

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz  
Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie  
Leiterin: Frau Professor Dr. C.A. Müller

**Die Disintegrin- und Metalloproteinasen-Familie „ADAM“  
im humanen hämatopoetischen System**

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**Jeannette Sy**  
aus Balingen

2002

Dekan: Prof. Dr. Claus D. Claussen

1. Berichterstatter: PD Dr. G. Klein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Dannecker

**Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung	1
1.1. Das hämatopoetische „Microenvironment“	1
1.2. Matrixmetalloproteinasen	2
1.3. Adhäsionsmoleküle	3
1.4. Die Disintegrin- und Metalloproteinasen-Familie ADAM	4
1.4.1. Die Domänen-Struktur der ADAMs	5
1.4.2. Die Entdeckung der ADAMs	8
1.4.3. Beschreibung einzelner Mitglieder der ADAM-Familie	9
1.4.4. ADAMs und Hämatopoese	16
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Chemikalien	19
2.1.2. Geräte	19
2.1.3. Molekulargewichtsstandards und DNA-Längenstandards	20
2.1.4. PCR-Primer für ADAMs	20
2.1.5. Antikörper	21
2.1.6. Puffersysteme	21
2.2. Zellkulturen	22
2.2.1. CD 34+ Zelllinien: KG1a, TF-1	22
2.2.2. Stromazelllinien: L88/5, L87/4, HS-5	22
2.2.3. Knochenmark-Endothelzelllinie: HBME-1	23
2.2.4. Knochenmarklangzeitkulturen	24
2.2.5. Kontrollzelllinie: K562 für RT-PCR	24
2.2.6. Kulturbedingungen	25
2.2.7. Kulturmedien	25
2.2.8. Einfrieren von Zelllinien	26
2.2.9. Auftauen von Zelllinien	26
2.3. Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1. RNA-Isolierung	26
2.3.2. DNase-Verdau und Konzentrationsbestimmungen	27
2.3.3. Reverse Transkription	28
2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.3.5. Agarose-Gel-Elektrophorese	31
2.3.6. Sequenzierung der PCR-Produkte	32
2.4. Immunologische Methoden	34
2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	34
2.4.2. Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)	36
2.4.3. Western-Blot	37
3. Ergebnisse	43
3.1. Nachweis der mRNA-Expression verschiedener ADAMs auf Zellen des humanen Knochenmark	43
3.1.1. RT-PCR-Analysen mit den CD 34+ Zelllinien KG1a und TF-1	44

---

3.1.2. RT-PCR-Analysen mit den Knochenmark-Sromazelllinien L87/4, L88/5 und HS-5	45
3.1.3. RT-PCR-Analyse mit der Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1	46
3.1.4. RT-PCR-Analyse mit Knochenmark-Langzeitkulturen	47
3.1.5. Überblick über die mRNA Expression von Zellen des humanen Knochenmark	47
3.1.6. Sequenzierung der RT-PCR-Amplifikationsprodukte	48
3.2. Nachweis der Proteinexpression von ADAM 9, ADAM 10 und ADAM 15 auf Zellen des humanen Knochenmark	49
3.2.1. Nachweis der ADAM 9 Expression	50
3.2.2. Nachweis der ADAM 15 Expression	51
3.2.3. Nachweis der ADAM 10 Expression	52
3.3. Nachweis der Proteinexpression von Notch-1 auf Zellen des humanen Knochenmark	55
3.3.1. Nachweis der Notch-1 Expression	55
4. Diskussion	58
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	68
7. Abkürzungsverzeichnis	80

## **Die Disintegrin- und Metalloproteinasen-Familie „ADAM“ im humanen hämatopoetischen System**

### **1. Einleitung**

#### **1.1. Das hämatopoetische „Microenvironment“**

Das blutbildende Knochenmark des Menschen setzt sich aus verschiedenen Strukturen zusammen, die durch gegenseitige Beeinflussung und Interaktionen die Hämatopoese bestreiten. Ausgangspunkt der Hämatopoese ist eine pluripotente Stammzelle, aus der sich lymphatische und myeloische Vorläuferzellen bilden, die ihrerseits über verschiedene Entwicklungsstufen zu reifen Blutzellen ausdifferenzieren (Kondo et al., 1997; Metcalf, 1998; Akashi et al., 2000).

Die Stammzellen und die daraus folgenden Entwicklungsstufen sind von einem sogenannten hämatopoetischen „Microenvironment“ umgeben, das eine Einheit aus extrazellulärer Matrix (ECM) und verschiedenen Stromazellen, zu denen fibroblastenähnliche Zellen, Makrophagen und Adipozyten zählen, darstellt (Greenberger, 1991; Chabannon and Torok-Storb, 1992). Die Stromazellen können Zytokine sezernieren. Hierzu gehören Interleukine, Interferone und CSFs („Colony Stimulation Factors“), die entweder direkt auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen wirken oder als inaktive Vorstufe sezerniert und in der ECM gespeichert werden, um dann in aktiver Form den hämatopoetischen Stammzellen präsentiert zu werden (Gordon et al., 1987; Roberts et al., 1988; Ruoslahti and Yamagushi, 1991; Klein, 1995). Die Moleküle der ECM können in drei Hauptklassen, Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine, eingeteilt werden. Diese Matrixkomponenten können sowohl von hämatopoetischen Zellen als auch von Stromazellen synthetisiert werden (Coulombel et al., 1992; Verfaillie et al., 1994; Klein, 1995).

