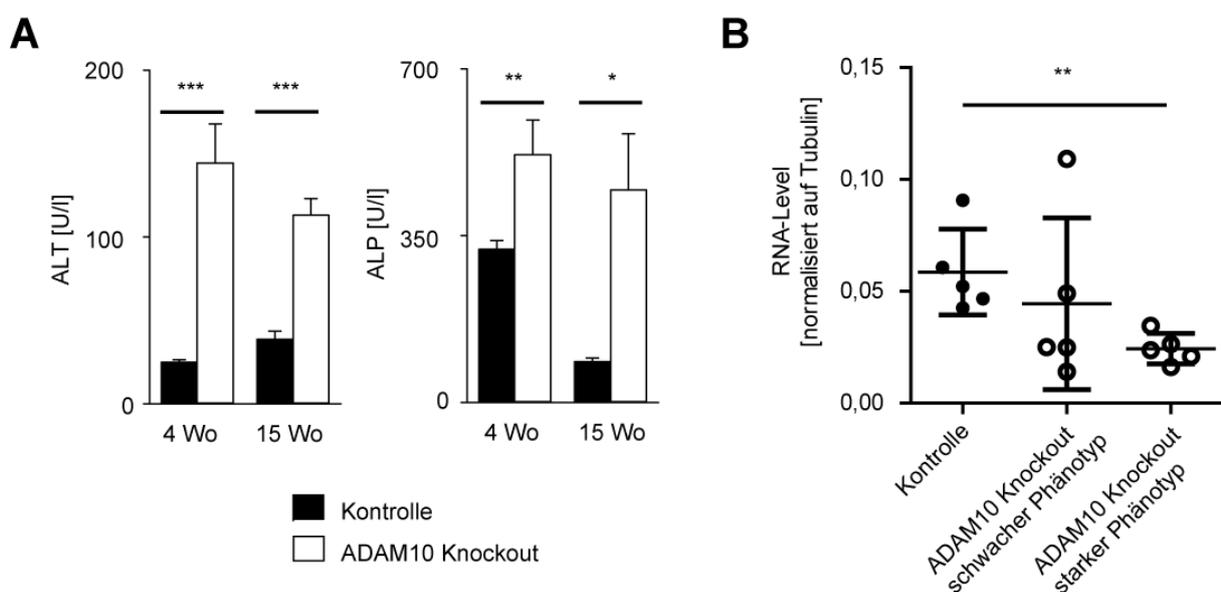


Abb. 3.2.5. Klinische Parameter im ADAM10-Knockout und Relevanz des ADAM10-Niveaus.

(A) Die Serumwerte für ALT und ALP stehen im Zusammenhang zu Leberschädigungen und wurden in Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (n = 4-16). (B) Leberproben vier Wochen alter Tiere aus beiden Gruppen wurden einer qRT-PCR gegen ADAM10 unterzogen (n = 5). Die Normalisierung erfolgte über Tubulin. Geringere *Adam10*-mRNA-Mengen korrelierten mit einem stärkeren Phänotyp, gemessen an der Hepatomegalie, den Nekrosen sowie den unter (A) aufgeführten Parameter. Wo = Wochen, ALT = Alanin Aminotransferase, ALP = Alkalische Phosphatase. Signifikanzen: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Dennoch waren nur etwa 30-50 % der ADAM10-Knockout Tiere von diesem deutlichen Phänotyp betroffen. Eine Überprüfung der *Adam10*-mRNA-Menge zeigte, dass die betroffenen Tiere stabil ein sehr niedriges *Adam10*-Level besaßen (Abb. 3.2.5. B). Die Tiere mit milderem Phänotyp dagegen zeigten ein schwächer reduziertes *Adam10*-mRNA-Level. Analog waren auch die ALT- und ALP-Werte dieser Tiere weniger auffällig und korrelierten mit dem deutlich schwächer ausgeprägten Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die

weiteren Analysen mit Schwerpunkt auf phänotypisch auffällige Tiere durchgeführt, welche nach Leber- und Milzgewicht, den Serumwerten von ALP und ALT, sowie dem *Adam10*-mRNA-Level eingestuft wurden.

Der beobachtete Rückgang der nekrotischen Regionen über die Zeit legt die Vermutung nahe, dass infolge der Schädigung Reparatur- und Regenerationsmechanismen in Gang gesetzt wurden, um die geschädigten Bereiche wiederherzustellen (Abb. 3.2.4. A-B). Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden die Gewebsschnitte gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt. Tatsächlich zeigten die ADAM10-Knockout Tiere gegenüber den Kontrollproben eine deutliche Zunahme der Ki67-Färbung (Abb. 3.2.6.). Hierbei wurde in vier und 15 Wochen alten ADAM10-Knockout Tieren doppelt so viel Ki67-Färbung detektiert wie in den Kontrollen (Quantifizierung nicht gezeigt). Nach 15 Wochen war die Ki67-Färbung der ADAM10-Knockout Tiere im Vergleich zum Alter von vier Wochen verringert. Während die Ki67-Färbung nach vier Wochen über das gesamte Gewebe verteilt detektierbar war, zeigten 15 Wochen alte ADAM10-Knockout Mäuse nur noch eine lokal Anreicherung. Der Rückgang der Ki67-Färbung ging somit zeitlich mit der Reduktion der nekrotischen Regionen einher (Abb. 3.2.4. A).

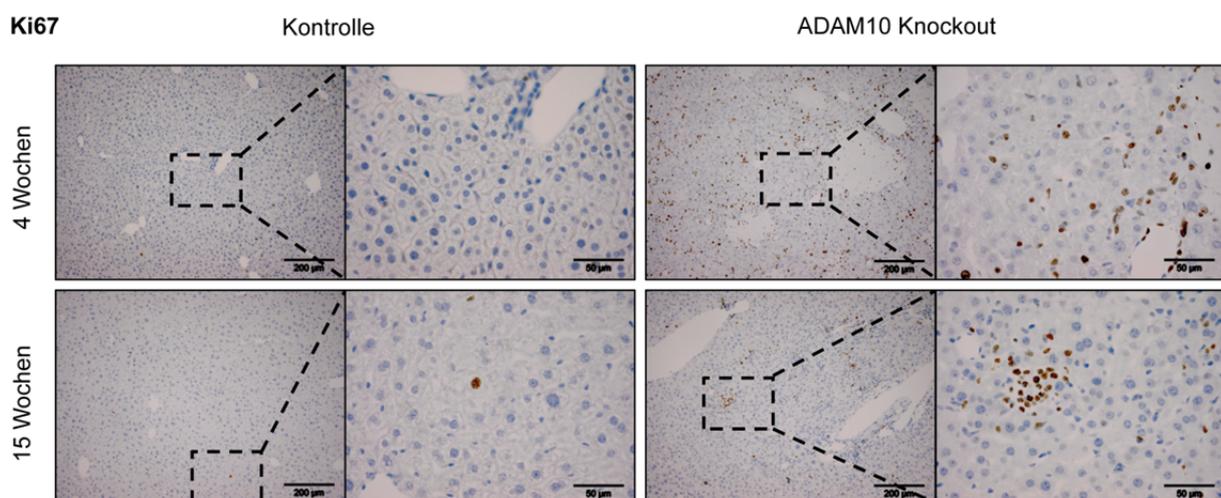


Abb. 3.2.6. Proliferation in Lebern der ADAM10-Knockout Tiere.

Zur Überprüfung einer Regenerationsantwort wurden proliferierende Zellen in Leber-Paraffinschnitten von Kontroll- und ADAM10-Knockout mittels Ki67 angefärbt. Maßstabsbalken = 200 µm bzw. 50 µm.

Der *Alp*-Promotor erlaubt eine Expression der Cre-Rekombinase ab dem Embryonaltag E9,5. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Nekrosen auf einen Entwicklungsdefekt zurückzuführen sind, wurden Proben neugeborener Tiere (P1) HE gefärbt. Interessanterweise konnte an Tag P1 in den ADAM10-Knockout Tieren

keine Hinweise auf eine Nekrose gefunden werden (Abb. 3.2.7.). Daher scheint die Ursache für diese nicht während der Leberentwicklung zu liegen, sondern erst später aufzutreten. Die beobachtete Erhöhung des ALP-Wertes weist auf Störungen im Galleabfluss hin, weswegen die Gallengänge als mögliche Ursache der Nekrosen in Frage kommen.

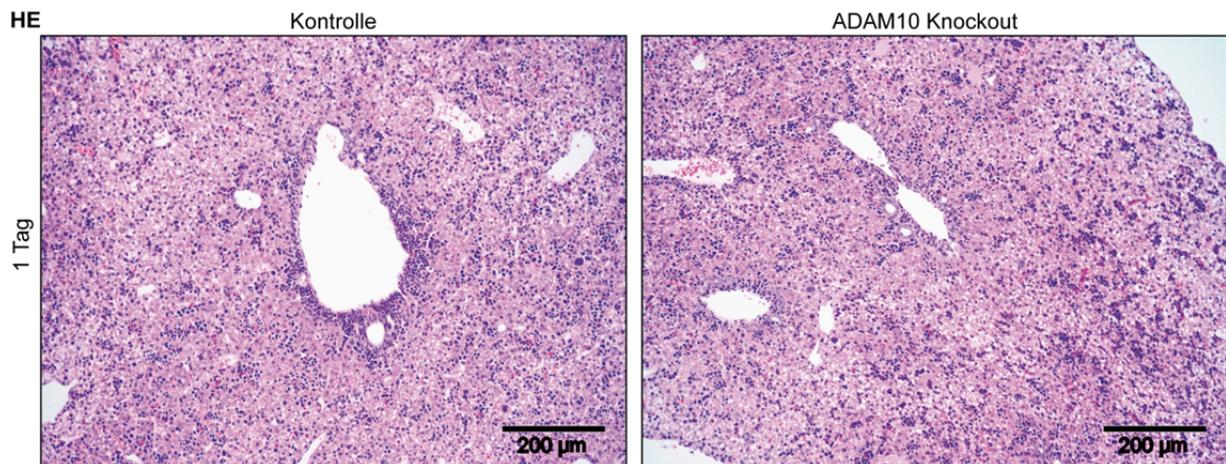


Abb. 3.2.7. Lebern neugeborener Tiere zeigen keine Nekrosen.

Eine HE-Färbung von Gewebsschnitten paraffinierter Lebern von Kontroll- und ADAM10-Knockout Mäusen direkt nach der Geburt zeigte keine Nekrosen in den Lebern. HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Maßstabsbalken = 200 µm.

Die Gallengänge werden erst im adulten Tier durch die Notch2-abhängige Ausdifferenzierung von Cholangiozyten komplett abgeschlossen [Kodama *et al.*, 2004]. Da der Notch2-Rezeptor ein Substrat der ADAM10-Proteolyse ist, könnte eine Defizienz von ADAM10 in den Cholangiozyten-Vorläufern zu Störungen während der Ausbildung der Gallengänge führen [Groot *et al.*, 2014]. Eine daraus resultierende Gallengangsfehlentwicklung könnte die Aufstauung von Galle, eine sogenannten Cholestase, zur Folge haben. Die aufgestauten Gallensalze könnten dann die beobachtete Nekrose in den benachbarten Hepatozyten einleiten [Woolbright *et al.*, 2015].

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde eine Gewebefärbung gegen Cytokeratin19 (CK19) durchgeführt. Dieses Markerprotein erlaubt die spezifische Färbung von Leber-Vorläuferzellen (LPC) und Cholangiozyten. In neugeborenen Tieren konnten keine Unterschiede in der CK19-Färbung zwischen ADAM10-defizienten Tieren und Kontrollen detektiert werden (Abb. 3.2.8.). Im Alter von vier und 15 Wochen dagegen nahm die Menge der CK19 positiven Strukturen in den ADAM10-Knockout Tieren im Vergleich zu den Kontrollen deutlich zu. Eine mögliche

Erklärung für das vermehrte Auftreten der CK19-Färbung ist eine Zunahme neugebildeter Gallengänge zur Ableitung der infolge einer Cholestase im Gewebe aufgestauten Galle.

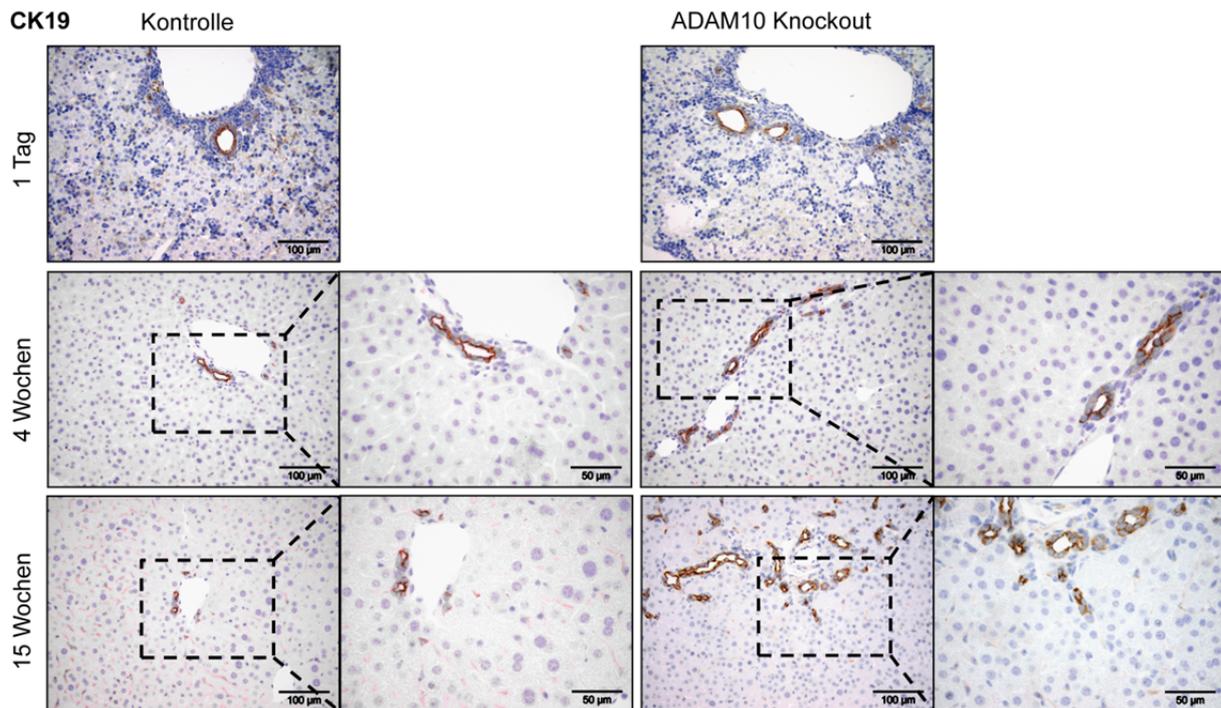


Abb. 3.2.8. Analyse der Gallengangsanzahl als mögliche Ursache der Nekrosen.

CK19-Färbung von Paraffinschnitten von Kontroll- und ADAM10-Knockout Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten. CK19-färbt sowohl Leberportalzellern als auch Cholangiozyten, die die Gallengänge begrenzen. Maßstabsbalken = 100 µm bzw. 50 µm.

3.2.3. Charakterisierung der Ursache der Nekrosen

Zur Beurteilung einer möglichen Fehlentwicklung der Gallengänge wurde der speziell für Entwicklungsprozesse wichtige Notch-Signalweg untersucht. Wie bereits erwähnt stellt insbesondere der Notch2-Signalweg einen wichtigen Regulator während der Gallengangsentwicklung dar. Da die ADAM10-vermittelte Proteolyse des Notch-Rezeptors als klassischer Initiator dieses Signalweges gilt, muss dieser besonders im Zusammenhang zu einer ADAM10-Deletion betrachtet werden. Daher wurde eine quantitative *Real-Time-PCR* von Totalleberproben gegen verschiedene Komponenten des Notch-Signalweges durchgeführt (Abb. 3.2.9. A). Jagged-1 wird durch mesenchymale Zellen bereitgestellt und ist essentiell für die Differenzierung von Hepatoblasten zu Cholangiozyten [Hofmann *et al.*, 2010]. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte ein Unterschied hinsichtlich des mRNA-Levels von

Jagged-1 gezeigt werden. Damit sind die Voraussetzungen für einen funktionierenden Notch-Signalweg in den Kontroll- und den ADAM10-Knockout Tieren prinzipiell gegeben. Die Untersuchung der *Notch1*- und *Notch2*-mRNA zeigte eine signifikante Reduktion in den ADAM10-Knockouts im Alter von vier Wochen. Im Alter von 15 Wochen glichen sich diese Unterschiede hinsichtlich des Notch2-Rezeptors wieder an, die Reduktion der *Notch1*-mRNA erreichte keine Signifikanz mehr. Speziell für den Notch1-Rezeptor wurde bereits eine positive *Feedback*-Regulation durch Bindung der Notch intrazellulären Domäne (NICD) an den Notch-

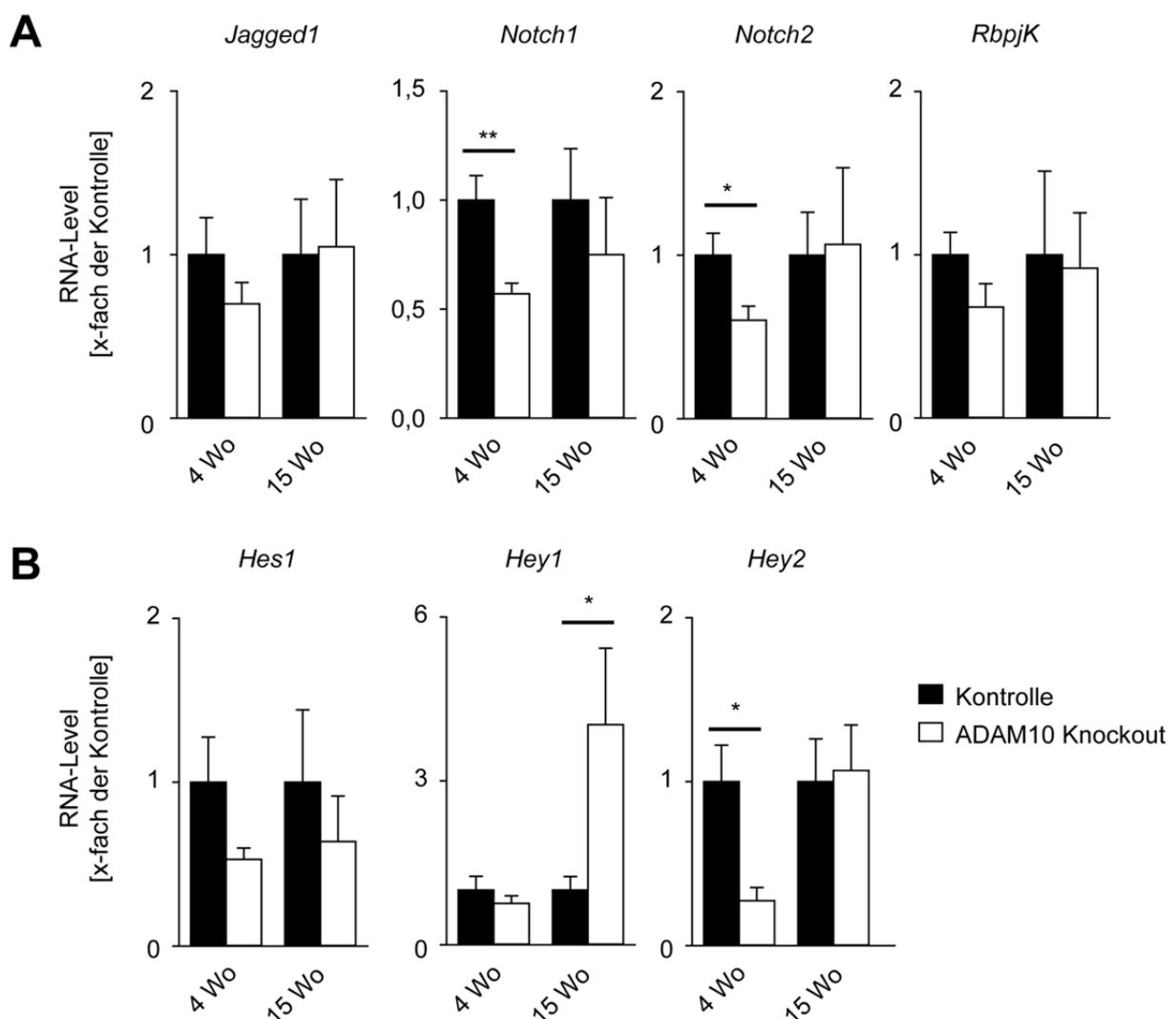


Abb. 3.2.9. Der Notch-Signalweg als Regulator der Gallengangsbildung.

(A) QRT-PCR-Analyse verschiedener Komponenten des Notch-Signalweges, die potentiell an der Gallengangsbildung beteiligt sind. (B) Überprüfung der Aktivität des Notch-Signalweges als Regulator der Gallengangsbildung anhand von klassischen Notch-responsiven Genen. Leberproben von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (n = 4-5). Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und als Vielfaches der Kontrolle abgetragen. Wo = Wochen. Signifikanzen: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Promotor beschrieben. Hierbei führte eine verringerte Notch1-Aktivität zu einer Reduktion der Expression des Notch1-Rezeptors selbst [Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009; Del Monte *et al.*, 2007]. Damit könnte die Reduktion der Expression der Notch-Rezeptoren auf eine verringerte Aktivität des Notch-Signalweges durch eine verringerte ADAM10-vermittelte Proteolyse zurückzuführen sein. Dennoch kann eine Reduktion der mRNA der Notch-Rezeptoren noch keinen direkten Rückschluss darauf geben, ob auch tatsächlich eine verringerte Aktivität des Signalweges vorliegt. Der Notch-Mediator *RbpjK* zeigte in vier Wochen alten ADAM10-Knockout Tieren eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der mRNA. Nach 15 Wochen war dieser Unterschied verringert.

Um eine möglichen Modulation der Aktivität des Notch-Signalweges im ADAM10-Knockout nachzugehen, wurden anschließend die klassischen Notch-responsiven Gene mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 3.2.9. B). *Hes1*, welches als relevant für die Entwicklung der Gallengänge beschrieben wurde, unterlag zu keinem Zeitpunkt einer signifikanten Veränderung [Kodama *et al.*, 2004]. *Hey2* war nach vier Wochen signifikant reduziert, erreichte nach 15 Wochen jedoch wieder das Level der Kontrolltiere. Die *Hey1*-mRNA-Menge hingegen zeigte keine Unterschiede nach vier Wochen, war aber nach 15 Wochen unter ADAM10-Defizienz signifikant erhöht. Anhand dieser responsiven Gene war somit keine eindeutige Beeinflussung des Notch-Signalweges sichtbar.

Abgesehen von *Hey1* erreichten alle untersuchten Notch-responsiven Gene nach anfänglicher Reduktion in 15 Wochen Tieren fast wieder das Niveau der Kontrolltiere. Dennoch könnte die Reduktion der Notch-Aktivität im Alter von vier Wochen Auswirkungen auf die Gallengangsentwicklung haben. Im Alagille-Syndrom (Defekt des Notch2-Signalweges) und im Notch2-Knockout wurde eine Unterentwicklung der Gallengänge gezeigt, die sich in einer starken Reduktion der Verzweigungen der Gallengänge äußert [McDaniell *et al.*, 2006; Sparks *et al.*, 2010]. Eine solche Fehlentwicklung kann zum gestörten Abtransport der Gallensäuren und zur kompensatorischen Neuanlage kleine Gallengänge führen. Aufgrund des Hinweises der verstärkten CK19-Färbung im ADAM10-Knockout (Vergleiche Abschnitt 3.2.2., Abb. 3.2.8.) wurde anhand einer Gallengangsplastination überprüft, ob eine Störung des Notch-Signalweges nach vier Wochen eine Gallengangsfehlbildung nach sich zieht (Abb. 3.2.10. A). Die erhaltenen Gallengangsbäume der ADAM10-Knockout

Mäuse wurden mit Gallengangsplastinationen der Literatur verglichen [Sparks *et al.*, 2010; Müller, 2015]. Morphologisch wies das Gallengangsnetz der ADAM10-Knockout Mäuse im Alter von vier Wochen im Vergleich zu den Kontrollen keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der kleinen Gallengänge und der Verzweigungen auf.

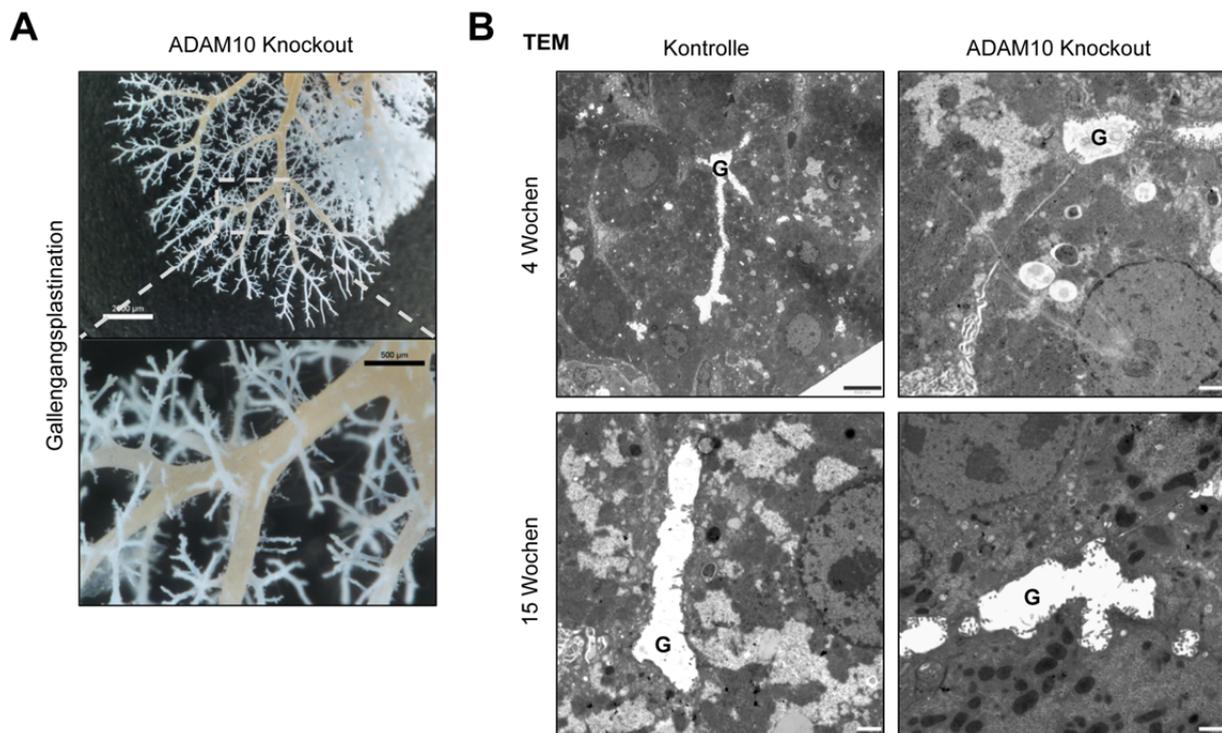


Abb. 3.2.10. Analyse der Beeinflussung der Gallengangsbildung durch ADAM10.

(A) Gallengangsplastination der ADAM10-Knockout Tiere im Alter von 4 Wochen (n = 12) zeigen keine Unterschiede zu Kontrolltieren (Vergleiche [Sparks *et al.*, 2010; Müller, 2015]). Maßstabsbalken = 2000 µm bzw. 500 µm. (B) Eine elektronenmikroskopische Analyse wurde herangezogen, um Veränderungen der Feinstruktur der Gallekanälchen auszuschließen. Maßstabsbalken = 1 µm. TEM = Transmissions-Elektronenmikroskopie, G = Gallekanälchen.

Zur noch feineren Darstellung der Galle-ableitenden Strukturen wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Gallekanälchen durchgeführt (Abb. 3.2.10. B). Die Ultrastrukturanalyse zeigte jedoch ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Morphologie der Gallekanälchen, wie z. B. den Verlust von an Gallekanälchen angrenzenden Mikrovilli, zwischen ADAM10-Knockout Tieren und Kontrollen zu den gewählten Zeitpunkten. Somit liegen keine morphologischen Hinweise auf Veränderungen der Galle-ableitenden Strukturen vor, die eine Cholestase auslösen können. Daher muss eine andere Erklärung als die Fehlbildung von Gallengängen als Ursache der Nekrosen im Gewebe der ADAM10-Knockout Tiere in Betracht gezogen werden.

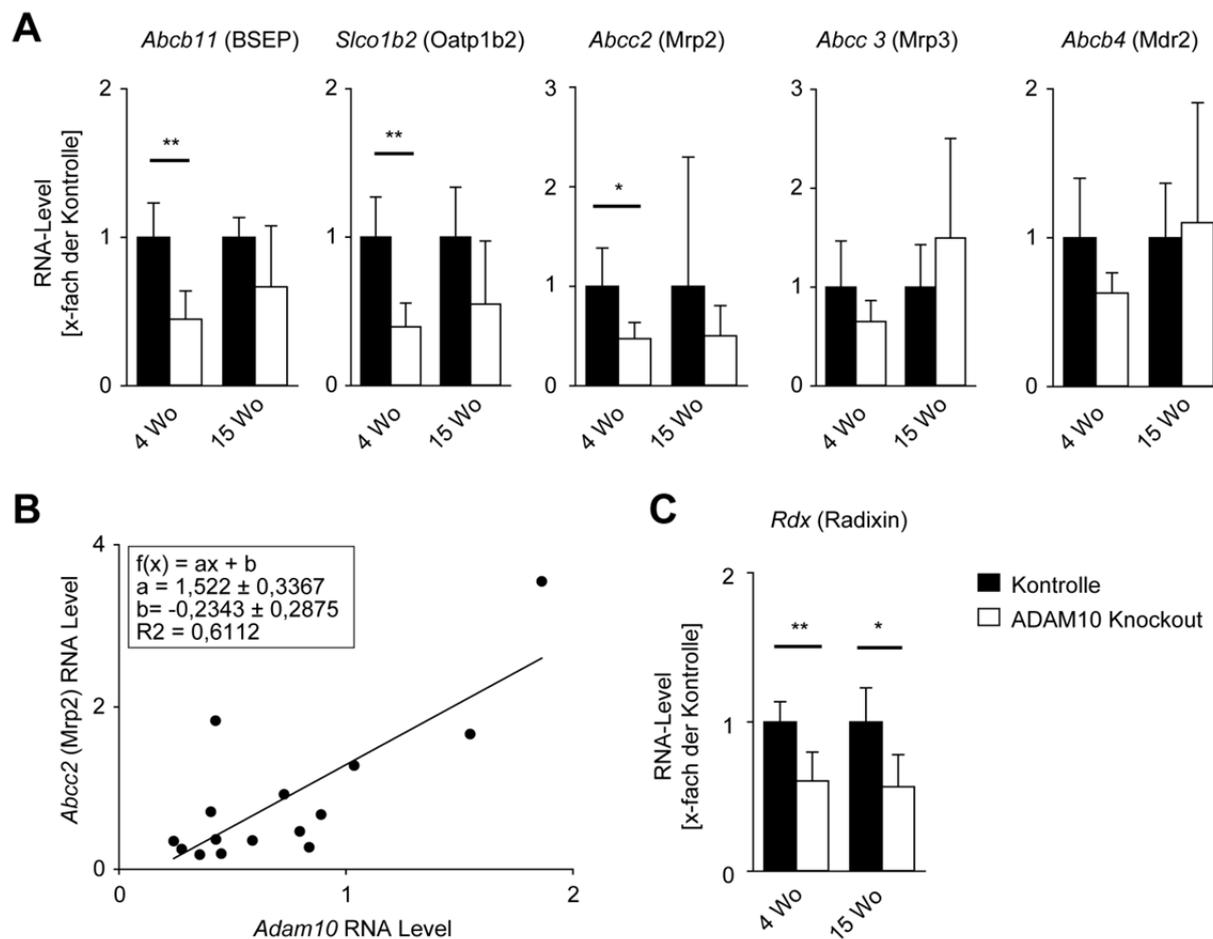


Abb. 3.2.11. Expression der Gallensäuretransporter als mögliche Ursache der Nekrose.

(A,C) QRT-PCR-basierte Untersuchung der Expression verschiedener Gallensäuretransporter (A), sowie des Mrp2-Transporters Radixin (*Rdx*) (C) in Leberproben ($n = 4-5$). Proben von Kontroll- und ADAM10-Knockout Mäusen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und als Vielfaches der Kontrollen dargestellt. (B) Korrelation der Expression des Gallensäuretransporters Mrp2 (*Abcc2*) mit der Expression von *Adam10*. Wo = Wochen. Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Ein weiterer Ansatz, die Entstehung der Nekrose in den ADAM10-Knockout Mäusen zu erklären, ist eine mögliche Störung im Gallensäurehaushalt. Hierbei kann vor allem die Fehlregulation des Transportes über hepatozytäre Gallensäuretransporter von Bedeutung sein. Infolgedessen können sich lokal Gallensäuren anstauen und analog einer Cholestase die Nekrose betroffener Zellen einleiten. Um den möglichen Beitrag von Störungen des Gallensäurehaushaltes zur Nekrose zu überprüfen, wurden die mRNAs verschiedener Gallensäuretransporter mittels quantitativer *Real-Time*-PCR untersucht (Abb. 3.2.11. A). Die Analyse der kanalikulär gelegenen Sekretionstransporter *multidrug resistance-associated protein 2* (Mrp2) und *bile salt export pump* (BSEP) zeigten eine deutliche Reduktion in den vier Wochen alten ADAM10-Knockout Tieren, die bei 15 Wochen alten Tieren nicht mehr signifikant

war. Die mRNA des basolateral gelegenen Importtransporters *organic anion-transporting peptide 1b2* (*Oatp1b2*) wies ebenfalls eine signifikante Reduktion in den vier Wochen alten ADAM10-Knockout-Tieren auf. Nach 15 Wochen war auch hier die Reduktion weniger prominent und nicht mehr signifikant. Das *multidrug resistance-associated protein 3* (*Mrp3*) und das *multidrug resistance protein 2* (*Mdr2*) zeigten zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung. Interessanterweise zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen den mRNA-Mengen von *Adam10* und *Abcc2* (*Mrp2*) (Abb. 3.2.11. B). Tiere mit geringer *Adam10*-mRNA-Expression zeigten auch die geringsten Werte für *Mrp2*, höhere *Adam10*-mRNA-Mengen gingen mit höheren Werten für *Mrp2* einher. Damit bietet sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der Stärke des beschriebenen Phänotyps und der verbleibenden ADAM10-Expression im ADAM10-Knockout. Der Transport von *Mrp2* zur Membran erfolgt über Radixin, ein Protein der ERM-Familie (Ezrin/Radixin/Myosin-Familie) [Kikuchi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2008]. Eine qRT-PCR gegen Radixin zeigten eine starke Reduktion in den ADAM10-Knockout Tieren im Alter von vier und 15 Wochen (Abb. 3.2.11. C). Somit ist möglicherweise nicht nur die Expression der Gallensäuretransporter gestört, sondern auch der Transport zur Zellmembran.

Zur Absicherung der möglichen ADAM10-Abhängigkeit der Reduktion der Gallensäuretransporter, wurden die Untersuchungen auf eine murine Leber Vorläuferzelllinie, BMOL Zellen (*bipotential murine oval liver*), ausgeweitet. Hierzu erfolgte ein siRNA-vermittelter Knockdown von ADAM10. Die Überprüfung der mRNA-Expression mittels qRT-PCR, bestätigte die erfolgreiche Reduktion von *Adam10*, wogegen das als Kontrolle untersuchte *Adam17* unverändert vorlag (Abb. 3.2.12. A).

Die Überprüfung der Gallensäuretransporter zeigte, dass nur ein Teil der zuvor in Totalleberproben detektierten Transporter auch in BMOL Zellen exprimiert werden (*Mrp2*, *Mrp3* und *Mdr2*). Dennoch ging auch hier eine Reduktion von *Adam10* auf mRNA-Ebene mit einer Reduktion der mRNA-Level von *Mrp2* einher und wies auf eine mögliche Regulation durch ADAM10 auch in BMOL Zellen hin (Abb. 3.2.12. A). Zusätzlich bewirkte die Reduktion von ADAM10 auch eine Reduktion der mRNA von *Mrp3*, obwohl dieser Effekt vorher in den Leberproben nicht signifikant nachgewiesen werden konnte. *Mdr2* lag in den BMOL-Zellen nach ADAM10-siRNA Behandlung leicht erhöht vor. Zur Unterscheidung, ob diese Beobachtungen von der

katalytischen Aktivität von ADAM10 abhängig ist, wurden die BMOL-Zellen 72 h mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X inkubiert. Neben 3 μ M GI254023X waren die mRNA-Expressionslevel von *Adam10* und *Adam17* erwartungsgemäß unbeeinflusst (Abb. 3.2.12. B). Interessanterweise war unter diesen Bedingungen kein Effekt auf die mRNA-Expression der exprimierten Gallensäuretransporter (*Mrp2*, *Mrp3* und *Mdr2*) detektierbar. Dieses Experiment weist darauf hin, dass die Reduktion der Transporter von der Proteaseaktivität von ADAM10 unabhängig ist. Stattdessen könnten andere Domänen der Protease hierfür Bedeutung haben, die bei den

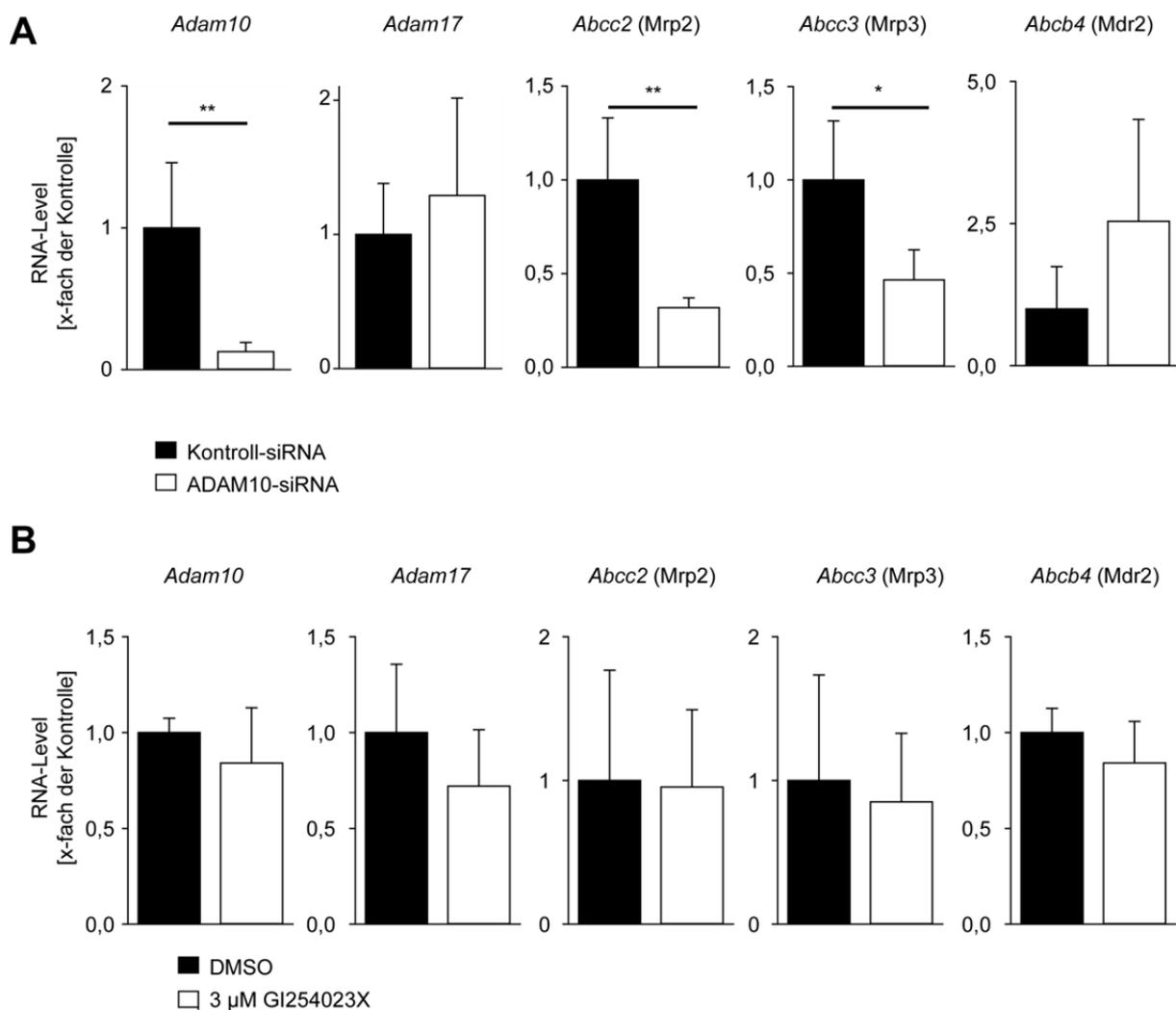


Abb. 3.2.12. ADAM10-Abhängigkeit der Expression von Gallensäuretransportern in BMOL-Zellen.

(A) BMOL-Zellen wurden mit Kontroll- oder ADAM10-siRNA behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf die Expression verschiedener Gallensäuretransporter untersucht (n = 3). Die Spezifität der siRNA wurde anhand von qRT-PCRs gegen *Adam10* und *Adam17* überprüft. (B) Dieselben Untersuchungen wurden in BMOL-Zellen nach Inhibition der ADAM10-Aktivität durch 3 μ M GI254023X für 72 h durchgeführt (n = 3). Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und als Vielfaches der Kontrollen dargestellt. Signifikanzen: * p < 0,05; ** p < 0,01.

ADAM10-Inhibitor gestützten Experimenten noch funktionsfähig waren. Ein möglicher Kandidat hierfür ist die intrazelluläre Domäne von ADAM10, die zwar im Zellkern nachgewiesen, der aber bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte [Tousseyn *et al.*, 2009].

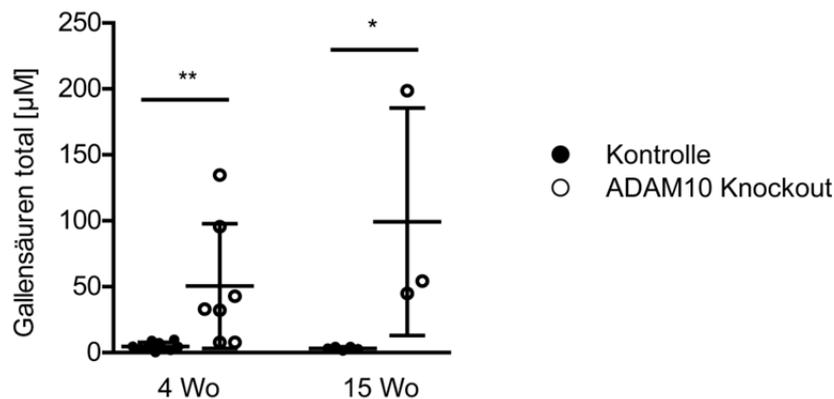


Abb. 3.2.13. Untersuchung des Gallensäurehaushaltes in ADAM10-Knockout Mäusen.

Um einen Einfluss der veränderten Expression der Gallensäuretransporter auf den Gallensäurehaushalt zu überprüfen, wurde die Gallensäure in Seren von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (n = 3-7). Wo = Wochen. Signifikanzen: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Zur Überprüfung, ob eine Fehlregulation der Expression der Transporter tatsächlich auch in den ADAM10-defizienten Mäusen eine physiologische Relevanz haben kann, wurden in diesen die Konzentrationen der Gallensäuren bestimmt (Abb. 3.2.13.). Stauen diese sich infolge unzureichender Sekretion in den Hepatozyten auf, erhöht sich rückwirkend auch der Gallensäuregehalt im Serum. Tatsächlich zeigte sich eine signifikante Zunahme der Gallensäuren im Serum der ADAM10-Knockout Tiere im Vergleich zu den Kontrollen zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Damit sind erhöhte Gallensäurewerte zeitlich parallel zu den Nekrosen in den Hepatozyten nachweisbar.

Zusammenfassend zeigten die ADAM10-defizienten Tieren eine deutliche Reduktion der Expression einiger Gallensäuretransporter. Eine mögliche intrazelluläre Aufstauung von Gallensäuren könnte die beobachtete Erhöhung der ALP-Werte und die bereits makroskopisch sichtbaren Nekrosen in ADAM10-Knockout Tieren bedingen.

3.2.4. Charakterisierung des Regenerationsprozesse nach initialer Pathologie

Die Untersuchung der ADAM10-Knockout Tiere zeigte eine Schädigung der Lebern, die sich in einer Nekrose von Hepatozyten äußerte. Nekrotische Zellen initiieren die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Schädigung, wo sie eine Wundheilung unterstützen können [McDonald *et al.*, 2010]. Um eine Beteiligung der neutrophilen Granulozyten an der Regeneration des geschädigten Gewebes zu untersuchen, wurde deren Verteilung im Lebergewebe untersucht.