Nahm man früher an, die ECM sei ein lediglich stabilisierendes inaktives Gerüst, so weiß man heute, dass die Matrix eine aktive Rolle bei zahlreichen Funktionen und Regulationsmechanismen spielt (Hay, 1991; Kreis and Vale, 1999). Moleküle der ECM können an der Regulation der Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation sowie

der Präsentation von Zytokinen im humanen Knochenmark beteiligt sein (Klein, 1995; Pierce et al., 1998).

## **1.2. Matrixmetalloproteinasen**

Wechselwirkungen zwischen Zellen und ECM stellen eine wichtige Voraussetzung für die kontrollierte Neubildung oder den Verlust von gewebespezifischen Funktionen, Zellwanderung, Gewebersatz, Tumorentstehung und Zelltod dar (Basbaum and Werb, 1996). Dies macht deutlich, dass die Neusynthese und der Abbau der ECM einer genauen Regulation unterliegen müssen. Dabei ist der Abbau der ECM-Proteine, die sogenannte perizelluläre Proteolyse, genauso wichtig wie deren Synthese. Prominente Beispiele, bei denen die Proteolyse der ECM von großer Bedeutung ist, sind die Wanderung von Leukozyten durch die Basalmembran des Gewebes im Rahmen einer Infektion, die Wundheilung oder die Metastasierung von Tumorzellen in verschiedene Organsysteme (Pakianathan, 1995; Friedl et al., 1998; Eckes et al., 2000).

Die perizelluläre Proteolyse erfolgt durch Proteasen, die sich in zwei Hauptgruppen einteilen lassen:

- Serinproteinasen (z.B. urokinaseabhängiger Plasminaktivator), die einen Serinrest in ihrem aktiven Zentrum aufweisen und
- Metalloproteinasen

Hauptsächlich Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind für die gezielte, begrenzte perizelluläre Proteolyse verantwortlich (Ravanti and Kahari, 2000). Sie sind zink-abhängige Endopeptidasen, werden entweder von Zellen sezerniert und können an Proteinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, um dann aktiv ECM-Proteine abzubauen, oder sie werden als membrangebundene Proteinasen (MT-MMP = membrane type MMP) von der Zelle synthetisiert und bauen dort ECM-Proteine ab. Ein Beispiel hierfür ist der Abbau von fibrinreicher provisorischer ECM, die bei der Heilung einer Hautwunde produziert wird und damit eine Schlüsselfunktion im Heilungsprozess einnimmt. Hat sich ein Fibrinpfropf gebildet, schließen einwandernde Keratinozyten, die eine Vielzahl von Proteasen produzieren können, die Wundoberfläche. Sie interagieren gleichzeitig mit den darunterliegenden dermalen Fibroblasten, um die Verletzung zu reparieren (Basbaum and Werb, 1996). Die Expression von MMPs kann in malignem Tumorgewebe wesentlich stärker und

schneller erfolgen als in vergleichbarem gesunden Gewebe. So werden Kollagenase-3 oder Stromelysin-3 verstärkt von Tumorzellen des Mamma-Karzinoms exprimiert, während MT-MMP oder Gelatinase-B vermehrt von Zellen des Lungen-Karzinoms gebildet werden (Birkedal-Hansen, 1995).

MMPs können durch verschiedene Mechanismen reguliert und kontrolliert werden. Sie werden als inaktive Vorstufen, sog. Zymogene, sezerniert, die aktiviert werden müssen. Der Aktivierungsmechanismus wird als „Cystein-Switch“ bezeichnet. Die inaktive Vorstufe wird durch einen intramolekularen Komplex zwischen einem Cystein-Rest des Propeptids und dem Zink-Ion im katalytisch aktiven Zentrum gebildet, wobei die Entfernung des Propeptids zur Aktivierung der Proteinase führt (Birkedal-Hansen, 1995; Fox and Bjarnason, 1995). Die Expression der MMPs wird außerdem durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine kontrolliert, die die MMP-Expression entweder stimulieren (z.B. Interleukin-1, TNF- $\alpha$ , EGF) oder unterdrücken (z.B. TGF- $\beta$ , Interleukin-4). Eine Hemmung der MMP-Aktivität erfolgt durch spezifische Proteinase-Inhibitoren, den TIMPs (= tissue inhibitors of metalloproteases) (McDonnell et al., 1999; Fassina et al., 2000).

### **1.3. Adhäsionsmoleküle**

Eine weitere Voraussetzung für Wechselwirkungen zwischen Zellen und ECM ist deren Kontakt über membranständige Rezeptoren, die auch als Adhäsionsmoleküle bezeichnet werden. Adhäsionsmoleküle werden heute als entscheidende Aktivatoren und Regulatoren vieler Signaltransduktionswege betrachtet (McNeill, 2000).

Eine große Familie von Adhäsionsmolekülen, die hauptsächlich als Rezeptoren für Matrixproteine dienen, sind die transmembranständigen Integrine (Hynes, 1992). Es sind Heterodimere, die aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen, die nicht kovalent untereinander gebunden sind. Integrine binden ihre Liganden mit einer relativ geringen Affinität, jedoch ist die Avidität der Integrine streng reguliert (van Kooyk and Figdor, 2000). Sie können Wechselwirkungen zwischen der ECM und dem Aktin des Zytoskeletts in beide Richtungen vermitteln („in-side-out“ und „out-side-in“), sind abhängig von der Präsenz zweiwertiger Ionen und dienen als Signalüberträger (Faull and Ginsberg, 1996; Dedhar, 1999; Calderwood et al., 2000). Man unterscheidet verschiedene Integrin-Erkennungs-Sequenzen, häufig findet man die Sequenz RGD

(Arginin-Glycin-Aspartat). Zwar gelten Integrine als die Hauptrezeptoren für die zelluläre Adhäsion an die ECM, sie können aber auch Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (Ruoslahti, 1996).