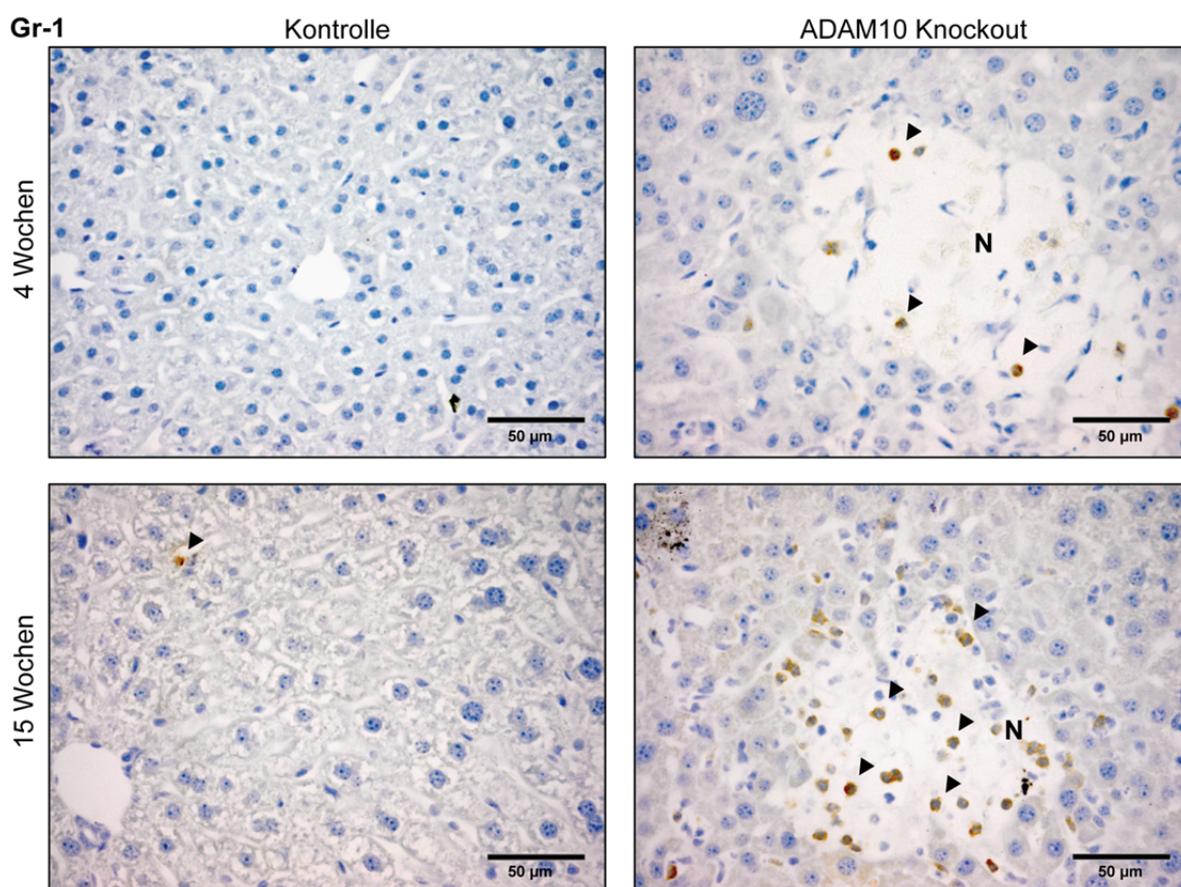


Abb. 3.2.14. Infiltration der Nekrosen durch neutrophilen Granulozyten.

Zur Überprüfung einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu den beobachteten Nekrosen wurden Paraffinschnitten von Kontroll- und ADAM10-Knockout Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten über Ly6G (Gr-1) angefärbt. Maßstabsbalken = 50 μm. N = nekrotische Hepatozyten.

Die Färbung gegen Ly6G (Gr-1) ermöglicht die spezifische Detektion von neutrophilen Granulozyten in den peripheren Organen, also auch im Lebergewebe. Die Färbung gegen neutrophile Granulozyten (Abb. 3.2.14.) zeigte in den Kontrolltieren nur vereinzelt Gr-1-positive Zellen. Die ADAM10-Knockout Tiere

wiesen dagegen eine deutliche Anreicherung dieser Zellpopulation auf. Tatsächlich lagen die neutrophilen Granulozyten dabei vor allem in den als nekrotisch identifizierten Arealen konzentriert vor.

Infolge der auftretenden Nekrosen zeigten die ADAM10-defizienten Mäusen eine Zunahme der Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki67, sowie eine verstärkte CK19-Färbung (Vergleiche Abschnitt 3.2.2., Abb. 3.2.6. und Abb. 3.2.8.). Beide Färbungen deuten auf eine Zunahme der CK19-exprimierenden Lebererkrankungsvorläuferzellen (LPC) hin, welche im Rahmen einer Regenerationsantwort auf Gewebsschädigungen proliferieren und zu Hepatozyten oder Cholangiozyten differenzieren können [Shin *et al.*, 2011; Espanol-Suner *et al.*, 2012]. Aufgrund der möglichen Beteiligung der LPC an der Regeneration der nekrotischen Areale wurde untersucht, ob die Wirkung LPC-stimulierender Mitogene über die Aktivität von ADAM10 reguliert werden kann.

LPC können über die mitogen wirkenden Faktoren TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) und den Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) zur Proliferation angeregt werden [Ishikawa *et al.*, 2012; Bird *et al.*, 2013]. HGF wirkt über seinen Rezeptor cMet, der durch ADAM10-vermittelte Proteolyse an der Zelloberfläche freigesetzt werden kann, um die Wirkung von HGF auf die Zelle zu blockieren [Kopitz *et al.*, 2007; Schelter *et al.*, 2010]. Um zu überprüfen, ob der HGF-Signalweg bei ADAM10-Knockout Tieren und Kontrollen auf Ebene des HGF-Rezeptors cMet reguliert sein könnte, wurden der Serumwert für lösliches cMet (scMet) bestimmt. Das scMet-Serumlevel unterlag jedoch zwischen den untersuchten Gruppen keinen signifikanten Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

Eine Beurteilung der Beeinflussung der LPC-Proliferation durch ADAM10-vermitteltes *shedding* von cMet in den Tieren ist jedoch schwierig. Falls eine Proteolyse von cMet erst während der Aktivierung der LPC stattfindet, ist diese in den Kontrolltieren nicht sichtbar. Die Kontrolltiere wiesen im Gegensatz zu den ADAM10-Knockout Tieren keine Nekrosen und keine CK19-Färbung abseits der Gallengänge auf, was gegen eine Induktion der LPC-Proliferation spricht. Unter ADAM10-Defizienz wiederum wäre eine Induktion der ADAM10-abhängigen cMet-Proteolyse nicht nachweisbar, selbst wenn sie unter ADAM10-Expression stattfindet [Schelter *et al.*, 2010].

Aus diesem Grund wurde den Einfluss von ADAM10 auf die LPC-Proliferation anhand von BMOL-Zellen untersucht, die nach siRNA-vermitteltem ADAM10-

Knockdown mit den Mitogenen HGF und TWEAK stimuliert wurden (Abb. 3.2.15.). Die siRNA-Behandlung bewirkte eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von ADAM10 in BMOL-Zellen. Die Stimulation der Zellen mit HGF bewirkte die Phosphorylierung des Rezeptors cMet. Die Aktivierung der *downstream* gelegenen *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) wurde anhand deren Phosphorylierung nachgewiesen. Unter ADAM10-Defizienz war die Phosphorylierung von cMet und ERK verstärkt. Das generelle Expressionslevel des cMet-Rezeptors war dagegen unbeeinflusst. Die Stimulation mit dem ebenfalls mitogen wirkenden TWEAK dagegen initiiert den NFκB-Signalweg, dessen Aktivierung über die Degradation von IκB nachgewiesen werden kann. Die Stimulation mit TWEAK bewirkte in den BMOL Zellen jedoch nur eine leichte Abnahme der IκB-Proteinmenge in den Kontroll-siRNA

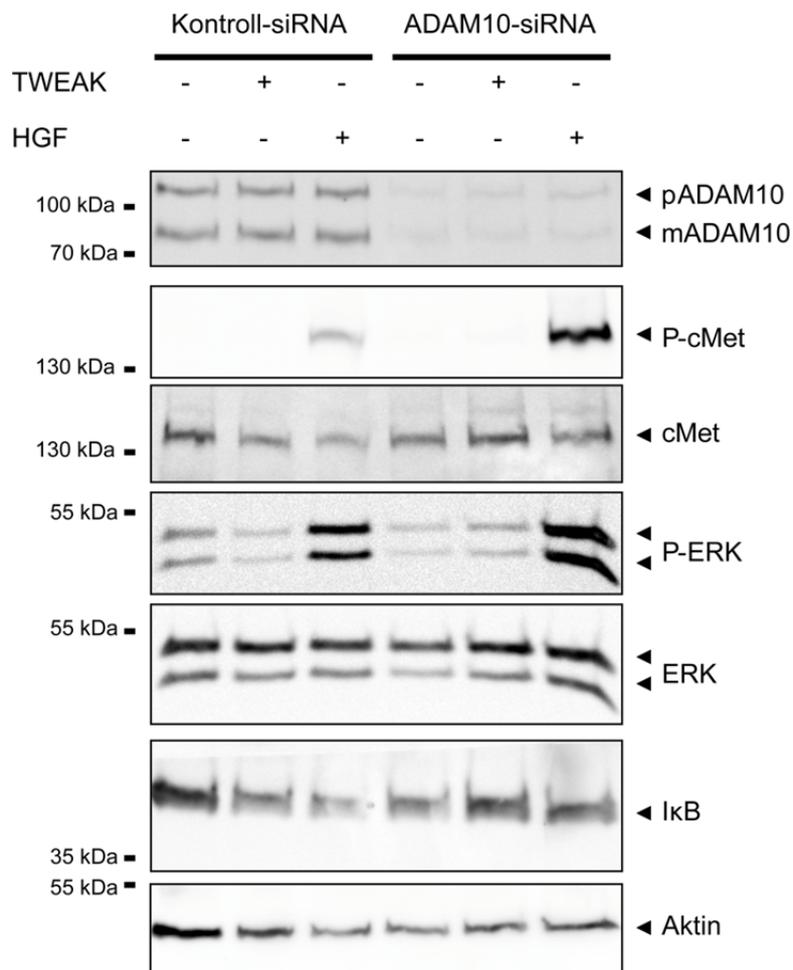


Abb. 3.2.15. Abhängigkeit der BMOL-Proliferation von ADAM10.

BMOL-Zellen wurden mit Kontroll- oder ADAM10-siRNA behandelt und ein Stimulationsexperiment mit HGF und TWEAK durchgeführt (n = 3). Die Stimulation der Zellen mit TWEAK wurde durch einen Western Blot gegen das nachgeschaltete IκB überprüft. Die Wirkung von HGF wurde über die Phosphorylierung des HGF-Rezeptors cMet und der ERK-Kinasen bewertet. Als Ladekontrolle diente Aktin.

behandelten Zellen. In ADAM10-siRNA behandelten Zellen waren nach TWEAK-Stimulation keine Unterschiede der I κ B-Proteinmenge detektierbar. Der Beitrag von TWEAK zur Proliferation der BMOL-Zellen ist damit entweder generell geringer als der von HGF, oder aber die Stimulation mit TWEAK war in den Zellen nicht erfolgreich. Die Stimulationsexperimente weisen auf eine verstärkte LPC-Proliferation unter ADAM10-Defizienz über das Mitogen HGF.

Es wurde bereits gezeigt, dass dauerhafte Leberschädigung und Proliferation der LPC zu einer Aktivierung von Itozellen führen kann [Kuramitsu *et al.*, 2013; Tirnitz-Parker *et al.*, 2014]. Itozellen liegen normalerweise inaktiv im Gewebe vor und enthalten intrazelluläre Vitamin A-Speicher. Infolge einer Aktivierung differenzieren sie zu Myofibroblasten, die dann insbesondere an der Produktion extrazellulärer Matrix beteiligt sind. Die Differenzierung kann über die Expression von α *smooth muscle actin* (α SMA) verfolgt werden, welches erst von aktiven Myofibroblasten gebildet wird [Minato *et al.*, 1983; Friedman *et al.*, 1993]. Eine Färbung gegen α SMA in Gewebsschnitten zeigte eine deutliche Zunahme der Myofibroblasten in ADAM10-Knockout Tieren (Abb. 3.2.16. A). In 15 Wochen alten ADAM10-Knockout Tieren konnten dabei deutlich mehr Myofibroblasten angefärbt werden als in vier Wochen alten Tieren. Diese Beobachtung weist auf eine Zunahme der Myofibroblasten über die Zeit hin.

Anschließend wurde auch die Neubildung und Ablagerung extrazellulärer Matrix durch die Myofibroblasten mittels einer Siriusrot-Färbung dargestellt (Abb. 3.2.16. B). In den Kontrolltieren beschränkte sich die Collagen-Färbung auf die endothelialen Bereiche um die Blutgefäße. Die ADAM10-Knockout Tiere dagegen zeigten eine signifikante Zunahme der Färbung, die nicht nur endotheliale Bereiche betraf, sondern auch weit ins Leberparenchym reichte. Die Siriusrot-Färbung der 15 Wochen alten Tiere zeigte deutlich stärkere Collagenablagerungen im Vergleich zu vier Wochen alten Tieren. Wird die Bindegewebsneubildung nicht terminiert und setzt sich unkontrolliert fort, spricht man von einer Fibrose. Interessanterweise hielt die Produktion von Collagen noch weiter an, selbst wenn die initialen Schädigungen im Gewebe längst repariert waren. So konnten nach 33 Wochen keine nekrotischen Bereiche mehr gefunden werden, die Siriusrot-Färbung gegen Collagen dagegen war sogar noch stärker als in den 15 Wochen alten Tieren (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigten die 33 Wochen alten ADAM10-defizienten Tiere auffällige Verhärtungen der

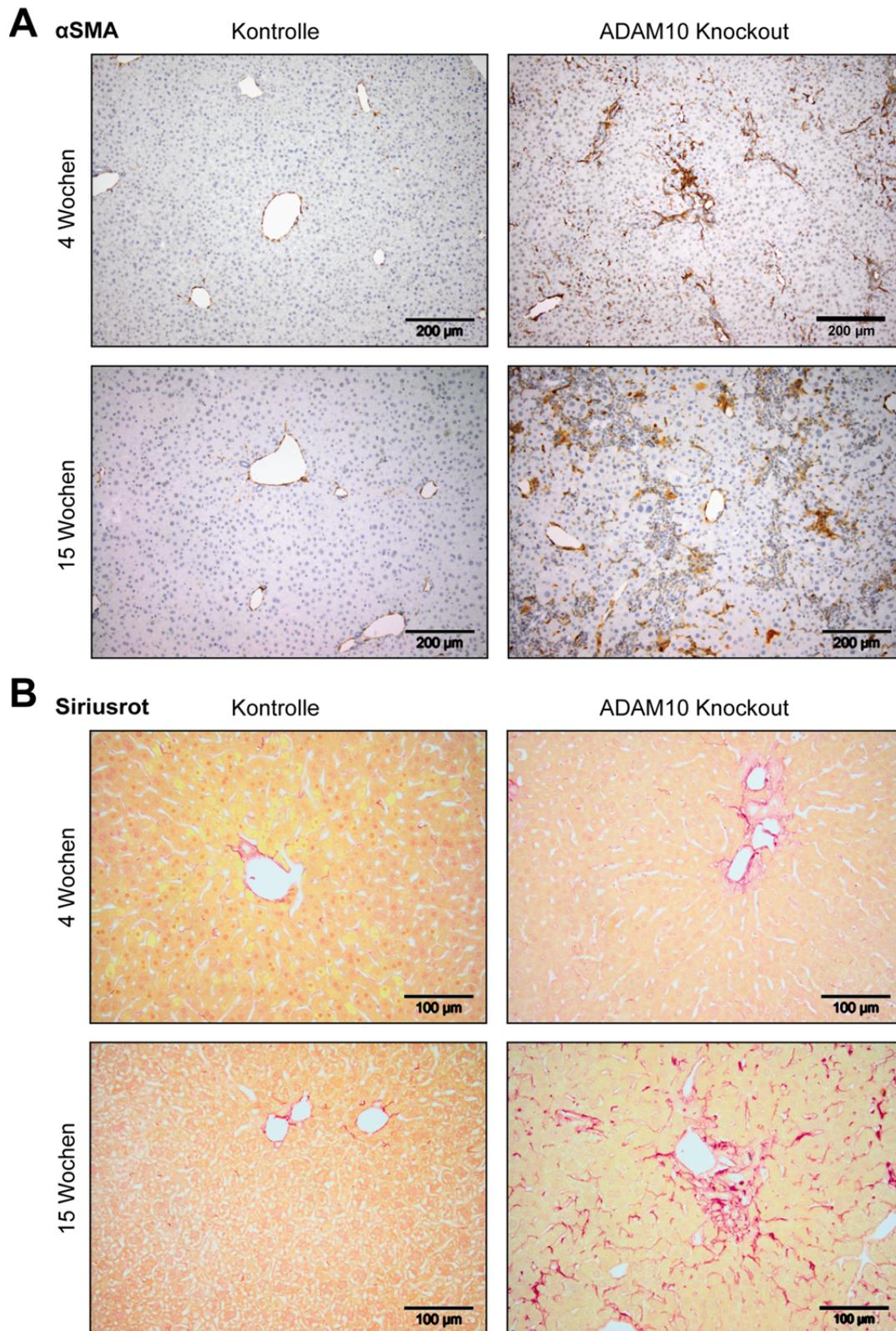


Abb. 3.2.16. Analyse der Aktivierung von Itozellen im ADAM10-Knockout.

(A) Die Aktivierung der Itozellen zu Myofibroblasten wurde über eine Färbung von Paraffinschnitten der Leber gegen α SMA verfolgt. Hierzu wurde Kontroll- und ADAM10-Knockout Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Maßstabsbalken = 200 μ m. (B) Zusätzlich wurde die durch Myofibroblasten vermittelte Ablagerung von Collagen mittels Siriusrot-Färbung von Paraffinschnitten dargestellt. Maßstabsbalken = 100 μ m.

Leber, die bereits einen Übergang zur Zirrhose darstellen könnten (Daten nicht gezeigt).

3.3. Charakterisierung potentieller Interaktionspartner von ADAM10

Die Metalloprotease ADAM10 besitzt ein breites Substratspektrum. Neben dem Amyloiden Vorläuferprotein (APP), welches bei der Entstehung der Alzheimer'schen Erkrankung von Bedeutung ist, werden beispielsweise auch der Notch-Rezeptor, sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle (CD44), Wachstumsfaktoren (Betacellulin) und Entzündungsregulatoren (CX3CL1) von ADAM10 proteolysiert [Lammich *et al.*, 1999; Sotillos *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 2015; Sahin *et al.*, 2004; Hundhausen *et al.*, 2003]. Die therapeutische Modulation der Enzymaktivität durch gegen ADAM10 gerichtete Wirkstoffe ist daher aufgrund möglicher Nebeneffekte nicht uneingeschränkt in der Praxis anwendbar. Stattdessen ist es oft sinnvoller, Wirkstoffe gegen ADAM10-Regulatoren zu entwickeln, die die Enzymaktivität im Idealfall auch substratspezifisch beeinflussen. Aus diesem Grund war ein Ziel der Arbeit die Identifikation und Charakterisierung möglicher Regulatoren von ADAM10.

3.3.1. Identifizierung potentieller Interaktionspartner von ADAM10

In Vorarbeit zu dieser Studie wurden zwei breit angelegte *Screens* auf Interaktionspartner durchgeführt, um potentielle Regulatoren der ADAM10-Aktivität zu identifizieren.

Hierzu wurde ein *Screen* mit einem abgewandelten Hefe-2-Hybrid-System durchgeführt, dem *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System* [Johnsson und Varshavsky, 1994]. Dieses System eignet sich besonders für membranständige Proteine, wogegen die untersuchten Proteine beim klassischen Hefe-2-Hybrid-System im Zellplasma vorliegen müssen, um im Falle einer Interaktion in den Kern zu lokalisieren [Fields und Song, 1989]. ADAM10 wurde in diesem *Screen* als *bait*-Protein verwendet, die *prey*-Proteine entstammten einer murinen Hirn-cDNA-Datenbank [Prox, 2012; Prox *et al.*, 2012]. Hierbei wurden über 30 putative Interaktionspartner gefunden (Tab. 3.3.1.). Aufgrund weiterer Parameter, wie dem korrekt vorliegenden Leserahmen, wurden diese weiter gefiltert.

Tab. 3.3.1. Potentielle Interaktionspartner aus dem *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System*.

UniProt Nr.	Abk.	UniProt Name	subzelluläre Lokalisation
O35465	FKBP38	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP38</i>	ER, Mitochondrien
Q99JP7	Ggt7	<i>Gamma-glutamyltransferase 7</i>	Zellmembran
Q8BQU6	Gjc2	<i>Connexin 47</i>	Zellmembran
Q91XA2	Golm1	<i>Golgi membrane protein 1</i>	Golgi-Apparat
Q61500	Itm2a	<i>Integral membrane protein 2A</i>	Zellmembran
O89051	Itm2b	<i>Integral membrane protein 2B</i>	Zellmembran, Golgi-Apparat
Q8BG66	LAPTM4A	<i>Lysosomal-associated transmembrane protein 4A</i>	Zellmembran, Golgi-Apparat
Q91XQ6	LAPTM4B	<i>Lysosomal-associated transmembrane protein 4B</i>	Zellmembran
Q9Z1X2	Ptdss2	<i>Phosphatidylserine synthase 2</i>	ER, Zellmembran
Q9Z0S9	Rabac1	<i>Prenylated Rab acceptor protein 1</i>	Zellmembran, synaptische Vesikel
Q8K0T0	Rtn1	<i>Reticulon 1</i>	ER
P36536	Sar1a	<i>GTP-binding protein SAR1a</i>	ER
P54227	Stmn1	<i>Stathmin 1</i>	Zellplasma
Q8R191	Syngr3	<i>Synpatogyrin3</i>	Zellmembran
Q78S06	Sys1	<i>Protein SYS1 homolog</i>	Golgi-Apparat
Q9CR67	TMEM33	<i>Transmembrane Protein 33</i>	Zellmembran
Q9QY33	Tspan3	<i>Tetraspanin 3</i>	Zellmembran
F7BWT7	Tspan15	<i>Tetraspanin 15</i>	Zellmembran

Über eine Literaturrecherche wurden die Kandidaten hinsichtlich einer möglichen Bedeutung als Regulator der ADAM10-Maturierung oder -Aktivität bewertet. Interessante Kandidaten wurden für eine Verifizierung im *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System* ausgewählt und kloniert. Das SYS1 Golgi-lokalisierte integrale Membranprotein Homolog (Sys1), ist an Transportprozessen am Golgi-Apparat beteiligt. Bisher ist bekannt, dass Sys1 als Rezeptor für die *ARF-like* GTPase Arl3p dient und darüber zu dessen Lokalisation im Golgi-Apparat beiträgt [Behnia *et al.*, 2004; Setty *et al.*, 2004]. Anhand des GPI-verankerten Proteins Gas1p wurde

gezeigt, dass die Mitglieder der *ARF-like GTPase* Familie den Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran vermitteln können [Liu *et al.*, 2006]. Daher war Sys1 aufgrund des möglichen Einflusses auf den Transport der Protease ADAM10 zur Zelloberfläche interessant.

Das FK506-bindende Protein 38 (FKBP38) ist ein Faltungshelfer aus der Familie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. Im Zusammenhang zu seiner Funktion als Chaperon wurde für FKBP38 bereits ein Beitrag zur Reifung und dem Transport eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (HERG = human ether-a-go-go-related gene) identifiziert [Walker *et al.*, 2007]. Daher wurde FKBP38 in die Verifizierung integriert, um einen möglichen Einfluss auf die Reifung von ADAM10 zu untersuchen.

Synaptogyrin3 (Syngr3) ist ein Vertreter der Synptogyrine, welchem eine Beteiligung an der Neurotransmitterabgabe zugeschrieben wird [Belizaire *et al.*, 2004]. Das Protein wurde in synaptischen Vesikeln nachgewiesen und ist dort an der Regulation neurologischer Prozesse beteiligt. Hierbei wurde vor allem die positive Beeinflussung der Aktivität des Dopamin-Transporters durch Syngr3 untersucht [Egana *et al.*, 2009]. Eine Interaktion und Regulation von ADAM10 könnte neben der möglichen Beeinflussung neurologischer Prozesse auch in Bezug auf die Entstehung oder Progression der Alzheimer'schen Erkrankung von Bedeutung sein.

Connexin-47 (Con47) ist ein wichtiger Bestandteil der *gap junctions* von Oligodendrozyten. *Gap junctions* sind röhrenförmige Kanäle, die insbesondere an Zell-Zell-Kontakten auftreten und den Transport von Ionen und osmotisch folgendem Wasser zwischen den Zellen ermöglichen. Die Transportprozesse sind auch über lange Strecken möglich, wodurch die *gap junctions* eine wichtige Bedeutung für die Homöostase des Ionenhaushalts der Zelle haben [Kamasawa *et al.*, 2005]. Durch eine Interaktion von Con47 mit ADAM10 wäre zum Beispiel eine Regulation des Ionentransports zwischen Nachbarzellen denkbar. Die ADAM10-vermittelte Proteolyse von Adhäsionsproteinen könnte, über die Verringerung der Kontaktstellen, die Möglichkeit des Ionenaustausches zwischen Nachbarzellen einschränken.

Zur Verifizierung der ausgewählten putativen Interaktionen wurde erneut das *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid*-System verwendet. Hierzu wurde ein Fusionsprotein aus ADAM10 und dem C-terminalen Ubiquitin-Fragment (ADAM10-Cub), sowie ein

Fusionsprotein aus dem potentiellen Interaktionspartner und dem modifizierten N-terminalen Ubiquitin-Fragment (X-NubG) generiert. Beide Konstrukte wurden in Hefen transformiert und das Wachstum auf Mangelmedien kontrolliert. Die Vektoren exprimieren Auxotrophie-Gene, so dass erfolgreiche Transformanden Wachstum auf Leu/Trp-Mangelmedium aufweisen. Die direkte Interaktion der klonierten Proteine bewirkt die Rekonstitution funktionalen Ubiquitins und setzt dadurch einen Transkriptionsfaktor frei. Dieser vermittelt dann zusätzlich eine Histidin-Auxotrophie und ermöglicht das Wachstum auf His/Leu/Trp-Mangelmedium.

Zur Kontrolle des Systems diente ein Test des ADAM10-Cub-Konstruktes mit den reinen N-terminalen Ubiquitin-Fragmenten Nubl und NubG. Die Positivkontrolle Nubl ist die Wildtyp-Variante des Ubiquitin-Fragmentes und weist eine relativ hohe Affinität zu Cub auf. Die modifizierte Negativkontrolle NubG dagegen enthält eine Mutation (I3G), die die Affinität zu Cub stark reduziert, so dass keine Interaktion beider Fragmente auftritt.

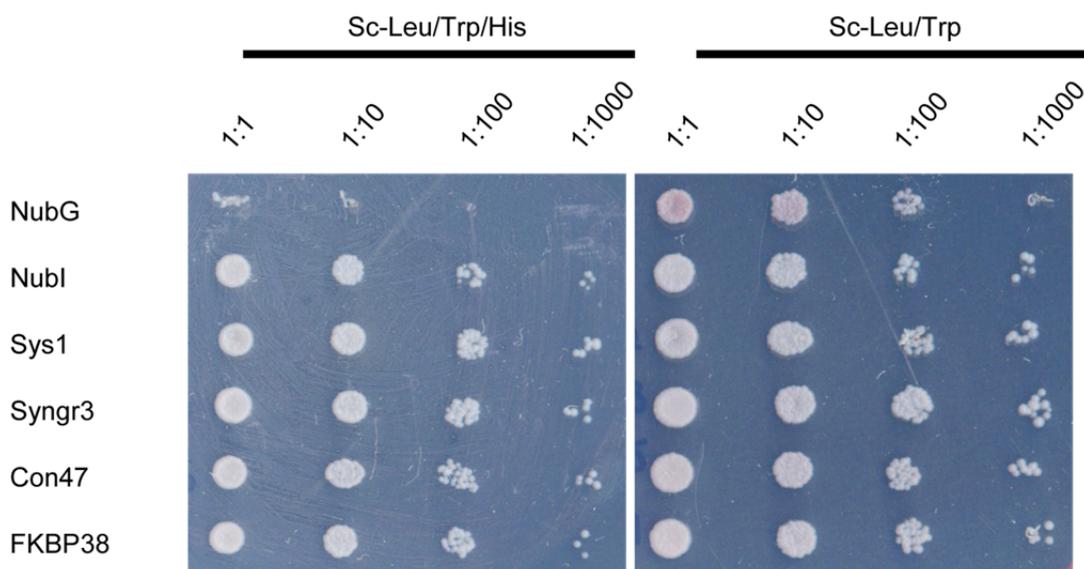


Abb. 3.3.1. Interaktionstest im *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System*.

Das ADAM10-Cub-Fusionsprotein wurde mit den NubG-fusionierten Proteinen in Hefezellen exprimiert und das Wachstum verschiedener Verdünnungsstufen auf Mangelmedien überprüft. Das Leu/Trp-Mangelmedium (Sc-Leu/Trp) dient der Kontrolle der Expression, zusätzliches Wachstum unter His-Mangel (Sc-Leu/Trp(His)) weist eine Interaktion nach. NubG und Nubl dienen als Kontrolle des Systems.

Alle Kombinationen aus ADAM10 und den Kontrollen bzw. den potentiellen Interaktoren zeigten Wachstum auf Leu/Trp-Mangelmedium in allen Verdünnungsstufen und bestätigten daher die Expression der transformierten Konstrukte (Abb. 3.3.1.). NubG transformierte Hefen wiesen im Gegensatz zu Nubl

auf His/Leu/Trp-Mangelmedium kein Wachstum auf. Die Transformation der potentiellen Interaktionspartner führte in allen vier Fällen zum Wachstum unter Histidin-Mangel in allen Verdünnungsstufen. Die Ergebnisse des initialen Screens bezüglich der potentiellen Interaktion mit ADAM10 konnte damit für alle Kandidaten in der Hefe bestätigt werden. Dennoch wurde für die spätere Charakterisierung nur FKBP38 herangezogen, da die übrigen Proteine durch andere Parameter weniger geeignet erschienen. So lag z.B. Con47 lediglich als trunkeerte Form im Test-Vektor vor. Die Interaktion zwischen ADAM10 und Syngn3 konnte in höheren eukaryotischen Zellen (HeLa Zellen) anhand einer Koimmunpräzipitation nicht verifiziert werden. Für Sys1 konnte zwar auch in HeLa Zellen eine schwache Interaktion gezeigt werden, jedoch war kein offensichtlicher Effekt auf die Expression oder Reifung von ADAM10 nachweisbar. Die Untersuchung der Proteolyse von APP und N-Cadherin lieferte außerdem keine Indizien einer Sys1-abhängigen Regulation der ADAM10-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

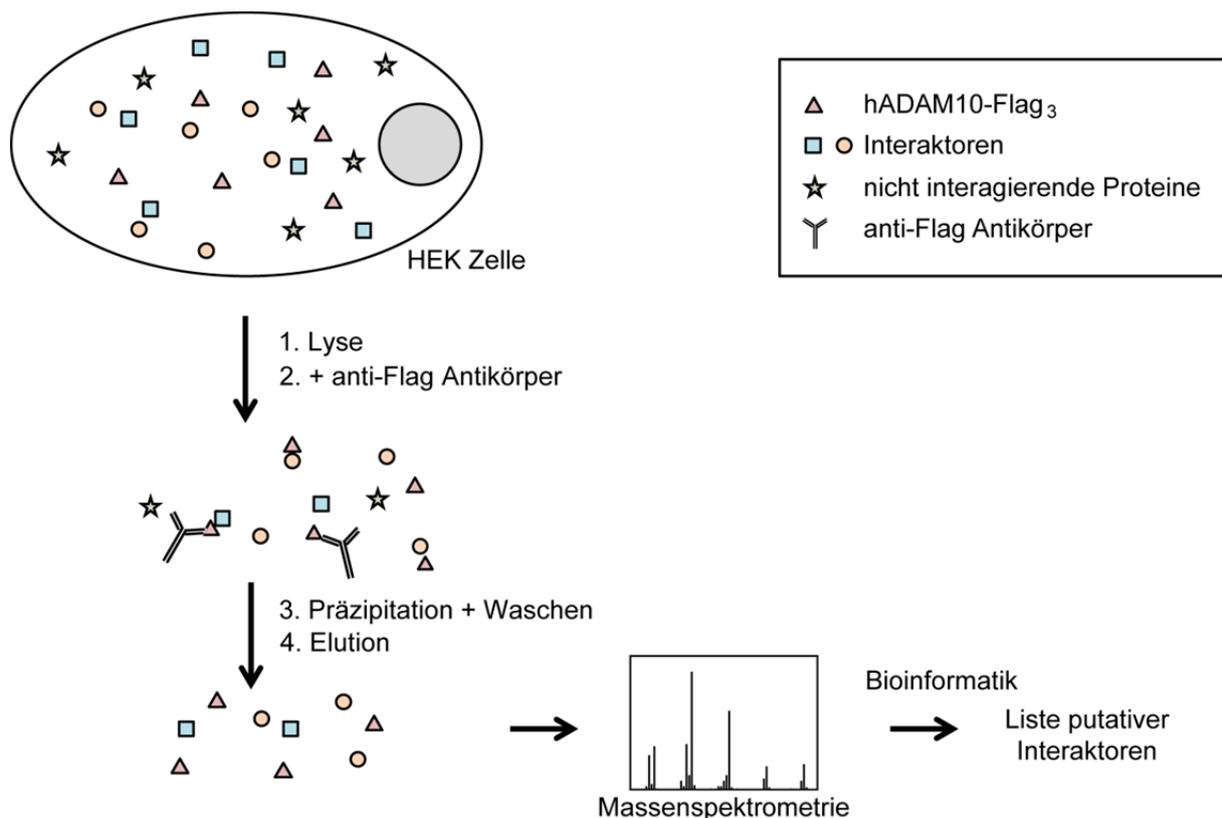


Abb. 3.3.2. Prinzip des HEK-Screens.

Das Protein von Interesse wird mit einem dreifachen Flag-tag in HEK-Zellen überexprimiert und anschließend präzipitiert. Spezifisch interagierende Proteine werden eluiert, mittels Massenspektrometrie identifiziert und bioinformatisch nach deren Potential als Interaktor gewichtet.

In einem zweiten, unabhängigen *Screen* auf ADAM10-Interaktionspartner wurde ein humanes ADAM10-Konstrukt mit einem dreifachen Flag-*tag* kloniert (hADAM10-Flag₃). Dieses Konstrukt wurde von Dr. Stefanie Jäger (Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco, USA) in einem von ihr etablierten *Screen* in HEK-Zellen untersucht (Abb. 3.3.2.) [Jäger *et al.*, 2012]. Nach der Expression des hADAM10-Flag₃-Konstruktes wurden die Zellen lysiert. Es folgte ein Aufreinigungsschritt über den dreifachen Flag-*tag*, in dem die Bedingungen so gewählt wurden, dass Proteinkomplexe erhalten blieben. Die Eluate wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und bioinformatisch über den *MiST-Score* (*Mass Spectrometry Interaction Statistics*) gewertet [Jäger *et al.*, 2012]. Über diesen Algorithmus werden häufig auftretende und somit wahrscheinlich unspezifisch bindende Proteine bei der Analyse schwächer bewertet. Der *MiST-Score* ermöglicht daher die bessere Abschätzung wahrscheinlicher Interaktionspartner. Ausgewählte Ergebnisse dieses *Screens* sind nachfolgend aufgeführt (Tab. 3.3.2.). Neben dem direkt präzipitierten ADAM10 konnten auch bereits bekannte Interaktionspartner mit hohem *MiST-Score* identifiziert werden, wie z.B. Timp1 und die Tetraspanine Tspan14 und Tspan15 [Amour *et al.*, 2000; Haining *et al.*, 2012; Prox *et al.*, 2012]. Aus der über den HEK-*Screen* erhaltenen Liste putativer Interaktoren von ADAM10 wurde MAP3K7 zur weiteren Analyse ausgewählt. Diese Kinase war als möglicher Interaktor von ADAM10 interessant, da für das eng verwandte ADAM17 bereits eine Regulation des sekretorischen Transportes und der Aktivität durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne bekannt ist [Soond *et al.*, 2005; Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2011; Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002]. Mit TAB1 konnte im HEK-*Screen* zudem ein weiteres, bekanntes MAP3K7-bindendes Protein identifiziert werden, weswegen das Risiko einer falsch-positiven Detektion von MAP3K7 als Interaktor von ADAM10 geringer ist [Shibuya *et al.*, 1996].

Tab. 3.3.2. Potentielle Interaktionspartner aus dem HEK-Screen.

<i>MiST-Score</i>	UniProt Nr.	Abk.	UniProt Name	subzelluläre Lokalisation
0,97099	O14672	ADAM10	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase 10</i>	Zellmembran
0,68551	Q9BXI3	5NT1A	<i>Cytosolic 5'-nucleotidase 1A</i>	Zellplasma

Tab. 3.3.2. Potentielle Interaktionspartner aus dem HEK-Screen.

MiST-Score	UniProt Nr.	Abk.	UniProt Name	subzelluläre Lokalisation
0,68551	Q8NG11	Tspan14	Tetraspanin 14	Zellmembran
0,68551	O95858	Tspan15	Tetraspanin 15	Zellmembran
0,68551	P51815	Zn75D	Zink finger protein 75D	Zellkern
0,67626	Q9NWS8	RMND1	Required for meiotic nuclear division protein 1 homolog	Mitochondrien
0,52808	Q8ND83	Slain1	SLAIN motif protein 1	Zellkern
0,45673	Q9NZJ4	SACS	Sacsin	Zellkern, Mitochondrien
0,36924	P61009	SPCS3	Signal peptidase complex subunit 3	ER
0,34585	P40855	PEX19	Peroxisomal biogenesis factor 19	Zellplasma, Peroxisom
0,34310	P01033	TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	Extrazellulär
0,31674	O95373	IPO7	Importin 7	Zellkern, Zellplasma
0,30768	Q96P70	IPO9	Importin 9	Zellkern, Zellplasma
0,30638	O15397	IPO8	Importin 8	Zellkern, Zellplasma
0,30472	O43318	MAP3K7 (TAK1)	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	Zellplasma
0,30335	Q15750	TAB1	TAK1-binding protein	Zellkern, Zellplasma
0,29964	Q9P2R3	ANFY1	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	Endosom
0,29794	Q6DKK2	TTC19	Tetratricopeptide repeat protein 19	Zellplasma, Mitochondrien
0,29136	P35232	PHB	Prohibitin	Zellkern, Plasmamembran, Mitochondrien
0,29018	Q9Y2H1	STK38L	Serine/threonine-protein kinase 38-like	Zellplasma
0,28093	Q92973	TNPO1	Transportin 1	Zellkern, Zellplasma

Tab. 3.3.2. Potentielle Interaktionspartner aus dem HEK-Screen.

MiST-Score	UniProt Nr.	Abk.	UniProt Name	subzelluläre Lokalisation
0,27957	Q9Y5L4	TIMM13	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13</i>	Mitochondrien
0,25233	P06454	PTMA	<i>Prothymosin alpha</i>	Zellkern, Zellplasma
0,23301	O60220	TIMM8A	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A</i>	Mitochondrien
0,21348	P67812	SEC11A	<i>Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A</i>	ER
0,20323	Q15005	SPCS2	<i>Signal peptidase complex subunit 2</i>	ER
0,16222	Q13144	EIF2B5	<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon</i>	Zellkern

3.3.2. Charakterisierung des potentiellen ADAM10-Interaktionspartners FKBP38

Das FK506-bindende Protein 38 (FKBP38) wurde im *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid*-System als potentieller Interaktionspartner von ADAM10 identifiziert. Hefesysteme können jedoch abhängig vom Hefestamm hinsichtlich der posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen der Proteine, Unterschiede zu eukaryotischen Zellen aufweisen. Diese Unterschiede können die Interaktion beeinflussen, weswegen es besonders wichtig war, das Ergebnis des Screens in einem höheren eukaryotischen Zellsystem insbesondere in Säugerzellen zu überprüfen.

3.3.2.1. Untersuchung auf Interaktion und Lokalisation der Interaktion zwischen ADAM10 und FKBP38

Um die physikalische Interaktion von ADAM10 und FKBP38 im Säugersystem zu überprüfen wurden HeLa Zellen mit murinen ADAM10- und FKBP38-myc-

Konstrukten transfiziert. Anschließend wurden Immunpräzipitationen mit einem gegen ADAM10- bzw. einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper durchgeführt, um eine mögliche Kopräzipitation des potentiellen Interaktionspartners nachzuweisen (Abb. 3.3.3.).

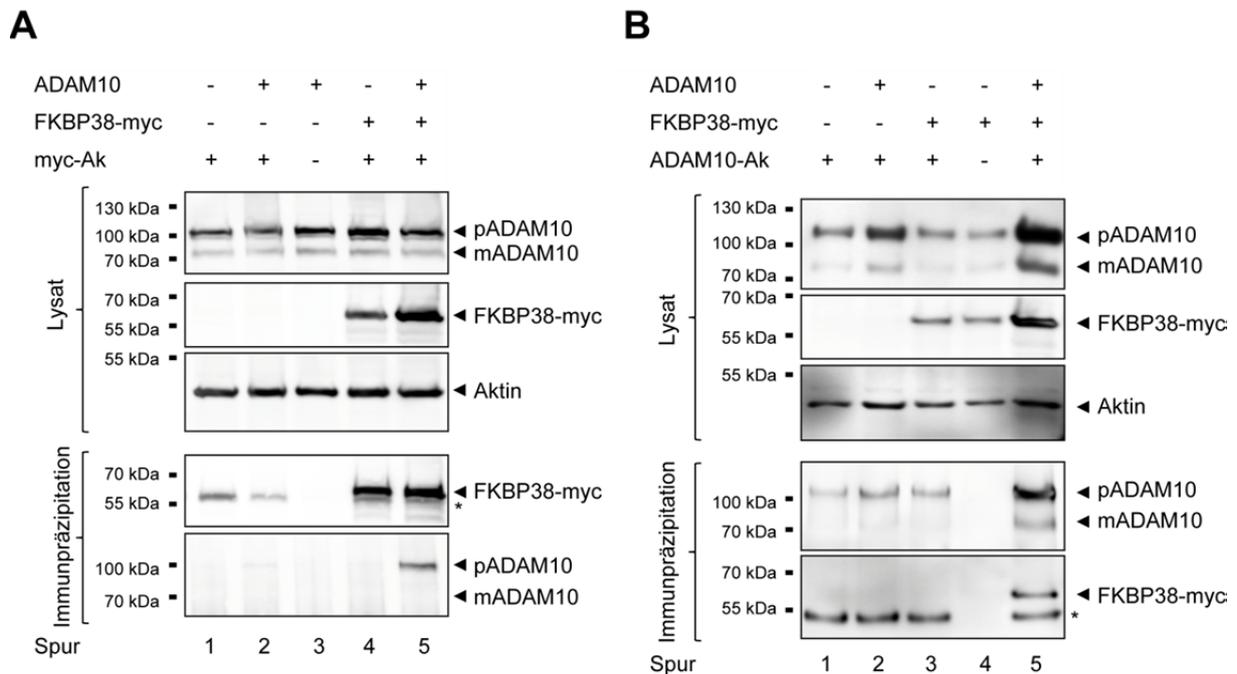


Abb. 3.3.3. Immunpräzipitation von ADAM10 und FKBP38.

(A-B) HeLa Zellen wurden einzeln oder mit beiden Konstrukten (ADAM10 bzw. FKBP38-myc) transfiziert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper (A) bzw. einem ADAM10-spezifischen Antikörper (B) durchgeführt. Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde in den Lysaten über einen Western Blot mittels ADAM10- und myc-Antikörper nachgewiesen. Mit den gleichen Antikörpern erfolgte die Untersuchung des Präzipitats auf die entsprechenden Proteine. Als Kontrolle der Spezifität der Präzipitation diente eine Antikörper-freie Probe. Ak = Antikörper, pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, * = unspezifisches Signal.

Die Lysat-Fractionen bezeichnen Proben der Zellen vor der Präzipitation und dienen der Überprüfung der eigentlichen Expression der Konstrukte. Nach der Transfektion von FKBP38-myc konnte dieses deutlich in den entsprechenden Lysat-Proben beider dargestellten Experimente nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3. A-B). Die Transfektion des ADAM10-Konstruktes führte dagegen nur in einem der beiden Experimente zu einer deutlich detektierbaren Steigerung der ADAM10-Expression (Abb. 3.3.3. B). Die Kotransfektion des ADAM10- und FKBP38-Konstruktes führte zu einer verstärkten Expression beider kodierter Proteine, obwohl in allen Telexperimenten gleiche Mengen an DNA für die Transfektion eingesetzt wurden. Diese Beobachtung trat auch in weiteren Experimenten auf, war aber unabhängig von der kotransfizierten

DNA. So zeigten auch nicht interagierende Kontrollen wie GFP diesen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Die Western Blots der Immunpräzipitation mit dem myc-Antikörper (Abb. 3.3.3. A) zeigten eine Anreicherung des FKBP38-myc-Proteins im Präzipitat aller FKBP38-myc exprimierender Proben. ADAM10 dagegen konnte ausschließlich im Präzipitat der doppelt transfizierten FKBP38-myc/ADAM10-Koexpression nachgewiesen werden (Spur 5). In keinem der anderen Präzipitate war ADAM10 darstellbar, wodurch auch eine unspezifische Bindung an die verwendeten Agarose-*Beads* ausgeschlossen werden kann (Spur 3). Die Koimmunpräzipitation von endogenem ADAM10 mit überexprimiertem FKBP38-myc (semi-endogene Präzipitation) führte ebenfalls nicht zur Anreicherung von ADAM10 (Spur 4). Interessanterweise konnte in der Doppeltransfektion (Spur 5) nur die proteolytisch inaktive ADAM10-Proform (ca. 100 kDa) mit FKBP38 kopräzipitiert werden.

In den Immunpräzipitationen mit dem ADAM10-Antikörper konnte vor allem die ADAM10-Proform, aber auch schwächer die mature Form nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3. B). Das Verhältnis beider ADAM10-Spezies entsprach dabei der in den Lysat-Fraktionen beobachteten Verteilung. Eine Kopräzipitation von FKBP38-myc konnte auch hier nur unter FKBP38-myc/ADAM10-Koexpression detektiert werden (Spur 5). Eine Kopräzipitation von überexprimiertem FKBP38-myc mit endogenem ADAM10 (semi-endogene Präzipitation) war dagegen unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar (Spur 3). Unspezifische Bindungen des FKBP38 an die Agarose-*Beads* konnten ausgeschlossen werden, da in der Fraktion ohne Antikörper-Fällung kein Protein detektiert werden konnte (Spur 4).

Neben der grundlegenden physikalischen Möglichkeit der Interaktion zweier Proteine ist auch die räumliche Nähe in der Zelle eine zwingende Voraussetzung, um der Interaktion eine physiologisch relevante Bedeutung zu ermöglichen. Daher sollte mit einer Immunfluoreszenz in HeLa-Zellen überprüft werden, ob ADAM10 und FKBP38 zumindest teilweise in gleichen Zellkompartimenten nachweisbar sind (Abb. 3.3.4.). Mit Hilfe eines FKBP38-spezifischen Antikörpers konnte FKBP38 endogen angefärbt werden. Der Nachweis der Spezifität der Färbung erfolgte anhand von *fkbp8*-defizienten HAP1-Zellen (Vergleiche Abschnitt 3.3.2.4., Abb. 3.3.11.). Ein myc-spezifischer Antikörper diente der Färbung des überexprimierten FKBP38-myc-Konstruktes. Die Kofärbung zwischen ADAM10 und dem endogen exprimierten

FKBP38 zeigte ein teilweise überlagerndes Signal für beide Proteine (Abb. 3.3.4. A). Eine Anfärbung des überexprimierten FKBP38-myc zeigte ebenfalls ein Signal, welches mit dem von ADAM10 kolokalisiert (Abb. 3.3.4. B). Somit konnten sowohl die Interaktion als auch die räumlich Nähe beider Proteine gezeigt werden.

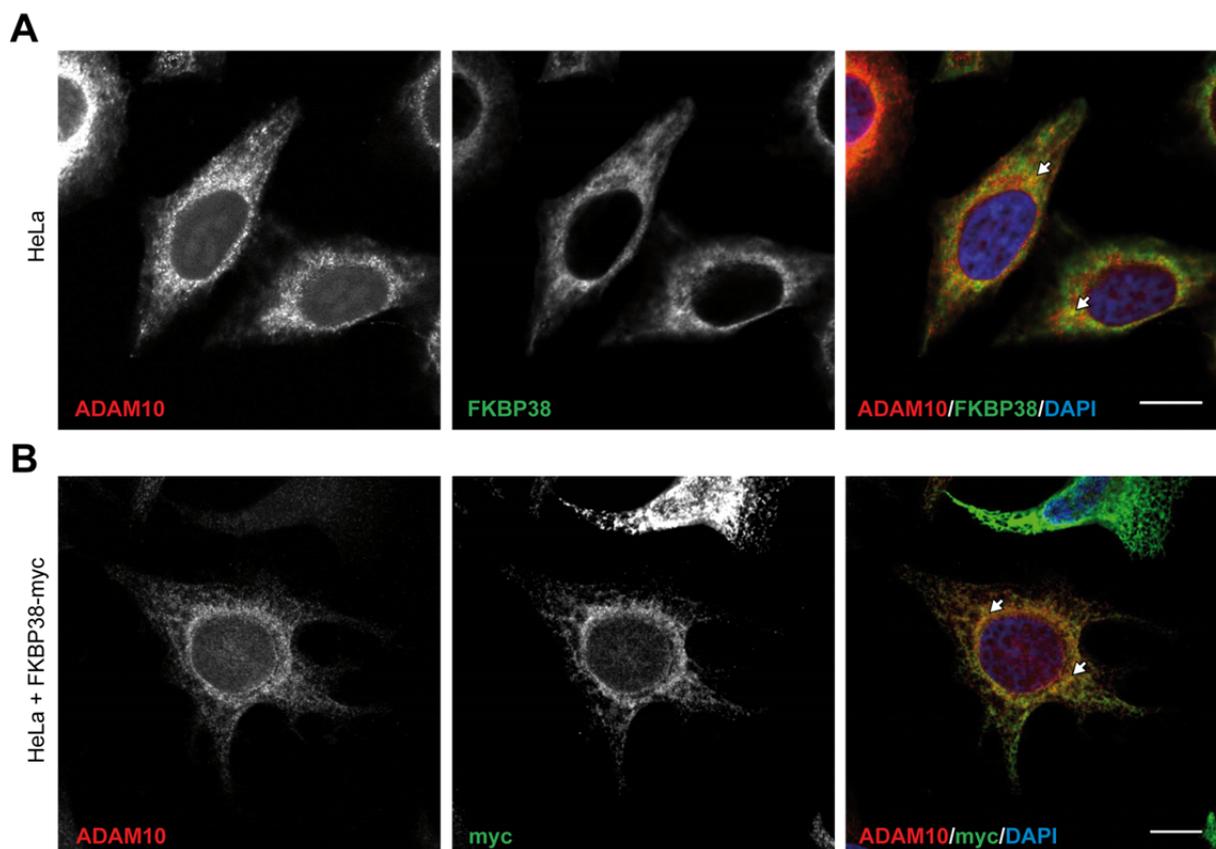


Abb. 3.3.4. Kolokalisation von ADAM10 und FKBP38 in HeLa-Zellen.

(A) Zur Überprüfung eines möglichen Kontaktes von ADAM10 und FKBP38 in der Zelle wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Hierzu wurden ADAM10 (rot) und FKBP38 (grün) durch spezifische Antikörper in HeLa-Zellen angefärbt. (B) Die Möglichkeit des Kontaktes von ADAM10 und dem überexprimierten FKBP38-myc wurde in HeLa-Zellen durch Kofärbung mit einem ADAM10- (rot) und einem myc-spezifischen Antikörper (grün) analysiert. Kolokalisation ist als gelbes Signal sichtbar (Pfeile). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken = 10 µm.

Da FKBP38 sowohl als ER-lokalisiertes als auch als mitochondriales Protein beschrieben ist, wurde nicht nur die Kolokalisation mit ADAM10, sondern auch die Lokalisation des endogenen und des überexprimierten Proteins in der Zelle untersucht [Edlich *et al.*, 2005]. Hierzu wurden Kofärbungen mit einem ER- und einem mitochondrialen Marker durchgeführt (Abb. 3.3.5.). Die Kofärbung zwischen FKBP38 und dem ER-Marker KDEL zeigte dabei eine deutliche Signalüberlagerung, sowohl des endogenen als auch des überexprimierten Proteins (Abb. 3.3.5. A-B).

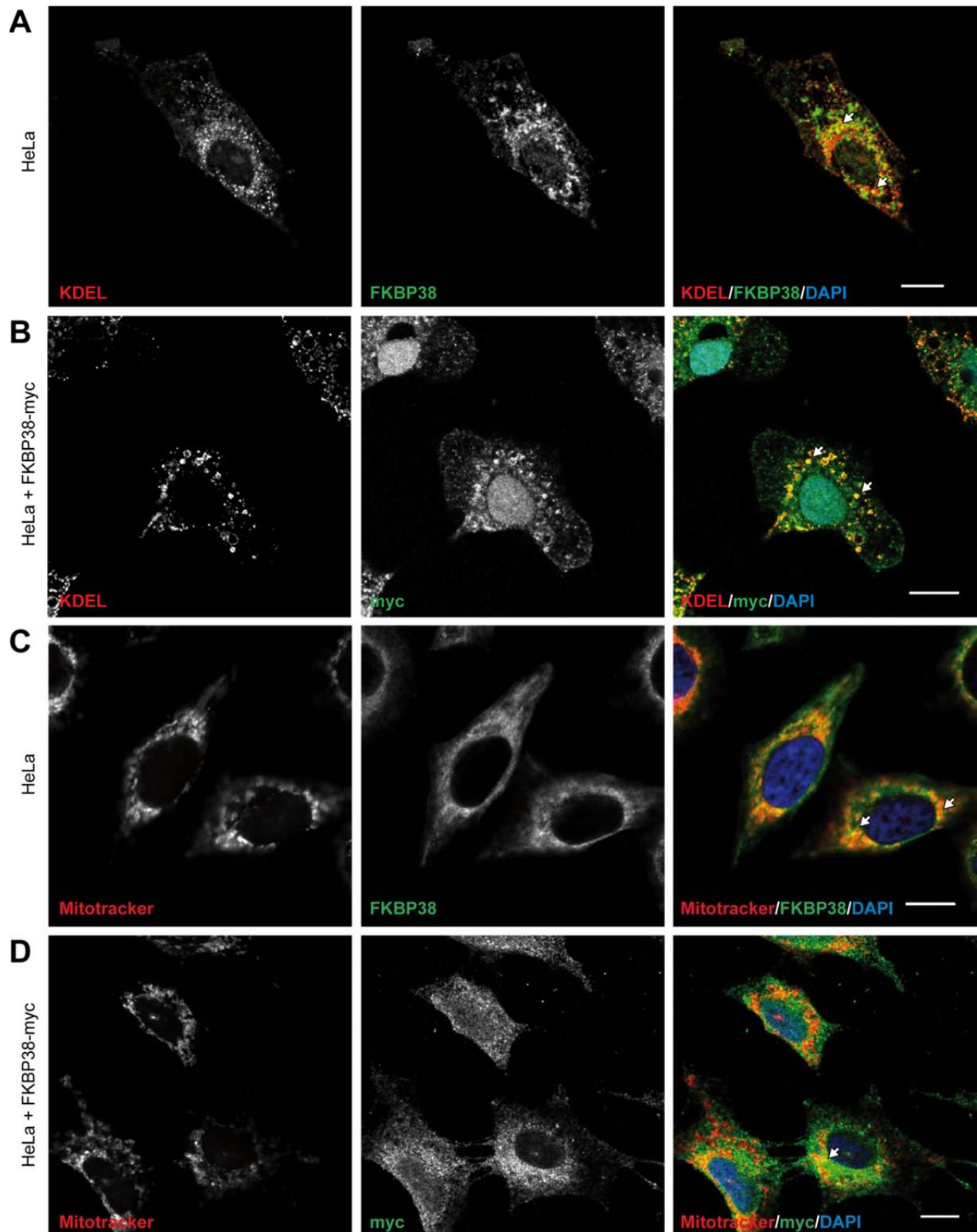


Abb. 3.3.5. Intrazelluläre Lokalisation von überexprimiertem FKBP38-myc in HeLa-Zellen.

(A-D) HeLa-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz auf die Kolokalisation von endogen exprimiertem FKBP38 bzw. überexprimiertem FKBP38-myc (grün) mit verschiedenen Kompartimentmarkern (rot) untersucht. Endogenes FKBP38 wurde mit einem FKBP38-spezifischen Antikörper nachgewiesen (A, C), überexprimiertes FKBP38-myc mit einem myc-spezifischen Antikörper (B, D). Das ER wurde durch Färbung gegen KDEL dargestellt (A-B), die Mitochondrien über Mitotracker (C-D). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Kolokalisation zweier Signale ist anhand eines gelben Signals sichtbar (Pfeile). Maßstabsbalken = 10 μ m.

Im Gegensatz dazu zeigte die Kofärbung mit dem mitochondrialen Marker Mitotracker vor allem eine Kolokalisation mit dem endogen exprimierten FKBP38 (Abb. 3.3.5. C). Die Kofärbung des mitochondrialen Markers mit überexprimiertem FKBP38-myc dagegen war weniger stark nachweisbar (Abb. 3.3.5. D). Während das endogene Protein somit im ER und den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte, erhöhte die Überexpression von FKBP38 vor allem dessen ER-lokalisierte Form. Dennoch kann ein Teil des überexprimierten Proteins auch in Mitochondrien nachgewiesen werden.

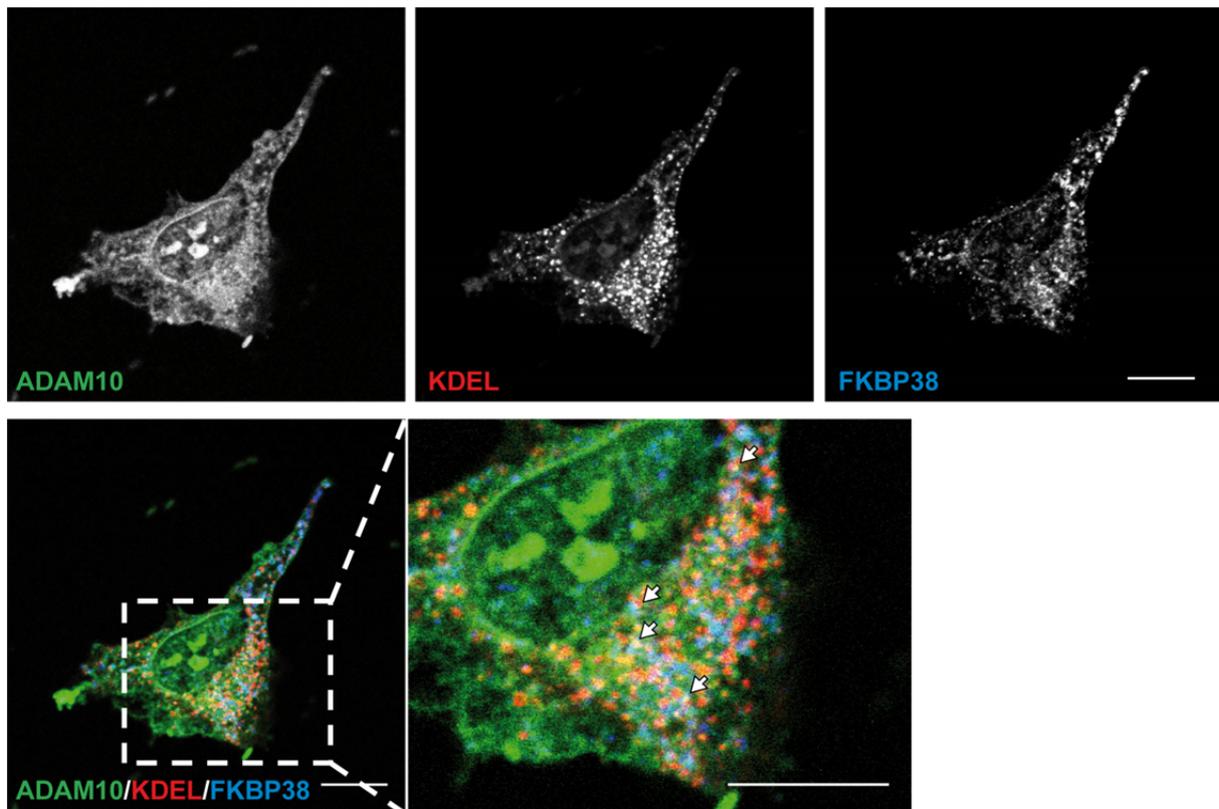


Abb. 3.3.6. Kolokalisation von ADAM10 und FKBP38 im ER in HeLa-Zellen.

Zur Identifizierung des Ortes einer möglichen Interaktion wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen ADAM10 (grün), FKBP38 (blau) und KDEL (rot) durchgeführt. Die Kolokalisation aller drei Signale ist als weißes Signal sichtbar (Pfeile). Maßstabsbalken = 10 μ m.

Die bisherigen Ergebnisse gaben Hinweise auf eine Interaktion der beiden Proteine, nicht aber über das entsprechende Kompartiment in der Zelle. Aus diesem Grund wurde eine Dreifachfärbung der beiden putativen Interaktoren mit verschiedenen Zellkompartiment-Markern durchgeführt. Die Dreifachfärbung zwischen ADAM10, endogenem FKBP38 und dem ER-Marker KDEL zeigte hierbei die stärkste Kolokalisation aller drei Signale (Abb.3.3.6.). Jedoch war auch hier nur für einige

kleine Bereiche im perinukleären Bereich eine Überlagerung der Signale für alle drei Proteine detektierbar (weiße Signale, siehe Pfeile). Die Überlagerung nur zweier Signale (lila: ADAM10 + FKBP38, gelb: ADAM10 + KDEL, türkis: FKBP38 + KDEL) dagegen konnte in zusätzlichen Bereichen detektiert werden. Zusammenfassend weisen die bisherigen Daten darauf hin, dass das ER der Ort einer möglichen Interaktion zwischen ADAM10 und FKBP38 ist.

3.3.2.2. Untersuchung des Effektes einer Interaktion mit FKBP38 auf ADAM10

Die Experimente der Interaktionsanalysen stärken die Beobachtung aus dem initialen *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-Screen*, dass FKBP38 tatsächlich mit ADAM10 interagiert. Da FKBP38 vorrangig die inaktive Proform von ADAM10 kopräzipitieren konnte, wäre eine potentielle Interaktion am wahrscheinlichsten während des sekretorischen Transportes von ADAM10 zur Zellmembran relevant. Die Immunfluoreszenz-Analyse wiesen dabei vor allem auf das ER als möglichen Ort der Interaktion hin. Daher wurde untersucht, ob FKBP38 den Transport von ADAM10 und als Konsequenz auch dessen Aktivität beeinflussen könnte.

Eine mögliche Bedeutung der Interaktion von FKBP38 und ADAM10 im ER besteht darin, dass der Transport von ADAM10 zur Zelloberfläche beeinflusst sein könnte. Zur Überprüfung eines solchen Einflusses auf die Oberflächenexpression von ADAM10 wurde eine Biotinylierung und Präzipitation der Zelloberflächenproteine durchgeführt. Hierzu wurde endogen FKBP38 exprimierende HeLa-Zellen mit FKBP38-myc überexprimierenden Zellen verglichen (Abb. 3.3.7.). Als Kontrolle der Aufreinigung dienten die zytosolische Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) bzw. der Zellmembran-lokalisierte Transferrinrezeptor (TfR). In den Expressionskontrollen (Abb. 3.3.7., Lysat) verstärkte die Transfektion von FKBP38-myc die Gesamtexpression von FKBP38. In Bezug auf ADAM10 waren dagegen keine Unterschiede hinsichtlich der Expression sichtbar. Es konnte weder eine Verschiebung der Signalintensität zwischen maturer und Proform von ADAM10 nachgewiesen werden, noch unterlagen die totalen ADAM10-Proteinlevel offensichtlichen Veränderungen. In den präzipitierten Zelloberflächen-Fractionen (Abb. 3.3.7., Präzipitation) dagegen konnte in den FKBP38-myc überexprimierenden

Zellen ein Anstieg von ADAM10 an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dieser Anstieg betraf vor allem die mature, aktive ADAM10-Form (ca. 70 kDa), schwächer jedoch auch die proteolytisch inaktive Proform. FKBP38 konnte ebenfalls in der präzipitierten Fraktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Immunpräzipitationsexperimenten wurde bei der Biotinylierung aber kein zusätzlicher Waschschrift durchgeführt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass FKBP38 in den Präzipitaten aufgrund unspezifischer Bindung an die *Beads* detektiert wurde. Ein Indiz hierfür ist auch, dass FKBP38 in den nicht-biotinylierten Präzipitationen schwach nachweisbar war.

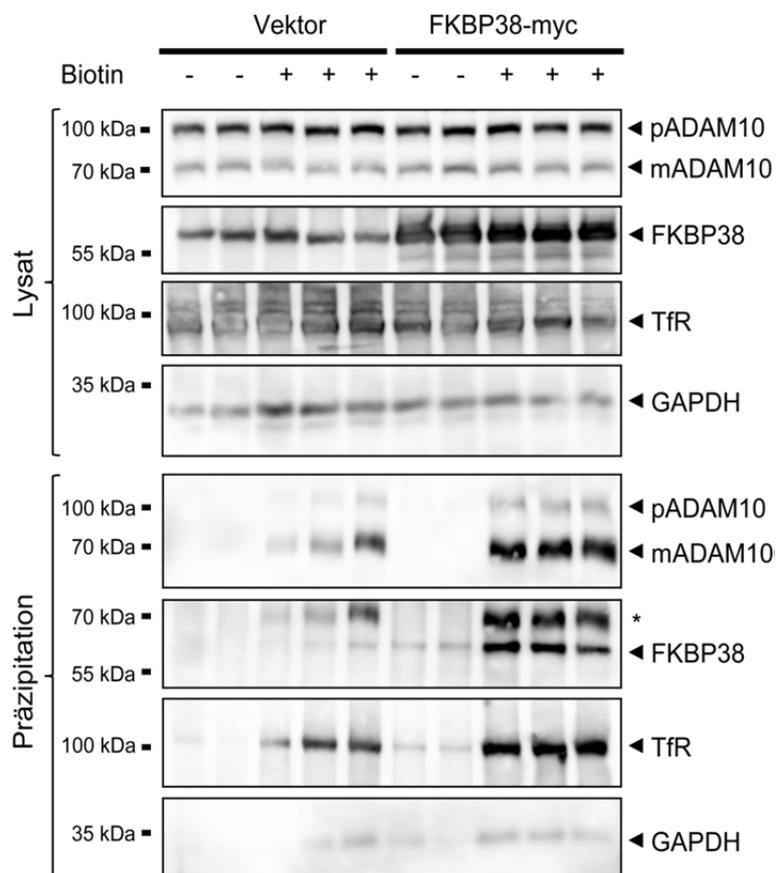


Abb. 3.3.7. Beeinflussung der ADAM10-Reifung durch FKBP38-Überexpression.

Um den Einfluss von FKBP38 auf die Reifung von ADAM10 zu überprüfen wurde eine Oberflächenbiotinylierung von HeLa-Zellen mit endogener FKBP38-Expression und FKBP38-myc-Überexpression durchgeführt. Die Lysatfraktionen dienen der Kontrolle der Expression der jeweiligen Proteine. Zur Färbung der Proteine wurde ein ADAM10- bzw. FKBP38-spezifischer Antikörper (Detektion von endogenem FKBP38 und FKBP38-myc) verwendet. Als Qualitätskontrolle der Biotinylierung dienen der Transferrinrezeptor (Tfr) und die zytosolische GAPDH. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, * = unspezifisches Signal.

Zur Absicherung der Beobachtung wurde dieses Experiment auch unter siRNA-vermittelter Reduktion der FKBP38-Expression durchgeführt (Abb. 3.3.8.). Die

Zelllysate (Lysat) der FKBP38-siRNA-behandelten Proben zeigten eine deutliche Verringerung der FKBP38-Proteinmenge. Wie bei den FKBP38-myc-überexprimierenden Proben zeigte auch die Verringerung der FKBP38 Expression keinen offensichtlichen Einfluss auf ADAM10 in den Lysatproben (Abb. 3.3.8., Lysat). In den Präzipitaten der Oberflächenproteine (Abb. 3.3.8., Präzipitation) konnte nach FKBP38-Reduktion ein deutlicher Anstieg an ADAM10 detektiert werden. Hierbei lag jedoch die Menge an maturer Form unverändert vor, während ein Anstieg der Proform (ca.100 kDa) auf ca. das 3,5-fache nachweisbar war (Normalisierung von ADAM10-Proform auf Transferrinrezeptor im Präzipitat). FKBP38 konnte in diesem Experiment nicht in den Präzipitaten nachgewiesen werden. Da ein geringeres Expressionslevel auch eine geringere unspezifische Anreicherung bedeutet, unterstützt diese Beobachtung die Vermutung einer unspezifischen Bindung von FKBP38 an die *Beads* im ersten Biotinylierungsexperiment.

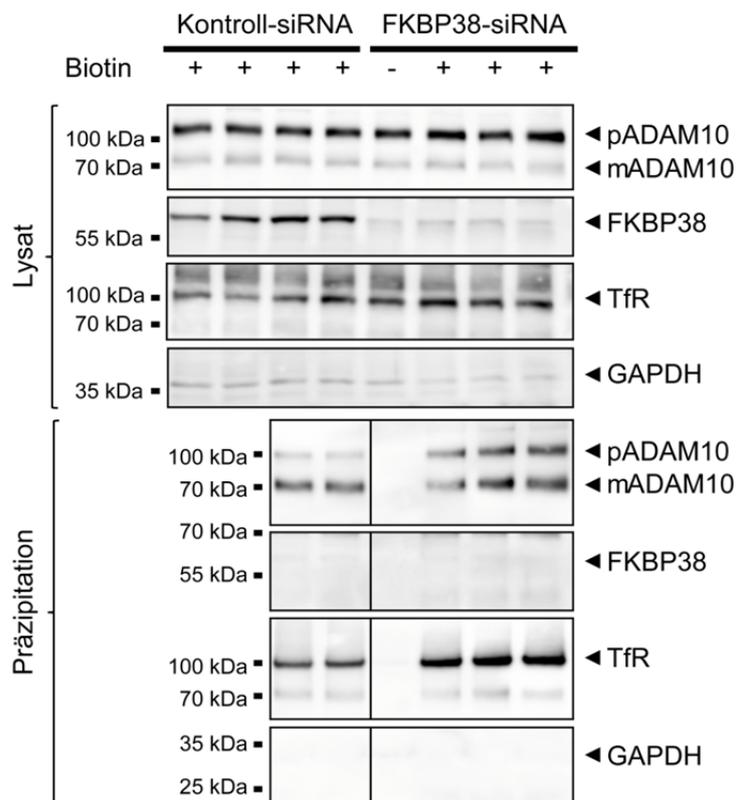


Abb. 3.3.8. Beeinflussung der ADAM10-Reifung unter FKBP38-Reduktion.

Der Einfluss von FKBP38 auf die Reifung von ADAM10 wurde in HeLa-Zellen auch nach siRNA-vermittelter Reduktion von FKBP38 mittels einer Oberflächenbiotinylierung überprüft. Die Lysatfraktionen dienten der Kontrolle der Expression der jeweiligen Proteine. Zur Färbung der Proteine wurde ein ADAM10- bzw. FKBP38-spezifischer Antikörper verwendet. Als Qualitätskontrolle der Biotinylierung dienten der Transferrinrezeptor (TfR) und die zytosolische GAPDH. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10.

Die Biotinylierungsexperimente zeigten an der Zelloberfläche zunehmende Mengen an maturem ADAM10 mit steigenden Mengen an FKBP38 und Zunahme der ADAM10-Proform mit abnehmenden Mengen an FKBP38. Damit wiesen die Ergebnisse auf eine mögliche Rolle des Faltungshelfers FKBP38 bei der Regulation des Transportes von ADAM10 zur Zelloberfläche hin..

An der Zelloberfläche vermittelt das katalytisch aktive, mature ADAM10 die Proteolyse von Substraten. Daher wurde überprüft, ob die FKBP38-Überexpression über eine Regulation des Transportes von ADAM10 einen Einfluss auf die Proteolyse verschiedener ADAM10-Substrate ausüben kann. Hierzu wurden die Lysate aus dem Biotinylierungsexperiment unter FKBP38-Überexpression (Vergleiche Abb. 3.3.7.) auf die Proteolyse der klassischen ADAM10-Substrate APP und N-Cadherin überprüft (Abb. 3.3.9.).

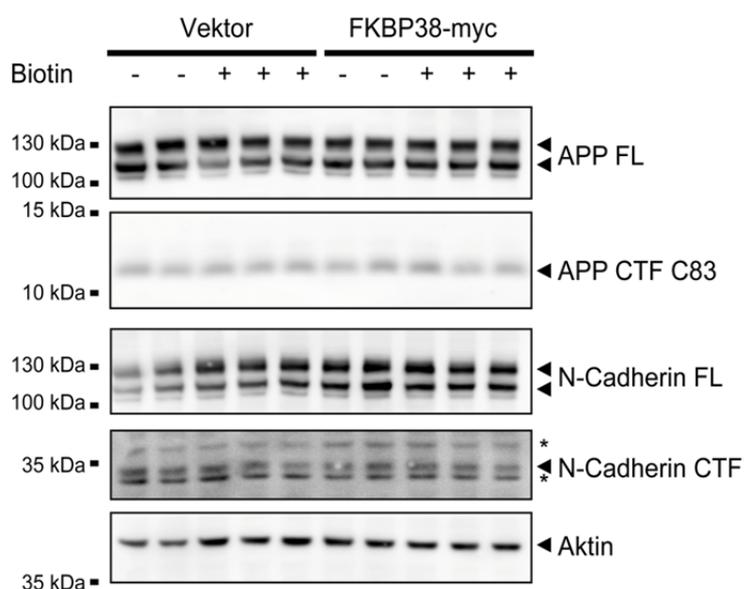


Abb. 3.3.9. ADAM10-Aktivität neben FKBP38-Überexpression.

Die Lysatfraktionen aus Abb. 3.3.7. wurden gegen klassische ADAM10-Substrate gefärbt, um eine Beeinflussung der Aktivität der Protease durch FKBP38 zu untersuchen (n = 5). Als Ladekontrolle diente Aktin. FL = Volllänge, CTF = C-terminales Fragment, * = unspezifisches Signal.

APP zeigte nach FKBP38-Überexpression keine Unterschiede hinsichtlich der Menge an immaturer (ca. 115 kDa) und maturer (ca. 130 kDa) Vollängen-Form (APP FL). Das Signal des ADAM10-generierten C-terminalen APP-Fragments (APP CTF C83) zeigte ebenfalls keine Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Expressionsbedingungen. Auch für N-Cadherin wurde kein Unterschied hinsichtlich der Mengen der beiden Vollängen-Formen (N-Cadherin FL)

nachgewiesen. Die Intensität des Signals des C-terminalen Fragmentes (N-Cadherin CTF), welches durch ADAM10-Proteolyse gebildet wird, wurde ebenfalls unverändert detektiert. Obwohl Indizien vorliegen, dass die Oberflächenexpression von murenen ADAM10 durch FKBP38 beeinflusst sein könnte (Abb. 3.3.7., Abb. 3.3.8.), war kein Effekt auf die Prozessierung der Substrate APP und N-Cadherin durch die Protease nachweisbar.

3.3.2.3. Untersuchung einer induzierbaren FKBP38-Überexpressions-Linie

Die bisherigen Untersuchungen von FKBP38 wurden in HeLa-Zellen durchgeführt und unterstützen zwar eine Interaktion mit ADAM10, konnten jedoch keinen eindeutigen Aufschluss über deren Funktion in Bezug auf ADAM10 geben. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte von FKBP38 auf ADAM10 in verschiedenen Zellen verschieden prominent sind. Aus diesem Grund wurde als weiteres System eine T-REx HEK293-Zelllinie mit Doxycyclin-induzierbarer FKBP38-Überexpression generiert (Flp-In™ T-REx™ Core Kit, Thermo Fisher Scientific) [Mentrup *et al.*, 2015]. Hierzu wurden die DNA von murinem FKBP38 und seine PPlase-Domäne-defiziente Mutante FKBP38(Δ PPI) mit *myc-tag* in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor kloniert und stabil in T-REx-Zellen transfiziert. Die PPlase-defiziente Mutante sollte hierbei zeigen, ob mögliche Effekte von der katalytischen Aktivität von FKBP38 abhängig sind. Durch Zugabe von Doxycyclin zum Medium kann die Überexpression des transfizierten Konstruktes induziert werden, während nicht-induzierte Zellen als ausschließlich endogen exprimierende Kontrolle dienen. Zur Kontrolle des Systems wurde die Expression der Konstrukte über den *myc-tag* nachgewiesen (Abb. 3.3.10.).

Die FKBP38-myc-transfizierten Zellen zeigten nach Doxycyclin-Behandlung ein deutliches FKBP38 Signal im Western Blot. Dennoch war FKBP38-myc auch schwach in den unbehandelten Proben detektierbar, was auf eine gewisse unspezifische Grundexpression hinwies. Die Expression des FKBP38(Δ PPI)-myc-Proteins nach Induktion mit Doxycyclin war ebenfalls detektierbar, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als das Wildtyp-Protein (FKBP38-myc). In diesen Zellen konnte ohne Induktion kein Protein mit dem myc-spezifischen Antikörper detektiert

werden, was aber wahrscheinlich auf die schwächere generelle Expression zurückzuführen ist. Da die FKBP38-Proteinmenge durch Doxycyclin-Behandlung deutlich erhöht werden konnten, wurde analog zu den Untersuchungen in HeLa-Zellen ein möglicher Effekt auf die ADAM10-Maturierung geprüft. Die Überexpression von FKBP38-myc zeigte jedoch keine Beeinflussung der Expressionslevel der maturen oder der Proform von ADAM10 in den T-REx Zellen, das Gesamtproteinlevel der Protease war ebenfalls unverändert. Entsprechend bewirkte auch die induzierte Expression von FKBP38(Δ PPI)-myc keine Änderungen hinsichtlich beider ADAM10-Spezies.

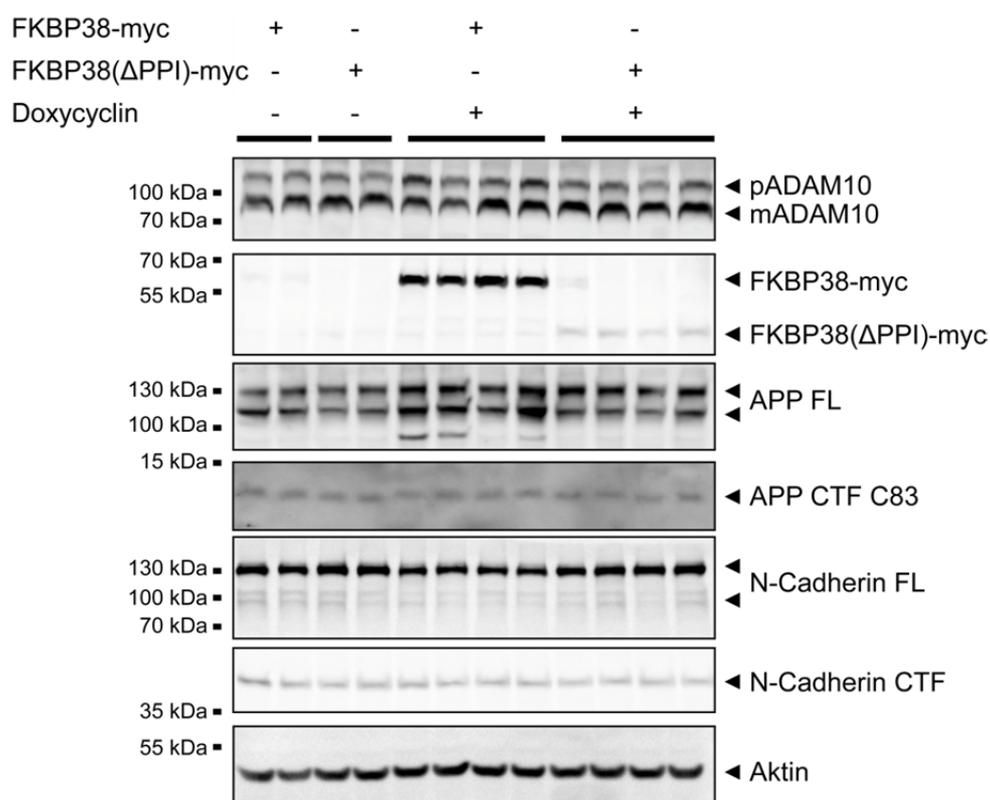


Abb. 3.3.10. Analyse von T-REx-Zellen mit induzierbarer FKBP38-Expression.

T-REx-Zellen wurden stabil mit einem induzierbaren Konstrukt von FKBP38-myc oder der PPIase-defizienten Mutante FKBP38(Δ PPI)-myc transfiziert. Über die Applikation von Doxycyclin wurde die Expression der Konstrukte in den angegebenen Fraktionen für 48 h induziert und im Western Blot mit einem myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Anschließend wurden ADAM10 und verschiedene ADAM10-Substrate angefärbt, um eine Beeinflussung der ADAM10-Reifung oder -Aktivität zu kontrollieren ($n = 4$). Als Ladekontrolle diente Aktin. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, FL = Volllänge, CTF = C-terminales Fragment.

Wie schon in den HeLa-Zellen gezeigt, könnte aber dennoch die Oberflächenexpression beider ADAM10-Spezies verändert vorliegen und somit die Aktivität an der Zelloberfläche beeinflusst sein. Aus diesem Grund wurde auch in diesen Zellen die Proteolyse der Substrate APP und N-Cadherin untersucht

(Abb. 3.3.10.). Hinsichtlich APP konnte in Gegenwart der FKBP38-myc-Überexpression eine leichte Zunahme der beiden Vollängen-Spezies detektiert werden. Die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante FKBP38(Δ PPI)-myc führte zu einem schwächeren Anstieg der APP-Vollängen-Spezies. Die Zunahme betraf dabei vorrangig die mature APP-Form (ca. 130 kDa), während die immature Form (ca. 100 kDa) etwa dem Niveau der Kontrollen entsprach. Das APP CTF C83 wurde im Vergleich zu den Kontrollen unverändert detektiert, was gegen einen Einfluss von FKBP38 auf die APP-Proteolyse durch ADAM10 spricht. Für N-Cadherin führte die Überexpression von FKBP38-myc zu einer leichten Reduktion der schwereren unprozessierten Vollängen-Formen (130 kDa). Neben dem katalytisch inaktiven FKBP38(Δ PPI)-myc war diese Reduktion nicht detektierbar. Allerdings war weder für FKBP38-myc noch für die inaktive Mutante eine Veränderung des N-Cadherin CTF nachweisbar, was gegen eine Beeinflussung der ADAM10-medierten Proteolyse spricht.

3.3.2.4. Untersuchung einer haploiden FKBP38-Knockoutzelllinie

Durch die Experimente in der T-REx Zelllinie konnte lediglich der Einfluss einer Überexpression von FKBP38 auf ADAM10 und dessen Substrate untersucht werden. Um auch die Folgen reduzierter FKBP38-Level in einem zweiten Zellsystem zu analysieren, wurde eine haploide Zelllinie verwendet, die HAP1-Zellen. In dieser kommerziellen Zelllinie wurde das *fkbp8*-Gen mit Hilfe der CRISPR-Cas9 Technik so verändert, dass das Protein nicht mehr exprimiert werden sollte.

Um die Funktionalität des Systems zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse der HAP1 *fkbp8*-deletierten Zellen und der zugehörigen Kontrollzellen durchgeführt (Abb. 3.3.11.). Eine Kofärbung mit dem ER-Marker KDEL diente dem Nachweis der Spezifität der FKBP38-Färbung, da in vorangegangenen Experimenten alle Zellen eine deutliche FKBP38-Lokalisation im ER aufwiesen. Zudem ermöglicht die Kofärbung eine Kontrolle des Färbeprotokolls für den Fall, dass das Protein infolge einer erfolgreichen Deletion nicht mehr nachweisbar ist. In den HAP1-Kontrollzellen zeigte die Immunfluoreszenzanalyse ein mit dem ER-Marker KDEL kolokalisierendes Signal für endogenes FKBP38. Somit konnte eine endogene Expression des Proteins nachgewiesen werden. In den *fkbp8*-deletierten Zellen

(HAP1 $\Delta fkbp8$) war dagegen nur noch das KDEL-Signal detektierbar, während endogenes FKBP38 nicht mehr angefärbt werden konnte.

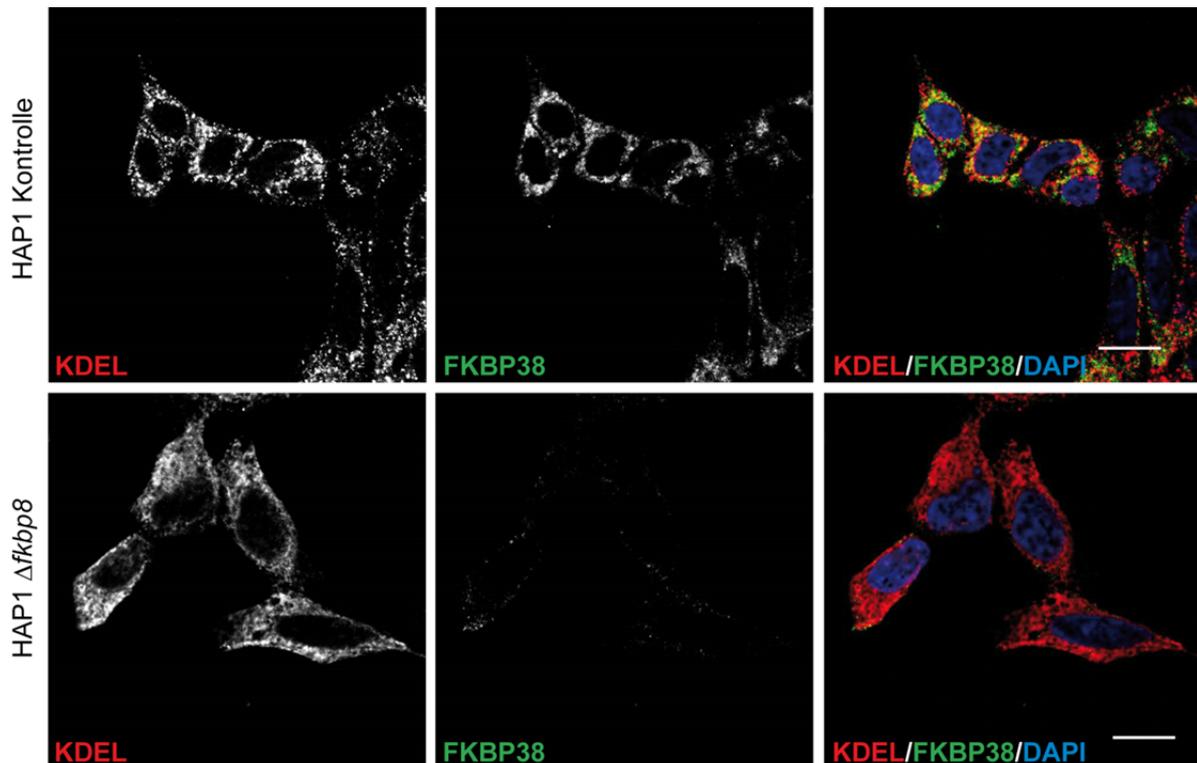


Abb. 3.3.11. Kontrolle der FKBP38-Defizienz in HAP1-Zellen.

HAP1-Kontrollzellen und die FKBP38-defiziente HAP1 $\Delta fkbp8$ Linie wurden mit einem FKBP38-spezifischen Antikörper gefärbt. Als Kontrolle des Färbeprotokolls diente der ER-Marker KDEL. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken = 10 μ m.

Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte den tatsächlichen Knockout des *fkbp8*-Gens in den entsprechenden Zellen, weswegen die Zelllinie auf mögliche Effekte von FKBP38 auf ADAM10 untersucht wurde. Der hierzu durchgeführte Western Blot bestätigte das Ergebnis der Immunfluoreszenz und zeigte die Abwesenheit von endogenem FKBP38 in den *fkbp8*-deletierten Zellen (Abb. 3.3.12.). Zusätzlich wurden *fkbp8*-deletierte Zellen zur Kontrolle mit FKBP38-myc transfiziert, um im Falle eines sichtbaren Effektes den Beitrag von FKBP38 nachzuweisen. Der Western Blot zeigte eine erfolgreiche Transfektion der *fkbp8*-deletierten Zellen (HAP1 $\Delta fkbp8$) mit FKBP38-myc, wodurch wieder das FKBP38-Expressionslevel der Kontrollzellen erreicht wurde. Hinsichtlich der ADAM10-Maturierung zeigte der Western Blot eine leichte Zunahme der ADAM10-Proform (ca. 100 kDa) in den *fkbp8*-deletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Eine Reexpression von FKBP38 durch Transfektion mit dem FKBP38-myc-Konstrukt konnte das ADAM10-Proteinlevel

jedoch nicht wieder auf das Kontrollzellniveau überführen. Stattdessen erschienen die Signalintensitäten der beiden ADAM10-Spezies nach Reexpression von FKBP38 wie in den *fkbp8*-deletierten Zellen. Somit scheint die Beobachtung ein zellspezifisches Phänomen und damit unabhängig von der Expression von FKBP38 zu sein.

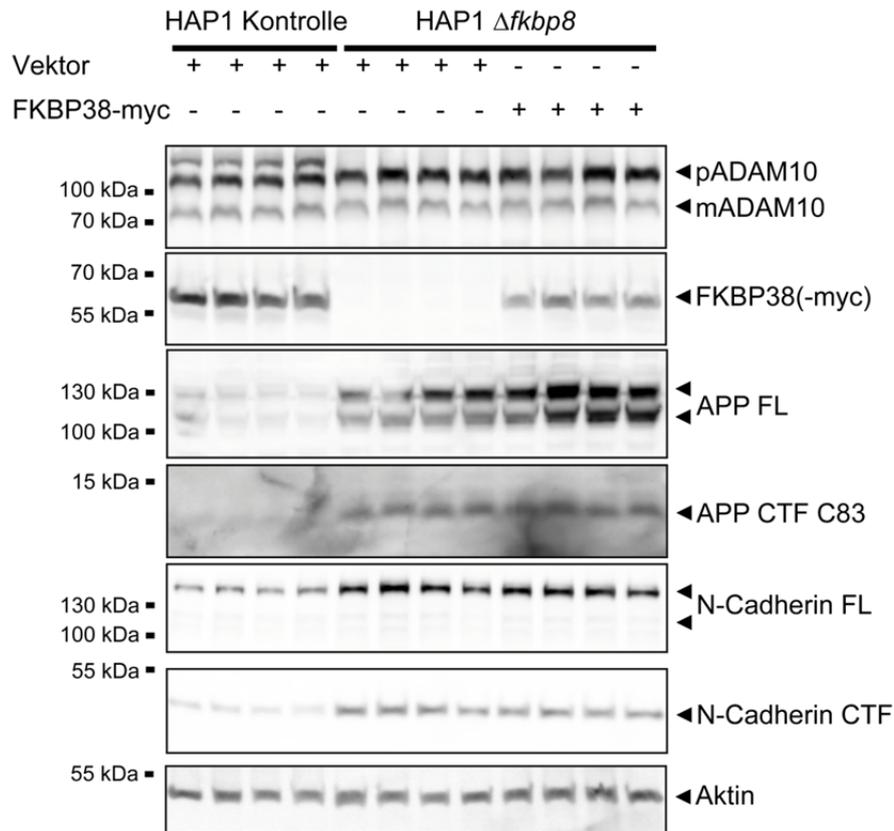


Abb. 3.3.12. Untersuchung von HAP1-Zellen mit FKBP38-Defizienz.