Neben den eigentlichen Liganden gibt es auch Proteine, die eine sogenannte Disintegrin-Domäne aufweisen. Der Begriff 'Disintegrin' beschreibt einen Vorgang, bei dem ein integrinvermittelter Prozeß gestört bzw. verhindert wird. Einige der Disintegrine tragen die oben erwähnte Integrin-Bindungssequenz RGD. Man unterscheidet freie und lösliche von membrangebundenen Disintegrinen (Blobel and White, 1992).

#### **1.4. Die Disintegrin- und Metalloproteinasen-Familie ADAM**

Eine große, seit Ende der 80er Jahre bekannte und seitdem ständig wachsende Familie transmembranaler Proteine mit Disintegrinfunktion sind die ADAMs. Der Begriff ADAM steht für „A Disintegrin And Metalloprotease“ (Black and White, 1998).

Diese transmembranständigen Moleküle weisen in ihrem extrazellulären Teil eine Proteinase-Domäne und eine Adhäsions-Domäne auf. Da sowohl Adhäsionsmechanismen als auch die perizelluläre Proteolyse für die Reifung hämatopoetischer Zellen wichtige Beiträge leisten können, stellen die ADAMs eine für die Hämatopoese grundsätzlich sehr interessante Proteinfamilie dar.

ADAMs gehören zu den zinkabhängigen Metalloproteinasen, den Metzinkinen, einer Untergruppe der Zinkine, die einen sog. „Methionin-turn“ aufweisen. Hierbei trägt ein Methionin-Rest dazu bei, das aktive Zentrum der Protease zu stabilisieren (Bode et al., 1996). Die Metzinkine werden in Matrixine, Astazine, Serralysine und Reprolysine bzw. Adamalysine aufgegliedert, wobei die ADAM-Proteinfamilie zu letzteren gehört (Stocker et al., 1995; Wolfsberg and White, 1996).

ADAMs bestehen in der Regel aus 750-800 Aminosäuren. Das N-terminale extrazelluläre Ende wird von einer Pro-Domäne gebildet, die von der Metalloproteinase-Domäne gefolgt wird. Daran schließt sich eine Disintegrin-Domäne an, gefolgt von einer cysteinreichen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne (EGF=epidermal growth factor), einer Transmembran-Domäne und einem zytoplasma-



tischen carboxyterminalen Anteil (Abb.1; Wolfsberg and White, 1996; 1998).

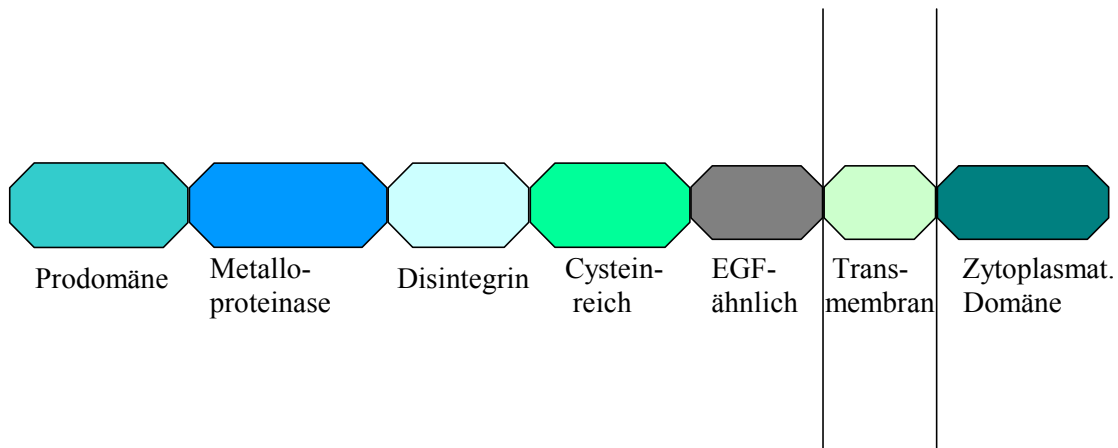


Abb.1: Struktur der ADAMs

Schema der Domänen-Struktur der ADAMs. Die senkrechten Linien deuten die Zellmembran an (nach Wolfsberg and White, 1996).

Die Aminosäuresequenzen der ADAMs sind zu circa 30 % identisch mit den in Schlangengift enthaltenen, löslichen Metalloproteinasen SVMPs (=snake venom metalloprotease), die ebenfalls zur Familie der Reprolysine gehören (Jia et al., 1996). SVMPs sind für die massive Hämorrhagie durch Destruktion von Proteinen der kapillären Basalmembran bei Schlangenbißopfern verantwortlich. Sie enthalten außerdem Disintegrin-Domänen, die an Integrine binden und Wechselwirkungen zwischen Zelle und ECM verhindern. Neben der Basalmembrandestruktion kommt es außerdem zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Man unterscheidet P-I, P-II und P-III SVMPs, wobei letztere den ADAMs am ähnlichsten sind, da sie neben Signalsequenz, Prosequenz, zinkabhängiger Metalloproteinase-Domäne (P-I) und Disintegrin-Domäne (P-II) ebenfalls eine cysteinreiche Domäne am C-terminalen Ende besitzen (Wolfsberg and White, 1996).