Zur Überprüfung der Reifung und Aktivität von ADAM10 wurden FKBP38-defiziente HAP1-Zellen und die entsprechenden HAP1-Kontrollzellen verwendet. Ein Teil der FKBP38-defizienten Zellen wurde mit FKBP38-myc transfiziert, um eventuelle Effekte über den *rescue* durch Reexpression des Proteins zu überprüfen (n = 2). Endogenes FKBP38 und FKBP38-myc wurden mit einem FKBP38-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Anschließend wurden gegen ADAM10 und verschiedene ADAM10-Substrate angefärbt. Als Ladekontrolle diente Aktin. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, FL = Volllänge, CTF = C-terminales Fragment.

Weiterhin zeigten *fkbp8*-defiziente Zellen sowohl für APP als auch für N-Cadherin eine deutlich erhöhte Menge an Vollängenprotein und dem ADAM10-Proteolyseprodukt (CTF). Eine Reexpression von FKBP38 konnte diesen Effekt erneut nicht auf das Level der Kontrollzelllinie zurückführen, sondern die Signalintensitäten der verschiedenen N-Cadherin- und APP-Spezies verblieben auf dem Niveau der FKBP38-defizienten HAP1-Zellen. Hinsichtlich der Maturierung von ADAM10 und der Proteolyse dessen Substrate konnte somit kein FKBP38-

spezifischer Effekt in den HAP1-Zellen gefunden werden. Stattdessen erwiesen sich die verwendeten Zellen aufgrund der FKBP38-unabhängigen Unterschiede im Proteinhaushalt als für die durchgeführten Analysen wenig geeignet.

3.3.3. Charakterisierung des potentiellen ADAM10-Interaktionspartners MAP3K7

Der *HEK-Screen* lieferte unter anderem die zytosolisch lokalisierte Kinase MAP3K7 als möglichen Interaktionspartner von ADAM10 (Abschnitt 3.3.1., Tab. 3.3.2.). Da gleichzeitig auch der MAP3K7-Aktivator TAB1 identifiziert wurde, erfolgte eine genauere Untersuchung der Kinase [Shibuya *et al.*, 1996]. Der *Screen* basierte auf den humanen Konstrukten, daher kann dessen Resultat gut auf das humane System extrapoliert werden. Dennoch musste die Interaktion bestätigt und deren Bedeutung analysiert werden. Hierzu wurden in den nachfolgenden Experimenten mit humanen Konstrukten von ADAM10 und MAP3K7 bzw. in HeLa-Zellen gearbeitet.

3.3.3.1. Untersuchung auf Interaktion und Lokalisation der Interaktion zwischen ADAM10 und MAP3K7

Zur Verifizierung des *HEK-Screens* hinsichtlich der direkten Interaktion zwischen ADAM10 und MAP3K7 wurden Koimmunpräzipitationsexperimente in HeLa-Zellen durchgeführt (Abb. 3.3.13.). Zuerst erfolgte die Überprüfung der Expression der transfizierten Konstrukte in den Lysatfraktionen vor der Präzipitation (Lysat). Ein Anstieg der ADAM10 Expression nach Transfektion von hADAM10-Flag₃ war jedoch nur in einem der Experimente (Abb. 3.3.13. B) deutlich sichtbar, in zweiten Experiment dagegen schwächer. Der Anstieg betraf zudem vorrangig die Proform (ca. 100 kDa), während die Signalintensität der maturen Form (ca. 70 kDa) nahezu unverändert war. Die Überexpression von MAP3K7 wurde in den entsprechenden Proben erfolgreich über den *myc-tag* nachgewiesen. Auch in diesem Experiment zeigte sich wieder ansatzweise die bereits angesprochene Steigerung der Expression von ADAM10 und dem potentiellen Interaktor nach einer Transfektion beider Konstrukte (Abb. 3.3.13. B, Spur 6; Vergleiche Abschnitt 3.3.2.1., Abb. 3.3.3.).

Die Immunpräzipitation mit dem ADAM10-Antikörper ermöglichte eine effektive Präzipitation der Pro- und der muren Form von ADAM10 in allen Antikörper-versetzten Proben (Abb. 3.3.13. A, Immunpräzipitation). Die ADAM10-Proform (ca. 100 kDa) war im Präzipitat wie auch schon im Lysat stärker nachweisbar als die mature Form. Die Überprüfung der Kopräzipitation von hMAP3K7-myc erfolgte über den *myc-tag* und zeigte eine deutliche Anreicherung nach der Koexpression von ADAM10 und MAP3K7 (Spur 6). Zudem ist ein sehr schwaches Signal für MAP3K7 nach Kopräzipitation mit endogenem ADAM10 sichtbar (Spur 4). Unspezifische Bindungen der Kinase an die *Beads* wurden über einen Antikörper-freien Präzipitationsansatz ausgeschlossen (Spur 5).

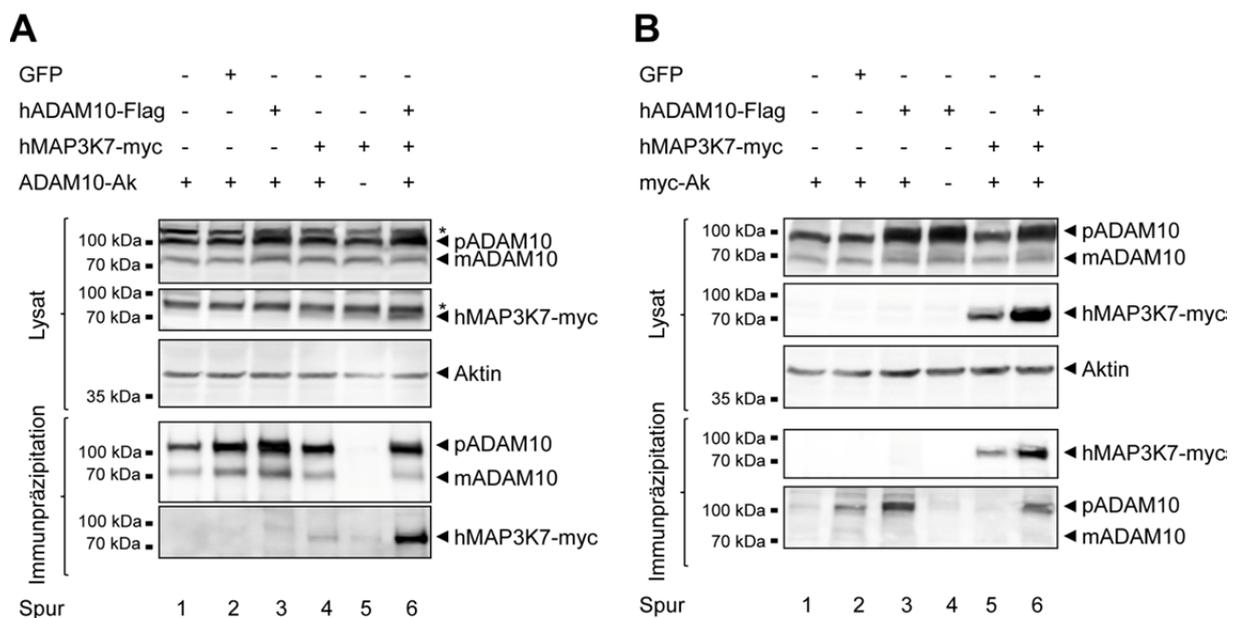


Abb. 3.3.13. Immunpräzipitation von ADAM10 und MAP3K7.

(A-B) HeLa Zellen wurden einzeln oder mit beiden Konstrukten (hADAM10-Flag₃ bzw. hMAP3K7-myc) transfiziert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit einem ADAM10-spezifischen Antikörper (A) bzw. einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper (B) durchgeführt (n = 2). Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde über die Lysate im Western Blot mittels ADAM10- und myc-spezifischem Antikörper nachgewiesen. Mit den gleichen Antikörpern erfolgte die Untersuchung des Präzipitats auf die entsprechenden Proteine. Als Kontrolle der Spezifität der Präzipitation dienten eine Antikörper-freie Probe und eine GFP-transfizierte Probe. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, * = unspezifisches Signal.

Im zweiten Koimmunpräzipitationsexperiment wurde hMAP3K7-myc über den *myc-tag* präzipitiert (Abb. 3.3.13. B) und konnte über diesen in den entsprechenden Proben (Präzipitat, Spur 5 und 6) nachgewiesen werden. Die Detektion von ADAM10 im Präzipitat lieferte nur ein Signal auf Höhe der katalytisch inaktiven Proform (ca. 100 kDa). Dieses war in der Doppeltransfektion deutlich sichtbar (Spur 6). Eine

eindeutige Aussage über eine Interaktion ist für dieses zweite Experiment jedoch nicht möglich. Für die spezifische Bindung an MAP3K7 spricht die Abwesenheit von ADAM10 in der Antikörper-freien Präzipitation (Spur 4) und in zwei weiteren Proben (Spur 1 und 5). Jedoch waren deutliche Signale für die ADAM10-Proform in den Spuren 2 und 3 sichtbar, ohne parallele Expression von hMAP3K7-myc. Matures ADAM10 konnte in keiner der Präzipitationsfraktionen nachgewiesen werden. Zusammenfassend genügen die Ergebnisse der beiden Koimmunpräzitationen nicht, eine eindeutige Aussage über die Interaktion von ADAM10 mit MAP3K7 zu treffen.

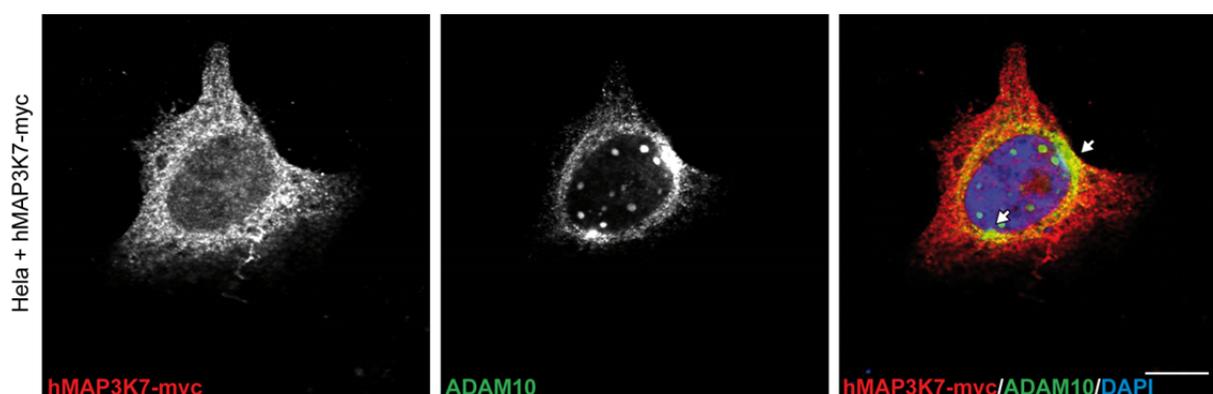


Abb. 3.3.14. Kolokalisation von ADAM10 und MAP3K7 in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit hMAP3K7-myc transfiziert und anschließend einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen, um auf einen möglichen Kontakt beider Proteine in der Zelle zu überprüfen. hMAP3K7-myc wurde über einen myc-spezifischen Antikörper (rot) gefärbt, ADAM10 mit einem ADAM10-spezifischen Antikörper (grün). Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. Eine Kolokalisation der Proteine ist als gelbes Signal sichtbar (Pfeil). Maßstabsbalken = 10 μ m.

Daher wurde mittels einer Immunfluoreszenzanalyse überprüft, ob eine Interaktion beider Proteine aufgrund der Lokalisation in der Zelle theoretisch möglich ist (Abb. 3.3.14.). Eine Färbung gegen den myc-tag ermöglichte den Nachweis einer deutlichen Expression von hMAP3K7-myc in HeLa-Zellen nach Überexpression. Die Färbung von Vektor-transfizierten Zellen diente als Negativkontrolle für den gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper (Daten nicht gezeigt). Obwohl MAP3K7 anhand einer subzellulären Fraktionierung von Jiang *et al.* hauptsächlich als zytosolisch lokalisiert beschrieben wurde, wurde das Protein auch in der Membranfraktion nachgewiesen. Die Präsenz des Proteins in der Membranfraktion wurde dabei einer vorübergehenden Assoziation zur Zellmembranproteinen zugeschrieben [Jiang *et al.*, 2002]. Tatsächlich konnte das überexprimierte hMAP3K7-myc als eine netzartige Färbung über die gesamte Zelle verteilt

nachgewiesen werden, die auf eine Lokalisation an der ER-Membran hindeutet (Abb. 3.3.14.). Die Immunfluoreszenz zeigte weiterhin ein kolokalisierendes Signal für endogen exprimiertes ADAM10 und hMAP3K7-myc besonders in unmittelbarer Umgebung zum Zellkern. Somit ist eine direkte Interaktion von ADAM10 und MAP3K7 aufgrund der subzellulären Lokalisation der Proteine möglich. Insbesondere aufgrund des Färbemusters von MAP3K7 ist eine mögliche Interaktion mit ADAM10 am ER naheliegend. Übereinstimmend dazu wurde in der Immunpräzipitation nur die ER-residente Proform von ADAM10 mit hMAP3K7-myc kopräzipitiert (Abb. 3.3.13. B).

Eine potentielle Interaktion von MAP3K7 mit der ER-residenten Form von ADAM10 bietet die Möglichkeit der Regulation des sekretorischen Transportes von ADAM10. Aus diesem Grund wurde die Kolokalisation von ADAM10 mit einem ER-Marker (KDEL) aber auch anderen Markern subzellulärer Kompartimente (Daten nicht gezeigt) unter verschiedenen MAP3K7-Expressionsleveln mittels Immunfluoreszenz visualisiert (Abb. 3.3.16). Hierbei wurde HeLa-Zellen sowohl nach Überexpression von MAP3K7, als auch nach siRNA-vermitteltem Knockdown von MAP3K7 analysiert. Die Überexpression von MAP3K7 wurde durch parallele Anfärbung der Kinase über den *myc-tag* nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Da der Nachweis von endogenem MAP3K7 in der Immunfluoreszenz über einen MAP3K7-spezifischen Antikörper nicht möglich war, wurde die Effektivität der siRNA in einem unabhängigen Experiment im Western Blot nachgewiesen (Abb. 3.3.15.). Hier wurde eine deutliche Reduktion der MAP3K7-Proteinmenge nach siRNA-Behandlung nachgewiesen, die auch in späteren Experimenten auf mRNA- und Proteinebene bestätigt werden konnte.

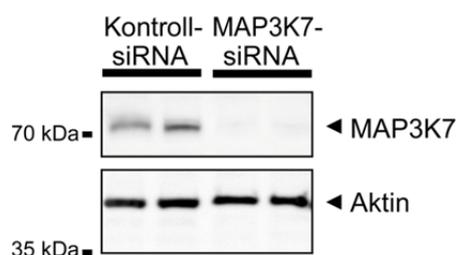


Abb. 3.3.15. Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von MAP3K7 in HeLa-Zellen. Mangels eines funktionellen MAP3K7-spezifischen Antikörpers für Immunfluoreszenzanalysen wurde die Effizienz der MAP3K7-siRNA in HeLa-Zellen im Western Blot überprüft. MAP3K7 wurde über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen, Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Kofärbung zwischen ADAM10 und dem ER-Marker KDEL zeigten jeweils eine starke Überlagerung der angefärbten Regionen (Abb. 3.3.16., Vergleich der Einzelkanalbilder I-III). Die Signalintensität von ADAM10 und KDEL untereinander dagegen war unter den verschiedenen MAP3K7-Expressionsbedingungen deutlich verschieden. Der MAP3K7-Knockdown zeigte eine vergleichsweise dominante ADAM10-Färbung (I). Steigende Mengen an MAP3K7 dagegen führten zu einer

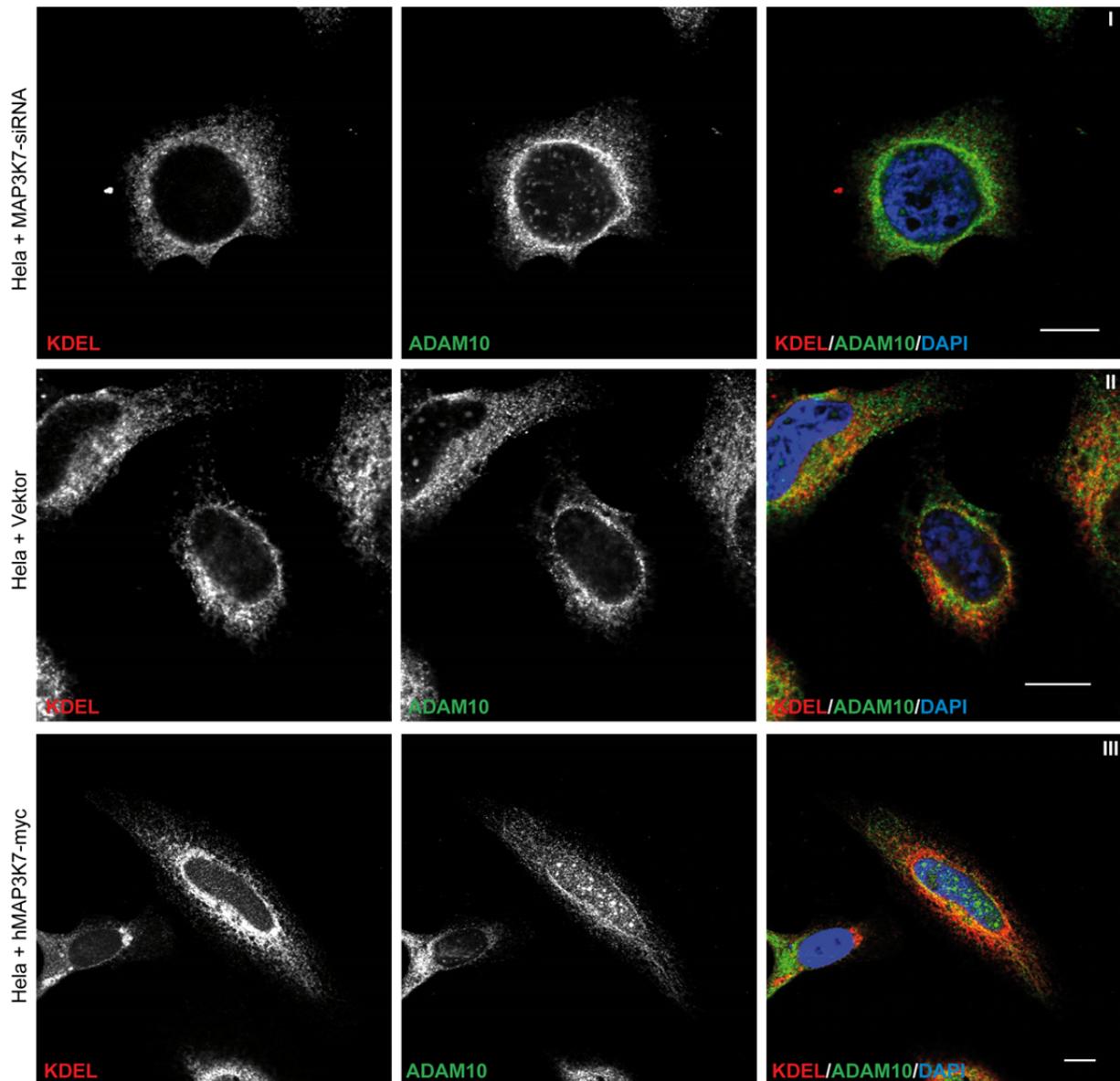


Abb. 3.3.16. hMAP3K7-Abhängigkeit der ADAM10-Reifung in der Immunfluoreszenz.

HeLa-Zellen wurden mit MAP3K7-siRNA behandelt oder mit Vektor bzw. hMAP3K7-myc transfiziert, um verschiedene Grade der MAP3K7-Expression einzustellen. Anschließend wurden die Zellen für Immunfluoreszenzanalysen gegen ADAM10 (grün) und den ER-Marker KDEL (rot) gefärbt. Abhängig vom Expressionslevel von MAP3K7 konnten Unterschiede hinsichtlich der Dominanz der ADAM10-Färbung im Vergleich zum ER-Marker detektiert werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Aufnahmen wurden die Aufnahmebedingungen komplett identisch gehalten. Maßstabsbalken = 10 μ m.

Reduktion des ADAM10-Signals relativ zum KDEL-Signal (II-III). Nach hMAP3K7-myc-Überexpression dominierte entsprechend das KDEL-Signal (III). Der deutlichste Effekt im Vergleich zum Grundzustand (Vektor) war im siRNA-vermittelten Knockdown von MAP3K7 sichtbar, in dem der ER-lokalisierte ADAM10-Anteil im Vergleich zur endogenen MAP3K7-Expression deutlich erhöht vorlag.

3.3.3.2. Untersuchung des Effektes der MAP3K7-Defizienz auf ADAM10

Die Immunfluoreszenzanalyse deutete auf die Zunahme von ADAM10 im ER unter MAP3K7-Defizienz, welche potentiell zwei Ursachen haben kann. Zum einen könnte ein transkriptioneller Effekt zu einer Expressionssteigerung von *Adam10* führen, die sich zuerst als Zunahme von ADAM10 im ER äußert. Zum anderen könnte eine Regulation des Transportes der Protease aus dem ER vorliegen.

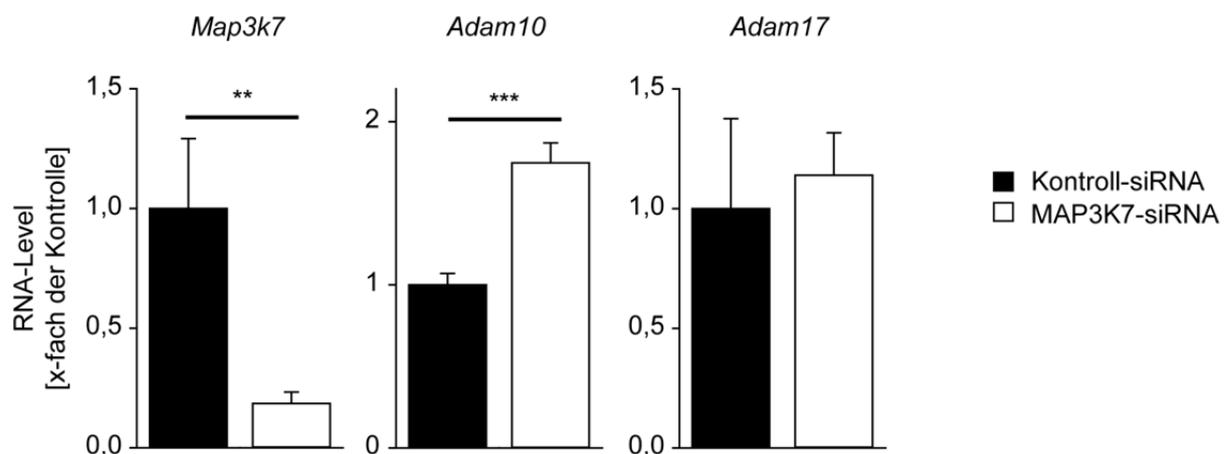


Abb. 3.3.17. Einfluss der MAP3K7-Reduktion auf die *Adam10*-Expression.

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. MAP3K7-siRNA behandelt (4-6 technische Replikate) und anschließend eine qRT-PCR gegen die *Adam10*-mRNA durchgeführt. Die Effektivität der siRNA wurde mittels einer qRT-PCR gegen *Map3k7* überprüft. *Adam17* diente als Kontrolle der Spezifität des Effektes. Die Werte wurden auf GAPDH normiert und als Vielfaches der Kontroll-siRNA behandelten Proben abgetragen. Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Da MAP3K7 die Initiator kinase verschiedener Kinasekaskaden ist, ist eine Steigerung der ADAM10-ER-Expression durch Regulation der *Adam10*-Expression über einen Kinase-aktivierten Transkriptionsfaktor denkbar [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Fanger *et al.*, 1997]. Zur Überprüfung der Transkriptionsregulation wurde MAP3K7 mittels siRNA in HeLa-Zellen herunterreguliert und die mRNA der Proben

mittels qRT-PCR analysiert. Diese zeigte eine signifikante Reduktion der *Map3k7*-mRNA auf etwa 16 % des ursprünglichen Levels (Abb. 3.3.17.). Für die *Adam10*-mRNA wurde ein signifikanter Anstieg auf fast das Doppelte nach MAP3K7-Knockdown nachgewiesen. Zur Überprüfung der Spezifität der transkriptionellen Regulation für ADAM10 wurde zusätzlich die mRNA-Expression von *Adam17* überprüft. Diese zeigten jedoch keine Unterschiede des mRNA-Levels nach MAP3K7-Knockdown. Damit könnte MAP3K7 durch Initiation einer Kinasekaskade zur Unterdrückung der ADAM10-Expression beitragen. Entsprechend würde die Defizienz der Kinase umgekehrt zur Steigerung der ADAM10-Expression führen.

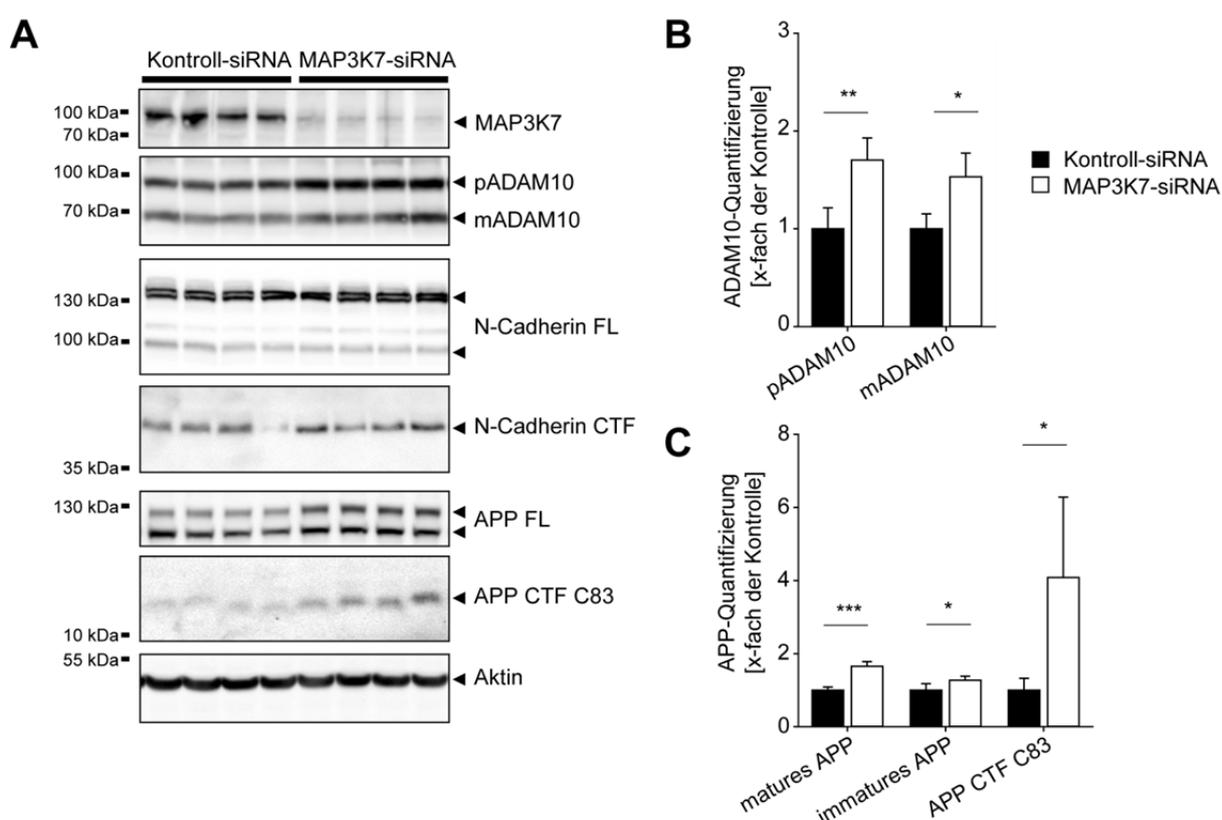


Abb. 3.3.18. Einfluss der MAP3K7-Reduktion auf die ADAM10-Reifung und -Aktivität.

(A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. MAP3K7-siRNA behandelt und gegen ADAM10 und dessen Substrate APP und N-Cadherin geblottet. Der Nachweis der Reduktion von MAP3K7 erfolgte über einen MAP3K7-spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente Aktin. (B-C) Die einzelnen ADAM10- bzw. APP-Signale aus dem Western Blot wurden anschließend quantifiziert. Hierzu wurden die jeweiligen Signalintensitäten auf Aktin normalisiert und als Vielfaches der Kontroll-siRNA-behandelten Proben abgetragen. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, FL = Volllänge (ca. 130 kDa = matures APP, ca. 100 kDa = immatures APP), CTF = C-terminales Fragment.

Zur weiteren Überprüfung einer Regulation der ADAM10-Transkription durch MAP3K7 wurden Western Blot Analysen der siRNA-behandelten Proben durchgeführt und die Expression von MAP3K7 und ADAM10 überprüft (Abb. 3.3.18.).

Auch hier konnte eine deutliche Reduktion von MAP3K7 detektiert werden (Abb. 3.3.18. A). Die ADAM10-Proform unterlag einem signifikanten Anstieg, wenn MAP3K7 schwächer exprimiert wurde (Abb. 3.3.18. A-B). Diese Beobachtungen decken sich somit mit der gesteigerten ER-Lokalisation von ADAM10 in den Immunfluoreszenzanalysen als auch mit der gesteigerten mRNA-Expression nach MAP3K7-Knockdown (Abb. 3.3.16, Abb. 3.3.17.). Die mature Form von ADAM10 (ca. 70 kDa) konnte infolge des MAP3K7-Knockdowns ebenfalls erhöht nachgewiesen werden (Abb. 3.3.18. A-B).

Da ADAM10 infolge des siRNA-vermittelten Knockdowns von MAP3K7 verstärkt exprimiert wurde, wurde auch die proteolytische Prozessierung der klassischen ADAM10-Substrate N-Cadherin, APP und Notch untersucht. Hinsichtlich N-Cadherin zeigte die Reduktion von MAP3K7 keine Effekte auf die ADAM10-vermittelte Proteolyse (Abb. 3.3.18. A). Die Signalintensitäten der Vollängenformen und des C-terminalen Fragmentes (CTF) waren unter Kontroll- und MAP3K7-siRNA-Behandlung gleich. Die Proteolyse von APP dagegen zeigte eine Erhöhung der maturaen Vollängenform (ca. 130 kDa) auf etwa das 1,7-fache nach MAP3K7-Knockdown, während die immature Vollängenform nur leicht erhöht vorlag (Abb. 3.3.18. A, C). Zusätzlich konnte nach MAP3K7-Knockdown ein Anstieg des ADAM10-Proteolyseproduktes APP CTF C83 auf das 4-fache des Kontrollniveaus gezeigt werden.

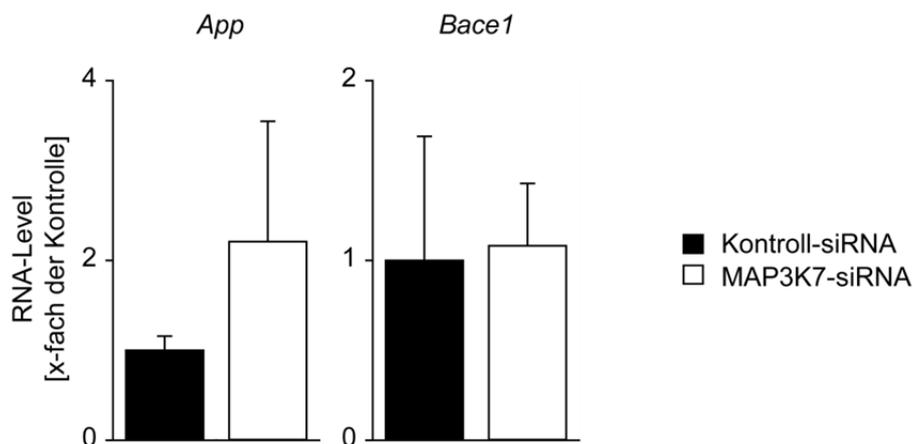


Abb. 3.3.19. Transkriptioneller Einfluss der MAP3K7-Reduktion auf APP und Bace1.

Eine qRT-PCR gegen *App* und *Bace1* diente der Überprüfung MAP3K7-vermittelter transkriptioneller Einflüsse auf die Expression von APP oder der APP-Protease Bace1 (4-6 technische Replikate). Hierzu wurden die Proben aus Abb. 3.3.17. verwendet. Die Werte wurden auf GAPDH normiert und als Vielfaches der Kontroll-siRNA behandelten Proben abgetragen.

Ein Widerspruch hierbei war, dass sowohl matures APP als auch das APP CTF C83 erhöht nachgewiesen wurden, eine verstärkte Proteolyse zum APP CTF C83 durch ADAM10 allerdings eine Abnahme des matures APP bedingen würde. Daher wurde eine qRT-PCR gegen *App* durchgeführt, um zu überprüfen, ob zusätzlich dessen mRNA-Expression verändert vorliegt (Abb. 3.3.19.). Hier zeigte sich eine Tendenz zur Zunahme des *App*-mRNA-Levels nach MAP3K7-Knockdown, welche aber keine statistische Signifikanz erreichte. Weiterhin wurde überprüft, ob neben ADAM10 noch weitere APP-prozessierende Proteine einer transkriptionellen Regulation unterliegen, welche eine verstärkte APP-Proteolyse verursachen könnten. Aus diesem Grund wurde auch das mRNA-Level der APP- β -Sekretase *Bace1* überprüft (Abb. 3.3.19.). Diese unterlag jedoch keinen Transkriptionsänderungen. Zusammenfassend geben die Experimente einen Hinweis darauf, dass ein MAP3K7-Knockdown die Expression von sowohl *Adam10* als auch *App* steigern könnte. Auf diese Weise könnte die nicht-amyloidogenen APP-Proteolyse zum APP CTF C83 begünstigt sein, da parallel kein Anstieg der Expression der β -Sekretase *Bace1* gezeigt werden konnte.

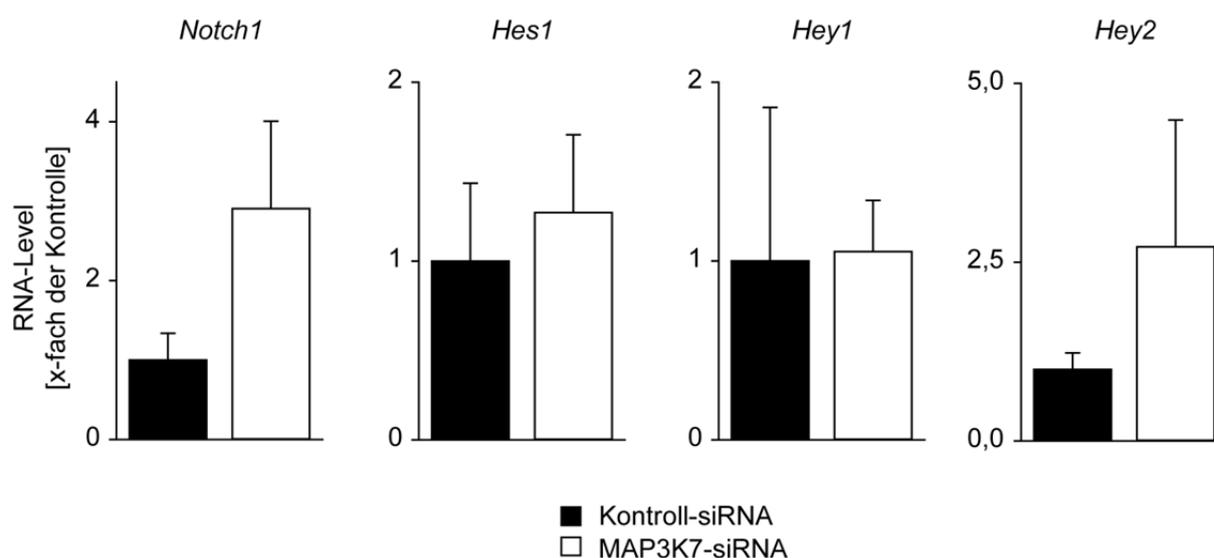


Abb. 3.3.20. Beeinflussung des Notch-Signalweges durch MAP3K7-Reduktion.

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. MAP3K7-siRNA behandelt (4-6 technische Replikate) und anschließend eine qRT-PCR gegen Komponenten des ADAM10-abhängigen Notch-Signalweges durchgeführt. Hierzu wurden die Proben aus Abb. 3.3.17. verwendet. Die Werte wurden auf GAPDH normiert und als Vielfaches der Kontroll-siRNA behandelten Proben abgetragen.

Die Analyse der Proteolyse des Notch-Rezeptor als ADAM10-Substrat erfolgte anhand von dessen responsiven Genen mittels qRT-PCR (Abb. 3.3.20.). Dabei zeigte sich die Tendenz zu einer verstärkten Expression des *Notch1*-mRNA nach

MAP3K7-Knockdown. Jedoch kann darüber nicht unterschieden werden, ob dies durch transkriptionelle Effekte der Kinase-Kaskade, oder autoregulatorisch durch verstärkte Notch1-Aktivität hervorgerufen wird [Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009]. Die Analyse der Notch-responsiven Gene zeigte keine Unterschiede hinsichtlich *Hes1* und *Hey1*. *Hey2* dagegen zeigte eine leichte Tendenz zur erhöhten Expression. Da jedoch keine signifikanten Effekte gefunden werden konnten, ist fraglich, ob die Notch-Proteolyse durch MAP3K7 beeinflusst werden kann. Eine Beeinflussung der *Notch1*-Expression ist allerdings unter der gegebenen Datenlage nicht auszuschließen.

3.3.3.3. Untersuchung des Effektes einer MAP3K7-Inhibitor auf ADAM10

In weiterführenden Experimenten sollte der Einfluss von MAP3K7 auf ADAM10 unter Überexpression der Kinase untersucht werden. Hierzu war es jedoch nötig, einen geeigneten Reporter der MAP3K7-Aktivität zu identifizieren, um auch die Funktionalität der Kinase nach ihrer Überexpression zu belegen. Aus diesem Grund wurden HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit dem MAP3K7-spezifischen Inhibitor Celastrol behandelt (Abb. 3.3.21.) [Sethi *et al.*, 2007]. Als mögliche Reporter-Kandidaten wurde die Phosphorylierung von p65, einer Komponente des NF κ B-Signalweges, sowie von p38, welches vor allem Stress-abhängig durch MAP3K7 phosphoryliert wird, untersucht [Sakurai *et al.*, 2003; Sethi *et al.*, 2007; Moriguchi *et al.*, 1996a].

Die Inhibition von MAP3K7 führte zu keinen offensichtlichen Veränderungen der Phosphorylierung von p38 im Vergleich zu DMSO behandelten HeLa-Zellen (pp38). Die Gesamtexpression von p38 blieb ebenfalls unverändert. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ist dieser Reporter somit ungeeignet. Die Phosphorylierung von p65 dagegen lag in Gegenwart des Inhibitors stark reduziert vor (pp65), obwohl die Totalexpression von p65 keine Unterschiede aufwies. Auf diese Weise konnte sowohl die Funktionalität des Inhibitors nachgewiesen werden, als auch ein geeigneter Reporter für die Überprüfung der MAP3K7-Aktivität in späteren Experimenten unter Überexpression der Kinase identifiziert werden. Weiterhin wurde durch Färbung von ADAM10 überprüft, ob der Expressionseffekt

von der MAP3K7-Aktivität abhängig ist. Tatsächlich führte die Inhibition von MAP3K7 ebenso zur Zunahme der ADAM10-Proform (ca. 100 kDa) wie auch der siRNA-vermittelte Knockdown von MAP3K7. Ein offensichtlicher Effekt auf matures ADAM10 war jedoch nicht detektierbar. Die Proteolyse des ADAM10-Substrates APP unter Generierung des APP CTF zeigte nach 24-stündiger Behandlung mit dem MAP3K7-Inhibitor ebenfalls keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

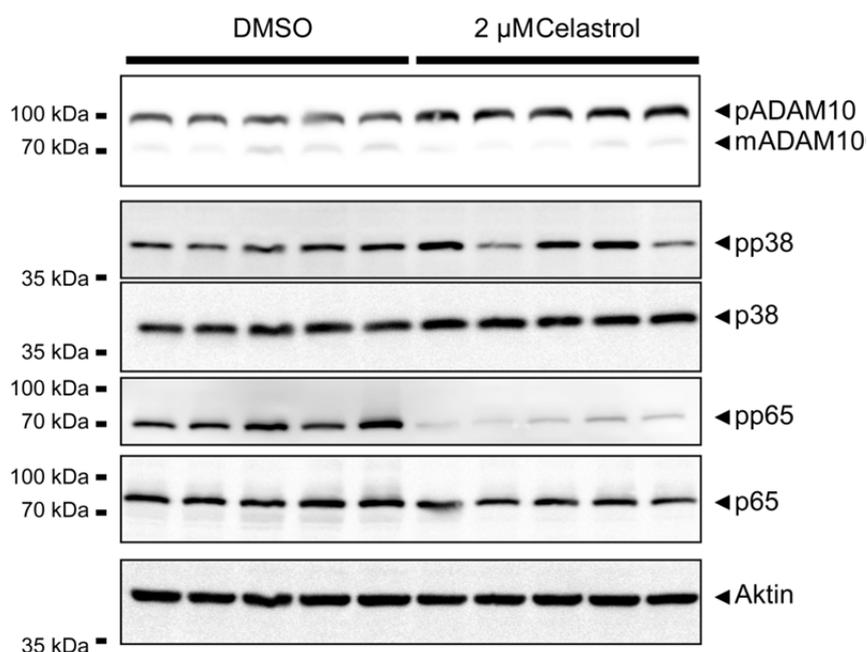


Abb. 3.3.21. Beeinflussung von ADAM10 durch die Inhibition von MAP3K7.

HeLa-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h mit 2 μ M Celastrol bzw. der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Potentielle Reporter der MAP3K7-Aktivität (p38, p65) wurden auf deren Phosphorylierung überprüft. Zusätzlich wurde ADAM10 angefärbt, um eine Beeinflussung der Expression durch die Aktivität von MAP3K7 zu untersuchen. Als Ladekontrolle diente Aktin. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10.

3.3.3.4. Untersuchung des Effektes der MAP3K7-Überexpression auf ADAM10

Die vorangegangenen Untersuchungen der Bedeutung von MAP3K7 für ADAM10 beruhten auf Experimenten, die die Aktivität der Kinase reduzieren. Zur Absicherung der beobachteten Effekte, wurden diese erneut nach Überexpression von MAP3K7 überprüft.

Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Vektor, GFP oder hMAP3K7-myc transfiziert und die Beeinflussung der Expression und der Aktivität von ADAM10 überprüft (Abb. 3.3.22.). Die erfolgreiche Überexpression von MAP3K7 konnte im Western Blot über den myc-

tag nachgewiesen werden. Die Überexpression des Kontrollproteins GFP war ebenfalls detektierbar. Anschließend wurde die Intensität der verschiedenen ADAM10-spezifischen Signale überprüft. Während die Inhibition der MAP3K7-Aktivität eine Steigerung der ADAM10-Expression vermittelte, führte die Überexpression von hMAP3K7-myc zu keinen Veränderungen der Intensitäten der einzelnen ADAM10-spezifischen Signale (Abb. 3.3.22.). Die Experimente nach Überexpression von MAP3K7 konnten damit die beobachtete Beeinflussung der Transkription von ADAM10 nach siRNA-vermittelter MAP3K7-Reduktion nicht bestätigen.

Dennoch wurde einer möglichen Beeinflussung der Aktivität von ADAM10 durch eine direkte Interaktion mit MAP3K7 nachgegangen. Da der HEK-Screen und die Koimmunpräzipitationen auf eine direkte Interaktion hinwiesen, ist eine Aktivitäts-regulierende direkte Phosphorylierung des ADAM10 C-Terminus denkbar. Eine solche Regulation wurde beispielsweise schon für die Proteinkinase C ϵ -abhängige Phosphorylierung von ADAM17 gezeigt [Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2011]. Die ADAM10-Aktivität wurde anhand der Proteolyse der Substrate N-Cadherin und APP beurteilt (Abb. 3.3.22.). N-Cadherin zeigte unter allen Bedingungen die gleiche Intensität der beiden Vollängenformen. Das N-Cadherin CTF dagegen war in den Vektor-transfizierten Kontrollproben etwas stärker exprimiert als in allen anderen. Die GFP-exprimierende Kontrollprobe zeigte wiederum die gleiche N-Cadherin CTF-Menge wie die hMAP3K7-myc exprimierende Probe. Daher scheint hier kein spezifischer Effekt auf die Proteolyse von N-Cadherin vorzuliegen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den siRNA-Experimenten, in denen auch kein Einfluss auf N-Cadherin gezeigt werden konnte.

Während der MAP3K7-Knockdown die Expression und Proteolyse von APP beeinflussen konnte, waren diese Effekte nach der Überexpression von MAP3K7 nicht sichtbar. Sowohl die beiden Vollängen Formen von APP, als auch das APP CTF C83 unterlagen zwischen den verschiedenen Proben keinen Änderungen. Damit lieferte die Überexpression weder Hinweise auf eine transkriptionelle Regulation von APP noch auf eine Beeinflussung der APP-Proteolyse. Da die Inhibitor-gestützten Experimente zeigten, dass die Effekte mindestens zum Teil von der Aktivität der Kinase abhängig waren, wurde deren Aktivität nach Überexpression überprüft.