#### 1.4.1. Die Domänen-Struktur der ADAMs

Im folgenden werden die einzelnen Domänen der ADAMs spezifisch besprochen.

### ***Die Metalloproteinase-Domäne***

Obwohl alle ADAMs eine relativ hochkonservierte Metalloproteinase-Domäne besitzen, konnte das katalytische Sequenzmotiv (HEXXH) bisher nur für einige ADAMs nachgewiesen werden (z.B. ADAM 1, 8-10, 12, 13, 15 und 17), andere Mitglieder der ADAM-Familie (z.B. ADAM 2-7 und 11) zeigen in dieser Domäne ein anderes Sequenzmuster. Dies bedeutet, dass nur etwa die Hälfte der ADAMs katalytisch aktiv sein könnten. Tatsächlich konnte der Nachweis proteolytischer Aktivität bisher nur für ADAM9, ADAM 10, ADAM 12 und ADAM 17 erbracht werden (Black et al., 1997; Moss et al., 1997; Pan and Rubin, 1997; Rosendahl et al., 1997; Lunn et al., 1997; Millichip et al., 1998; Loechel et al., 1998; Schwettmann and Tschesche, 2000). ADAMs, die eine aktive proteolytische Funktion aufweisen, besitzen einen „Cystein-Switch“ (siehe 1.2), sodass vermutet wird, dass ihre Proteinase-Domäne durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert wird (Wolfsberg et al., 1995; Wolfsberg and White, 1996; Black and White, 1998).

Die extrazellulären Domänen vieler Membranproteine können proteolytisch gespalten und so in eine lösliche aktive Form überführt werden (Schlöndorff and Blobel, 1999). Diese Abspaltung der Ektodomäne (auch als „Ectodomain-shedding“ bezeichnet) wird bei Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen und anderen Membranproteinen beobachtet. Eine derartige Modifikation der Zelloberfläche verändert die Kommunikationsmöglichkeiten der Zelle mit ihrer Umgebung und schafft gleichzeitig aktive, lösliche Regulatorproteine (Blobel, 2000).

### ***Die Disintegrin-Domäne: ein möglicher Ligand für Integrine.***

Die Adhäsions-Domäne der ADAMs ist in der Disintegrin-Domäne lokalisiert und ist vor allem bei P-II-SVMPs intensiv erforscht (Niewiarowski et al., 1994). Die Adhäsions-Domäne des P-II-SVMP bindet an das Thrombozyten-Integrin gpIIb/IIIa und verhindert somit die Bindung von Fibrinogen und folglich die Thrombozytenaggregation. In ihrer Struktur besteht die Disintegrin-Domäne aus ca. 50-75 Aminosäuren (AS), die einen 13 AS langen „Loop“ enthalten, an dessen Spitze die Integrin-Erkennungssequenz RGD steht. P-III SVMPs sind den P-II-SVMPs in ihrer Struktur sehr ähnlich. Als Integrin-Ligand der P-III SVMPs wird jedoch ein Cysteinrest

am C-terminalen Ende des P-III SVMP vermutet, den die P-II SVMPs nicht aufweisen (Wolfsberg and White, 1996). ADAMs zeigen diesen Cysteinrest ebenfalls, variieren jedoch bezüglich des AS-„Loop“ stark. Diese Sequenzschleife der ADAMs besteht bei einigen nicht aus 13, sondern aus 14 AS und verschiedene Vertreter der ADAMs weisen verschiedene Tripeptid-Reste an derselben Position auf (Wolfsberg and White, 1996). So konnte die RGD-Sequenz bisher nur bei ADAM 15 nachgewiesen werden (Krättschmar et al., 1996). Die Bedeutung dieser Sequenzabweichung ist noch nicht geklärt. Sie könnte bedeuten, dass nicht alle ADAMs Liganden für Integrine darstellen, dass ADAMs mit verschiedenen Sequenzen unterschiedliche Rezeptortypen binden, oder dass die Rezeptoren für spezifische ADAM-Klassen eine große Anzahl von ADAM-Disintegrin-Bindungssequenzen erkennen können. Als eine Funktion für die Disintegrin-Domäne wird angenommen, dass ADAMs über Integrinrezeptoren in der Lage sind, Signale zu transduzieren (Wolfsberg et al., 1995; Wolfsberg and White, 1996).

#### ***Die Fusionsdomäne: Beteiligung an Fertilisation und Myogenese***

Zell-Zell-Fusion ist ein entscheidender Vorgang für die Entwicklung multizellulärer Organismen. Dem zugrunde liegt ein mehrstufiger Prozess: die Zellen müssen zuerst differenzieren, um die Kompetenz für die Fusion zu erlangen und anschließend aneinander haften, um sich schließlich zu vereinigen. Diese Vorgänge gehen mit weitreichenden Veränderungen der Gen- und Proteinexpression, proteolytischer Umwandlung von Oberflächenproteinen sowie mit Änderungen ihrer Form und Gestalt einher (Huovila et al., 1996).