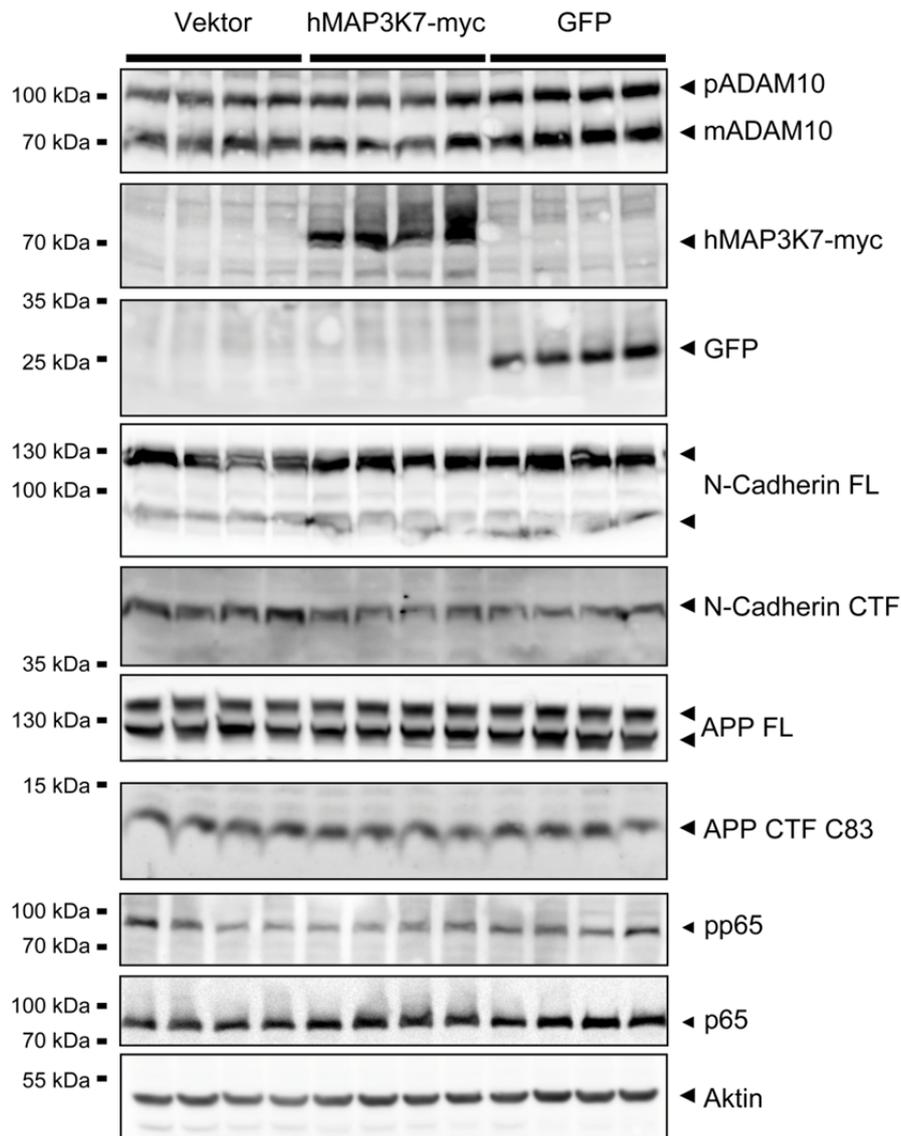


Abb. 3.3.22. Einfluss der MAP3K7-Überexpression auf die ADAM10-Reifung und -Aktivität.

HeLa-Zellen wurden mit Vektor, hMAP3K7-myc oder GFP transfiziert und die Lysate anschließend gegen ADAM10, APP und N-Cadherin geblottet (n = 2-4). Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde über einen myc-spezifischen bzw. einen GFP-spezifischen Antikörper überprüft. GFP diente als Kontrolle für eine generelle Proteinüberexpression. Zur Überprüfung der MAP3K7-Aktivität wurde die zuvor gezeigte Phosphorylierung von p65 verfolgt. Als Ladekontrolle diente Aktin. pADAM10 = ADAM10-Proform, mADAM10 = matures ADAM10, FL = Volllänge, CTF = C-terminales Fragment.

Hierzu wurde die Phosphorylierung von p65 überprüft, welche in den vorangegangenen Experimenten als geeigneter Reporter der MAP3K7-Aktivität nachgewiesen wurde. Tatsächlich zeigte sich trotz Überexpression der Kinase keine Zunahme der phosphorylierten p65 Spezies (pp65) in Relation zum totalen p65-Protein (p65). Somit konnte unter den gewählten Bedingungen keine Zunahme der MAP3K7-Aktivität nach Überexpression nachgewiesen werden, was möglicherweise das Ausbleiben der vorher beschriebenen Effekte auf ADAM10 und APP erklärt.



4. Diskussion

ADAM10 vermittelt die Proteolyse wichtiger Oberflächenmoleküle wie Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, dem amyloiden Vorläuferprotein und dem Notch-Rezeptor [Maretzky *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2005; Hundhausen *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2004; Lammich *et al.*, 1999; van Tetering *et al.*, 2009]. Die möglichen Auswirkungen auf die Zellen verschiedener Gewebe sind damit vielfältig und bislang in *in vivo*-Modellen nur zum Teil beschrieben [Jorissen *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2011; Yoda *et al.*, 2011; Prox *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014].

4.1. Untersuchungen zur Rolle von ADAM10 in der Niere

Die Klärung der Bedeutung von ADAM10 für die Niere ist interessant, da verschiedene ADAM10-Substrate die Eigenschaften des Podozyten als Teil der Filtrationsbarriere bestimmen. Zum einen bilden die Podozyten über ein kompliziertes Netzwerk von Adhäsionsmolekülen die Schlitzmembran, welche zur Filtrationsleistung und zur Barrierefunktion der Niere beiträgt [Putala *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Rodewald und Karnovsky, 1974]. Zum anderen reguliert ADAM10 auch die Aktivität des Wnt- und Notch-Signalweges [Reiss *et al.*, 2005; van Tetering *et al.*, 2009]. Eine Hyperaktivierung des Wnt- bzw. des Notch-Signalweges in Podozyten kann dann zur Entstehung einer Nephritis beitragen [Kato *et al.*, 2011; Niranjan *et al.*, 2008].

4.1.1. Die Funktionsfähigkeit der Podozyten ist von einer ADAM10-Defizienz unbeeinträchtigt

Viele der bisher untersuchten Mausmodelle zeigten Entwicklungsstörungen aufgrund der Deregulation des Notch-Signalweges unter ADAM10-Defizienz [Hartmann *et al.*, 2002; Jorissen *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2011]. Der zur ADAM10-Deletion verwendete Podocin-Promotor ist ab dem Embryonaltag 8,5 als aktiv beschrieben, weswegen die ADAM10-Knockout Tiere hinsichtlich der Entwicklung einer funktionellen Filtrationsbarriere untersucht wurden [Moeller *et al.*, 2003]. Die

Darstellung der Schlitzmembran über Podozyten-Markerproteine und die ultrastrukturelle Untersuchung der Podozytenmorphologie zeigten jedoch keine offensichtlichen Anomalitäten der Podozytenentwicklung unter ADAM10-Defizienz. Die Bestimmung des Proteingehalt im Urin als Kriterium der Funktionalität der gebildeten Filtrationsbarriere [Ruotsalainen *et al.*, 1999; Tryggvason, 1999; Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011] war ebenfalls unauffällig. Zusammenfassend ist die Entwicklung funktioneller Podozyten unter ADAM10-Defizienz normal.

Da die Filtrationsbarriere funktionsfähig war, konnte die ADAM10-Defizienz auch als Auslöser einer Nephritis während der Entwicklung ausgeschlossen werden. Langfristig geht eine Nephritis mit Flüssigkeitseinlagerungen im Gewebe einher [Assmann *et al.*, 1985; Gluck und Nolph, 1987], weswegen das Körpergewicht der Mäuse über den Zeitraum von einem halben Jahr verfolgt wurde. Jedoch wurden keine Abweichungen des Körpergewichtes zwischen ADAM10-Knockout- und Kontrolltieren detektiert. Die Integrität und Funktionalität der Filtrationsbarriere unter ADAM10-Defizienz in Podozyten erscheint demnach auch langfristig gegeben.

4.1.2. Eine ADAM10-Defizienz wirkt protektiv auf das nephrotische Syndrom

Die Untersuchung ADAM10-defizienter Mäuse zeigte eine normale Entwicklung der Podozyten und keine Hinweise auf eine intrinsisch bedingte Schädigung der Filtrationsbarriere. Da jedoch z. B. eine Aktivierung des Notch-Signalweges zur Schädigung der Filtrationsbarriere führt, wurde der Beitrag der Notch-Protease ADAM10 zur Entstehung einer Nephritis untersucht [Niranjan *et al.*, 2008]. Hierzu wurde das anti-Podozyten Nephritis Schadensmodell (APN-Modell) verwendet [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Über die Applikation von Antikörpern gegen Podozytenantigene im APN-Modell bilden sich subepitheliale Immunkomplexe aus und induzieren eine Schädigung der Podozyten.

Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Podozytenmarker in Wildtyp-Tieren bestätigte die erfolgreiche Schädigung der Schlitzmembran über das verwendete APN-Modell. Interessanterweise zeigte die Immunfluoreszenzanalyse parallel eine verstärkte

ADAM10-Färbung in den Podozyten, was auf die Beteiligung der Protease an der Induktion der Nephritis hindeuten könnte.

Die Injektion des APN-Antikörpers in Kontrolltiere der ADAM10-Knockoutlinie bewirkte ultrastrukturell das von Shirato *et al.* beschriebene *foot process effacement* der Podozyten [Shirato *et al.*, 1996]. Über eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Podozytenmarker wurden Schäden der Schlitzmembran nachgewiesen. Übereinstimmend mit Beobachtungen aus Experimenten unter nephrotischem Milieu von Coward *et al.* konnte die Endozytose des Schlitzmembranproteins Nephrins detektiert werden [Coward *et al.*, 2005]. Parallel zu den morphologischen Veränderungen der Podozyten bestätigte ein rascher Anstieg der Proteinmenge im Urin der Kontrolltiere eine funktionelle Schädigung der Filtrationsbarriere nach APN-Antikörper-Behandlung.

Die Defizienz von ADAM10 in Podozyten wirkte dagegen protektiv auf die morphologischen Veränderungen der Podozyten und die Schädigung der Schlitzmembran. Jedoch wurde auch in den ADAM10-defizienten Tieren eine Zunahme der Proteinurie nachgewiesen. Diese trat im Vergleich zu den Kontrolltieren verzögert ein und war etwas schwächer ausgeprägt.

Möglicherweise aktiviert der polyklonale APN-Antikörper neben ADAM10 weitere Proteasen an der Zelloberfläche. Analysen im Heymann-Nephritis-Modell lieferten Hinweise auf eine gesteigerte Expression der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9) nach einer Podozytenschädigung [McMillan *et al.*, 1996]. Eine Überexpression von MMP9 in kultivierten Podozyten durch Li *et al.* führte zur Dedifferenzierung von Podozyten unter Verlust der Nephrin-Expression [Li *et al.*, 2014]. ADAM10-defiziente Mäuse zeigten im APN-Modell jedoch keine morphologische Veränderung der Podozyten und auch eine Nephrin-Färbung unter ADAM10-Defizienz war unauffällig. Daher scheint im APN-Modell keine MMP9-abhängige Dedifferenzierung der Podozyten vorzuliegen. Jedoch wurde auch eine MMP9-vermittelte Proteolyse von Adhäsionsmolekülen wie den Cadherinen in verschiedenen Zell- und Mausmodellen nachgewiesen [Dwivedi *et al.*, 2009; Symowicz *et al.*, 2007; Shichi *et al.*, 2011]. Somit könnte eine MMP9-Aktivierung im APN-Modell möglicherweise die Proteolyse von Schlitzmembranproteinen der Cadherin-Familie, wie P-Cadherin und Fat1, vermitteln. Leisten die Cadherine nur einen vergleichsweise geringen Beitrag zur Integrität der Schlitzmembran, ist die Podozytenmorphologie von der MMP9-

Aktivierung möglicherweise unbeeinflusst. Dennoch könnten leichte Schädigungen der Schlitzmembran auftreten und zur Entwicklung der Proteinurie unter ADAM10-Defizienz beitragen.

Zur besseren Bewertung des potentiell protektiven Effektes der ADAM10-Defizienz gegenüber der Schädigung der Podozyten müssen weitere klinische Parameter zur Beschreibung der glomerulären Filtration herangezogen werden, wie der Serumharnstoff-, -creatinin- und -cholesteringehalt [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Diese Parameter hängen jedoch stark vom genetischen Hintergrund ab, weswegen zu deren Charakterisierung eine Rückkreuzung auf einen reinen C57/BL6-Hintergrund initiiert wurde.

Die Analyse des ADAM10-Knockout Mausmodells legen nahe, dass ADAM10 wahrscheinlich an der Entstehung einer Nephritis beteiligt ist. Dabei wird ADAM10 vermutlich aufgrund eines pronephrotischen Stimulus wie der Behandlung mit dem APN-Antikörper aktiviert. Anschließend könnte die gesteigerte ADAM10-Expression und -Aktivität zur verstärkten Initiierung des Notch-Signalweges führen. Tatsächlich zeigten Niranjan *et al.*, dass die Überexpression der Notch intrazellulären Domäne (NICD) eine Schädigung der Podozyten auslöst [Niranjan *et al.*, 2008]. Eine weitere Möglichkeit der ADAM10-vermittelten Schädigung der Filtrationsbarriere ist eine direkte Schwächung der Schlitzmembran durch die Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls Nephrin. Auf diese Weise kann der Zell-Zell-Kontakt zwischen den Podozyten gebrochen werden, der der beobachteten Endozytose von Nephrin vorausgehen könnte. Tatsächlich war der Verlust des Oberflächen-exprimierten Nephrins durch Endozytose nach APN-Antikörper-Behandlung von der ADAM10-Expression abhängig. Diese Betrachtung impliziert eine große Bedeutung von Nephrin für den funktionsfähigen Podozyten, wie sie auch in Nephrin-defizienten Mäusen beschrieben wurde [Putala *et al.*, 2001].

Die begrenzten Probenmengen der isolierten Glomeruli schränken jedoch die Analysemöglichkeiten zur Unterscheidung der Ursache der Schädigung stark ein. Aus diesem Grund wurde die Analyse der molekularen Zusammenhänge der Schädigung in einem zellbasierten System durchgeführt.

4.1.3. Der APN-Antikörper vermittelt eine Schädigung von EPZ im zellbasierten Modell

Der APN-Antikörper induzierte eine Schädigung der Podozyten im Tiermodell und wurde daher auf seine Wirksamkeit in der Podozyten-ähnlichen EPZ-Zelllinie getestet [Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011]. Die Behandlung der EPZ mit steigenden Konzentrationen an APN-Antikörper zeigte mikroskopische Ähnlichkeiten zum *foot process effacement* der Podozyten. Die Zellform der EPZ war verändert und die Anzahl der Pseudopodien reduziert.

Analog zum Tiermodell wurde der Beitrag von ADAM10 zur Schädigung der EPZ beurteilt. Neben der morphologischen Beeinflussung der Podozyten bewirkte der APN-Antikörper eine Reduktion der Adhäsion der EPZ. Interessanterweise konnte die Zugabe des ADAM10-Inhibitor GI254023X die morphologischen Veränderungen abschwächen und das Adhäsionsverhalten nach APN-Antikörper-Behandlung verbessern. Das Zellmodell bestätigt somit die Beobachtungen aus dem Mausmodell, dass eine unterdrückte ADAM10-Aktivität die strukturelle Schädigung der Podozyten im APN-Modell abmildert. Zudem deutet der Adhäsionsassay auf den Beitrag der ADAM10-vermittelten Proteolyse von Adhäsionsmolekülen zur Schädigung der Filtrationsbarriere.

4.1.4. Die Morphologieveränderung der EPZ ist unabhängig vom Notch-Signalweg

Die Aktivierung des Notch-Signalweges wurde bereits als möglicher Initiator einer Nephritis identifiziert [Niranjan *et al.*, 2008], weswegen der Beitrag einer ADAM10-abhängigen Notch-Proteolyse zur Schädigung der EPZ untersucht wurde. Die Induktion einer Nephritis durch Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch führte im Modell von Niranjan *et al.* zur Zunahme der Expression beider Notch-Rezeptoren und der Notch-responsiven Gene *Hes1*, *Hes5* und *Hey1*.

Die APN-Antikörper-Behandlung der EPZ erhöhte die Transkription von *Notch1* und *Notch2*. Der Effekt war jedoch nicht eindeutig ADAM10-abhängig, da die Inhibition der Protease durch GI254023X den Anstieg nur teilweise unterdrücken konnte.

Zudem zeigte ausschließlich das Notch-responsive Gen *Hey1* einen Anstieg der Expression im zellbasierten Modell. Daher ist die beobachtete Schädigung der Podozyten im APN-Modell wahrscheinlich unabhängig von einer ADAM10-vermittelten Aktivierung des Notch-Signalweges.

Der Anstieg von *Hey1* nach APN-Antikörper Behandlung bedeutet möglicherweise aber, dass weitere Proteasen durch den APN-Antikörper aktiviert werden. In diesem Zusammenhang könnte erneut die Matrixmetalloprotease MMP9 von Bedeutung sein, aber auch MMP2. Beide MMPs sind an der proteolytischen Aktivierung von TGF β beteiligt, über das eine Notch-unabhängige Induktion der *Hey1*-Expression erfolgt [Yu und Stamenkovic, 2000; Zavadil *et al.*, 2004]. Ein Beitrag von TGF β zur Podozytenschädigung im APN-Modell erscheint außerdem möglich, da TGF β bereits als Auslöser eines Podozyten-Verlustes in geschädigten Glomeruli identifiziert wurde [Schiffer *et al.*, 2001]. Dieser Befund deutet somit erneut auf eine Aktivierung von MMP9 durch den APN-Antikörper hin.

Eine Beeinflussung des TGF β -Signalweges sollte aufgrund des möglichen Beitrags zur Podozytenschädigung im APN-Modell genauer abgeklärt werden. Eine Aktivierung des TGF β -Signalweges in den isolierten Mausglomeruli kann dabei am einfachsten über die Phosphorylierung der Proteine der Smad-Familie nachgewiesen werden [Heldin *et al.*, 1997].

4.1.5. ADAM10 vermittelt die Podozytenschädigung über die Proteolyse von Adhäsionsmolekülen

Zur Aufklärung des Beitrags von ADAM10 zur Podozytenschädigung wurden die ADAM10-Substrate APP und N-Cadherin, sowie P-Cadherin auf deren Proteolyse nach Inkubation mit dem APN-Antikörper untersucht [Lammich *et al.*, 1999; Reiss *et al.*, 2005]. Interessanterweise bewirkte der APN-Antikörper eine Zunahme der N-Cadherin-Ektodomänenspaltung. Hinsichtlich APP konnte nach der APN-Behandlung lediglich eine schwach reduzierte Proteolyse nachgewiesen werden. Eine Beurteilung der Proteolyse von P-Cadherin scheiterte an der geringen Spezifität des verwendeten Antikörpers (Daten nicht gezeigt). Ein Adhäsionsassay konnte die Beteiligung der ADAM10-vermittelten Proteolyse von Adhäsionsmolekülen an der

strukturellen Schädigung der Podozyten bestätigen, weswegen vor allem N-Cadherin im Fokus der weiteren Betrachtung stand.

Anhand einer Zeitreihe konnte die Induktion der ADAM10-abhängigen Proteolyse von N-Cadherin durch den APN-Antikörper in EPZ-Zellen bestätigt werden. Eine Immunfluoreszenzanalyse zeigte die Reduktion der N-Cadherin-Färbung an den Kontaktstellen der EPZ untereinander nach der Behandlung mit dem APN-Antikörper. Durch Inhibition der ADAM10-Aktivität blieb die N-Cadherin-Färbung an den Kontaktstellen der Zellen dagegen erhalten. Übereinstimmend dazu konnte die Abhängigkeit der N-Cadherin-Oberflächenexpression von der ADAM10-Aktivität bereits von Reiss *et al.* in murinen embryonalen Fibroblasten nachgewiesen werden [Reiss *et al.*, 2005].

Die Verteilung des Signals von N-Cadherin an den Zell-Zell-Kontakten weist auf die Lokalisation dieses Adhäsionsproteins an Bereichen hin, die im Tiermodell den Bereichen der Schlitzmembran entsprechen. Somit zeigt das EPZ-Zellmodell anhand von N-Cadherin, dass das *shedding* eines Oberflächenmoleküls direkt die Filtrationsbarriere schwächen kann. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da die Cadherine Fat1 und P-Cadherin wichtige Bestandteile der Schlitzmembran sind [Reiser *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001]. Zudem ist eine ADAM10-vermittelte Proteolyse von Nephrin denkbar, die der im Tiermodell beobachteten Internalisierung vorausgehen könnte. In der EPZ-Zelllinie konnte Nephrin mit dem verwendeten Antikörper jedoch nicht dargestellt werden, so dass eine Proteolyse durch ADAM10 nicht untersucht werden konnte.

4.1.6. Der Wnt-Signalweg als möglicher zusätzlicher Mediator der Podozytenschädigung

Eine Beeinflussung der Oberflächenexpression von Vertretern der Cadherine kann auch die Aktivität des Wnt-Signalweges regulieren [Maretzky *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2005]. Durch Verringerung der Oberflächen-exprimierten Cadherine wird C-terminal assoziiertes β -Catenin in den intrazellulären Pool freigesetzt. Auf diese Weise steht zusätzliches β -Catenin für die Signalweiterleitung im Rahmen des Wnt-Signalweges bereit, wodurch dieser verstärkt ablaufen kann [Xu *et al.*, 2000;

Taneyhill und Pennica, 2004]. Interessanterweise wurde die Deregulation des Wnt-Signalweges bereits in Zusammenhang mit einer Prädisposition für nephrotische Erkrankungen beschrieben [Kato *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2009].

Die Überprüfung der Aktivität des Wnt-Signalweges anhand einer qRT-PCR zeigte eine ADAM10-abhängiger Zunahme der klassischen Wnt-responsiven Gene Axin2 (*Axin2*), CyclinD1 (*Ccnd1*) und β -Enolase (*Eno3*) nach Behandlung mit dem APN-Antikörper. Obwohl die Unterschiede der Transkriptmenge teilweise sehr schwach waren, könnten diese zur weiteren Reduktion der adhäsiven Eigenschaften der Zellen beitragen [Kato *et al.*, 2011]. Kato *et al.* zeigten eine Beeinträchtigung der Podozytenadhäsion aufgrund der Wnt-induzierten Verringerung der Transkription des basolateral exprimierten Adhäsionsmoleküls β 1-Integrin und des Schlitzmembranproteins Nephrin. Für andere Wnt-responsive Gene (*Fn1*, *Tiam1*) wurde keine ADAM10-abhängige Reduktion nachgewiesen, so dass deren Bedeutung im APN-Modell der Nephritis möglicherweise zu vernachlässigen ist.

Der Wnt-Signalweg ist in den EPZ-Zellen möglicherweise nur basal aktiv, weswegen nur schwache Unterschiede in den Wnt-responsiven Genen detektiert werden konnten. In Nephritis-Modellen der Maus dagegen wurde eine erhöhte Expression von Wnt-Liganden beschrieben, wodurch der Beitrag von Wnt zur Nephritis stärker ausfallen könnte [Matsui *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2011]. Eine Wnt-abhängige Unterdrückung der Nephrin-Expression [Dai *et al.*, 2009] könnte daher zum Verlust von Nephrin an der Podozyten-Zelloberfläche im APN-Modell beitragen.

Aus diesem Grund ist eine genauere Klärung der Beteiligung des Wnt-Signalweges zur Schädigung im verwendeten Modell nötig. Hierfür ist beispielsweise die Messung von Wnt-Liganden im Serum bzw. die Kontrolle deren Expression über qRT-PCR im Glomerulus sinnvoll. Die Auswirkungen einer möglichen Zunahme der Liganden im Zuge des APN-Modells müsste dann in zellbasierten Experimenten unter paralleler Stimulation des Wnt-Signalweges untersucht werden.

4.1.7. ADAM10 als therapeutisches Ziel zur Prävention einer Nephritis

Die Versuche zum Maus- und Zellmodell weisen auf einen möglichen Einfluss von ADAM10 bei der Entstehung einer Nephritis hin (Modell: Abb. 4.1.1.). Eine Reduktion der ADAM10-Aktivität führte zu einer Abmilderung des Krankheitsbildes.

Eine naheliegende Ursache hierfür war die ADAM10-vermittelte Proteolyse des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin im APN-Modell, über die die Adhäsion der Podozyten untereinander und die Funktionalität der Schlitzmembran gestört wurden. Widersprüchlich hierzu ist jedoch, dass für viele Vertreter der Cadherin-Familie (N-Cadherin, P-Cadherin, Fat-1) ein Rückgang ihrer Expression während der Maturierung von Podozyten beschrieben wurde [Nouwen *et al.*, 1993; Yaoita *et al.*, 2002; Tassin *et al.*, 1994; Reiser *et al.*, 2000; Yaoita *et al.*, 2005]. Dennoch werden beispielsweise P-Cadherin und Fat1 auch von murenen Podozyten exprimiert [Reiser *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001]. Somit stellen vor allem die Cadherine mögliche Ziele der ADAM10-Aktivität im Rahmen der APN-induzierten Nephritis dar.

Aufgrund des potentiellen Beitrags der Proteolyse verschiedener Zelladhäsionsmoleküle zur Podozytenschädigung zeigt sich die Möglichkeit der ADAM10-Inhibition als therapeutische Lösung. Hierbei ist die genaue Applikation des Inhibitors essentiell, da sonst aufgrund des breiten Substratspektrums von ADAM10 mit Nebenwirkungen in anderen Organen zu rechnen ist. Dies und die Anforderung an die Spezifität für die Protease erschweren die Entwicklung eines Wirkstoffes gegen ADAM10 trotz stetiger Weiterentwicklungen [Friedman *et al.*, 2009; Saftig und Reiss, 2011].

Obwohl im verwendeten APN-Modell keine Hinweise auf die Beteiligung des Notch-Signalweges an der Podozytenschädigung vorliegen, darf eine Regulation der Proteolyse des Notch-Rezeptors als Therapieansatz bei einer Nephritis nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise führen andere Auslöser der Nephritis zu einer Notch-Aktivierung. Tatsächlich korrelierte der Grad an Proteinurie in beispielsweise Lupus Nephritis, membranöser Nephropathie und fokaler segmentaler Glomerulosklerose mit der Expression des aktivierten Notch-Rezeptors [Murea *et al.*, 2010]. Daher kann die katalytische Inaktivierung der Notch-Initiatorprotease ADAM10 auch im Falle einer Notch-abhängigen Nephritis hilfreich sein. Neben ADAM10 werden weitere Proteasen wie ADAM17 und MMP-MT1 als Notch-Aktivator diskutiert

und müssen daher ebenfalls als mögliche Ursache einer Nephritis in Betracht gezogen werden [Brou *et al.*, 2000; Murthy *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2014].

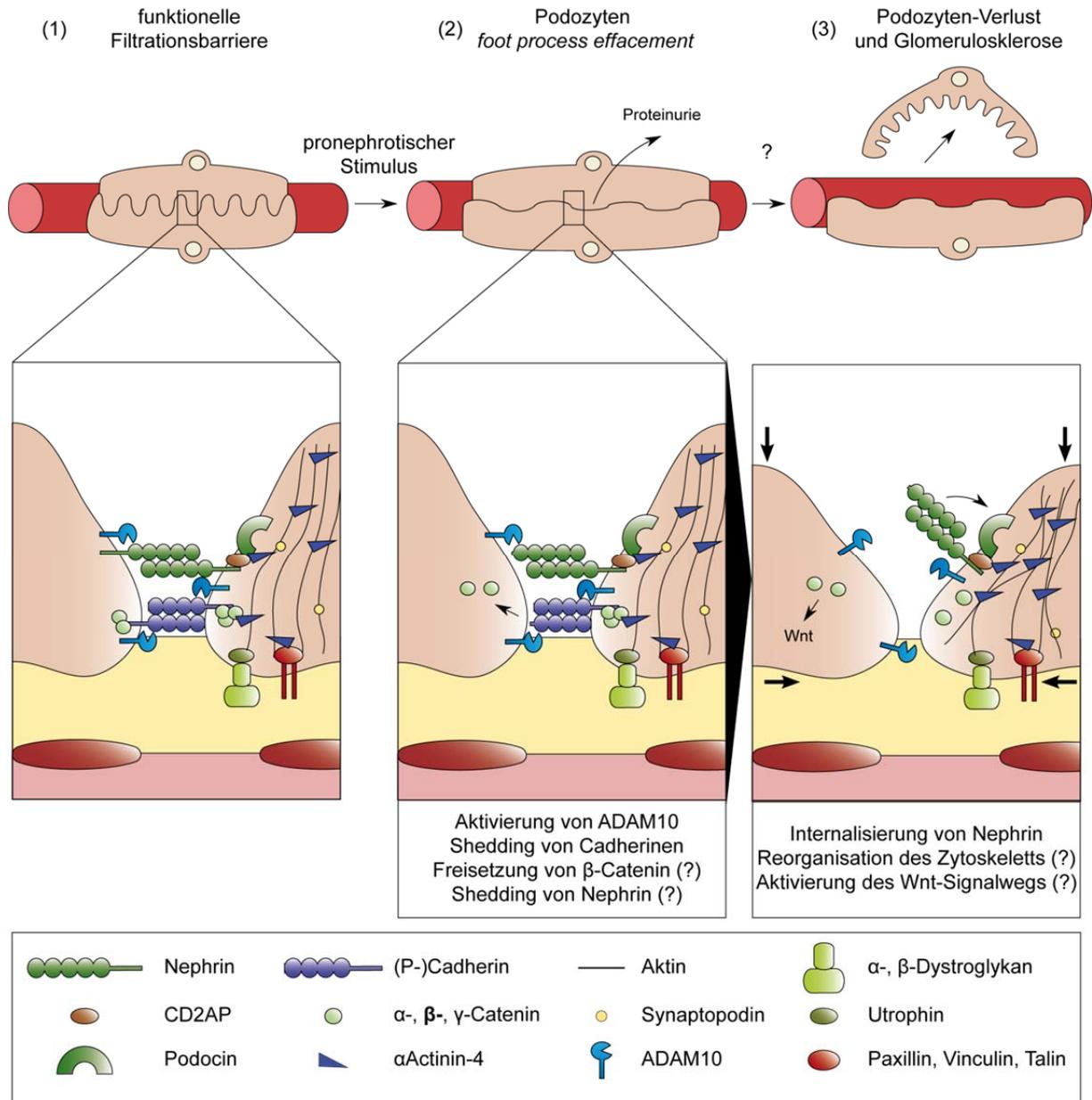


Abb. 4.1.1. Modell des Beitrags von ADAM10 zum Podozyten *foot process effacement*.

Ein pronephrotischer Stimulus, wie die Behandlung mit dem APN-Antikörper, induziert eine Aktivierung von ADAM10. ADAM10 vermittelt die Proteolyse von Adhäsionsmolekülen wie Cadherinen und wahrscheinlich Nephrin und schwächt damit die Schlitzmembran der Filtrationsbarriere. Dieser Prozess ist physiologisch an einer Proteinurie sichtbar. Über das Cadherin-Shedding wird möglicherweise zusätzlich der zelluläre β -Catenin-Pool erhöht und der Wnt-Signalweg verstärkt. Eine verstärkte Wnt-Aktivität wiederum geht mit einer Prädisposition zu glomerulären Schädigungen und Anomalitäten der glomerulären Basalmembran einher [Kato *et al.*, 2011]. Die Veränderung der glomerulären Basalmembran wiederum wirkt sich auf das Zytoskelett aus und führt damit zum typischen *foot process effacement* [Kojima *et al.*, 2004]. Langfristig kann die Schädigungen der Podozyten zu deren Verlust von der glomerulären Basalmembran und der Entstehung einer Glomerulosklerose führen.

4.2. Die Bedeutung von ADAM10 in der Leber

Die Leber zeichnet sich durch eine hohe Regenerationskapazität aus [Higgins und Anderson, 1931; Tannuri *et al.*, 2007; Michalopoulos, 2007]. Nach partieller Hepatektomie vermitteln verschiedene Signale eine Proliferation der Hepatozyten, wie z. B. die Aktivierung des cMet-Signalweges durch HGF und der Notch-Signalweg [Kohler *et al.*, 2004; Shiota *et al.*, 1994]. Zudem tragen Vorläuferzellen zur Regeneration des Gewebes bei, wenn die Proliferation der Hepatozyten gestört ist. Notch-abhängig erfolgt dann die Entscheidung über die Differenzierungsrichtung zu Cholangiozyten bzw. Hepatozyten [Boulter *et al.*, 2012]. Aufgrund des Einflusses von Notch auf die Regeneration geschädigter Hepatozyten war daher die Untersuchung der Funktion der Notch-Protease ADAM10 in der Leber interessant.

4.2.1. Leber-spezifische ADAM10-Deletion unter Kontrolle des Alfp-Promotors

Die Leber-spezifische ADAM10-Deletion erfolgte durch Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Alfp-Promotors. Der Promotor wurde als spezifisch für Hepatoblasten und den von Hepatoblasten abstammenden Zellen beschrieben [Kellendonk *et al.*, 2000]. Übereinstimmend mit Kellendonk *et al.* wurde die Aktivität der Cre-Rekombinase über einen Reporter in Hepatozyten und Cholangiozyten nachgewiesen, nicht aber in den Endothelzellen der Leber. Die Knockoutstrategie führte auf DNA-Ebene zur Rekombination im ADAM10 Exon 2 und zu einer deutlichen Reduktion der *Adam10*-mRNA-Menge. Auf Proteinebene traten jedoch Varianzen hinsichtlich der Reduktion des muren ADAM10 auf.

Das noch detektierbare ADAM10-Signal im ADAM10-Knockout, stammt möglicherweise von nicht-parenchymale Zellen der Leber, die von der Deletion nicht betroffen sind. Jedoch ist auch eine unvollständige Deletion von ADAM10 in der Hepatozyten-Population als Ursache denkbar. Mangels eines geeigneten immunhistochemischen Protokolls zur Darstellung von ADAM10 in der Leber ist eine Aufreinigung der Hepatozyten und Cholangiozyten aus der Leber sinnvoll, um diese isoliert auf die Reduktion der ADAM10-Expression zu überprüfen.

4.2.2. Die ADAM10-Defizienz in der Leber führt zu einer Nekrose von Hepatozyten

Der Alfp-Promotor zur Deletion von ADAM10 in der Leber ist ab Tag E9,5 als aktiv beschrieben [Kellendonk *et al.*, 2000], weswegen neugeborene Mäuse (Tag P1) auf Störungen der Leberentwicklung untersucht wurden. Weder makroskopisch noch histologisch wurden Auffälligkeiten der Leberarchitektur der neugeborenen, ADAM10-defizienten Mäuse deutlich, weswegen eine normale Entwicklung der Leber geschlussfolgert wurde.

Interessanterweise zeigten ADAM10-defiziente Mäuse im Alter von vier Wochen weiße Bereiche an der Oberfläche der Leber, die histologisch und ultrastrukturell als nekrotische Areale identifiziert wurden. Gleichzeitig bestätigten erhöhte Serumwerte für die Alanin Aminotransferase (ALT) eine voranschreitende Schädigung der Hepatozyten [DiMarino *et al.*, 2010]. Nekrotische Tiere zeigten zudem eine leichte Hepatomegalie. Mit zunehmendem Alter gingen die Nekrosen und die Hepatomegalie zurück, die ALT-Werte waren jedoch weiterhin erhöht. Diese Beobachtungen legen nahe, dass kurz nach der Geburt ein nekrotischer Stimulus einsetzt. Die anhaltende Erhöhung der ALT-Werte auch in älteren Tieren weist auf eine fortlaufende Schädigung der Hepatozyten hin. Der Rückgang der Nekrosen in älteren Tieren belegt eine Heilung der Nekrosen durch Regeneration der Hepatozyten. Die Regeneration kann dabei möglicherweise eine parallel ablaufende Schädigung der Hepatozyten kompensieren, wodurch in älteren Tieren zwar erhöhte ALT-Werte aber keine Nekrosen nachweisbar sind.

4.2.3. Die Entstehung der Gallengangsstrukturen ist ADAM10-unabhängig

Die ADAM10-defizienten Tiere wiesen zu allen untersuchten Zeitpunkten erhöhte Serumwerte für die Alkalische Phosphatase (ALP) auf, was auf Störungen des Galleflusses hindeutet [DiMarino *et al.*, 2010]. Als Ursache der beobachteten Nekrosen muss daher eine Schädigung der Hepatozyten infolge einer Cholestase in Betracht gezogen werden [Woolbright *et al.*, 2015]. Aus diesem Grund wurden die Gallengänge der ADAM10-defizienten Mäuse auf Entwicklungsdefekte untersucht.

Die Gallengangs-begrenzenden Cholangiozyten entwickeln sich Notch2-abhängig aus ihren Vorläufern [Groot *et al.*, 2014; Kodama *et al.*, 2004; Sparks *et al.*, 2010; Jeliaskova *et al.*, 2013]. Störungen der Cholangiozyten-Differenzierung können sich daher auf die Funktionsfähigkeit und die Struktur der Gallengänge auswirken. Eine Schädigung der Gallengänge unter normaler Belastung ist denkbar, wenn die Cholangiozyten aufgrund einer Fehlentwicklung dem Druck im Gallengang nicht standhalten können. Die Gallensäuren können dann in das umgebende Gewebe freigesetzt werden und eine Nekrose auslösen [Woolbright *et al.*, 2015]. Eine solche Schädigung wäre ausschließlich in periportalen Regionen zu erwarten und deckt sich damit nicht mit der Position der beobachteten Nekrosen in den ADAM10-defizienten Tieren.

Ein Notch-Knockout-Mausmodell von Geisler *et al.* zeigte die Ausbildung Gallengangs-ähnlicher Strukturen im Leberparenchym, die keine Verbindung zum Gallengangsnetz aufwiesen [Geisler *et al.*, 2008]. Solche Fehlentwicklungen der Gallengänge können zur Aufstauung von Gallensäuren im Gewebe abseits der Periportalfelder führen und darüber die beobachteten Nekrosen bedingen.

Zum Ausschluss einer gestörten Gallengangsentwicklung unter ADAM10-Defizienz, wurde der Notch-Signalweg untersucht. Im Alter von vier Wochen lagen die *Notch1*- und *Notch2*-mRNA reduziert vor. Eine Blockade des Notch-Signalweges führte in verschiedenen Modellen zu einer reduzierten Notch-Expression, was auf einen Notch-Feedback-Mechanismus hindeutet [Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009; Del Monte *et al.*, 2007]. Eine mögliche Störung des Notch-Signalweges könnte daher auch die Reduktion der Notch-Expression unter ADAM10-Defizienz erklären. Jedoch unterlag der Großteil der untersuchten Notch-responsiven Gene im Vergleich zu den Kontrollen keiner Änderung, nur *Hey2* wurde reduziert nachgewiesen. In älteren Tieren konnte keine Reduktion der Notch-responsiven Gene nachgewiesen werden. Damit liegen keine Hinweise auf einen Notch-abhängigen Entwicklungsdefekt der Gallengänge vor.

Eine Fehlentwicklung der Gallengänge wurde makroskopisch über eine Gallengangsplastination und die anschließende Beurteilung der Gallengangsbäume ausgeschlossen. Tatsächlich zeigten Kontroll- und ADAM10-Knockout Tiere keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Verzweigungen der Gallengangsbäume oder deren Länge [Sparks *et al.*, 2010; Müller, 2015]. Da keine Anzeichen einer

kompensatorischen Neuanlage von Gallengängen als Antwort auf eine Cholestase vorliegen, scheint der Galleabfluss über die Gallengänge unbeeinflusst zu sein.

Wie unter Notch-Knockout-Bedingungen könnten jedoch nicht-funktionale Gallengangsabschnitte im Leberparenchym vorliegen, die sich mit zunehmendem Alter zurück bilden [Geisler *et al.*, 2008]. Eine CK19-Färbung der Lebern neugeborener ADAM10-defizienter Tiere war vergleichbar mit den Kontrollen und lieferte somit keine Hinweise auf eine defiziente Konnektivität terminaler Gallengangsabschnitte als Ursache der Nekrosen. Da die Gallengangsplastination unter ADAM10-Defizienz unauffällig war, ist die beobachtete Zunahme der CK19-Färbung in älteren Tieren wahrscheinlich auf eine Zunahme der Lebervorläuferzellen (LPC) zurückzuführen und nicht auf die Cholangiozyten [Schmelzer *et al.*, 2007].

Die Gallengangsplastination und die Analysen des Notch-Signalweges liefern keine Hinweise auf eine Störung der Cholangiozyten-Differenzierung und der Entwicklung der Gallengänge unter ADAM10-Defizienz. Tatsächlich konnte analog dazu in BMOL-Zellen gezeigt werden, dass die normale Ausbildung tubulärer Strukturen durch die Inhibition der γ -Sekretase gestört wird, jedoch unabhängig von einer ADAM10-Aktivität ablaufen kann [Müller, 2015]. Dies legt die Beteiligung einer weiteren Protease als Notch2-Sheddase nahe, die den Verlust von ADAM10 während der Differenzierung der Cholangiozyten kompensieren kann. Mögliche Kandidaten hierfür sind die bereits als Notch1-Protease beschriebenen ADAM17 und MMP-MT1 [Brou *et al.*, 2000; Murthy *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2014].

4.2.4. Eine Deregulation der Expression von Gallensäuretransportern unter ADAM10-Defizienz bedingt die Nekrose der Hepatozyten

Auch Hepatozyten können direkt zur Entstehung einer Cholestase beitragen, da sie Gallensäuren aus dem Blut resorbieren, neu synthetisieren und in die Gallekanälchen sekretieren [Davis *et al.*, 1983; Dawson und Oelkers, 1995]. Störungen des Gallensäure-Transportes können eine lokale Anreicherung der Gallensäuren bedingen und darüber zur Schädigung von Hepatozyten führen (Zusammenfassung Abschnitt 4.2.6., Abb. 4.2.1.) [Woolbright *et al.*, 2015].

Daher wurde die Expression verschiedener Gallensäuretransporter der Hepatozyten in den ADAM10-defizienten Mäusen überprüft. Tatsächlich waren die mRNA-Mengen des basolateral exprimierten Transporters *Oatp1b2*, sowie der kanalikulär lokalisierten Transporter *Mrp2* und BSEP in vier Wochen alten ADAM10-defizienten Mäusen auf die Hälfte reduziert. Die korrekte Lokalisation von *Mrp2* an der Zellmembran wurde zudem als Radixin-abhängig beschrieben [Kikuchi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2008]. Radixin vermittelt die Assoziation des Aktin-Skelettes zur Zellmembran, worüber Transportprozesse beeinflusst werden können, die zur Organisation von Proteinen an der Zellmembran beitragen [Bretscher *et al.*, 2002; Fievet *et al.*, 2007]. In Hepatozyten ist Radixin an der basolateralen und der kanalikulären Zellmembran lokalisiert [Amieva *et al.*, 1994]. Interessanterweise war die Radixin-Expression (*Rdx*) unter ADAM10-Defizienz reduziert. Färbung von Leberschnitten gegen *Mrp2* und Radixin unter ADAM10-Defizienz wiesen ebenfalls die Reduktion beider Proteine in der Leber nach [Müller, 2015].

Kikuchi *et al.* zeigten anhand der Erhöhung des Blut-Bilirubin-Gehaltes nach Verlust der *Mrp2*-Funktion, dass Störungen der Sekretion von Gallensäuren durch den Hepatozyten auch zur Erhöhung der im Serum nachweisbaren Gallensäuren führen [Kikuchi *et al.*, 2002]. Übereinstimmend mit dem Konzept eines solchen Rückstaus wiesen ADAM10-defiziente Tiere erhöhte Serum-Gallensäurewerte auf. Jedoch zeigten nicht alle untersuchten ADAM10-Knockout Tiere den beschriebenen Phänotyp unter Ausbildung von Nekrosen. Tatsächlich korrelierte die Schwere des Phänotyps mit dem *Adam10*-Expressionslevel. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen der Expression des Gallensäuretransporters *Mrp2* (*Abcc2*) und *Adam10* nachgewiesen werden. Die ADAM10-Defizienz führt also wahrscheinlich aufgrund der unterdrückten Transkription von Gallensäuretransportern zur Ansammlung von Gallensäuren in den Hepatozyten und initiiert so die beobachteten Nekrosen. Die Abwesenheit von Nekrosen in einem Teil der untersuchten ADAM10-Knockout Tiere liegt wahrscheinlich an einer ausreichend hohen Restexpression von ADAM10, so dass der Gallensäurestoffwechsel noch funktionell ist.

Zur Absicherung der direkten Abhängigkeit der Expression der Gallensäuretransporter von der ADAM10-Expression, wurde ADAM10 in der Leber vorläuferzelllinie BMOL mittels siRNA herunterreguliert. Auch hier ging die Reduktion der ADAM10-Expression mit der Reduktion verschiedener

Gallensäuretransporter einher (Mrp2, Mrp3). Interessanterweise genügte die Inhibition der ADAM10-Aktivität durch GI254023X nicht, die Expression der Gallensäuretransporter zu unterdrücken. Die Transkriptionskontrolle erfolgt demnach wahrscheinlich nicht über die Proteolyse eines ADAM10-Substrates. Stattdessen könnte möglicherweise die zytosolisch lokalisierte ADAM10 C-terminale Domäne (ADAM10-CTD) die Transkription der Gallensäuretransporter beeinflussen. Die ADAM10-CTD wurde bereits im Zellkern nachgewiesen [Tousseyn *et al.*, 2009] und könnte daher analog der intrazellulären Domäne von Notch als Kofaktor in einem DNA-bindenden, transkriptionsregulierenden Komplex aktiv sein.

Somit liegen erste Hinweise vor, dass die ADAM10-CTD tatsächlich eine transkriptionelle Regulation vermitteln kann. Eine ADAM10-abhängige Beeinflussung der Transkription der Gallensäuretransporter sollte durch Überexpression der ADAM10-CTD in ADAM10-defizienten BMOL-Zellen überprüft werden. Eine Expressionsregulation der Gallensäuretransporter durch die ADAM10-CTD kann dann über eine quantitative *Real-Time-PCR*, eine Western Blot Analyse oder eine Immunfluoreszenzfärbung verfolgt werden.

4.2.5. Die Regenerationsantwort auf eine Leberschädigung ist von ADAM10 unabhängig

Nekrosen beeinträchtigen die Funktionsfähigkeit des Gewebes, weswegen die Fähigkeit des Gewebes ADAM10-defizienter Tiere zur Regeneration der Schäden überprüft wurde. Eine solche Regeneration umfasst neben der Entsorgung der nekrotischen Zellen auch die Wiederherstellung der Gesamtzellmasse durch Proliferation.

Tatsächlich wurde unter ADAM10-Defizienz bereits eine Umverteilung von Makrophagen im Lebergewebe beschrieben [Müller, 2015]. Während die Makrophagen in den Kontrolltieren über das gesamte Gewebe verteilt detektiert wurden, waren sie unter ADAM10-Defizienz vermehrt benachbart zu CKpan-positiven Bereichen nachweisbar [Müller, 2015]. Diese Beobachtung legt nahe, dass Makrophagen an einer Aktivierung der CK19-positiven LPC beteiligt sind, die dann zur Regeneration des Gewebes beitragen [Schmelzer *et al.*, 2007; Espanol-Suner *et*

al., 2012]. In den nekrotischen Arealen wurden vermehrt neutrophile Granulozyten nachgewiesen, die über die Freisetzung von Matrixmetalloproteasen zum Abbau extrazellulärer Matrix beitragen können [Kruger *et al.*, 2015]. Auf diese Weise könnte möglicherweise eine Infiltration von LPC zum Ort der Nekrose gewährleistet werden, die essentiell für eine Regeneration des geschädigten Gewebes ist.

Die Umverteilung der Makrophagen zu CKpan-positiven Bereichen weist auf die Ausbildung eines direkten Kontaktes zwischen Makrophagen und den CK19-positiven LPC hin [Müller, 2015]. Neben ihrer Funktion als Phagozyt setzen Makrophagen auch das LPC-Mitogen TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) frei [Bird *et al.*, 2013]. Auf diese Weise regen Makrophagen die LPC zur Proliferation an, die dann zu Hepatozyten differenzieren und das geschädigte Gewebe regenerieren [Shin *et al.*, 2011; Espanol-Suner *et al.*, 2012]. Das Expressionslevel von TWEAK war allerdings unter ADAM10-Defizienz unverändert [Müller, 2015]. Jedoch nahm die Expression des LPC-exprimierten TWEAK-Rezeptors Fn14 (*Tnfrsf12a*) in Leberproben ADAM10-defizienter Mäuse zu [Müller, 2015]. Übereinstimmend mit der beobachteten Zunahme der CK19-Färbung ohne entsprechende Auffälligkeiten der Gallengangsstruktur weist die erhöhte Fn14-Expression auf das vermehrte Auftreten von LPC im Zuge der Regenerationsantwort in den Lebern der ADAM10-Knockout Tiere hin.

Eine fortschreitende Regeneration wird zudem anhand der Zunahme der Ki67-Färbung in den nekrotischen Lebern deutlich. Eine Kofärbung des Proliferationsmarkers Ki67 mit dem LPC- und Cholangiozyten-Marker CKpan zeigte hierbei, dass die Proliferation anteilig auf die LPC zurückgeht [Müller, 2015]. Anhand einer HE-Färbung der Leber konnte bestätigt werden, dass die Vermehrung der LPC mit der Regeneration des geschädigten Gewebes einhergeht. Die nekrotischen Areale nahmen mit zunehmendem Alter ab. Die Regeneration der Leber nach deren Schädigung ist somit auch unter ADAM10-Defizienz funktionsfähig.

Trotz der funktionellen Regenerationsantwort ist es überraschend, dass die Nekrosen im Alter zurückgehen. Diese Beobachtungen sprechen für die Reduktion des nekrotischen Stimulus, der wahrscheinlich aus der Akkumulation von Gallensäuren resultiert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass während der Regeneration der nekrotischen Areale eine Selektion für Zellen mit einer höheren ADAM10- bzw. Gallensäuretransporter-Expression erfolgen könnte. Auf diese Weise

könnte die Gesamtmenge der Transporter im Gewebe einen gewissen Schwellenwert erreichen, der genügt, die Aufstauung der Gallensäuren zu reduzieren und so den nekrotischen Stimulus abzuschwächen.

Eine Selektion der Hepatozyten für höhere ADAM10-Expressionslevel ist beispielsweise über eine Darstellung der *Adam10*-mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung von Gewebsschnitten nachweisbar. In vier Wochen alten Tieren müsste in den nekrotischen Bereichen eine geringere *Adam10*-Expression detektiert werden. Erfolgt während der Regeneration tatsächlich eine Selektion für Zellen mit höherer ADAM10-Expression, so sollte in älteren Tieren über das gesamte Gewebe etwa die gleiche Menge *Adam10* nachweisbar sein.

4.2.6. Die Proliferation von Lebervorläuferzellen ist unter ADAM10-Defizienz verstärkt

Die LPC konnten als wichtiger Mediator der Regeneration des geschädigten Gewebes identifiziert werden, da deren Proliferation unter ADAM10-Defizienz nachgewiesen wurde [Müller, 2015]. Dennoch war die starke LPC-Färbung über CK19 in älteren Tieren unerwartet, da die HE-Färbung zeigte, dass das Gewebe bereits weitestgehend regeneriert war. Einerseits könnte diese Beobachtung eine anhaltende Aktivierung der LPC bedeuten, da die erhöhten ALT-Werte immer noch eine parallele Schädigung des Gewebes anzeigen. Andererseits könnte ADAM10 ein essentieller negativer Regulator der LPC-Proliferation sein.

Im ADAM10-Knockout Mausmodell war eine Untersuchung der Termination der LPC-Proliferation durch ADAM10 jedoch nicht möglich. Lediglich die ADAM10-defizienten Mäuse wiesen Nekrosen auf und zeigten daher eine Aktivierung der LPC, Kontrolltiere dagegen nicht. Aus diesem Grund ist die Verwendung eines induzierbaren LPC-spezifischen ADAM10-Knockouts hilfreich, wodurch alle Mäuse während der Entwicklung den gleichen Gesundheitszustand aufweisen. Hierzu würden sich beispielsweise CK19-CreER^T-exprimierende Mäuse eignen [Means *et al.*, 2008]. Die LPC können dann durch die Applikation von 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidin (DDC) oder eine Cholin-defiziente, Ethionin-supplementierte (CDE) Ernährung aktiviert werden [Jakubowski *et al.*, 2005; Akhurst *et al.*, 2001]. Auf diese

Weise werden die LPC sowohl in ADAM10-Knockout, als auch in Kontrolltieren stimuliert, wodurch der Einfluss von ADAM10 auf die LPC-Proliferation untersucht werden kann. Alternativ kann die ADAM10-Abhängigkeit der Proliferation der LPC auch im zellbasierten Modell überprüft werden. Tatsächlich zeigten Experimente an BMOL-Zellen allein unter ADAM10-Inhibition durch GI254023X eine generelle Zunahme der Proliferation [Müller, 2015], was auf eine Funktion von ADAM10 als Regulator der LPC-Proliferation hindeutet.

Zur molekularen Aufklärung des Beitrags von ADAM10 zur Proliferation der LPC erfolgte eine Stimulation mit den bekannten LPC-Mitogenen TWEAK und HGF [Bird *et al.*, 2013; Jakubowski *et al.*, 2005; Hasuike *et al.*, 2005]. Die Stimulation der Proliferation mit HGF bewirkte die Phosphorylierung der Mitogen aktivierten Proteinkinasen ERK, die in Abwesenheit von ADAM10 noch weiter gesteigert wurde. Stimulationsexperimente auf Basis des ADAM10-Inhibitors GI254023X bestätigten die siRNA-gestützten Experimente [Müller, 2015]. Somit unterstützt der Stimulationsversuch in BMOL-Zellen die Beobachtung einer verstärkten LPC-Proliferation in den ADAM10-defizienten Tieren. Gleichzeitig liefern die Experimente den Hinweis auf einen starken Beitrag des HGF-Signalweges zur LPC-Proliferation. Übereinstimmend dazu zeigten Mäuse mit einer Defizienz für den HGF-Rezeptor cMet eine verringerte Proliferation der LPC [Ishikawa *et al.*, 2012].

Als mögliche molekulare Ursache für die verstärkte Proliferation unter ADAM10-Defizienz ist eine verringerte ADAM10-vermittelte Proteolyse des HGF-Rezeptors cMet in Betracht zu ziehen [Naldini *et al.*, 1991; Schelteme *et al.*, 2010]. Eine reduzierte Proteolyse von cMet gemessen an den Mengen des löslichen cMet-Rezeptors im Serum war in den ADAM10-defizienten Tieren jedoch nicht darstellbar. Möglicherweise wird eine ADAM10-vermittelte Proteolyse von cMet aber erst nach der Aktivierung der LPC initiiert, so dass ein Vergleich zu den Kontrolltieren ungeeignet ist. Tatsächlich impliziert die Beobachtung einer verstärkten LPC-Proliferation unter ADAM10-Defizienz eine Funktion von ADAM10 als Terminator der Proliferation. Durch Proteolyse des Rezeptor cMet werden die LPC möglicherweise für das Mitogen HGF insensitiv und die Proliferation der LPC kommt zum Erliegen.

Eine Termination der LPC-Proliferation ist insbesondere in chronischen Erkrankungen wichtig, da neben der Schädigung selbst auch eine übermäßige LPC-Proliferation als Auslöser einer Fibrose diskutiert wird [Clouston *et al.*, 2005].

Tatsächlich zeigte sich in 15 Wochen alten ADAM10-defizienten Tieren eine verstärkte Aktivierung von Itozellen zu Myofibroblasten und aufgrund deren Aktivität auch die Zunahme von Collagen-Ablagerungen im Gewebe. Diese Veränderungen sind frühe Stadien der Fibrose. Übereinstimmend mit den Hinweisen auf eine Fibrose wurden zudem verschiedene Fibrose-assoziierte Gene, wie z. B. *Mmp2*, *Mmp13* und *Timp1*, infolge einer Itozellaktivierung unter ADAM10-Defizienz verstärkt exprimiert [Müller, 2015].

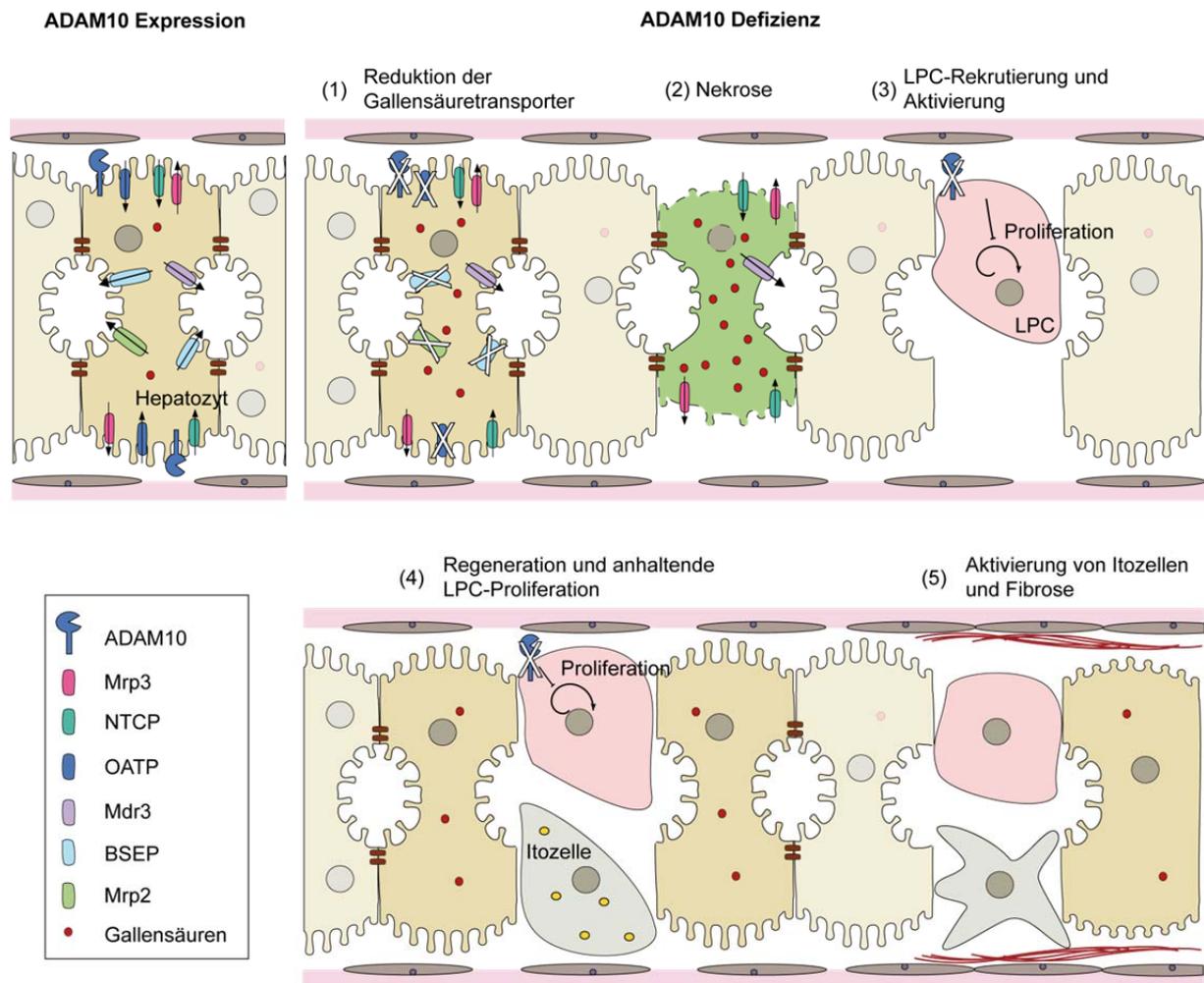


Abb. 4.2.1. Modell der Leberschädigung unter ADAM10-Defizienz.

Die ADAM10-Defizienz führt auf transkriptioneller Ebene zur Verringerung der Expression verschiedener Gallensäuretransporter (1). Daraus resultiert eine Aufstauung der Gallensäuren in den Hepatozyten, die deren Absterben durch Nekrose einleitet (2). Im Zuge der Entsorgung der nekrotischen Zellen werden Wachstumsfaktoren (HGF) und Zytokine (TWEAK) freigesetzt, die LPC aktivieren (3). Durch Proliferation und Differenzierung der LPC zu Hepatozyten wird das geschädigte Gewebe ersetzt (4). Infolge der ADAM10-Defizienz wird die Aktivierung der LPC nicht terminiert und führt neben der langfristigen Gewebsschädigung zur Transdifferenzierung von Itozellen zu Myofibroblasten (5). Diese lagern zunehmend Collagene ab und initiieren darüber eine Fibrose.

Die Fibrose gilt, über die Entwicklung einer Zirrhose, als wichtige Ursache von hepatozellulären Karzinomen (HCC) [Ramakrishna *et al.*, 2013]. Beispielsweise wurde TGF β als wichtiger Stimulus der Entstehung von Leberkrebs beschrieben [Wu *et al.*, 2012]. Auch die ADAM10-defizienten Mäuse zeigten eine Zunahme der *Tgfb1*- und *Tgfb2*-mRNA, was auf frühe Stadien der Krebsentstehung hinweist [Müller, 2015]. Übereinstimmend mit einer verstärkten TGF β -Expression lagen in den ADAM10-defizienten Mäusen Hinweise auf eine erhöhte TGF β -Aktivität vor. So wurde die Expression von *Hey1* als einziges Notch-responsives Gen in 15 Wochen alten ADAM10-Knockout Tieren erhöht nachgewiesen.

Zusammenfassend ist ADAM10 ein wichtiger Terminator der LPC-Proliferation (Abb. 4.2.1.). Schreitet die LPC-Proliferation aufgrund der unterdrückten Aktivität von ADAM10 voran, wird über die Aktivierung von Itozellen ein profibrotisches Milieu generiert [Arthur *et al.*, 1998; Arthur *et al.*, 1992; Knittel *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2007]. Das Voranschreiten der Fibrose wird durch die erhöhte Expression des ADAM10-Inhibitors *Timp1* im fibrotischen Gewebe möglicherweise weiter begünstigt [Nie *et al.*, 2004; Yoshiji *et al.*, 2000].

4.2.7. Therapeutische Möglichkeiten der Modulation der ADAM10-Aktivität in der Leber

Insbesondere die Bedeutung als Terminator der LPC-Proliferation zeigt das therapeutische Potential von ADAM10 während der Entstehung einer Fibrose. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ist eine Aktivierung von ADAM10 in den frühen Phasen einer Fibrose denkbar, um den zusätzlichen profibrotischen Stimulus durch anhaltende LPC-Proliferation zu unterbinden. Auf diese Weise kann das Fortschreiten der Fibrose hin zur Zirrhose oder einem Leberkarzinom verzögert werden, um Zeit zur Diagnose und Beseitigung der eigentlichen Ursachen des profibrotischen Stimulus zu gewinnen. Dennoch ist hierbei zu berücksichtigen, dass in vielen Krebsarten eine erhöhte ADAM10-Expression nachgewiesen wurde [Pan *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2013; Mullooly *et al.*, 2015].

Jedoch kann eine Steigerung der ADAM10-Aktivität in LPC auch abseits der Fibrose von therapeutischem Nutzen sein. Beispielsweise kann eine Transplantation von

LPC genutzt werden, um Hepatozyten oder Cholangiozyten in geschädigten Lebern zu regenerieren [Lu *et al.*, 2015]. Durch die Aktivierung der ADAM10-Aktivität könnte die hierzu nötige *ex vivo* Expansion der LPC beschleunigt werden. In beiden Zusammenhängen ist daher eine Aktivierung von ADAM10 sinnvoll, wie sie z. B. über das synthetische Retinoid Acitretin beschrieben ist [Endres *et al.*, 2014]. Acitretin verdrängt all-trans Retinsäure (atRA) von den zellulären Retinsäure Bindeproteinen (CRABP) und erhöht damit dessen intrazelluläre Verfügbarkeit. Freies atRA aktiviert anschließend das Retinsäure-Rezeptor/Retinoid X Rezeptor (RAR/RXR)-Heterodimer, welches an den ADAM10-Promotor bindet und die Transkription induziert [Tippmann *et al.*, 2009].

4.3. Potentielle neue Regulatoren von ADAM10

Aufgrund der vielseitigen Bedeutung von ADAM10 für verschiedene Prozesse des Organismus ist eine genaue Regulation der Enzymaktivität essentiell. Während eine verstärkte ADAM10-Aktivität mit verschiedenen Karzinomen in Verbindungen gebracht wurde, bedeutet eine verringerte ADAM-Aktivität beispielsweise ein erhöhtes Risiko für die Alzheimer'sche Erkrankung [Mochizuki und Okada, 2007; Murphy, 2008; Duffy *et al.*, 2011; Postina *et al.*, 2004; Lichtenthaler, 2011]. Diese Beobachtungen erschweren den therapeutischen Einsatz genereller ADAM10-Inhibitoren oder -Aktivatoren aufgrund möglicher Nebenwirkungen. Daher ist es wichtig, körpereigene Regulatoren der ADAM10-Aktivität zu identifizieren und zu charakterisieren.

4.3.1. Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase FKBP38 interagiert mit ADAM10

Über die Nutzung eines *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System* wurden potentielle Interaktionspartner von ADAM10 aus einer murinen Hirn-cDNA-Datenbank identifiziert [Prox, 2012], unter ihnen die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase FKBP38. Da solche breit angelegten *Screens* mitunter falsch positive Treffer liefern, wurde die Interaktion zwischen FKBP38 und ADAM10 gezielt im *Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-System* überprüft und konnte in der Hefe bestätigt werden. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation in HeLa-Zellen durchgeführt, welche die Interaktion zwischen ADAM10 und FKBP38 nach der Überexpression beider Proteine bestätigte.

Die bloße physikalische Möglichkeit der Interaktion ist noch nicht ausreichend, dieser eine physiologische Bedeutung zuzuordnen. Daher erfolgte eine Lokalisationsanalyse von FKBP38 und ADAM10 mittels Immunfluoreszenz, über die die Möglichkeit des Kontaktes beider Proteine in der Zelle nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zu den bisherigen Hinweisen auf eine direkte Interaktion wurden beide Proteine im Rahmen einer ER-Aufreinigung aus HeLa-Zellen in der gleichen Fraktion angereichert (Daten nicht gezeigt). Die Immunpräzipitation, die Immunfluoreszenz und die ER-Aufreinigung zeigten somit, dass FKBP38 und

ADAM10 in HeLa-Zellen miteinander interagieren können, weswegen als nächstes die physiologische Relevanz dieser Interaktion untersucht wurde.

4.3.2. Indizien für einen positiven Effekt von FKBP38 auf den Transport von ADAM10 zur Zellmembran

Eine Immunfluoreszenzanalyse zeigte die beste Kolo­kalisierung zwischen ADAM10 und FKBP38 und dem ER-Markerprotein KDEL. Übereinstimmend dazu wurden ADAM10 und FKBP38 in der gleichen Fraktion einer ER-Aufreinigung nachgewiesen. Zuletzt wurde durch Präzipitation von überexprimiertem FKBP38-myc vor allem die ER-lokalisier­te ADAM10-Proform kopräzipitiert. Alle Befunde weisen daher auf eine physiologisch relevante Interaktion von FKBP38 und ADAM10 am ER hin.

FKBP38 wurde als Regulator der Apoptose und als Faltungshelfer beschrieben, wobei die Apoptose-Regulation der mitochondrial lokalisierten Form zugeordnet wurde [Shirane und Nakayama, 2003]. Da die Daten jedoch eine Interaktion zwischen ADAM10 und FKBP38 am ER unterstützen, ist eine Funktion von FKBP38 als Faltungshelfer von ADAM10 anzunehmen.

Das aktive Zentrum von FKBP38 ist zum Zytosol hin gerichtet [Bulgakov *et al.*, 2004], weswegen eine Beteiligung an der Faltung des C-Terminus von ADAM10 denkbar ist. Tatsächlich befinden sich in diesem Sequenzabschnitt von ADAM10 mehrere mögliche Substratstellen für die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (Vergleiche Abschnitt 1.4.1., Abb. 1.4.1. B).

Über eine Modulation des Faltungsstatus des ADAM10 C-Terminus könnte die Bindung von z. B. Transport-vermittelnden Proteinen wie SAP-97 reguliert werden [Marcello *et al.*, 2007]. Tatsächlich wurde für den Faltungshelfer FKBP38 anhand von siRNA-basierten Experimenten bereits eine Transport-Regulation des spannungsabhängigen Kaliumkanals HERG (human ether-a-go-go-related gene) beschrieben [Walker *et al.*, 2007]. Eine Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen in HeLa-Zellen zeigte eine Zunahme von maturem ADAM10 an der Zelloberfläche nach Überexpression von FKBP38.

Die Zunahme der Zelloberflächenexpression von maturem ADAM10 kann dabei auch auf eine gesteigerte Reifung zurückzuführen sein [Prox *et al.*, 2012]. Ein Effekt von FKBP38 auf die Maturierung von ADAM10 konnte darüber ausgeschlossen werden, dass im Zelllysate keine Zunahme der murenen Form zu Lasten der Proform von ADAM10 sichtbar war. Daher deutet die Zunahme des Zelloberflächen-exprimierten ADAM10 auf eine Bedeutung der Chaperon-Aktivität von FKBP38 für den Transport von ADAM10 zur Zellmembran.

Überraschenderweise führte jedoch die siRNA-vermittelte Unterdrückung der FKBP38-Expression nicht zur Senkung der Oberflächenexpression von maturem ADAM10. Stattdessen wurde matures ADAM10 gleich stark an der Zelloberfläche detektiert, der Transport zur Zelloberfläche scheint daher FKBP38-unabhängig zu sein. Unter FKBP38-Knockdown Bedingungen wurde aber die ADAM10-Proform stärker an der Zelloberfläche nachgewiesen. Möglicherweise reguliert FKBP38 also spezifisch den Golgi-Export der ADAM10-Proform.

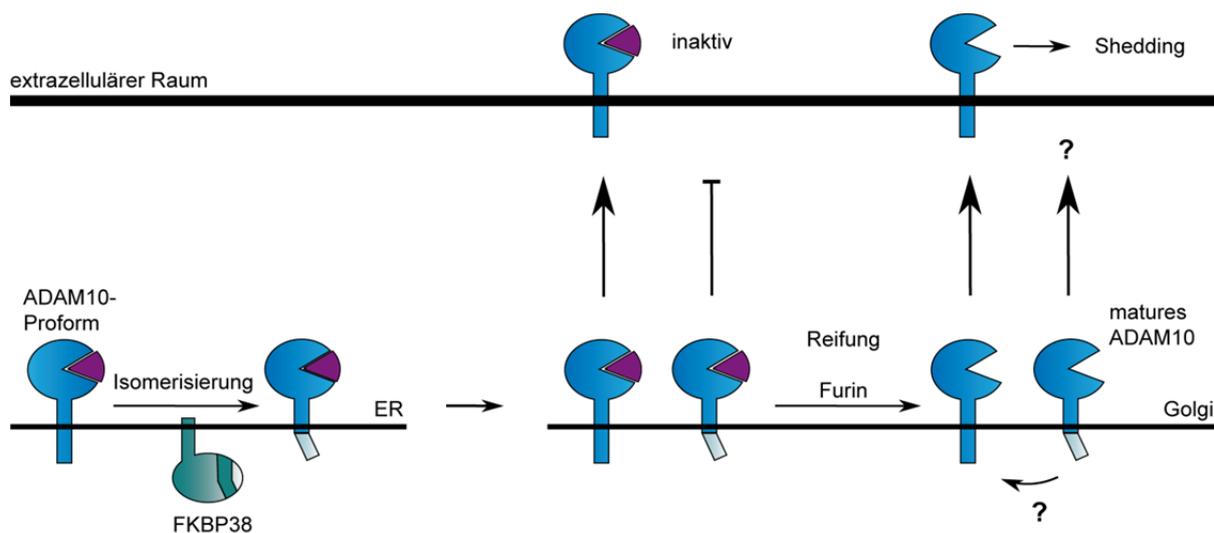


Abb. 4.3.1. Modell der Beeinflussung des ADAM10-Transports durch FKBP38.

Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase FKBP38 kann potentiell zur Isomerisierung der Xaa-Pro-Bindungen im ADAM10 C-Terminus führen. Diese Konformationsänderung hat keinen Einfluss auf die Furin-vermittelte Aktivierung von ADAM10. Jedoch scheint sie den Transport der immaturren ADAM10-Proform zur Zellmembran zu verhindern. Möglicherweise reguliert die Konformation des C-Terminus die Bindung wichtiger Transportproteine, wie SAP-97, und darüber den Transport der Protease vom Golgi zur Zellmembran [Marcello *et al.*, 2007]. Ob der Transport aufgrund einer erneuten Konformationsänderung infolge der Furin-vermittelten Maturierung wieder ermöglicht wird, wurde nicht geklärt.

In einer solchen Modellvorstellung würde die FKBP38-abhängige Faltung der C-terminalen Domäne von ADAM10 (CTD) den Transport der ADAM10-Proform vom Golgi-Apparat zur Zellmembran hemmen (Abb. 4.3.1.). Interessanterweise wurden

die Prolin-reichen Regionen der ADAM10-CTD als Bindestellen für Transport-regulierende Interaktionspartner identifiziert [Wild-Bode *et al.*, 2006; Marcello *et al.*, 2007; Ebsen *et al.*, 2014]. Daher könnte der Isomeriezustand der Peptidyl-Prolyl-Bindungen die Zugänglichkeit der C-terminaler Bindestellen für bestimmte Transportproteine einschränken. Infolgedessen wird die ADAM10-Proform im Golgi-Apparat zurückgehalten bis die Furin-abhängige Reifung erfolgt. Die Maturierung von ADAM10 vermittelt dann möglicherweise eine weitere Konformationsänderung der ADAM10-CTD, die den Transport der maturen Form von ADAM10 zur Zelloberfläche wieder begünstigt. Im FKBP38-Knockdown dagegen ist eine Golgi-Exporthemmung nicht möglich, weswegen ein Teil der ADAM10-Proform der Reifung entgeht und direkt zur Zellmembran transportiert wird. Neben dem murenen ADAM10 kann daher dann auch die ADAM10-Proform an der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

An diesem Modell bleibt fraglich, ob eine Beeinflussung der Faltung des ADAM10 C-Terminus durch FKBP38 im ER nicht auch einen Einfluss auf den ER-Export haben müsste. Möglicherweise sind beim Export von ADAM10 aus dem Golgi-Apparat aber andere Transportproteine involviert als beim ER-Export. Insbesondere die Beteiligung von Tetraspaninen ist hier denkbar, da diese mit extrazellulären Anteilen von ADAM10 interagieren [Prox *et al.*, 2012; Noy *et al.*, 2016].

4.3.3. FKBP38 beeinflusst die ADAM10-Aktivität unter Normalbedingungen nicht

Über eine Beeinflussung der FKBP38-Aktivität ließe sich gegebenenfalls auch die Aktivität von ADAM10 regulieren.

Ein siRNA-vermittelter Knockdown von FKBP38 veränderte die Zelloberflächenexpression von katalytisch aktivem, maturem ADAM10 nicht und beeinflusste folgerichtig auch nicht die proteolytische Aktivität gegenüber den untersuchten Substraten. Unerwartet war jedoch, dass die FKBP38-Überexpression eine Lokalisation von maturen ADAM10 an der Zelloberfläche begünstigte, ohne dass eine Zunahme der proteolytischen Aktivität nachweisbar war.

Falls FKBP38 tatsächlich die Oberflächenexpression von maturem ADAM10 beeinflusst, scheint sich dies nicht auf die konstitutive Aktivität von ADAM10

auszuwirken. Möglicherweise vermittelt eine gesteigerte FKBP38-Expression anteilig auch die Isomerisierung zusätzlicher, schlechter als Substrat geeigneter Peptidyl-Prolyl-Bindungen im ADAM10 C-Terminus (Vergleiche Abschnitt 1.4.1., Abb. 1.4.1. B). Dadurch könnte die Ausbildung des Protease-Substrat-Komplexes sterisch gehindert sein und eine effektive Proteolyse trotz gesteigerter Oberflächenexpression von ADAM10 erschweren. Der Nachweis der gesteigerten ADAM10-Oberflächenexpression bedeutet gleichzeitig, dass die Bindung von Transport-relevanten Interaktoren von der zusätzlichen Isomerisierung nicht betroffen ist.

Der Hauptanteil des Oberflächen-exprimierten ist ADAM10 außerhalb der Cholesterin-reichen *lipid rafts* lokalisiert [Kojro *et al.*, 2001]. Werden die *lipid rafts* durch beispielsweise Methyl- β -Cyclodextrin aufgelöst, gelangen normalerweise in *lipid rafts* lokalisierte ADAM10-Substrate in nicht-*lipid raft*-Regionen, was eine gesteigerten Proteolyse durch ADAM10 ermöglicht [Kojro *et al.*, 2001; Murai *et al.*, 2011]. Möglicherweise bedeutet diese Beobachtung aber, dass der geringe Anteil der Protease in den *lipid rafts* den Hauptanteil an der konstitutiven Substratproteolyse trägt. Infolge der putativen zusätzlichen Isomerisierung eines Teils des ADAM10-Pools (iso-ADAM10) ist dann möglicherweise der Kontakt des iso-ADAM10 zu den *lipid rafts* gestört. Die Zugänglichkeit des Substrates für iso-ADAM10 wäre dadurch eingeschränkt.

Unabhängig von der Proteolyse-Aktivität, ist die Beeinflussung einer möglichen transkriptionellen Aktivität der ADAM10 C-terminalen Domäne (CTD) über deren Faltung eine weitere mögliche Bedeutung der Interaktion mit FKBP38. Obwohl die ADAM10-CTD bereits im Zellkern nachgewiesen werden konnte, ist bisher noch kein Zielgen bekannt [Tousseyn *et al.*, 2009].

4.3.4. Indizien für eine Interaktion der Kinase MAP3K7 mit ADAM10

Ein HEK-Screen [Jager *et al.*, 2012] ermöglichte die Identifikation weiterer potentieller Interaktionspartner von ADAM10. Hierbei war die Identifikation der Kinase MAP3K7 besonders interessant. Die Kinase konnte mit einem *MiST*-Score (*Mass Spectrometry Interaction Statistics*) ähnlich des bekannten ADAM10-Inhibitors

Timp1 identifiziert werden [Amour *et al.*, 2000]. Zudem wurde auch das MAP3K7-bindende Protein TAB1 im Präzipitat nachgewiesen, was eine Relevanz der Interaktion von ADAM10 mit MAP3K7 zusätzlich unterstützt [Shibuya *et al.*, 1996].

Die weitergehenden Untersuchungen wurden in HeLa-Zellen durchgeführt, weswegen auch in diesen eine Interaktion beider Proteine überprüft wurde. Über eine Fällung von ADAM10 konnte die Kinase kopräzipitiert werden. Die Präzipitation über MAP3K7 dagegen lieferte zum Teil unspezifische Anreicherungen von ADAM10, weswegen eine spezifische physikalische Interaktion für dieses Telexperiment nicht bewertbar ist. Eine Immunfluoreszenzanalyse bestätigte die Möglichkeit eines Kontaktes zwischen ADAM10 und MAP3K7 in der Zelle. MAP3K7 wurde von Jiang *et al.* vor allem als zytosolisch lokalisiert nachgewiesen, weswegen theoretisch ein Kontakt zum C-Terminus von ADAM10 während des gesamten sekretorischen Transportes möglich ist [Jiang *et al.*, 2002].

4.3.5. Hinweise auf eine transkriptionelle Regulation von ADAM10 durch MAP3K7

Für das zu ADAM10 eng verwandte ADAM17 wurde bereits die Beeinflussung des Transportes zur Zellmembran über eine Phosphorylierung des C-Terminus beschrieben [Soond *et al.*, 2005]. Daher wurde der Einfluss von MAP3K7 auf die intrazelluläre Lokalisation von ADAM10 anhand einer Immunfluoreszenzanalyse überprüft. Eine Verringerung der MAP3K7-Expression steigerte die Menge an ER-lokalisiertem ADAM10. Umgekehrt bewirkte eine gesteigerte MAP3K7-Expression eine Reduktion der ER-Lokalisation von ADAM10.

Über die Analyse von ADAM10 unter MAP3K7-Knockdown konnte eine Hemmung der ADAM10-Maturierung als Ursache der gesteigerten ADAM10-ER-Lokalisation ausgeschlossen werden. Stattdessen wurden sowohl die ADAM10-Proform als auch matures ADAM10 erhöht nachgewiesen. MAP3K7-Inhibitor-gestützte Experimente konnten nach 24 h eine Zunahme der ADAM10-Proform bestätigen und zeigten damit gleichzeitig deren Abhängigkeit von der Kinase-Aktivität von MAP3K7.

Nachdem eine Hemmung der ADAM10-Maturierung als Ursache der verstärkten ER-Lokalisation von ADAM10 ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Regulation

der Expression durch MAP3K7 in Betracht gezogen. Tatsächlich bestätigte eine qRT-PCR-Analyse die Zunahme der *Adam10*-mRNA infolge des MAP3K7-Knockdowns. Eine solche transkriptionelle Regulation kann die Beobachtung einer Zunahme der Proform und nachfolgend der maturen Form von ADAM10 erklären. Interessanterweise scheint diese Regulation sehr spezifisch zu sein, da für *Adam17* keine Expressionsregulation nachgewiesen wurde.

Die transkriptionelle Regulation der *Adam10*-Expression muss dabei über eine der verschiedenen durch MAP3K7 initiierten Kinase-Kaskaden vermittelt werden [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Takaesu *et al.*, 2003; Gingery *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 1995; Fanger *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 1996b]. Die Daten unter Inhibition von MAP3K7 mit Celastrol deuten dabei am ehesten auf eine transkriptionelle Regulation über den NF κ B-Signalweg (Vergleiche Abschnitt 4.3.6., Abb. 4.3.2. (1.)). Die Applikation des Inhibitors Celastrol hemmte die TAK1-abhängige Phosphorylierung von p65, während für p38 keine Änderung des Aktivitätszustands nachweisbar war [Sakurai *et al.*, 2003; Moriguchi *et al.*, 1996a]. Tatsächlich zeigten Ray *et al.* anhand von ADAM12 bereits die prinzipielle Möglichkeit der transkriptionellen Regulation einer ADAM-Protease über NF κ B in TGF β -stimulierten Zellen [Ray *et al.*, 2010].

4.3.6. Verstärkung der ADAM10-vermittelten APP-Proteolyse unter MAP3K7-Knockdown

Für die Substrate N-Cadherin und Notch, gemessen an der Expression Notch-responsiver Gene, konnte keine offensichtliche Beeinflussung der ADAM10-vermittelten Proteolyse unter MAP3K7-Knockdown nachgewiesen werden. Für APP dagegen wurde sowohl eine Erhöhung der Expression der maturen Form als auch des *shedding*-Produktes APP CTF C83 nachgewiesen. Die mRNA-Analysen belegten eine leicht verstärkte Transkription von *App* als mögliche Ursache der Erhöhung der maturen APP-Form. Die verstärkte Proteolyse zum APP CTF C83 wird dann über die α -Sekretase ADAM10 vermittelt [Postina *et al.*, 2004].

Die Inhibitor-gestützten Experimente konnten die Beeinflussung der APP-Proteolyse durch MAP3K7 jedoch nicht bestätigen. Die Kinase-Aktivität von MAP3K7 war in

diesem Experiment aber über einen deutlich kürzeren Zeitraum unterdrückt als unter siRNA-Behandlung. Nach 24-stündiger Celastrol-Behandlung war noch keine Zunahme des murenen ADAM10 sichtbar.

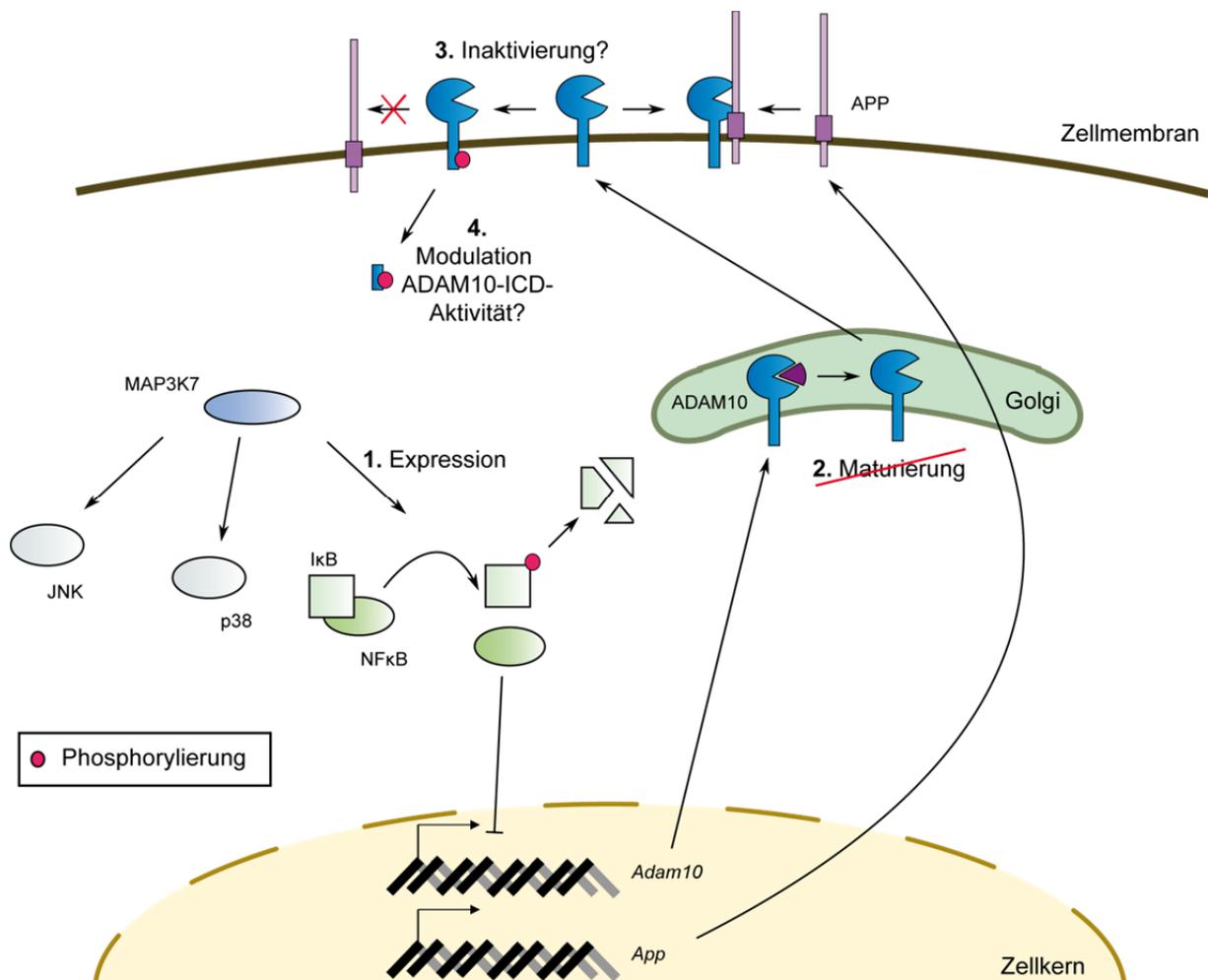


Abb. 4.3.2. Modell einer Beeinflussung von ADAM10 durch MAP3K7.

Die Kinase MAP3K7 inhibiert über den NFκB-Signalweg die Transkription von *Adam10* und *App* (1.). Nach ihrer Biosynthese werden APP und ADAM10 über den sekretorischen Weg bis zur Zellmembran transportiert. Die Maturierung von ADAM10 im Golgi-Apparat ist von der Aktivität der Kinase unabhängig (2.). Durch Unterdrückung der MAP3K7-Aktivität kann spezifisch die Prozessierung von APP durch ADAM10 induziert werden. Der Einfluss der transkriptionellen Effekte auf die Proteolyse wird möglicherweise zusätzlich durch eine MAP3K7-abhängige Phosphorylierung des ADAM10 C-Terminus verstärkt (3.). Durch die intrazelluläre Phosphorylierung von ADAM10 könnte eine APP-spezifische Interaktionsstelle maskiert werden, wodurch der Enzym-Substrat-Komplex nicht mehr ausgebildet werden kann und die Proteolyse gehemmt wird. Außerdem könnte eine MAP3K7-abhängige Phosphorylierung der intrazellulären Domäne (ICD) von ADAM10 dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor beeinflussen (4.).

Die β-Sekretase Bace1 trägt wahrscheinlich nicht zum verstärkten *shedding* von APP unter MAP3K7-Knockdown Bedingungen bei, da das Spaltprodukt APP CTF C99 im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte [Vassar *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2001]. Jedoch unterlag Bace1 auch keiner transkriptionellen Regulation durch

MAP3K7. Um einen Beitrag von Bace1 zur APP-Proteolyse sicher auszuschließen, ist eine Untersuchung anhand der Schwedischen Mutante von APP (APP^{sw}) sinnvoll. Für diese APP-Mutante wurde die Favorisierung der amyloiden Proteolyse durch Bace1 gezeigt, so dass das APP CTF C99 auch unter Normalbedingungen detektierbar wird [Citron *et al.*, 1992]. Basiert der MAP3K7-abhängige Effekt auf die APP-Proteolyse hauptsächlich auf der Steigerung der APP-Expression, zeigt sich dies an der Zunahme des APP CTF C83 und des Bace1-generierten APP CTF C99. Erfolgt die MAP3K7-abhängige Induktion der APP-Proteolyse dagegen tatsächlich spezifisch über ADAM10, sollte infolge der reduzierten MAP3K7-Aktivität nur das Produkt der α -Sekretase-Proteolyse (APP CTF C83) vermehrt entstehen.

4.3.7. Möglichkeiten einer direkten ADAM10-MAP3K7-Interaktion

Die vorgestellten Ergebnisse implizieren eine transkriptionelle Regulation von ADAM10 durch MAP3K7. Dennoch bedeuten die Interaktionsanalysen mittels *HEK-Screen* und Immunpräzipitation, dass zusätzlich eine direkte Interaktion beider Proteine vorliegen könnte. Eine mögliche funktionelle Bedeutung besteht darin, dass die Kinase MAP3K7 über eine direkte Phosphorylierung der ADAM10 C-terminalen Domäne (CTD) die Aktivität der Protease beeinflusst (Vergleiche Abschnitt 4.3.6., Abb. 4.3.2.). Tatsächlich weist diese Domäne potentielle Phosphorylierungsstellen für MAP3K7 auf (Ser705, Ser706) und macht daher eine Aktivitäts-regulierende direkte Phosphorylierung denkbar (Vergleiche Abschnitt 1.4.2., Abb. 1.4.2. B). Analog dazu wurde beispielsweise für die durch MAP3K7 aktivierte Kinase p38 bereits eine aktivierende, direkte Phosphorylierung von ADAM17 nach TGF β -Stimulation im Zellmodell nachgewiesen [Xu und Derynck, 2010].