Den Anstoß zu der Annahme, dass ADAMs an Zellfusions-Vorgängen beteiligt sein könnten, gab die Tatsache, dass ADAM 1 (Fertilin- $\alpha$ ) eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit viralen Fusionsproteinen aufweist (Blobel et al., 1992). Drei weitere Vertreter der ADAM-Familie besitzen ebenfalls Sequenzen für potentielle Fusionsproteine (ADAM 9, 11 und 12). Hierbei handelt es sich um einen aus circa 23 AS bestehenden, hydrophoben Strang (Wolfsberg and White, 1996).

### ***Der zytoplasmatische Teil***

Der zytoplasmatische Rest der verschiedenen Mitglieder der ADAM-Familie zeigt Längenunterschiede von 11 bis 176 AS. Manche dieser zytoplasmatischen Anteile sind reich an Lysin oder Serin, manche besitzen Konsensussequenzen für Phosphorylierungen und wieder andere sind reich an Prolin und enthalten Bindungssequenzen für Proteine des Zytoskeletts oder SH3-haltige Proteine, die eine umfangreiche Gruppe von Signalmolekülen darstellen (Wolfsberg and White, 1996).

Für ADAM 12 konnte die Bindung der SH3-Domäne einer Tyrosinkinase nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung von ADAM 12 an der Signaltransduktion wahrscheinlich ist (Kang et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ADAM 9 und ADAM 15 über prolinreiche SH3-Liganden (wie z.B. Endophilin I) in der Lage sind, Proteine zu binden, die eine SH3-Domäne enthalten, wodurch diese Proteine die intrazellulären Regulationsmechanismen der ADAMs beeinflussen können (Howard et al., 1999).

#### **1.4.2. Die Entdeckung der ADAMs**

Die ersten beiden ADAMs wurden im Rahmen einer Spermaproteinanalyse bei Meerschweinchen isoliert (Blobel et al., 1990). Das als Fertilin oder PH-30 bezeichnete Heterodimer besteht aus zwei Untereinheiten, Fertilin- $\alpha$  und - $\beta$ , die 1992 erstmals als ADAM 1 und 2 bezeichnet wurden (Wolfsberg et al., 1995).

ADAM 1 und ADAM 2 sind aktiv an der Bindung von Spermium und Eizelle sowie der Spermatogenese beteiligt (Blobel et al., 1992; Wolfsberg et al., 1995). Die Grundlage für die Kategorisierung dieser Proteine als ADAMs schaffte die Erkenntnis, dass ADAM 2 als Integrin-Ligand fungiert. Die disintegrinähnliche Domäne weist allerdings, anstatt der RGD-Sequenz, eine TDE-Sequenz auf. ADAM 1 ist ebenfalls in der Lage, Integrine zu binden und besitzt neben einer zinkabhängigen Metalloproteinase-Domäne eine Fusions-Domäne. So scheint ADAM 2 für die Bindung eines Integrin auf der Oberfläche der Eizelle zuständig zu sein, während ADAM 1 die Membranfusion vermittelt (Primakoff et al., 1987; Blobel et al., 1992; Myles et al., 1994).

Inzwischen unterscheidet man über 30 verschiedene ADAMs, wovon 21 in menschlichem Gewebe charakterisiert werden konnten, andere wiederum sind ubiquitär vertreten (Wolfsberg and White, 1996; Zhu et al., 1999; [http://www.people.virginia.edu/~jag6n/Table\\_of\\_the\\_ADAMs.html](http://www.people.virginia.edu/~jag6n/Table_of_the_ADAMs.html)).

Bisher konnte eine Beteiligung der ADAMs an verschiedenen Fusions- und Adhäsionsmechanismen nachgewiesen werden (Wolfsberg and White, 1996). Sie sind an proteolytischen Ereignissen während der Immunantwort beteiligt (Yamamoto et al., 1999), spielen eine Rolle bei der Neurogenese, der Myoblastenfusion sowie bei vielen weiteren proteolytischen Vorgängen und Signaltransduktionswegen. Die mögliche Beteiligung der ADAMs an Mechanismen der Immunantwort zeigt die Expression von ADAM 8 (CD 156), welches sehr stark in der monozytären Zellreihe exprimiert wird (Yamamoto et al., 1999).

#### 1.4.3. Beschreibung einzelner Mitglieder der ADAM-Familie

Die folgenden Vertreter der ADAM-Familie sind Gegenstand dieser Arbeit: ADAM 9, 10, 11, 12, 15 und 17 (s. Tab.1) und werden im folgenden näher beschrieben. Die Kriterien für ihre Auswahl und ihre mögliche Relevanz für das hämatopoetische System werden im Anschluss daran dargestellt.

Tabelle 1

	Synonyme	beschriebenes Vorkommen	Referenz
ADAM 9	MDC 9, Meltrin- $\gamma$	ubiquitär	Weskamp et al., 1996
ADAM 10	MADM, Kuzbanian	Hirn, Milz, Knochen u.v.a.	Howard et al., 1996
ADAM 11	MDC	Hirn, Tumorzelllinien, u.a.	Emi et al., 1993
ADAM 12	Meltrin- $\alpha$	Plazenta, Muskulatur	Yagami-Hiromasha et al., 1995
ADAM 15	MDC 15, Metargidin	ubiquitär	Krätschmar et al., 1996
ADAM 17	TACE	ubiquitär	Black et al., 1997

### **ADAM 9**

ADAM 9 ist im Organismus weit verbreitet. Northern-Blot-Daten zeigten eine Expression in Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel und Leukozyten (Weskamp et al., 1996). Western-Blot-Analysen belegten die Expression von ADAM 9 auf Zellen aus Lunge, Leber, Herz, Hirn, Hoden, Skelettmuskel, Sperma und Fibroblasten sowie Myoblasten (Weskamp et al., 1996). Inoue und Mitarbeiter konnten die Expression von ADAM 9 auf Osteoblasten und Osteoklasten nachweisen, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass ADAM 9 an Knochenentstehung und Knochenabbau beteiligt ist (Inoue et al., 1998).