Zur Abklärung einer solchen Aktivitätsregulierung ist es nötig, eine MAP3K7-abhängige Phosphorylierung von ADAM10 nachzuweisen. Hierzu könnte ADAM10 aus MAP3K7-Inhibitor-behandelten Zelllysaten präzipitiert und anschließend mittels Massenspektrometrie auf Phosphorylierungen untersucht werden. Nach der Identifikation der potentiellen Phosphorylierungsstellen in der ADAM10-CTD könnten diese mutiert werden (Ser \rightarrow Ala: keine Phosphorylierung; Ser \rightarrow Glu: Phosphorylierungs-Mimikry) und die Mutanten auf deren Aktivität hinsichtlich der

APP-Proteolyse untersucht werden. Vorteilhaft ist dabei auch, dass diese Analyse unabhängig von den beobachteten MAP3K7-abhängigen transkriptionellen Effekten wäre.

Die Beobachtungen aus den MAP3K7-Knockdown-Experimenten legen dabei eine Proteolyse-hemmende Funktion der potentiellen ADAM10-Phosphorylierung nahe. Möglicherweise maskiert die Phosphorylierung potentielle Substrat-Bindestellen in der ADAM10-CTD (Vergleiche Abschnitt 4.3.6., Abb. 4.3.2. (3.)). Auf diese Weise könnte die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes gestört und die Proteolyse gehemmt werden. Eine Aktivitäts-regulierende Phosphorylierung der ADAM10-CTD ist möglicherweise sogar Substrat-spezifisch, wenn die potentiellen Bindestellen nur von bestimmten Substraten genutzt werden. Ein solches Modell könnte erklären, dass die Proteolyse von APP beeinflusst ist, die von anderen ADAM10-Substraten hingegen nicht.

Eine weitere mögliche Bedeutung der potentiellen Phosphorylierung der ADAM10-CTD könnte unabhängig von der Protease-Aktivität über eine Aktivität als Transkriptionsfaktor vermittelt sein (Vergleiche Abschnitt 4.3.6., Abb. 4.3.2. (4.)). Die ADAM10-CTD wurde bereits im Zellkern nachgewiesen, so dass eine Phosphorylierung möglicherweise analog zu Proteinen der NFκB-Familie die transkriptionelle Aktivität der CTD modulieren kann [Tousseyn *et al.*, 2009; Viatour *et al.*, 2005].

4.3.8. Die ADAM10-Expression und -Aktivität ist von einer MAP3K7-Überexpression unbeeinflusst

Die Unterdrückung der MAP3K7-Aktivität zeigte eine Beeinflussung der Expression von ADAM10 und der APP-Proteolyse. Zur Absicherung der Beobachtungen wurden diese Veränderungen auch nach Überexpression von MAP3K7 untersucht. Hierbei konnten jedoch die bisherigen Befunde der Beeinflussung von ADAM10 und APP nicht bestätigt werden. Die Überprüfung der MAP3K7-Aktivität, wie sie in den Inhibitor-gestützten Experimenten etabliert wurde, zeigte jedoch auch das Ausbleiben einer Phosphorylierungssteigerung von p65 infolge der MAP3K7-Überexpression. Die bloße Überexpression von MAP3K7 scheint demnach nicht zu

einer zusätzlichen Aktivierung der Kinase zu führen und erklärt die Abwesenheit der vorher beobachteten Effekte auf ADAM10 und APP.

Wahrscheinlich ist eine parallele Stimulation der Kinase notwendig, um Effekte einer Überexpression von MAP3K7 zu bewerten. Die Aktivierung über Stresssignale ist vermutlich weniger relevant [Raingeaud *et al.*, 1995], da die Inhibition von MAP3K7 keine Einfluss auf die p38-Phosphorylierung hatte. Stattdessen deuten die Experimente auf eine NFκB-abhängige Regulation der *Adam10*-Expression. Daher ist eine parallele Stimulation mit IL-1, TGF-β und TNFα sinnvoll, da diese MAP3K7-abhängig den NFκB-Signalweg initiieren können [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Takaesu *et al.*, 2003; Gingery *et al.*, 2008].

4.3.9. Praktische Anwendungsmöglichkeiten der identifizierten Interaktionspartner

Die Analyse der potentiellen Regulatoren von ADAM10 diente deren Beurteilung hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials. Obwohl die ADAM10-Oberflächenexpression durch FKBP38 beeinflusst wurde, war keine Auswirkung auf die Proteolyse der untersuchten ADAM10-Substrate detektierbar. Der therapeutische Nutzen der Aktivitätsregulation von FKBP38 ist daher derzeit nicht beurteilbar. Pharmakologische Aktivator von FKBP38 sind derzeit nicht bekannt. Eine therapeutische Umsetzung ist zudem erschwert, da klassische Wirkstoffe wie der Inhibitor FK506 gegen alle aktiven FKBP und nicht nur gegen FKBP38 wirksam sind [Rosen *et al.*, 1990]. Speziell für FK506 ist dessen immunsuppressive Wirkung bekannt, so dass die langfristige pharmakologische Regulation der FKBP38-Aktivität mit einer starken Belastung einhergehen könnte [McCaffrey *et al.*, 1993].

Für MAP3K7 konnte die Regulation der Expression von ADAM10 gezeigt werden, während das eng verwandte ADAM17 unbeeinflusst vorlag. Interessanterweise war zusätzlich die APP-Proteolyse beeinflusst, während die Proteolyse anderer ADAM10-Substrate unverändert war. Möglicherweise vermittelt eine direkte Phosphorylierung der ADAM10 C-terminalen Domäne eine spezifische Regulation der Bindung des Substrates APP. Können weitere Experimente tatsächlich eine spezifische Modulation der ADAM10-Aktivität gegenüber APP durch MAP3K7 bestätigen, wäre

diese gerade im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung interessant. Eine Inhibition von MAP3K7 könnte somit Anwendung finden, gezielt die nicht-amyloidogene Proteolyse von APP zu steigern und der Entstehung von A β ₄₂ in der Alzheimer'schen Erkrankung entgegen zu wirken [Vassar *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 2001].

5. Zusammenfassung

Die A Disintegrin und Metalloprotease 10 (ADAM10) gewährleistet über die Proteolyse seiner Substrate die zelluläre Funktionalität. Insbesondere die ADAM10-abhängige Aktivierung des Notch-Signalweges stellt einen wichtigen Schalter für Entwicklungsprozesse dar. Durch die Verwendung verschiedener Gewebespezifischer Knockout-Mausmodelle für ADAM10 wurde die Rolle der Protease untersucht.

Ein ADAM10-Knockout in den Podozyten der Niere hatte keinen unmittelbaren Einfluss auf die Entwicklung und Funktion dieser Zellen. In einem anti-Podozyten-Antikörper-basierten Nephritis-Modell konnte gezeigt werden, dass der podozytäre Verlust von ADAM10 den Krankheitsverlauf verzögert. Ähnlich wie in den Mäusen führte die Antikörper-Behandlung auch im Podozyten-Zellmodell zu einer Schädigung der Zellen, die unabhängig vom Notch-Signalweg erfolgte. Diese Experimente belegten eine verringerte Zell-Zell-Interaktion durch eine ADAM10-vermittelte Proteolyse von Cadherinen, die im Tiermodell möglicherweise zum Verlust der Integrität der Schlitzmembran im Rahmen der Nephritis beiträgt. ADAM10 erscheint daher als ein wichtiger Mediator der Schädigung der Schlitzmembran während der Entwicklung einer Nephritis.

Mäuse mit einer ADAM10-Defizienz in Hepatoblasten, Hepatozyten und Cholangiozyten wiesen Nekrosen des Leberparenchyms auf, die aus einem gestörten Galleabfluss aus der Leber resultierten. Die Notch2-abhängige Entwicklung der Gallengänge war jedoch unauffällig. Stattdessen wurde eine reduzierte Transkription und Expression von Gallensäuretransportern als Ursache der Nekrosen identifiziert. Während der Regeneration der nekrotischen Areale terminierte ADAM10 die Proliferation von Lebervorläuferzellen (LPC) über die Hemmung des HGF/cMet-Signalweges. Die Daten identifizieren ADAM10 als essentiellen Faktor der Leberhomöostase.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem die ADAM10-Interaktoren FK506-bindendes Protein 38 (FKBP38) und TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1, MAP3K7) untersucht. Während FKBP38 den zellulären Transport von ADAM10 regulierte, wurde für MAP3K7 eine Hemmung der *Adam10*-Transkription nachgewiesen. Die

Kinase bewirkte zudem eine spezifische Beeinflussung der ADAM10-vermittelten APP-Proteolyse.

6. Summary

The A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM10) ensures cellular functionality through the proteolysis of integral membrane or GPI-anchored proteins. In this regard the ADAM10-dependent activation of the Notch pathway marks an essential switch in developmental processes. Due to its diverse molecular functions, the role of the protease ADAM10 was investigated using different tissue-specific knockout mice.

ADAM10 deficiency in podocytes of the kidney did not affect the development or the function of these cells. An anti-podocyte antibody-based nephritis model revealed that the loss of ADAM10 delays the progression of the disease. In line with this observation an antibody-treated podocyte cell line also showed signs of cell damage, which was independent of Notch signalling. The cell-based experiments demonstrated that an ADAM10-dependent proteolysis of cadherins caused an impaired cell-cell interaction, possibly explaining the loss of slit diaphragm integrity in the animal model. The study suggests that ADAM10 is an important mediator of slit diaphragm damage during the development of a nephritis.

Mice deficient for ADAM10 in hepatoblasts, hepatocytes and cholangiocytes displayed necrosis in liver parenchyma due to a disturbed bile flow. The Notch2-dependent development of the bile ducts appeared normal. Liver necrosis was caused by a reduced transcription and expression of bile acid transporters. During the regeneration of necrotic areas ADAM10 controlled the proliferation of liver progenitor cells (LPC) through inhibition of the HGF/cMet-pathway. The data indicate that ADAM10 acts as an important regulator of liver tissue homeostasis.

In cell-based experiments, the ADAM10 interacting proteins FK506 binding protein 38 (FKBP38) and TGF- β activated kinase 1 (TAK1, MAP3K7) were analysed. While FKBP38 regulated the cellular transport of ADAM10, MAP3K7 blocked *Adam10* transcription. Additionally, the kinase specifically affected ADAM10-dependent APP proteolysis.



7. Literaturverzeichnis

- Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T.A., Broadway, N., Hartmann, D., Sedlacek, R., Dietrich, S., Muetze, B., Schuster, B., Kallen, K.J., Saftig, P., Rose-John, S., and Ludwig, A. (2004). The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* *172*, 6362-6372.
- Ajibade, A.A., Wang, H.Y., and Wang, R.F. (2013). Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol* *34*, 307-316.
- Akhurst, B., Croager, E.J., Farley-Roche, C.A., Ong, J.K., Dumble, M.L., Knight, B., and Yeoh, G.C. (2001). A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology* *34*, 519-522.
- Altmepfen, H.C., Prox, J., Krasemann, S., Puig, B., Kruszewski, K., Dohler, F., Bernreuther, C., Hoxha, A., Linsenmeier, L., Sikorska, B., Liberski, P.P., Bartsch, U., Saftig, P., and Glatzel, M. (2015). The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *Elife* *4*.
- Amieva, M.R., Wilgenbus, K.K., and Furthmayr, H. (1994). Radixin Is a Component of Hepatocyte Microvilli in-Situ. *Experimental Cell Research* *210*, 140-144.
- Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knauper, V., Docherty, A.J., and Murphy, G. (2000). The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* *473*, 275-279.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Suchy, F.J. (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* *276*, 28857-28865.
- Andereg, U., Eichenberg, T., Parthaune, T., Haiduk, C., Saalbach, A., Milkova, L., Ludwig, A., Grosche, J., Averbek, M., Gebhardt, C., Voelcker, V., Sleeman, J.P., and Simon, J.C. (2009). ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* *129*, 1471-1482.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., and Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* *15*, 1837-1839.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770-776.
- Arthur, M.J., Mann, D.A., and Iredale, J.P. (1998). Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* *13 Suppl*, S33-38.
- Arthur, M.J., Stanley, A., Iredale, J.P., Rafferty, J.A., Hembry, R.M., and Friedman, S.L. (1992). Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J* *287 (Pt 3)*, 701-707.
- Assmann, K.J., Tangelder, M.M., Lange, W.P., Schrijver, G., and Koene, R.A. (1985). Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* *406*, 285-299.
- Bailey, A.M., and Posakony, J.W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* *9*, 2609-2622.

-
- Banasavadi-Siddegowda, Y.K., Mai, J., Fan, Y., Bhattacharya, S., Giovannucci, D.R., Sanchez, E.R., Fischer, G., and Wang, X. (2011). FKBP38 peptidylprolyl isomerase promotes the folding of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **286**, 43071-43080.
- Bao, L., Haas, M., Pippin, J., Wang, Y., Miwa, T., Chang, A., Minto, A.W., Petkova, M., Qiao, G., Song, W.C., Alpers, C.E., Zhang, J., Shankland, S.J., and Quigg, R.J. (2009). Focal and segmental glomerulosclerosis induced in mice lacking decay-accelerating factor in T cells. *J Clin Invest* **119**, 1264-1274.
- Behnia, R., Panic, B., Whyte, J.R., and Munro, S. (2004). Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. *Nat Cell Biol* **6**, 405-413.
- Belizaire, R., Komanduri, C., Wooten, K., Chen, M., Thaller, C., and Janz, R. (2004). Characterization of synaptogyrin 3 as a new synaptic vesicle protein. *J Comp Neurol* **470**, 266-281.
- Benninghoff, A. (1993). *Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen.*, 15th edn (Urban & Schwarzenberg).
- Bird, T.G., Lu, W.Y., Boulter, L., Gordon-Keylock, S., Ridgway, R.A., Williams, M.J., Taube, J., Thomas, J.A., Wojtacha, D., Gambardella, A., Sansom, O.J., Iredale, J.P., and Forbes, S.J. (2013). Bone marrow injection stimulates hepatic ductular reactions in the absence of injury via macrophage-mediated TWEAK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6542-6547.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., and Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
- Blatch, G.L., and Lassar, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 281-291.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X., and Stockler, W. (1993). Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* **331**, 134-140.
- Boulter, L., Govaere, O., Bird, T.G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R.A., Seo, S.S., Spee, B., Van Rooijen, N., Sansom, O.J., Iredale, J.P., Lowell, S., Roskams, T., and Forbes, S.J. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* **18**, 572-579.
- Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R., and Wisse, E. (1986). Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* **6**, 718-722.
- Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 586-599.

- Bridges, L.C., Sheppard, D., and Bowditch, R.D. (2005). ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. *Biochem J* 387, 101-108.
- Brogliè, P., Matsumoto, K., Akira, S., Brautigan, D.L., and Ninomiya-Tsuji, J. (2010). Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) kinase adaptor, TAK1-binding protein 2, plays dual roles in TAK1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of TAK1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway. *J Biol Chem* 285, 2333-2339.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
- Bulgakov, O.V., Eggenschwiler, J.T., Hong, D.H., Anderson, K.V., and Li, T. (2004). FKBP8 is a negative regulator of mouse sonic hedgehog signaling in neural tissues. *Development* 131, 2149-2159.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., and Wong, P.C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Aβ peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234.
- Cai, X.D., Golde, T.E., and Younkin, S.G. (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514-516.
- Cao, Y., Kang, Q., and Zolkiewska, A. (2001). Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with alpha-actinin-1. *Biochem J* 357, 353-361.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.
- Carver, L.A., LaPres, J.J., Jain, S., Dunham, E.E., and Bradfield, C.A. (1998). Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem* 273, 33580-33587.
- Cheng, A., Chan, S.L., Milhavet, O., Wang, S., and Mattson, M.P. (2001). p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells. *J Biol Chem* 276, 43320-43327.
- Cheng, H.T., and Kopan, R. (2005). The role of Notch signaling in specification of podocyte and proximal tubules within the developing mouse kidney. *Kidney Int* 68, 1951-1952.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Clotman, F., Jacquemin, P., Plumb-Rudewicz, N., Pierreux, C.E., Van der Smissen, P., Dietz, H.C., Courtoy, P.J., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2005). Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 19, 1849-1854.
- Clouston, A.D., Powell, E.E., Walsh, M.J., Richardson, M.M., Demetris, A.J., and Jonsson, J.R. (2005). Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 41, 809-818.
- Coward, R.J., Foster, R.R., Patton, D., Ni, L., Lennon, R., Bates, D.O., Harper, S.J., Mathieson, P.W., and Saleem, M.A. (2005). Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 16, 629-637.

-
- Dabeva, M.D., and Shafritz, D.A. (1993). Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 143, 1606-1620.
- Dai, C., Stolz, D.B., Kiss, L.P., Monga, S.P., Holzman, L.B., and Liu, Y. (2009). Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 20, 1997-2008.
- Dandapani, S.V., Sugimoto, H., Matthews, B.D., Kolb, R.J., Sinha, S., Gerszten, R.E., Zhou, J., Ingber, D.E., Kalluri, R., and Pollak, M.R. (2007). Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem* 282, 467-477.
- Davis, R.A., Hyde, P.M., Kuan, J.C., Malone-McNeal, M., and Archambault-Schexnayder, J. (1983). Bile acid secretion by cultured rat hepatocytes. Regulation by cholesterol availability. *J Biol Chem* 258, 3661-3667.
- Dawson, P.A., and Oelkers, P. (1995). Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol* 6, 109-114.
- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Janssen-van Rhijn, C.M., and Litvinov, S.V. (1999). Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 188, 201-206.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- de Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., and Hadchouel, M. (1998). Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 282-287.
- Decaens, T., Godard, C., de Reynies, A., Rickman, D.S., Tronche, F., Couty, J.P., Perret, C., and Colnot, S. (2008). Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. *Hepatology* 47, 247-258.
- Del Monte, G., Grego-Bessa, J., Gonzalez-Rajal, A., Bolos, V., and De La Pompa, J.L. (2007). Monitoring Notch1 activity in development: evidence for a feedback regulatory loop. *Dev Dyn* 236, 2594-2614.
- Deleuze, J.F., Jacquemin, E., Dubuisson, C., Cresteil, D., Dumont, M., Erlinger, S., Bernard, O., and Hadchouel, M. (1996). Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 23, 904-908.
- Denny, W.B., Valentine, D.L., Reynolds, P.D., Smith, D.F., and Scammell, J.G. (2000). Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology* 141, 4107-4113.
- Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121, 140-147.
- Diaz-Rodriguez, E., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., and Pandiella, A. (2002). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13, 2031-2044.
- DiMarino, A.J., Coben, R., Infantolino, A., and Sleisenger, M.H. (2010). Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease : review and assessment, 9th edn (Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier).

- Dooley, S., Hamzavi, J., Breitkopf, K., Wiercinska, E., Said, H.M., Lorenzen, J., Ten Dijke, P., and Gressner, A.M. (2003). Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 125, 178-191.
- Doublier, S., Ruotsalainen, V., Salvidio, G., Lupia, E., Biancone, L., Conaldi, P.G., Reponen, P., Tryggvason, K., and Camussi, G. (2001). Nephritin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 158, 1723-1731.
- Duffy, M.J., Moolooly, M., O'Donovan, N., Sukor, S., Crown, J., Pierce, A., and McGowan, P.M. (2011). The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics* 8, 9.
- Dusterhoft, S., Jung, S., Hung, C.W., Tholey, A., Sonnichsen, F.D., Grotzinger, J., and Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc* 135, 5776-5781.
- Dwivedi, A., Slater, S.C., and George, S.J. (2009). MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby beta-catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 81, 178-186.
- Ebsen, H., Lettau, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2014). Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the α disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *PLoS One* 9, e102899.
- Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghanel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J.U., and Fischer, G. (2005). Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca^{2+} /calmodulin. *EMBO J* 24, 2688-2699.
- Egana, L.A., Cuevas, R.A., Baust, T.B., Parra, L.A., Leak, R.K., Hochendoner, S., Pena, K., Quiroz, M., Hong, W.C., Dorostkar, M.M., Janz, R., Sitte, H.H., and Torres, G.E. (2009). Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *J Neurosci* 29, 4592-4604.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2003). Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* 270, 2386-2393.
- Endres, K., Fahrenholz, F., Lotz, J., Hiemke, C., Teipel, S., Lieb, K., Tuscher, O., and Fellgiebel, A. (2014). Increased CSF APPs- α levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology* 83, 1930-1935.
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122, 809-823.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Espanol-Suner, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin, P., Lemaigre, F., and Leclercq, I.A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 143, 1564-1575 e1567.
- Fan, Y., Yu, Y., Shi, Y., Sun, W., Xie, M., Ge, N., Mao, R., Chang, A., Xu, G., Schneider, M.D., Zhang, H., Fu, S., Qin, J., and Yang, J. (2010). Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor α - and interleukin-1 β -induced IKK/NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *J Biol Chem* 285, 5347-5360.

Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1997). MEKs, GSKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tkfs: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* 7, 67-74.

Farquhar, M.G., Saito, A., Kerjaschki, D., and Orlando, R.A. (1995). The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 6, 35-47.

Ferreiro, I., Joaquin, M., Islam, A., Gomez-Lopez, G., Barragan, M., Lombardia, L., Dominguez, O., Pisano, D.G., Lopez-Bigas, N., Nebreda, A.R., and Posas, F. (2010). Whole genome analysis of p38 SAPK-mediated gene expression upon stress. *BMC Genomics* 11, 144.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fievet, B., Louvard, D., and Arpin, M. (2007). ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 653-660.

Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984). [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta* 43, 1101-1111.

Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-478.

Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L., and Yee, H. (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* 3, e192.

Friedman, S., Levy, R., Garrett, W., Doval, D.C., Bondarde, S., Sahoo, T.P., Lokanatha, D., Julka, P.K., Shenoy, K., Nagarkar, R., Bhattacharyya, G.S., Kumar, K., Nag, S., Mohan, P.R., Narang, N.R., Raghunadharao, D., Walia, M., Yao, W., Li, J., Emm, T., Yeleswaram, S., Scherle, P., and Newton, R. (2009). Clinical Benefit of INCB7839, a Potent and Selective Inhibitor of ADAM10 and ADAM17, in Combination with Trastuzumab in Metastatic HER2 Positive Breast Cancer Patients. *Cancer Research* 69, 783s-784s.

Friedman, S.L., Wei, S., and Blaner, W.S. (1993). Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol* 264, G947-952.

Fu, L., Liu, N., Han, Y., Xie, C., Li, Q., and Wang, E. (2014). ADAM10 regulates proliferation, invasion, and chemoresistance of bladder cancer cells. *Tumour Biol* 35, 9263-9268.

Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882-1896.

Galat, A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* 216, 689-707.

Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276, 37993-38001.

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

- Geisler, F., Nagl, F., Mazur, P.K., Lee, M., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Radtke, F., Schmid, R.M., and Siveke, J.T. (2008). Liver-specific inactivation of Notch2, but not Notch1, compromises intrahepatic bile duct development in mice. *Hepatology* 48, 607-616.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., and Meier, P.J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273, 10046-10050.
- Gibb, D.R., El Shikh, M., Kang, D.J., Rowe, W.J., El Sayed, R., Cichy, J., Yagita, H., Tew, J.G., Dempsey, P.J., Crawford, H.C., and Conrad, D.H. (2010). ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *J Exp Med* 207, 623-635.
- Gingery, A., Bradley, E.W., Pederson, L., Ruan, M., Horwood, N.J., and Oursler, M.J. (2008). TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res* 314, 2725-2738.
- Glasscock, R.J. (2010). The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *Am J Kidney Dis* 56, 157-167.
- Glomski, K., Monette, S., Manova, K., De Strooper, B., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2011). Deletion of Adam10 in endothelial cells leads to defects in organ-specific vascular structures. *Blood* 118, 1163-1174.
- Gluck, Z., and Nolph, K.D. (1987). Ascites associated with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 10, 9-18.
- Goldsack, N.R., Chambers, R.C., Dabbagh, K., and Laurent, G.J. (1998). Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 641-646.
- Gonzales, P.E., Galli, J.D., and Milla, M.E. (2008). Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry* 47, 9911-9919.
- Gonzales, P.E., Solomon, A., Miller, A.B., Leesnitzer, M.A., Sagi, I., and Milla, M.E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem* 279, 31638-31645.
- Gough, P.J., Garton, K.J., Wille, P.T., Rychlewski, M., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2004). A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 172, 3678-3685.
- Grabbe, C., Husnjak, K., and Dikic, I. (2011). The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 295-307.
- Groot, A.J., Habets, R., Yahyanejad, S., Hodin, C.M., Reiss, K., Saftig, P., Theys, J., and Vooijs, M. (2014). Regulated proteolysis of NOTCH2 and NOTCH3 receptors by ADAM10 and presenilins. *Mol Cell Biol* 34, 2822-2832.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., and Zaret, K.S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10, 1670-1682.
- Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., and Jentsch, T.J. (1998). CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8075-8080.

-
- Guo, Q., Wang, Y., Tripathi, P., Manda, K.R., Mukherjee, M., Chaklader, M., Austin, P.F., Surendran, K., and Chen, F. (2015). Adam10 mediates the choice between principal cells and intercalated cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 26, 149-159.
- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lubbert, H., and Meier, P.J. (1991). Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10629-10633.
- Haining, E.J., Yang, J., Bailey, R.L., Khan, K., Collier, R., Tsai, S., Watson, S.P., Frampton, J., Garcia, P., and Tomlinson, M.G. (2012). The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. *J Biol Chem* 287, 39753-39765.
- Han, W., Ji, T., Mei, B., and Su, J. (2011). Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. *Med Hypotheses* 76, 543-546.
- Han, Y.P., Yan, C., Zhou, L., Qin, L., and Tsukamoto, H. (2007). A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem* 282, 12928-12939.
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., and Speicher, D.W. (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544-547.
- Haraldsson, B., Nystrom, J., and Deen, W.M. (2008). Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88, 451-487.
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., and Schreiber, S.L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11, 2615-2624.
- Hartmann, M., Parra, L.M., Ruschel, A., Lindner, C., Morrison, H., Herrlich, A., and Herrlich, P. (2015). Inside-out Regulation of Ectodomain Cleavage of Cluster-of-Differentiation-44 (CD44) and of Neuregulin-1 Requires Substrate Dimerization. *J Biol Chem* 290, 17041-17054.
- Hasuike, S., Ido, A., Uto, H., Moriuchi, A., Tahara, Y., Numata, M., Nagata, K., Hori, T., Hayashi, K., and Tsubouchi, H. (2005). Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 1753-1761.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.
- Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E.R., and Brenner, D.A. (1999). The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 30, 77-87.
- Hendriks, H.F., Verhoofstad, W.A., Brouwer, A., de Leeuw, A.M., and Knook, D.L. (1985). Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res* 160, 138-149.
- Heymann, W., Hackel, D.B., Harwood, S., Wilson, S.G., and Hunter, J.L. (1959). Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med* 100, 660-664.

- Higgins, G.M., and Anderson, R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12, 186–202.
- Hildebrandt, J.-P., Bleckmann, H., and Homberg, U. (2015). *Penzlin - Lehrbuch der Tierphysiologie*, 8th edn (Springer Verlag).
- Hirschfield, G.M., Heathcote, E.J., and Gershwin, M.E. (2010). Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 139, 1481-1496.
- Hoffmans, R., Stadel, R., and Basler, K. (2005). Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin. *Curr Biol* 15, 1207-1211.
- Hofmann, J.J., Zovein, A.C., Koh, H., Radtke, F., Weinmaster, G., and Iruela-Arispe, M.L. (2010). Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: insights into Alagille syndrome. *Development* 137, 4061-4072.
- Holzman, L.B., St John, P.L., Kovari, I.A., Verma, R., Holthofer, H., and Abrahamson, D.R. (1999). Nephritin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 56, 1481-1491.
- Howard, L., Maciewicz, R.A., and Blobel, C.P. (2000). Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J* 348 Pt 1, 21-27.
- Huber, T.B., Kwok, C., Wu, H., Asanuma, K., Godel, M., Hartleben, B., Blumer, K.J., Miner, J.H., Mundel, P., and Shaw, A.S. (2006). Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin. *J Clin Invest* 116, 1337-1345.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., Vries, R.G., Grompe, M., and Clevers, H. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247-250.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.J., Rose-John, S., and Ludwig, A. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102, 1186-1195.
- Hundhausen, C., Schulte, A., Schulz, B., Andrzejewski, M.G., Schwarz, N., von Hundelshausen, P., Winter, U., Paliga, K., Reiss, K., Saftig, P., Weber, C., and Ludwig, A. (2007). Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol* 178, 8064-8072.
- Huppert, S.S., Le, A., Schroeter, E.H., Mumm, J.S., Saxena, M.T., Milner, L.A., and Kopan, R. (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature* 405, 966-970.
- Ichihara, S., Beppu, N., and Mizushima, S. (1984). Protease IV, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*, has signal peptide peptidase activity. *J Biol Chem* 259, 9853-9857.
- Idris, A.I., Libouban, H., Nyangoga, H., Landao-Bassonga, E., Chappard, D., and Ralston, S.H. (2009). Pharmacologic inhibitors of I κ B kinase suppress growth and migration of mammary carcinosarcoma cells in vitro and prevent osteolytic bone metastasis in vivo. *Mol Cancer Ther* 8, 2339-2347.

Iglesias, D.M., Hueber, P.A., Chu, L., Campbell, R., Patenaude, A.M., Dziarmaga, A.J., Quinlan, J., Mohamed, O., Dufort, D., and Goodyer, P.R. (2007). Canonical WNT signaling during kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F494-500.

Inagaki, M., Omori, E., Kim, J.Y., Komatsu, Y., Scott, G., Ray, M.K., Yamada, G., Matsumoto, K., Mishina, Y., and Ninomiya-Tsuji, J. (2008). TAK1-binding protein 1, TAB1, mediates osmotic stress-induced TAK1 activation but is dispensable for TAK1-mediated cytokine signaling. *J Biol Chem* 283, 33080-33086.

Inagaki, Y., Mamura, M., Kanamaru, Y., Greenwel, P., Nemoto, T., Takehara, K., Ten Dijke, P., and Nakao, A. (2001). Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 187, 117-123.

Inoue, T., Yaoita, E., Kurihara, H., Shimizu, F., Sakai, T., Kobayashi, T., Ohshiro, K., Kawachi, H., Okada, H., Suzuki, H., Kihara, I., and Yamamoto, T. (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney International* 59, 1003-1012.

Ishii, M., Vroman, B., and LaRusso, N.F. (1989). Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology* 97, 1236-1247.

Ishikawa, T., Factor, V.M., Marquardt, J.U., Raggi, C., Seo, D., Kitade, M., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2012). Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 55, 1215-1226.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138, 181-192.

Jadrich, J.L., O'Connor, M.B., and Coucouvanis, E. (2006). The TGF beta activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo. *Development* 133, 1529-1541.

Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., Hernandez, H., Jang, G.M., Roth, S.L., Akiva, E., Marlett, J., Stephens, M., D'Orso, I., Fernandes, J., Fahey, M., Mahon, C., O'Donoghue, A.J., Todorovic, A., Morris, J.H., Maltby, D.A., Alber, T., Cagney, G., Bushman, F.D., Young, J.A., Chanda, S.K., Sundquist, W.I., Kortemme, T., Hernandez, R.D., Craik, C.S., Burlingame, A., Sali, A., Frankel, A.D., and Krogan, N.J. (2012). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 481, 365-370.

Jakubowski, A., Ambrose, C., Parr, M., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., Zheng, T.S., Browning, B., Michaelson, J.S., Baetscher, M., Wang, B., Bissell, D.M., and Burkly, L.C. (2005). TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 115, 2330-2340.

James, M., Nguyen, T.M., Wise, C.J., Jones, G.E., and Morris, G.E. (1996). Utrophin-dystroglycan complex in membranes of adherent cultured cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 33, 163-174.

Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.P., Lackmann, M., and Nikolov, D.B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, 291-304.

Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquie, O., Logeat, F., Strong, C.F., Brou, C., Seidah, N.G., and Isra I, A. (1998). Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol* 18, 7423-7431.

- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Hummel-Eisenbeiss, J., Burchell, B., and Keppler, D. (1997). ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* 327 (Pt 1), 305-310.
- Jeliazkova, P., Jors, S., Lee, M., Zimmer-Strobl, U., Ferrer, J., Schmid, R.M., Siveke, J.T., and Geisler, F. (2013). Canonical Notch2 signaling determines biliary cell fates of embryonic hepatoblasts and adult hepatocytes independent of Hes1. *Hepatology* 57, 2469-2479.
- Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22, 1172-1183.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K., and Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol* 22, 7158-7167.
- Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10340-10344.
- Jones, A.V., Lambert, D.W., Speight, P.M., and Whawell, S.A. (2013). ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with alphavbeta6 integrin. *FEBS Lett* 587, 3529-3534.
- Jonker, J.W., Stedman, C.A., Liddle, C., and Downes, M. (2009). Hepatobiliary ABC transporters: physiology, regulation and implications for disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 4904-4920.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C.P., Glatzel, M., De Strooper, B., and Saftig, P. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 30, 4833-4844.
- Kamasawa, N., Sik, A., Morita, M., Yasumura, T., Davidson, K.G., Nagy, J.I., and Rash, J.E. (2005). Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience* 136, 65-86.
- Kaplan, J.M., Kim, S.H., North, K.N., Rennke, H., Correia, L.A., Tong, H.Q., Mathis, B.J., Rodriguez-Perez, J.C., Allen, P.G., Beggs, A.H., and Pollak, M.R. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24, 251-256.
- Karaca, G., Swiderska-Syn, M., Xie, G., Syn, W.K., Kruger, L., Machado, M.V., Garman, K., Choi, S.S., Michelotti, G.A., Burkly, L.C., Ochoa, B., and Diehl, A.M. (2014). TWEAK/Fn14 signaling is required for liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *PLoS One* 9, e83987.
- Katayama, S., Tateno, C., Asahara, T., and Yoshizato, K. (2001). Size-dependent in vivo growth potential of adult rat hepatocytes. *Am J Pathol* 158, 97-105.
- Kato, H., Gruenwald, A., Suh, J.H., Miner, J.H., Barisoni-Thomas, L., Taketo, M.M., Faul, C., Millar, S.E., Holzman, L.B., and Susztak, K. (2011). Wnt/beta-catenin pathway in podocytes integrates cell adhesion, differentiation, and survival. *J Biol Chem* 286, 26003-26015.
- Kawano, K., Kantak, S.S., Murai, M., Yao, C.C., and Kramer, R.H. (2001). Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 262, 180-196.

-
- Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schutz, G., and Tronche, F. (2000). Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* 26, 151-153.
- Kerjaschki, D. (1978). Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B. *Lab Invest* 39, 430-440.
- Kerjaschki, D., and Farquhar, M.G. (1983). Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 157, 667-686.
- Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661, 3-38.
- Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., and Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1, 575-582.
- Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., and Tsukita, S. (2002). Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 31, 320-325.
- Kim, S.E., Huang, H., Zhao, M., Zhang, X., Zhang, A., Semonov, M.V., MacDonald, B.T., Garcia Abreu, J., Peng, L., and He, X. (2013). Wnt stabilization of beta-catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science* 340, 867-870.
- Kirsch, K.H., Georgescu, M.M., Ishimaru, S., and Hanafusa, H. (1999). CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6211-6216.
- Kishimoto, K., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2000). TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem* 275, 7359-7364.
- Knittel, T., Janneck, T., Muller, L., Fellmer, P., and Ramadori, G. (1996). Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology* 24, 352-360.
- Knittel, T., Mehde, M., Kobold, D., Saile, B., Dinter, C., and Ramadori, G. (1999). Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 30, 48-60.
- Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K., and Chiba, T. (2004). The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 127, 1775-1786.
- Kohler, C., Bell, A.W., Bowen, W.C., Monga, S.P., Fleig, W., and Michalopoulos, G.K. (2004). Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 39, 1056-1065.
- Kojima, H., Sakurai, S., Uemura, M., Kitamura, K., Kanno, H., Nakai, Y., and Fukui, H. (2008). Disturbed colocalization of multidrug resistance protein 2 and radixin in human cholestatic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 23, e120-128.
- Kojima, K., Davidovits, A., Poczewski, H., Langer, B., Uchida, S., Nagy-Bojarski, K., Hovorka, A., Sedivy, R., and Kerjaschki, D. (2004). Podocyte flattening and disorder of glomerular basement membrane are associated with splitting of dystroglycan-matrix interaction. *J Am Soc Nephrol* 15, 2079-2089.

- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5815-5820.
- Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O.R., Ister, D., Pennington, C.J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.W., Antolovic, D., Brew, K., Nagase, H., Stangl, M., von Weyhern, C.W., Brucher, B.L., Brand, K., Coussens, L.M., Edwards, D.R., and Kruger, A. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* 67, 8615-8623.
- Kos, C.H., Le, T.C., Sinha, S., Henderson, J.M., Kim, S.H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R.E., and Pollak, M.R. (2003). Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 111, 1683-1690.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S., and Basler, K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109, 47-60.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L., and Gridley, T. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14, 1343-1352.
- Kreidberg, J.A., Donovan, M.J., Goldstein, S.L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R.C., and Jaenisch, R. (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122, 3537-3547.
- Kretzler, M., Koeppen-Hagemann, I., and Kriz, W. (1994). Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Arch* 425, 181-193.
- Krishna, M. (2013). Microscopic anatomy of the liver. *Clinical Liver Disease* 2, S4-S7.
- Kriz, W., Hackenthal, E., Nobiling, R., Sakai, T., Elger, M., and Hahnel, B. (1994). A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney Int* 45, 369-376.
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., and Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 11, e1004651.
- Kuhn, P.H., Colombo, A.V., Schusser, B., Drey Mueller, D., Wetzel, S., Schepers, U., Herber, J., Ludwig, A., Kremmer, E., Montag, D., Muller, U., Schweizer, M., Saftig, P., Brase, S., and Lichtenthaler, S.F. (2016). Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. *Elife* 5.
- Kullak-Ublick, G.A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. (1994). Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. *Hepatology* 20, 411-416.
- Kunsch, C., Lang, R.K., Rosen, C.A., and Shannon, M.F. (1994). Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 153, 153-164.
- Kuramitsu, K., Sverdlov, D.Y., Liu, S.B., Csizmadia, E., Burkly, L., Schuppan, D., Hanto, D.W., Otterbein, L.E., and Popov, Y. (2013). Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am J Pathol* 183, 182-194.

-
- Laakkonen, H., Lonqvist, T., Uusimaa, J., Qvist, E., Valanne, L., Nuutinen, M., Ala-Houhala, M., Majamaa, K., Jalanko, H., and Holmberg, C. (2006). Muscular dystonia and athetosis in six patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1). *Pediatr Nephrol* 21, 182-189.
- Laenger, A., Lang-Rollin, I., Kozany, C., Zschocke, J., Zimmermann, N., Ruegg, J., Holsboer, F., Hausch, F., and Rein, T. (2009). XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells. *FEBS Lett* 583, 1493-1498.
- Lam, E., Martin, M., and Wiederrecht, G. (1995). Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. *Gene* 160, 297-302.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.
- Lang, C., Meier, Y., Stieger, B., Beuers, U., Lang, T., Kerb, R., Kullak-Ublick, G.A., Meier, P.J., and Pauli-Magnus, C. (2007). Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics* 17, 47-60.
- Lasagni, L., Ballerini, L., Angelotti, M.L., Parente, E., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Peired, A., Ronconi, E., Becherucci, F., Bani, D., Gacci, M., Carini, M., Lazzeri, E., and Romagnani, P. (2010). Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders. *Stem Cells* 28, 1674-1685.
- Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D.A., Niu, X.D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., and Blobel, C.P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *Journal of Cell Science* 123, 3913-3922.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17, 1807-1819.
- Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* 9, 2598-2608.
- Lehtonen, S., Zhao, F., and Lehtonen, E. (2002). CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F734-743.
- Lemaigre, F.P. (2003). Development of the biliary tract. *Mech Dev* 120, 81-87.
- Lemjabbar-Alaoui, H., Sidhu, S.S., Mengistab, A., Gallup, M., and Basbaum, C. (2011). TACE/ADAM-17 phosphorylation by PKC-epsilon mediates premalignant changes in tobacco smoke-exposed lung cells. *PLoS One* 6, e17489.
- Li, M.G., Katsura, K., Nomiya, H., Komaki, K., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Kobayashi, T., and Tamura, S. (2003). Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon). *J Biol Chem* 278, 12013-12021.
- Li, S., Wang, L., and Dorf, M.E. (2009). PKC phosphorylation of TRAF2 mediates IKKalpha/beta recruitment and K63-linked polyubiquitination. *Mol Cell* 33, 30-42.

- Li, S.Y., Huang, P.H., Yang, A.H., Tarnag, D.C., Yang, W.C., Lin, C.C., Chen, J.W., Schmid-Schonbein, G., and Lin, S.J. (2014). Matrix metalloproteinase-9 deficiency attenuates diabetic nephropathy by modulation of podocyte functions and dedifferentiation. *Kidney Int* **86**, 358-369.
- Libbrecht, L., Spinner, N.B., Moore, E.C., Cassiman, D., Van Damme-Lombaerts, R., and Roskams, T. (2005). Peripheral bile duct paucity and cholestasis in the liver of a patient with Alagille syndrome: further evidence supporting a lack of postnatal bile duct branching and elongation. *Am J Surg Pathol* **29**, 820-826.
- Lichtenthaler, S.F. (2011). alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* **116**, 10-21.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-847.
- Liu, G., Kaw, B., Kurfis, J., Rahmanuddin, S., Kanwar, Y.S., and Chugh, S.S. (2003). Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* **112**, 209-221.
- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.
- Liu, Y.W., Lee, S.W., and Lee, F.J. (2006). Arl1p is involved in transport of the GPI-anchored protein Gas1p from the late Golgi to the plasma membrane. *J Cell Sci* **119**, 3845-3855.
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (1999). Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem* **274**, 13427-13433.
- Lopez, E., Berna-Erro, A., Salido, G.M., Rosado, J.A., and Redondo, P.C. (2015). FKBP25 and FKBP38 regulate non-capacitative calcium entry through TRPC6. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 2684-2696.
- Lorenzen, I., Lokau, J., Dusterhoft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., and Grotzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* **586**, 1093-1100.
- Lu, W.Y., Bird, T.G., Boulter, L., Tsuchiya, A., Cole, A.M., Hay, T., Guest, R.V., Wojtacha, D., Man, T.Y., Mackinnon, A., Ridgway, R.A., Kendall, T., Williams, M.J., Jamieson, T., Raven, A., Hay, D.C., Iredale, J.P., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Forbes, S.J. (2015). Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol* **17**, 971-983.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., and Becherer, J.D. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**, 161-171.
- Lüllmann-Rauch, R., and Paulsen, F. (2012). Taschenlehrbuch Histologie, 4th Edition edn (Thieme Verlag).
- Lum, L., Reid, M.S., and Blobel, C.P. (1998). Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem* **273**, 26236-26247.

-
- Ma, J., Tang, X., Wong, P., Jacobs, B., Borden, E.C., and Bedogni, B. (2014). Noncanonical activation of Notch1 protein by membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) controls melanoma cell proliferation. *J Biol Chem* 289, 8442-8449.
- Maestre-Martinez, M., Edlich, F., Jarczowski, F., Weiwad, M., Fischer, G., and Lucke, C. (2006). Solution structure of the FK506-binding domain of human FKBP38. *J Biomol NMR* 34, 197-202.
- Maestre-Martinez, M., Haupt, K., Edlich, F., Jahreis, G., Jarczowski, F., Erdmann, F., Fischer, G., and Lucke, C. (2010). New structural aspects of FKBP38 activation. *Biol Chem* 391, 1157-1167.
- Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., and Maronpot, R.R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 33, 27-34.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarnier, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., and Robakis, N.K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21, 1948-1956.
- Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., and Robakis, N.K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114, 635-645.
- Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A., and Di Luca, M. (2007). Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci* 27, 1682-1691.
- Marcinkiewicz, M., and Seidah, N.G. (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 75, 2133-2143.
- Maretzky, T., Evers, A., Le Gall, S., Alabi, R.O., Speck, N., Reiss, K., and Blobel, C.P. (2015). The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding. *J Biol Chem* 290, 7416-7425.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9182-9187.
- Matovinović, M.S. (2009). Podocyte Injury in Glomerular Diseases (eJIFCC).
- Matsui, I., Ito, T., Kurihara, H., Imai, E., Ogihara, T., and Hori, M. (2007). Snail, a transcriptional regulator, represses nephrin expression in glomerular epithelial cells of nephrotic rats. *Lab Invest* 87, 273-283.
- Matsumoto, K., Miki, R., Nakayama, M., Tatsumi, N., and Yokouchi, Y. (2008). Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. *Dev Biol* 319, 234-247.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., and Zaret, K.S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294, 559-563.