Die Struktur von ADAM 9 entspricht dem allgemeinen Domänen-Aufbau aller ADAMs. ADAM 9 besitzt eine katalytische Konsensussequenz (HEXXH) in der MP-Domäne, kann also katalytisch aktiv sein (Roghani et al., 1998). Die Disintegrin-Domäne besitzt eine TSE-Sequenz, der ein zusätzlicher Cysteinrest folgt. Der zytoplasmatische Rest von ADAM 9 enthält zwei potentielle, prolinreiche SH3-bindende Konsensussequenzen, die in der Lage sind, Endophilin I und ein Phox-homologes Protein (SH3PX1) zu binden (Howard et al., 1999).

Roghani und Mitarbeiter fanden heraus, dass ein Vorläufer für ADAM 9 gebildet wird, der nach Abspaltung der Prodomäne in der Sekretionsphase mittels einer furinartigen Proprotein-Konvertase an der Zelloberfläche erscheint. Außerdem fanden sie erste Hinweise auf die katalytische Aktivität der gelösten MMP-Domäne von ADAM 9, da diese in der Lage ist, die  $\beta$ -Kette von Insulin *in vitro* zu spalten (Roghani et al., 1998).

HB-EGF (= heparin-binding EGF-like-growth-factor) ist ein membrangebundenes Protein, das an den EGF-Rezeptor bindet und dessen Phosphorylierung stimuliert. ADAM 9 wurde im Zusammenhang mit der Aktivierung des HB-EGF als spezifisches Bindungsprotein für einen Isotyp der Proteinkinase-C entdeckt und scheint daher an der Aktivierung von HB-EGF beteiligt zu sein (Izumi et al., 1998).

### **ADAM 10**

ADAM 10 wurde 1989 erstmals aus Myelinscheiden von Rinderhirn isoliert (Chantry et al., 1989) und als MADM (= mammalian disintegrin metalloproteinase) bezeichnet, bevor es später in die ADAM-Nomenklatur aufgenommen wurde. ADAM 10 konnte in schwächerer Ausprägung auch in anderen Rindergeweben sowie in verschiedenen

Säugetiergewebsarten und Zelllinien nachgewiesen werden, unter anderem in malignen hämatopoetischen Zellen und Epithelzellen, sowie in Knochengewebe. Im ZNS ist ADAM 10 ebenfalls weit verbreitet. Western-Blot-Analysen verschiedener, maligner Zelllinien (u.a. histozytäre Lymphomzellen, Lungen-, Kehlkopf- und Zervixkarzinomzellen) zeigten ebenfalls eine ADAM 10-Expression (Howard et al., 1996; Dallas et al., 1999; Karkkainen et al., 2000).

Die Analyse der Funktion von Kuzbanian, dem *Drosophila*-Homolog zu humanem ADAM 10, einem im Nervensystem der Fruchtfliege *Drosophila* exprimierten Protein, das am Vorgang der lateralen Hemmung während der Hirnentwicklung bei *Drosophila* beteiligt ist, brachte weitreichende Erkenntnisse über die möglichen Funktionen von ADAM 10. Laterale Hemmung ist das Basiselement zellulärer Differenzierung in zahlreichen Strukturen einschließlich des Nervensystems, der Muskulatur und der Hämatopoese (Nye, 1997). Es handelt sich dabei um einen Vorgang, bei dem Zellen ein hemmendes Signal an ihre Nachbarzellen aussenden, um diese von einer Differenzierung abzuhalten. Erhalten Zellen von ihrer Nachbarzelle keine hemmenden Signale, kommt es zur unkontrollierten Entstehung von Gewebe. *Drosophila*-Embryonen mit einer Mutation im Kuzbanian-Gen zeigten dramatische Defekte in der Entwicklung des ZNS und des Längenwachstums von Axonen. Kuzbanian scheint daher eine entscheidende Rolle bei der lateralen Hemmung und der axonalen Ausbreitung von Nervenzellen zu spielen (Fambrough et al., 1995; Rooke et al., 1996).

In diesem Zusammenhang dient das Transmembranprotein Notch als Rezeptor für das laterale Hemmungssignal, sodass dessen Expression über das Schicksal der Zelle entscheidet. Die extrazelluläre Domäne dieses Rezeptors wird durch Abspaltung aktiviert (Black and White, 1998). Pan und Rubin vertraten 1997 die Auffassung, dass die Metalloproteinase-Domäne von Kuzbanian für diese Abspaltung und damit für die Aktivierung von Notch verantwortlich ist (Pan and Rubin, 1997). Logeat und Mitarbeiter fanden 1998 Hinweise darauf, dass die Spaltung von Notch im Trans-Golgi-Netz einer furinartigen Konvertase unterliegt und Kuzbanian auf diese Spaltung keinen Einfluss hat, aber möglicherweise an nachfolgenden Aktivierungsprozessen der Notch-Liganden beteiligt sein könnte (Logeat et al., 1998). Ein Mitwirken von Kuzbanian an der Spaltung eines dieser Notch-Liganden, der als Agonist für den Notch-Rezeptor fungiert, wird neuerdings diskutiert (Qi et al., 1999).