- Mauad, T.H., van Nieuwkerk, C.M., Dingemans, K.P., Smit, J.J., Schinkel, A.H., Notenboom, R.G., van den Bergh Weerman, M.A., Verkruijzen, R.P., Groen, A.K., Oude Elferink, R.P., and et al. (1994). Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 145, 1237-1245.
- McCaffrey, P.G., Perrino, B.A., Soderling, T.R., and Rao, A. (1993). NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 268, 3747-3752.
- McDaniell, R., Warthen, D.M., Sanchez-Lara, P.A., Pai, A., Krantz, I.D., Piccoli, D.A., and Spinner, N.B. (2006). NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 79, 169-173.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366.
- McGuire, R.F., Bissell, D.M., Boyles, J., and Roll, F.J. (1992). Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* 15, 989-997.
- McMillan, J.I., Riordan, J.W., Couser, W.G., Pollock, A.S., and Lovett, D.H. (1996). Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *J Clin Invest* 97, 1094-1101.
- Means, A.L., Xu, Y., Zhao, A., Ray, K.C., and Gu, G. (2008). A CK19(CreERT) knockin mouse line allows for conditional DNA recombination in epithelial cells in multiple endodermal organs. *Genesis* 46, 318-323.
- Mentrup, T., Hasler, R., Fluhrer, R., Saftig, P., and Schroder, B. (2015). A Cell-Based Assay Reveals Nuclear Translocation of Intracellular Domains Released by SPPL Proteases. *Traffic* 16, 871-892.
- Meyer-Schwesinger, C., Dehde, S., Klug, P., Becker, J.U., Mathey, S., Arefi, K., Balabanov, S., Venz, S., Endlich, K.H., Pekna, M., Gessner, J.E., Thaiss, F., and Meyer, T.N. (2011). Nephrotic syndrome and subepithelial deposits in a mouse model of immune-mediated anti-podocyte glomerulonephritis. *J Immunol* 187, 3218-3229.
- Mezyk-Kopec, R., Bzowska, M., Stalinska, K., Chelmicki, T., Podkalicki, M., Jucha, J., Kowalczyk, K., Mak, P., and Bereta, J. (2009). Identification of ADAM10 as a major TNF sheddase in ADAM17-deficient fibroblasts. *Cytokine* 46, 309-315.
- Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213, 286-300.
- Michaud, J.L., Lemieux, L.I., Dube, M., Vanderhyden, B.C., Robertson, S.J., and Kennedy, C.R. (2003). Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol* 14, 1200-1211.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Grappone, C., Pellegrini, G., Pinzani, M., Casini, A., Calabro, A., Ciancio, G., Stefanini, F., and et al. (1994). Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 144, 528-537.
- Milla, M.E., Gonzales, P.E., and Leonard, J.D. (2006). The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem Biophys* 44, 342-348.

-
- Minato, Y., Hasumura, Y., and Takeuchi, J. (1983). The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 3, 559-566.
- Minond, D., Cudic, M., Bionda, N., Giulianotti, M., Maida, L., Houghten, R.A., and Fields, G.B. (2012). Discovery of novel inhibitors of a disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) using glycosylated and non-glycosylated substrates. *J Biol Chem* 287, 36473-36487.
- Mizuno, S., Yoda, M., Shimoda, M., Tohmonda, T., Okada, Y., Toyama, Y., Takeda, S., Nakamura, M., Matsumoto, M., and Horiuchi, K. (2015). A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Is Indispensable for Maintenance of the Muscle Satellite Cell Pool. *Journal of Biological Chemistry* 290, 28456-28464.
- Mochizuki, S., and Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 98, 621-628.
- Moeller, M.J., Sanden, S.K., Soofi, A., Wiggins, R.C., and Holzman, L.B. (2003). Podocyte-specific expression of Cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 35, 39-42.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., and Hagiwara, M. (1996a). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* 271, 13675-13679.
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Gotoh, Y., Iwamatsu, A., Irie, K., Mori, E., Kuroyanagi, N., Hagiwara, M., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1996b). Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor-alpha, and H₂O₂. *J Biol Chem* 271, 26981-26988.
- Morris, B.J. (1978). Activation of human inactive ("pro-") renin by cathepsin D and pepsin. *J Clin Endocrinol Metab* 46, 153-157.
- Moss, M.L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P.M., Gillispie, P.A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J.W., Palmisano, R., and Zhou, P. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* 282, 35712-35721.
- Mukerji, N., Damodaran, T.V., and Winn, M.P. (2007). TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. *Biochim Biophys Acta* 1772, 859-868.
- Müller, M. (2015). The role of a disintegrin and metalloprotease 10 in the liver. Christian-Albrechts-Universität, Kiel (Dissertation).
- Mullooly, M., McGowan, P.M., Kennedy, S.A., Madden, S.F., Crown, J., N, O.D., and Duffy, M.J. (2015). ADAM10: a new player in breast cancer progression? *Br J Cancer* 113, 945-951.
- Mundel, P., Heid, H.W., Mundel, T.M., Kruger, M., Reiser, J., and Kriz, W. (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139, 193-204.
- Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M., and Sato, C. (2011). Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration. *J Biol Chem* 286, 1999-2007.
- Murakami, D., Okamoto, I., Nagano, O., Kawano, Y., Tomita, T., Iwatsubo, T., De Strooper, B., Yumoto, E., and Saya, H. (2003). Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* 22, 1511-1516.

- Murea, M., Park, J.K., Sharma, S., Kato, H., Gruenwald, A., Niranjana, T., Si, H., Thomas, D.B., Pullman, J.M., Melamed, M.L., and Susztak, K. (2010). Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function. *Kidney Int* 78, 514-522.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 8, 929-941.
- Murphy, W.M., Moretta, F.L., and Jukkola, A.F. (1979). Epithelial foot-process effacement in patients with proteinuria. *Am J Clin Pathol* 72, 529-532.
- Murthy, A., Shao, Y.W., Narala, S.R., Molyneux, S.D., Zuniga-Pflucker, J.C., and Khokha, R. (2012). Notch activation by the metalloproteinase ADAM17 regulates myeloproliferation and atopic barrier immunity by suppressing epithelial cytokine synthesis. *Immunity* 36, 105-119.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M., and Saya, H. (2004). Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca²⁺ influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165, 893-902.
- Nakajima, O., Nakamura, F., Yamashita, N., Tomita, Y., Suto, F., Okada, T., Iwamatsu, A., Kondo, E., Fujisawa, H., Takei, K., and Goshima, Y. (2006). FKBP133: a novel mouse FK506-binding protein homolog alters growth cone morphology. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 140-149.
- Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., and et al. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 10, 2867-2878.
- Ni, L., Yang, C.S., Gioeli, D., Frierson, H., Toft, D.O., and Paschal, B.M. (2010). FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Mol Cell Biol* 30, 1243-1253.
- Nie, Q.H., Duan, G.R., Luo, X.D., Xie, Y.M., Luo, H., Zhou, Y.X., and Pan, B.R. (2004). Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 10, 86-90.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., and Matsumoto, K. (2003). A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* 278, 18485-18490.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
- Niranjana, T., Bielez, B., Gruenwald, A., Ponda, M.P., Kopp, J.B., Thomas, D.B., and Susztak, K. (2008). The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nat Med* 14, 290-298.
- Nouwen, E.J., Dauwe, S., van der Biest, I., and De Broe, M.E. (1993). Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int* 44, 147-158.

-
- Noy, P.J., Yang, J., Reyat, J.S., Matthews, A.L., Charlton, A.E., Furmston, J., Rogers, D.A., Rainger, G.E., and Tomlinson, M.G. (2016). TspanC8 Tetraspanins and A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Interact via Their Extracellular Regions: EVIDENCE FOR DISTINCT BINDING MECHANISMS FOR DIFFERENT TspanC8 PROTEINS. *J Biol Chem* 291, 3145-3157.
- O'Brien, R.J., and Wong, P.C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34, 185-204.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18, 2196-2207.
- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., and Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136, 1951-1960.
- Omori, E., Matsumoto, K., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Smart, R.C., and Ninomiya-Tsuji, J. (2006). TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 281, 19610-19617.
- Pan, Y., Han, C., Wang, C., Hu, G., Luo, C., Gan, X., Zhang, F., Lu, Y., and Ding, X. (2012). ADAM10 promotes pituitary adenoma cell migration by regulating cleavage of CD44 and L1. *J Mol Endocrinol* 49, 21-33.
- Perkinson, D.T., Baker, P.J., Couser, W.G., Johnson, R.J., and Adler, S. (1985). Membrane attack complex deposition in experimental glomerular injury. *Am J Pathol* 120, 121-128.
- Pinzani, M., Gesualdo, L., Sabbah, G.M., and Abboud, H.E. (1989). Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 84, 1786-1793.
- Plopper, G., and Ingber, D.E. (1993). Rapid induction and isolation of focal adhesion complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 571-578.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenue, A., Godaux, E., van Leuven, F., and Fahrenholz, F. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113, 1456-1464.
- Prox, J. (2012). Funktions- und Regulationsanalyse der zinkabhängigen Metalloprotease ADAM10, der bei der Alzheimer Demenz beteiligten α -Sekretase. Christian-Albrechts-Universität, Kiel (Dissertation).
- Prox, J., Bernreuther, C., Altmepfen, H., Grendel, J., Glatzel, M., D'Hooge, R., Stroobants, S., Ahmed, T., Balschun, D., Willem, M., Lammich, S., Isbrandt, D., Schweizer, M., Horre, K., De Strooper, B., and Saftig, P. (2013). Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J Neurosci* 33, 12915-12928, 12928a.
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., and Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 69, 2919-2932.
- Putaala, H., Soininen, R., Kilpelainen, P., Wartiovaara, J., and Tryggvason, K. (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 10, 1-8.

- Raats, C.J., van den Born, J., Bakker, M.A., Oppers-Walgreen, B., Pisa, B.J., Dijkman, H.B., Assmann, K.J., and Berden, J.H. (2000). Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 156, 1749-1765.
- Rahfeld, J.U., Rucknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., and Fischer, G. (1994). Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett* 352, 180-184.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-7426.
- Ramakrishna, G., Rastogi, A., Trehanpati, N., Sen, B., Khosla, R., and Sarin, S.K. (2013). From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver Cancer* 2, 367-383.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt 1), 205-218.
- Ray, A., Dhar, S., and Ray, B.K. (2010). Transforming growth factor-beta1-mediated activation of NF-kappaB contributes to enhanced ADAM-12 expression in mammary carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 8, 1261-1270.
- Reid, K.B., and Porter, R.R. (1981). The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem* 50, 433-464.
- Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M., and Mundel, P. (2000). The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *Journal of the American Society of Nephrology* 11, 1-8.
- Reiss, K., Maretzky, T., Haas, I.G., Schulte, M., Ludwig, A., Frank, M., and Saftig, P. (2006). Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281, 21735-21744.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24, 742-752.
- Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 263, 1149-1152.
- Rodewald, R., and Karnovsky, M.J. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60, 423-433.
- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., and Blobel, C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274, 3531-3540.
- Roselli, S., Heidet, L., Sich, M., Henger, A., Kretzler, M., Gubler, M.C., and Antignac, C. (2004). Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24, 550-560.
- Rosen, M.K., Standaert, R.F., Galat, A., Nakatsuka, M., and Schreiber, S.L. (1990). Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate. *Science* 248, 863-866.

-
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., and Zaret, K.S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.
- Rostgaard, J., and Qvortrup, K. (1997). Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc Res* 53, 1-13.
- Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestila, M., Jalanko, H., Holmberg, C., and Tryggvason, K. (1999). Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7962-7967.
- Saftig, P., and Reiss, K. (2011). The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol* 90, 527-535.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, 769-779.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., and Sugita, T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474, 141-145.
- Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 278, 36916-36923.
- Saleem, M.A., Ni, L., Witherden, I., Tryggvason, K., Ruotsalainen, V., Mundel, P., and Mathieson, P.W. (2002). Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol* 161, 1459-1466.
- Saraceno, C., Marcello, E., Di Marino, D., Borroni, B., Claeysen, S., Perroy, J., Padovani, A., Tramontano, A., Gardoni, F., and Di Luca, M. (2014). SAP97-mediated ADAM10 trafficking from Golgi outposts depends on PKC phosphorylation. *Cell Death Dis* 5, e1547.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-1095.
- Sayama, K., Hanakawa, Y., Nagai, H., Shirakata, Y., Dai, X., Hirakawa, S., Tokumaru, S., Tohyama, M., Yang, L., Sato, S., Shizuo, A., and Hashimoto, K. (2006). Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 is essential for differentiation and the prevention of apoptosis in epidermis. *J Biol Chem* 281, 22013-22020.
- Schaffner, F., and Poper, H. (1963). Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 44, 239-242.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 157-162.
- Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M.L., Becherer, J.D., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Kruger, A. (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* 285, 26335-26340.
- Schiffer, M., Bitzer, M., Roberts, I.S., Kopp, J.B., ten Dijke, P., Mundel, P., and Bottinger, E.P. (2001). Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 108, 807-816.

- Schiwek, D., Endlich, N., Holzman, L., Holthofer, H., Kriz, W., and Endlich, K. (2004). Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int* 66, 91-101.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., Kulik, M., Sherwood, S., Tallheden, T., Cheng, N., Furth, M.E., and Reid, L.M. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204, 1973-1987.
- Schmidt, R.F., and Thews, G.T. (1995). *Physiologie des Menschen*, 26th edn (Springer Verlag).
- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
- Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., and Brenner, D.A. (2003). c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 37, 824-832.
- Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M.A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A.S., Holzman, L.B., and Mundel, P. (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108, 1621-1629.
- Sellin, L., Huber, T.B., Gerke, P., Quack, I., Pavenstadt, H., and Walz, G. (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 17, 115-117.
- Sethi, G., Ahn, K.S., Pandey, M.K., and Aggarwal, B.B. (2007). Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kappaB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kappaB activation. *Blood* 109, 2727-2735.
- Setty, S.R., Strohlic, T.I., Tong, A.H., Boone, C., and Burd, C.G. (2004). Golgi targeting of ARF-like GTPase Arl3p requires its Nalpha-acetylation and the integral membrane protein Sys1p. *Nat Cell Biol* 6, 414-419.
- Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1996). TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.
- Shichi, K., Fujita-Hamabe, W., Harada, S., Mizoguchi, H., Yamada, K., Nabeshima, T., and Tokuyama, S. (2011). Involvement of matrix metalloproteinase-mediated proteolysis of neural cell adhesion molecule in the development of cerebral ischemic neuronal damage. *J Pharmacol Exp Ther* 338, 701-710.
- Shih, N.Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J.H., and Shaw, A.S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.
- Shin, S., Walton, G., Aoki, R., Brondell, K., Schug, J., Fox, A., Smirnova, O., Dorrell, C., Erker, L., Chu, A.S., Wells, R.G., Grompe, M., Greenbaum, L.E., and Kaestner, K.H. (2011). Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential. *Genes Dev* 25, 1185-1192.
- Shiota, G., Wang, T.C., Nakamura, T., and Schmidt, E.V. (1994). Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 19, 962-972.
- Shirane, M., and Nakayama, K.I. (2003). Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 28-37.

-
- Shirato, I., Sakai, T., Kimura, K., Tomino, Y., and Kriz, W. (1996). Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol* *148*, 1283-1296.
- Shoval, I., Ludwig, A., and Kalcheim, C. (2007). Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development* *134*, 491-501.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* *18*, 175-189.
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* *15*, 2321-2342.
- Simons, M., Schwarz, K., Kriz, W., Miettinen, A., Reiser, J., Mundel, P., and Holthofer, H. (2001). Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol* *159*, 1069-1077.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M.A., and et al. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* *75*, 451-462.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W., and Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* *118*, 2371-2380.
- Sotillos, S., Roch, F., and Campuzano, S. (1997). The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* *124*, 4769-4779.
- Sparks, E.E., Huppert, K.A., Brown, M.A., Washington, M.K., and Huppert, S.S. (2010). Notch signaling regulates formation of the three-dimensional architecture of intrahepatic bile ducts in mice. *Hepatology* *51*, 1391-1400.
- Spasic, D., and Annaert, W. (2008). Building gamma-secretase: the bits and pieces. *J Cell Sci* *121*, 413-420.
- Spicer, S.T., Tran, G.T., Killingsworth, M.C., Carter, N., Power, D.A., Paizis, K., Boyd, R., Hodgkinson, S.J., and Hall, B.M. (2007). Induction of passive Heymann nephritis in complement component 6-deficient PVG rats. *J Immunol* *179*, 172-178.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* *1*, 4.
- Stadeli, R., and Basler, K. (2005). Dissecting nuclear Wingless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech Dev* *122*, 1171-1182.
- Standaert, R.F., Galat, A., Verdine, G.L., and Schreiber, S.L. (1990). Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature* *346*, 671-674.
- Steiner, J.P., Dawson, T.M., Fotuhi, M., Glatt, C.E., Snowman, A.M., Cohen, N., and Snyder, S.H. (1992). High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature* *358*, 584-587.

- Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., and Thompson, R.J. (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 20, 233-238.
- Strazzabosco, M., Joplin, R., Zsembery, A., Wallace, L., Spirli, C., Fabris, L., Granato, A., Rossanese, A., Poci, C., Neuberger, J.M., Okolicsanyi, L., and Crepaldi, G. (1997). Na(+)-dependent and -independent Cl-/HCO₃⁻ exchange mediate cellular HCO₃⁻ transport in cultured human intrahepatic bile duct cells. *Hepatology* 25, 976-985.
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., and Greene, W.C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-1915.
- Suzuki, A., Sekiya, S., Onishi, M., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2008). Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48, 1964-1978.
- Symowicz, J., Adley, B.P., Gleason, K.J., Johnson, J.J., Ghosh, S., Fishman, D.A., Hudson, L.G., and Stack, M.S. (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 67, 2030-2039.
- Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5, 649-658.
- Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Kishida, S., Li, X., Stark, G.R., and Matsumoto, K. (2001). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21, 2475-2484.
- Takaesu, G., Surabhi, R.M., Park, K.J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Gaynor, R.B. (2003). TAK1 is critical for I kappa B kinase-mediated activation of the NF-kappa B pathway. *J Mol Biol* 326, 105-115.
- Takase, H.M., Itoh, T., Ino, S., Wang, T., Koji, T., Akira, S., Takikawa, Y., and Miyajima, A. (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* 27, 169-181.
- Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol* 20, 146-152.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., and Araki, S. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 25, 2388-2396.
- Tan, X., Yuan, Y., Zeng, G., Apte, U., Thompson, M.D., Cieply, B., Stolz, D.B., Michalopoulos, G.K., Kaestner, K.H., and Monga, S.P. (2008). Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* 47, 1667-1679.
- Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba, F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N., and Higashiyama, S. (2004). ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *J Biol Chem* 279, 41950-41959.
- Taneyhill, L., and Pennica, D. (2004). Identification of Wnt responsive genes using a murine mammary epithelial cell line model system. *BMC Dev Biol* 4, 6.

-
- Tannuri, A.C., Tannuri, U., Coelho, M.C., Santos, N.A., and Mello, E.S. (2007). Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. *Clinics (Sao Paulo)* 62, 757-762.
- Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler, W.E., Wakefield, L., Wilson, E.M., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2014). Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 15, 605-618.
- Tassin, M.T., Beziau, A., Gubler, M.C., and Boyer, B. (1994). Spatiotemporal expression of molecules associated with junctional complexes during the in vivo maturation of renal podocytes. *Int J Dev Biol* 38, 45-54.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425-1433.
- Thorne, K.J., Oliver, R.C., and Barrett, A.J. (1976). Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases. *Infect Immun* 14, 555-563.
- Tian, L., Wu, X.H., Chi, C.W., Han, M., Xu, T., and Zhuang, Y. (2008). ADAM10 is essential for proteolytic activation of Notch during thymocyte development. *International Immunology* 20, 1181-1187.
- Timerman, A.P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A.R., and Fleischer, S. (1993). The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268, 22992-22999.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., and Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* 23, 1643-1654.
- Tirnitz-Parker, J.E., Olynyk, J.K., and Ramm, G.A. (2014). Role of TWEAK in coregulating liver progenitor cell and fibrogenic responses. *Hepatology* 59, 1198-1201.
- Tirnitz-Parker, J.E., Tonkin, J.N., Knight, B., Olynyk, J.K., and Yeoh, G.C. (2007). Isolation, culture and immortalisation of hepatic oval cells from adult mice fed a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 2226-2239.
- Tomczuk, M., Takahashi, Y., Huang, J., Murase, S., Mistretta, M., Klaffky, E., Sutherland, A., Bolling, L., Coonrod, S., Marcinkiewicz, C., Sheppard, D., Stepp, M.A., and White, J.M. (2003). Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3. *Exp Cell Res* 290, 68-81.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15, 1419-1426.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.

- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., Annaert, W., Saftig, P., Hartmann, D., and De Strooper, B. (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 284, 11738-11747.
- Trouw, L.A., Groeneveld, T.W., Seelen, M.A., Duijs, J.M., Bajema, I.M., Prins, F.A., Kishore, U., Salant, D.J., Verbeek, J.S., van Kooten, C., and Daha, M.R. (2004). Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. *J Clin Invest* 114, 679-688.
- Tryggvason, K. (1999). Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10, 2440-2445.
- Tsai, Y.H., VanDussen, K.L., Sawey, E.T., Wade, A.W., Kasper, C., Rakshit, S., Bhatt, R.G., Stoeck, A., Maillard, I., Crawford, H.C., Samuelson, L.C., and Dempsey, P.J. (2014). ADAM10 regulates Notch function in intestinal stem cells of mice. *Gastroenterology* 147, 822-834 e813.
- van Eyken, P., Sciote, R., van Damme, B., de Wolf-Peeters, C., and Desmet, V.J. (1987). Keratin immunohistochemistry in normal human liver. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 412, 63-72.
- van Tetering, G., van Diest, P., Verlaan, I., van der Wall, E., Kopan, R., and Vooijs, M. (2009). Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem* 284, 31018-31027.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Viatour, P., Merville, M.P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30, 43-52.
- Viebahn, C.S., and Yeoh, G.C. (2008). What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 855-873.
- Walker, V.E., Atanasiu, R., Lam, H., and Shrier, A. (2007). Co-chaperone FKBP38 promotes HERG trafficking. *J Biol Chem* 282, 23509-23516.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001a). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Wang, H.Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K.I., and Nishimura, M. (2005). Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. *Hum Mol Genet* 14, 1889-1902.
- Wang, P., Li, M., Liu, Q., Chen, B., and Ji, Z. (2015). Detection of urinary podocytes and nephrin as markers for children with glomerular diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 240, 169-174.

-
- Wang, R., Salem, M., Yousef, I.M., Tuchweber, B., Lam, P., Childs, S.J., Helgason, C.D., Ackerley, C., Phillips, M.J., and Ling, V. (2001b). Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2011-2016.
- Weber, S., Niessen, M.T., Prox, J., Lullmann-Rauch, R., Schmitz, A., Schwanbeck, R., Blobel, C.P., Jorissen, E., de Strooper, B., Niessen, C.M., and Saftig, P. (2011). The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development* 138, 495-505.
- Weber, S., Wetzel, S., Prox, J., Lehmann, T., Schneppenheim, J., Donners, M., and Saftig, P. (2013). Regulation of adult hematopoiesis by the a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10). *Biochem Biophys Res Commun* 442, 234-241.
- Wernerson, A., Duner, F., Pettersson, E., Widholm, S.M., Berg, U., Ruotsalainen, V., Tryggvason, K., Hultenby, K., and Soderberg, M. (2003). Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18, 70-76.
- Weston, C.R., and Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12, 14-21.
- Widmann, J.J., and Fahimi, H.D. (1975). Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. A light and electron microscopic cytochemical study. *Am J Pathol* 80, 349-366.
- Wild-Bode, C., Fellerer, K., Kugler, J., Haass, C., and Capell, A. (2006). A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J Biol Chem* 281, 23824-23829.
- Wochnik, G.M., Ruegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., and Rein, T. (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 4609-4616.
- Wong, E., Maretzky, T., Peleg, Y., Blobel, C.P., and Sagi, I. (2015). The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *J Biol Chem* 290, 12135-12146.
- Woolbright, B.L., Dorko, K., Antoine, D.J., Clarke, J.I., Gholami, P., Li, F., Kumer, S.C., Schmitt, T.M., Forster, J., Fan, F., Jenkins, R.E., Park, B.K., Hagenbuch, B., Olyae, M., and Jaeschke, H. (2015). Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol* 283, 168-177.
- Wu, C., Chung, A.E., and McDonald, J.A. (1995). A novel role for alpha 3 beta 1 integrins in extracellular matrix assembly. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2511-2523.
- Wu, K., Ding, J., Chen, C., Sun, W., Ning, B.F., Wen, W., Huang, L., Han, T., Yang, W., Wang, C., Li, Z., Wu, M.C., Feng, G.S., Xie, W.F., and Wang, H.Y. (2012). Hepatic transforming growth factor beta gives rise to tumor-initiating cells and promotes liver cancer development. *Hepatology* 56, 2255-2267.
- Xu, G., Arregui, C., Lilien, J., and Balsamo, J. (2002). PTP1B modulates the association of beta-catenin with N-cadherin through binding to an adjacent and partially overlapping target site. *J Biol Chem* 277, 49989-49997.
- Xu, L., Corcoran, R.B., Welsh, J.W., Pennica, D., and Levine, A.J. (2000). WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev* 14, 585-595.

- Xu, P., and Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 37, 551-566.
- Xu, Q., Leiva, M.C., Fischkoff, S.A., Handschumacher, R.E., and Lyttle, C.R. (1992). Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem* 267, 11968-11971.
- Xu, X., Browning, V.L., and Odorico, J.S. (2011). Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mech Dev* 128, 412-427.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Yan, K., Khoshnoodi, J., Ruotsalainen, V., and Tryggvason, K. (2002). N-linked glycosylation is critical for the plasma membrane localization of nephrin. *J Am Soc Nephrol* 13, 1385-1389.
- Yang, Q., Onuki, R., Nakai, C., and Sugiyama, Y. (2007). Ezrin and radixin both regulate the apical membrane localization of ABCC2 (MRP2) in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Exp Cell Res* 313, 3517-3525.
- Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S., Kuida, K., and Boucher, D.M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12759-12764.
- Yaoita, E., Kurihara, H., Yoshida, Y., Inoue, T., Matsuki, A., Sakai, T., and Yamamoto, T. (2005). Role of Fat1 in cell-cell contact formation of podocytes in puromycin aminonucleoside nephrosis and neonatal kidney. *Kidney Int* 68, 542-551.
- Yaoita, E., Sato, N., Yoshida, Y., Nameta, M., and Yamamoto, T. (2002). Cadherin and catenin staining in podocytes in development and puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9, 16-19.
- Yashiro-Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M.E., Shestova, O., Xu, L., Fang, T.C., Chiang, M.Y., Intlekofer, A.M., Blacklow, S.C., Zhuang, Y., and Pear, W.S. (2009). Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev* 23, 1665-1676.
- Yoda, M., Kimura, T., Tohmonda, T., Uchikawa, S., Koba, T., Takito, J., Morioka, H., Matsumoto, M., Link, D.C., Chiba, K., Okada, Y., Toyama, Y., and Horiuchi, K. (2011). Dual functions of cell-autonomous and non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. *Blood* 118, 6939-6942.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Miyamoto, Y., Thorgeirsson, U.P., Gomez, D.E., Kawata, M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Thorgeirsson, S.S., and Fukui, H. (2000). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 32, 1248-1254.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.
- Zamek-Gliszczynski, M.J., Nezasa, K., Tian, X., Bridges, A.S., Lee, K., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., and Brouwer, K.L. (2006). Evaluation of the role of multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 in hepatic basolateral excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in Abcc3^{-/-} and Abcc4^{-/-} mice. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1485-1491.
- Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-18.

-
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., and Bottinger, E.P. (2004). Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* 23, 1155-1165.
- Zhang, C., Tian, L., Chi, C.W., Wu, X.H., Yang, X.A., Han, M., Xu, T.A., Zhuang, Y.A., and Deng, K.J. (2010). Adam10 Is Essential for Early Embryonic Cardiovascular Development. *Dev Dynam* 239, 2594-2602.
- Zhang, Q., Thomas, S.M., Lui, V.W., Xi, S., Siegfried, J.M., Fan, H., Smithgall, T.E., Mills, G.B., and Grandis, J.R. (2006). Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6901-6906.
- Zhao, R., Wang, A., Hall, K.C., Otero, M., Weskamp, G., Zhao, B., Hill, D., Goldring, M.B., Glomski, K., and Blobel, C.P. (2014). Lack of ADAM10 in endothelial cells affects osteoclasts at the chondro-osseous junction. *J Orthop Res* 32, 224-230.
- Zimmerli, B., Valantinas, J., and Meier, P.J. (1989). Multispecificity of Na⁺-dependent taurocholate uptake in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 301-308.
- Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., and Stanger, B.Z. (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 136, 1727-1739.
- Zong, Y., and Stanger, B.Z. (2012). Molecular mechanisms of liver and bile duct development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 643-655.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1. Domänenstruktur der ADAM-Proteasen.....	2
Abb. 1.1.2. Reifung und Aktivität von ADAM10.	6
Abb. 1.2.1. Aufbau der podozytären Fußfortsätze.	15
Abb. 1.3.1. Aufbau eines Leberläppchens (Ausschnitt).	19
Abb. 1.3.2. Entstehung der Gallengänge.....	20
Abb. 1.3.3. Lokalisation von Gallensäuretransportern am Hepatozyten.	22
Abb. 1.4.1. Aufbau von FKBP38 und Sequenz des potentiellen Substrates ADAM10.	28
Abb. 1.4.2. MAP3K7-Signalwege und Sequenz des potentiellen Substrates ADAM10.	30
Abb. 3.1.1. Verifizierung der ADAM10-Deletion in isolierten Glomeruli.	75
Abb. 3.1.2. Nachweis der ADAM10-Deletion in Immunfluoreszenzanalysen.....	77
Abb. 3.1.3. Analyse nicht-invasiver Nephritis-relevanter Parameter im ADAM10-Knockout.	79
Abb. 3.1.4. Untersuchungen der Schlitzmembran im podozytären ADAM10-Knockout.	80
Abb. 3.1.5. Podozytenschädigung über das anti-Podozyten Nephritis-Modell (APN-Modell).	82
Abb. 3.1.6. Effekt der Schädigung der Filtrationsbarriere auf ADAM10.	84
Abb. 3.1.7. Analyse der Schlitzmembran nach Podozytenschädigung im ADAM10-Knockout.	85
Abb. 3.1.8. Induktion einer Schädigung der EPZ-Zelllinie durch das APN-Model.....	88
Abb. 3.1.9. Expression von ADAM10 und dessen Substraten nach Schädigung der EPZ.	89
Abb. 3.1.10. Notch-Aktivität in der EPZ-Zelllinie nach deren Schädigung.	91
Abb. 3.1.11. Zelladhäsion der EPZ -Zelllinie nach deren Schädigung.	92
Abb. 3.1.12. Analyse des N-Cadherin- <i>shedding</i> nach Schädigung der EPZ.	94
Abb. 3.1.13. Immunfluoreszenzanalyse des N-Cadherin- <i>shedding</i> nach Schädigung der EPZ	95
Abb. 3.1.14. Aktivität des Wnt-Signalweges in EPZ nach deren Schädigung.....	96
Abb. 3.2.1. Aktivität der Cre-Rekombinase in Leberproben der Alfp-Cre-Linie.....	99
Abb. 3.2.2. Reduktion von ADAM10 in der Leber Alfp-Cre transgener Tiere.....	101

Abb. 3.2.3. Lebermakroskopie im ADAM10-Knockout.....	102
Abb. 3.2.4. Lebern der ADAM10-Knockout Mäuse weisen Nekrosen auf.	103
Abb. 3.2.5. Klinische Parameter im ADAM10-Knockout und Relevanz des ADAM10-Niveaus.....	104
Abb. 3.2.6. Proliferation in Lebern der ADAM10-Knockout Tiere.....	105
Abb. 3.2.7. Lebern neugeborener Tiere zeigen keine Nekrosen.	106
Abb. 3.2.8. Analyse der Gallengangsanzahl als mögliche Ursache der Nekrosen.	107
Abb. 3.2.9. Der Notch-Signalweg als Regulator der Gallengangsbildung.....	108
Abb. 3.2.10. Analyse der Beeinflussung der Gallengangsbildung durch ADAM10.	110
Abb. 3.2.11. Expression der Gallensäuretransporter als mögliche Ursache der Nekrose.	111
Abb. 3.2.12. ADAM10-Abhängigkeit der Expression von Gallensäuretransportern in BMOL-Zellen.	113
Abb. 3.2.13. Untersuchung des Gallensäurehaushaltes in ADAM10-Knockout Mäusen.....	114
Abb. 3.2.14. Infiltration der Nekrosen durch neutrophilen Granulozyten.	115
Abb. 3.2.15. Abhängigkeit der BMOL-Proliferation von ADAM10.	117
Abb. 3.2.16. Analyse der Aktivierung von Itozellen im ADAM10-Knockout.	119
Abb. 3.3.1. Interaktionstest im <i>Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid</i> -System.	124
Abb. 3.3.2. Prinzip des <i>HEK-Screens</i>	125
Abb. 3.3.3. Immunpräzipitation von ADAM10 und FKBP38.....	129
Abb. 3.3.4. Kolokalisation von ADAM10 und FKBP38 in HeLa-Zellen.....	131
Abb. 3.3.5. Intrazelluläre Lokalisation von überexprimiertem FKBP38-myc in HeLa-Zellen.....	132
Abb. 3.3.6. Kolokalisation von ADAM10 und FKBP38 im ER in HeLa-Zellen.	133
Abb. 3.3.7. Beeinflussung der ADAM10-Reifung durch FKBP38-Überexpression.	135
Abb. 3.3.8. Beeinflussung der ADAM10-Reifung unter FKBP38-Reduktion.	136
Abb. 3.3.9. ADAM10-Aktivität neben FKBP38-Überexpression.....	137
Abb. 3.3.10. Analyse von T-REx-Zellen mit induzierbarer FKBP38-Expression.	139
Abb. 3.3.11. Kontrolle der FKBP38-Defizienz in HAP1-Zellen.....	141
Abb. 3.3.12. Untersuchung von HAP1-Zellen mit FKBP38-Defizienz.	142
Abb. 3.3.13. Immunpräzipitation von ADAM10 und MAP3K7.....	144
Abb. 3.3.14. Kolokalisation von ADAM10 und MAP3K7 in HeLa-Zellen.....	145

Abb. 3.3.15. Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von MAP3K7 in HeLa-Zellen.....	146
Abb. 3.3.16. hMAP3K7-Abhängigkeit der ADAM10-Reifung in der Immunfluoreszenz.	147
Abb. 3.3.17. Einfluss der MAP3K7-Reduktion auf die <i>Adam10</i> -Expression.	148
Abb. 3.3.18. Einfluss der MAP3K7-Reduktion auf die ADAM10-Reifung und -Aktivität.	149
Abb. 3.3.19. Transkriptioneller Einfluss der MAP3K7-Reduktion auf APP und Bace1.	150
Abb. 3.3.20. Beeinflussung des Notch-Signalweges durch MAP3K7-Reduktion....	151
Abb. 3.3.21. Beeinflussung von ADAM10 durch die Inhibition von MAP3K7.....	153
Abb. 3.3.22. Einfluss der MAP3K7-Überexpression auf die ADAM10-Reifung und -Aktivität.....	155
Abb. 4.1.1. Modell des Beitrags von ADAM10 zum Podozyten <i>foot process effacement</i>	166
Abb. 4.2.1. Modell der Leberschädigung unter ADAM10-Defizienz.....	176
Abb. 4.3.1. Modell der Beeinflussung des ADAM10-Transports durch FKBP38.....	181
Abb. 4.3.2. Modell einer Beeinflussung von ADAM10 durch MAP3K7.	186



9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.1. ADAM10-Knockout Mausmodelle.....	8
Tab. 2.1.1. Genotypisierungsprimer und Primer für Deletions-PCR.....	42
Tab. 2.1.2. Klonierungsprimer.....	43
Tab. 2.1.3. QRT-PCR-Primer.....	44
Tab. 2.1.4. Primäre Antikörper, Farbstoffe und die eingesetzten Verdünnungen.....	46
Tab. 2.1.5. Sekundäre Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen.....	47
Tab. 2.2.1. Pipettierschemata der Genotypisierungs-PCRs.....	51
Tab. 2.2.2. PCR-Protokolle der Genotypisierungs-PCRs.....	52
Tab. 2.2.3. Pipettierschema der Klonierungs-PCRs.....	56
Tab. 2.2.4. PCR-Protokolle der Klonierungs-PCRs.....	56
Tab. 2.2.5. Pipettierschema der Ligasereaktion.....	56
Tab. 2.2.6. Pipettierschema der Mutagenese-PCR.....	57
Tab. 2.2.7. PCR-Protokoll der Mutagenese-PCR.....	57
Tab. 2.2.8. Pipettierschema der Klonierungs-PCR der induzierbaren Konstrukte.....	58
Tab. 2.2.9. PCR-Protokoll der Klonierung induzierbarer Konstrukte.....	58
Tab. 2.2.10. Pipettierschema der Deletions-PCR.....	64
Tab. 2.2.11. PCR-Protokoll der Deletions-PCR.....	64
Tab. 2.2.12. QRT-PCR-Protokoll.....	68
Tab. 3.3.1. Potentielle Interaktionspartner aus dem <i>Split-Ubiquitin-Yeast-2-Hybrid-</i> System.....	122
Tab. 3.3.2. Potentielle Interaktionspartner aus dem <i>HEK-Screen</i>	126



10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sebastian Wetzel
Geburtsdatum	02.01.1986
Geburtsort	Weißenfels
Staatszugehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1992 – 1996	Grundschule am Zollrain Halle/Saale
1996 – 2005	Gymnasium im Bildungszentrum Halle/Saale Abschluss: Abitur
10/2006 – 7/2011	Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2010 – 7/2011	Diplomarbeit an der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft „Untersuchung der FK506- und Cycloheximid-Bindung, sowie des Expressions- und Interaktionsmusters von FK506-bindenden Proteinen“ Abschluss: Diplom
seit 10/2011	Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe „Molecular Cell Biology and Transgenic Research“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Fachbezogenen berufliche Erfahrungen

7/2009 – 9/2009, 3/2010 – 5/2010, 8/2011 – 9/2011	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft
2012 – 2014	Anleitung der Auszubildenden Kristin Schröder

5/2013 – 7/2013	Betreuung der Bachelorarbeit von Vicky Steubler „Charakterisierung der Alpha-Sekretase Metalloprotease ADAM10“
8/2015 – 10/2015	Betreuung der Bachelorarbeit von Ludwig Werny „Untersuchungen zur Bedeutung der Interaktion der Metalloprotease ADAM10 mit der Kinase TAK1/MAP3K7“
seit 10/2011	Betreuung des Biochemischen Praktikums für Mediziner

berufliche Qualifikationen

24.02.2012	Versuchstierkunde und tierexperimentelle Techniken (FELASA B-Kurs)
------------	--

Sonstige berufliche Erfahrungen

10/2005 – 6/2006	Zivildienst als Krankenträger am Städtischen Krankenhaus Martha-Maria in Halle/Saale
7/2006 – 9/2006	Krankenträger am Städtischen Krankenhaus Martha-Maria in Halle/Saale

11. Veröffentlichungen

Publikationen

Muller, M.*, Wetzel, S.*, Kohn-Gaone, J., Chalupsky, K., Lullmann-Rauch, R., Barikbin, R., Bergmann, J., Wohner, B., Zbodakova, O., Leuschner, I., Martin, G., Tiegs, G., Rose-John, S., Sedlacek, R., Tirnitz-Parker, J.E., Saftig, P., and Schmidt-Arras, D. (2016). A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) is a central regulator of murine liver tissue homeostasis. *Oncotarget*.

Kuhn, P.H., Colombo, A.V., Schusser, B., Dreymueller, D., Wetzel, S., Schepers, U., Herber, J., Ludwig, A., Kremmer, E., Montag, D., Muller, U., Schweizer, M., Saftig, P., Brase, S., and Lichtenthaler, S.F. (2016). Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. *Elife* 5.

Weber, S., Wetzel, S., Prox, J., Lehmann, T., Schneppenheim, J., Donners, M., and Saftig, P. (2013). Regulation of adult hematopoiesis by the a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10). *Biochem Biophys Res Commun* 442, 234-241.

Präsentationen

- | | |
|---------------------|---|
| 25.02. – 01.03.2015 | 32 nd Winter School on Proteinases and Inhibitors in Tiers

Präsentation “ <i>The metalloprotease ADAM10 is an essential driver of podocyte damage</i> ” |
| 16.09. – 18.09.2015 | 1 st IRTG Summer School on Proteases and Pathophysiology in Kiel

Poster “ <i>The metalloprotease ADAM10 is an essential driver of podocyte damage</i> ” |



12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Abhandlung, abgesehen von der beratenden Tätigkeit durch die Betreuerin bzw. den Betreuer, eigenständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurden eingehalten.

Es wurden nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und Zitate, wörtlich oder sinngemäß, als solche gekennzeichnet. Teile dieser Arbeit wurden in Koautorenschaft veröffentlicht:

Muller, M.*, Wetzel, S.*, Kohn-Gaone, J., Chalupsky, K., Lullmann-Rauch, R., Barikbin, R., Bergmann, J., Wohner, B., Zbodakova, O., Leuschner, I., Martin, G., Tiegs, G., Rose-John, S., Sedlacek, R., Tirnitz-Parker, J.E., Saftig, P., and Schmidt-Arras, D. (2016). A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) is a central regulator of murine liver tissue homeostasis. Oncotarget.

Die Arbeit wurde weder ganz, noch in Teilen im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ich versichere, dass ich bis zum heutigen Tage weder an dieser, noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mir ein akademischer Titel aberkannt wurde.

Kiel, den 10.05.2016

Sebastian Wetzel



13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den Personen zu bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben

Allen voran danke ich Prof. Dr. Paul Saftig für die Möglichkeit das ADAM-Projekt in seinem Labor zu bearbeiten. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die vielen Möglichkeiten fachbezogener Weiterbildungen bedanken, sowie die Diskussionsbereitschaft während der experimentellen und schriftlichen Phase meiner Doktorarbeit. Zuletzt danke ich ihm auch für die Übernahme des Erstgutachtens.

Leider stand zum Zeitpunkt des Drucks der Zweitgutachter dieser Arbeit noch nicht fest. Dennoch möchte ich auch ihm für die Übernahme des Gutachtens danken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Dirk Schmidt-Arras und Dr. Miryam Müller für die schöne gemeinsame Zeit in den Tiefen der Leberforschung. Ihr habt mir den Einstieg leichter gemacht und stets zu einer entspannten Arbeitsatmosphäre beigetragen, egal wie stressig das Projekt war. Euch möchte ich ebenfalls für die Diskussionsbereitschaft auch in anderen Fragestellungen des ADAM10-Gebietes danken.

Dr. Catherine Meyer-Schwesinger und Marlies Sachs danke ich für die Einblicke in die Welt der Podozyten. Danke dass ihr mich so nett ins Labor aufgenommen habt und beide zum Fortschritt des Podozyten-Projekts beigetragen habt. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger danke ich auch für die die vielen Möglichkeiten der Diskussion unserer gemeinsamen Daten.

Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch und Dagmar Niemeier möchte ich dafür danken, dass sie mir anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen Blick auf die strukturellen Kleinigkeiten meiner Modelle ermöglicht haben.

Auch allen anderen Kooperationspartnern danke ich für die produktive Zusammenarbeit auf den verschiedenen Projekten.

Und natürlich danke ich auch den Mitarbeitern des Viktor-Hensen-Hauses, allen voran Andrea Henke, für die Versorgung meiner Tiere und die Hilfsbereitschaft bei den verschiedenen Experimenten und der Organisation der Zuchten.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern des SFB877 für die Diskussions- und Kooperationsbereitschaft danken.

Damit möchte ich als nächstes zu den Mitarbeitern im Labor kommen. Als erstes bedanke ich mich bei Marlies Rusch und Dr. Johannes Prox für die freundliche Aufnahme in der ADAM-Familie. Ihr wart vor allem am Anfang da, um mir bei allen Fragen und Problemen bei der Eingewöhnung ins Labor und die Projekte zu helfen. Und auch später konnte ich mich immer auf euch verlassen, wenn ich nicht weiter wusste.

Natürlich möchte ich mich auch noch bei meinen weiteren Wegbegleitern im ADAM-Projekt bedanken. Lisa, danke dass du dich mit mir stets Seite an Seite in die Geheimnisse der ADAM-Welt gekämpft hast. Kristin, ohne deine Hilfe wäre ich wohl so manches Mal über den Ausmaßen der Zellkultur und der Genotypisierung verzweifelt. Danke für deine Hilfe im Labor während und nach deiner Ausbildung. Vicky und Lui, danke dass ihr während eurer Bachelorarbeit einen Teil des Weges mit mir gegangen seid. Ich hoffe euch hat es genauso viel Freude bereitet wie mir. Und auch Nora möchte ich dafür danken, dass sie als Hiwi zu zahlreichen Klonierungen beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen lieben Mitlaboranten bedanken, die immer für mich da waren. Sie haben mich aufgemuntert, wenn mir die Decke auf den Kopf gefallen ist, und sich mit mir gefreut, wenn die Experimente meinen Erwartungen entsprachen. Danke Torben (für die vielen Sportgespräche und den Stunt mit der Glühweintasse), ACL (Cthulhu!), Sönke (I like it loud), Lisa (mein „ADAM10 Anti-Buddy“), Sandra („Mist, wieso habt ihr euer Bier schon alle?“) und Miry („Ich hab den Tisch nicht angefasst!“). Ohne euch wäre es nicht das Gleiche gewesen. Euch danke ich auch für das Teilen meiner Hobbys.

Auch den restlichen Mitarbeitern des Labors danke ich für die super Atmosphäre während der Arbeitsstunden und die Möglichkeiten einfach alles zu diskutieren.

Vielen Dank auch nochmal an meine Schreibtischnachbarn Lisa, David und Marlies für die angenehme Büroatmosphäre.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern der Basketballsparte des TuS Holtenau für den sportlichen Ausgleich zum Arbeitsalltag bedanken.

Vielen Dank auch an meine Freunde in der Heimat. Ihr wart nachsichtig, wenn ich zwar in der Gegend war, aber keine Zeit für euch hatte. Und wenn ich doch Zeit hatte, habt ihr sie euch genommen. Vielen Dank.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Freundin Sandra für den ständigen Rückhalt bedanken. Du hast mich stets versucht zu motivieren wo es ging und mir vor allem privat Arbeit abgenommen, wenn es am nötigsten war. Tausend Dank.

Als allerletztes möchte ein Lob an die Personen verleihen, die mich am häufigsten mit „Wann wirst du denn fertig?“ motivierten. Unangefochten haben diese Auszeichnung meine Eltern verdient. Vielen Dank für alles. Das Gleiche gilt natürlich auch meinen Großeltern. Danke dass ihr mir trotz der Entfernung den Rücken gestärkt habt, immer für mich da wart und vor allem immer an mich geglaubt habt.