ADAM 10 besitzt ebenfalls eine katalytische Konsensussequenz (HEXXH) und eine Beteiligung von ADAM 10 an zahlreichen proteolytischen Ereignissen konnte von vielen verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden. So ist ADAM 10 in der Lage, *in vitro* Kollagen Typ IV zu spalten. Die Prozessierung von TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ) durch ADAM 10 konnte ebenfalls gezeigt werden (Lunn et al., 1997; Millichip et al., 1997; Dallas et al., 1999). Seit kurzem wird für ADAM 10 auch eine Beteiligung an der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung diskutiert (Lammich et al., 1999).

### ***ADAM 11***

Allelverlust, der von Emi und Mitarbeitern 1993 in sporadisch auftretenden Brust- und Ovarialkrebszellen beobachtet wurde, ließ die Vermutung zu, dass an der entsprechenden Stelle auf Chromosom 17q21 ein Tumorsuppressorgen lokalisiert sein könnte. Die aus dieser kritischen Region isolierte cDNA führte zur Entdeckung eines neuen, 524 AS langen Proteins, welches aufgrund dessen, dass es eine Prodomäne, eine Metalloproteinase-Domäne, eine Disintegrin-Domäne und eine cysteinreiche Domäne aufwies, als MDC (=Metalloproteinase, Disintegrin, Cysteinrich) bezeichnet wurde. Das MDC-Protein, auch ADAM 11 genannt, wurde als mögliches Tumorsuppressorgen diskutiert (Emi et al., 1993).

Im Rahmen der Isolierung von cDNA aus verschiedenen menschlichen Geweben wurde entdeckt, dass es zwei Splicevarianten für ADAM 11 gibt (Katagiri et al., 1995). Neben dem zuerst isolierten MDC-524, fand man ein längeres, aus 769 AS bestehendes MDC-Protein. Dieses besitzt zusätzlich eine EGF-ähnliche Domäne, eine transmembranale Domäne, einen zytoplasmatischen Anteil und hat N-terminal eine wesentlich längere Prodomäne als MDC-524. ADAM 11 besitzt kein zinkbindendes Motiv innerhalb der MP-Domäne und scheint daher proteolytisch inaktiv zu sein. Die Disintegrin-Domäne enthält Cystein-Reste, die große Ähnlichkeit mit den Disintegrin-Domänen von ADAM 2 und 15 aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass ADAM 11 möglicherweise ebenfalls in der Lage ist, Integrine zu binden (Sagane et al., 1999).

Im Northern-Blot zeigte ADAM 11 im menschlichen Gehirn das höchste Expressions-Level, konnte aber auch in Herz-, Hoden- und Gonadengewebe gefunden werden



(Katagiri et al., 1995). Außerdem konnte ADAM 11 mRNA auch in hämatologischen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Wu et al., 1997).

### **ADAM 12**

Die Entstehung von Skelettmuskelzellen basiert auf der Fusion vieler Myoblasten, was die Differenzierung, vorübergehende Adhäsion und anschließende Verschmelzung der Myoblasten voraussetzt, wodurch sie zu mehrkernigen, langgestreckten Muskelzellen heranreifen. Genauso wie die Fusion von Eizelle und Spermium ist auch dieser Vorgang abhängig von der Beteiligung verschiedener Fusionsproteine. Aufgrund dieser Kenntnisse identifizierten Yagami-Hiromasa und Mitarbeiter 1995 drei neue, von Myoblasten exprimierte Genprodukte: Meltrin- $\alpha$  (ADAM 12), Meltrin- $\beta$  (ADAM 19) und Meltrin- $\gamma$  (ADAM 9). Deren weitere Untersuchung ergab, dass vor allem Meltrin- $\alpha$  (ADAM 12) von Skelettmuskulatur und Knochengewebe Neugeborener stark exprimiert wird und dass es an der Fusion von Myoblasten beteiligt ist. Sie beobachteten in Mausemblionen, dass die Expression von ADAM 12 mRNA zunimmt, wenn Myoblasten beginnen, sich zu differenzieren (Yagami-Hiromasa et al., 1995).

ADAM 12 kann wie ADAM 11 in zwei verschiedenen Formen auftreten, in einer kurzen Form als ADAM 12-S oder als langes, membrangebundenes ADAM 12-L. Die lösliche ADAM 12-S-Form besitzt keine transmembranösen und zytoplasmatischen Domänen. ADAM 12-S wurde bisher nur in Plazentagewebe nachgewiesen, wohingegen ADAM 12-L auch in Skelett-, Herz- und glatten Muskelzellen exprimiert wird. Die Expression beider Formen konnte in verschiedenen Tumorzelllinien entdeckt werden (Gilpin et al., 1998). Iba und Mitarbeiter fanden heraus, dass die Expression von ADAM 12 in menschlichem Tumorgewebe hochreguliert wird (Iba et al., 1999). ADAM 12 ist außerdem an der Osteosynthese und Riesenzellformation beteiligt (Abe et al., 1999). Es wird in Osteoblasten stark exprimiert, wohingegen reife Osteoklasten keine Expression von ADAM 12 aufweisen (Inoue et al., 1998). ADAM 12 wird außerdem auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, bei denen es durch Calcitriol hochreguliert werden kann (Abe et al., 1999).

Die Sequenzanalyse von ADAM 12 ergab, dass auch ADAM 12 die Konsensussequenz (HEXXH) aktiver Metalloproteinasen besitzt (Gilpin et al., 1998). Loechel und Mitarbeiter wiesen 1998 die proteolytische Aktivität von ADAM 12 nach. Sie konnten

zeigen, dass ADAM 12 in der Lage ist,  $\alpha$ 2-Makroglobulin *in vitro* zu spalten. Wie alle MMPs wird ADAM 12 als inaktive Vorstufe sezerniert und durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert (Loechel et al., 1998; 1999).

### **ADAM 15**

ADAM 15 ist das erste Mitglied der ADAM-Familie, in dessen Disintegrin-Domäne die für SVMPs typische Integrin-Erkennungssequenz RGD gefunden werden konnte. Krätschmar und Mitarbeiter isolierten 1996 die cDNA von ADAM 15, die für ein aus 814 AS bestehendes Protein codiert und nannten das Protein Metargidin (für Metalloprotease-RGD-Disintegrin-Protein). Northern-Blot-Analysen zeigten die Expression von ADAM 15 in zahlreichen menschlichen Geweben, darunter Herz, Hirn, Lunge, Plazenta und auch Leukozyten (Krätschmar et al., 1996). ADAM 15 wurde außerdem in humanem Nabelschnurendothel und glatter Muskulatur aus der Aorta nachgewiesen (Herren et al., 1997).

ADAM 15 weist genauso wie ADAM 9, 10 und 12 eine katalytische Konsensussequenz (HEXXH) auf und gilt daher als potentiell proteolytisch aktiv, wobei seine proteolytische Aktivität bisher noch nicht gezeigt werden konnte. An der Grenze zwischen der Metalloprotease-Domäne und der Prodomäne finden sich vier konsekutive Argininreste, die als Spaltungsstelle für Serinproteasen, wie beispielsweise die Proproteinkonvertase Furin, bekannt sind. Zwei kurze prolinreiche Sequenzen und Liganden für SH3-Domänen im zytoplasmatischen Anteil von ADAM 15 können Proteine binden, die SH3-Domänen aufweisen und mit diesen interagieren (Krätschmar et al., 1996; Howard et al., 1999).

Nath und Mitarbeiter konnten vor kurzem nachweisen, dass ADAM 15 an Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 auf einer monozytären Zelllinie und an Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 auf einer T-Zelllinie bindet. Diese Bindung scheint abhängig von der Anwesenheit der RGD-Sequenz zu sein (Nath et al., 1999). Die Expression von ADAM 15 auf Osteoblasten und Osteoklasten konnte, wie auch für ADAM 9, von Inoue und Mitarbeitern gezeigt werden (Inoue et al., 1998). Eine Beteiligung von ADAM 15 an der Entstehung der Arteriosklerose zeigten Ergebnisse von Herren und Mitarbeitern, die herausfanden, dass Gewebe gesunder Blutgefäße keine Expression für ADAM 15 zeigt, diese aber in Arteriosklerosearealen hochreguliert wird (Herren et al., 1997).

### **ADAM 17**

Der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  ist ein schon seit langem bekanntes, proinflammatorisches Zytokin, das im Rahmen von Entzündungsreaktionen und Autoimmunprozessen von Makrophagen und Monozyten gebildet wird (Sherry and Cerami, 1988). Der Vorläufer dieses Proteins ist membrangebunden und wird durch Abspaltung seiner Ektodomäne aktiviert. Für diesen proteolytischen Prozeß ist ADAM 17 verantwortlich, das auch als TACE (TNF- $\alpha$ -converting enzyme) bezeichnet wird. Erste Hinweise darauf, dass TACE für die Aktivierung von TNF- $\alpha$  verantwortlich sein könnte, brachte die Erkenntnis, dass Metalloproteinase-Inhibitoren die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus monozytären Zelllinien verhinderten. Zellen mit einer Mutation am Genlocus für die zinkbindende proteolytisch aktive Domäne von TACE waren ebenfalls nicht in der Lage, TNF- $\alpha$  freizusetzen (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Weitere Untersuchungen ergaben, dass TACE auch an der Aktivierung anderer Proteine, wie beispielsweise dem Adhäsionsmolekül L-Selektin, beteiligt ist (Peschon et al., 1998). Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass auch TRANCE (= TNF-related activation-induced cytokine), ein ebenfalls membran-gebundenes Vorläuferprotein durch Abspaltung der Ektodomäne mittels TACE aktiviert wird (Lum et al., 1999).

Die Struktur von ADAM 17 hat die größte Ähnlichkeit mit ADAM 10. Es besitzt ebenfalls eine katalytische Konsensussequenz (HEXXH). Im Gegensatz zu anderen ADAMs trägt es im Anschluß an die Disintegrin-Domäne eine EGF-ähnliche und eine Crambin-ähnliche Domäne. Auch die cysteinreiche Domäne zeigt Sequenzabweichungen im Vergleich mit anderen ADAMs. Der zytoplasmatische Rest von ADAM 17 weist eine prolinreiche Sequenz und eine SH3-bindende Domäne auf (Black et al., 1997; Moss et al., 1997).

Northern-Blot-Analysen ergaben den Nachweis von ADAM 17 mRNA in zahlreichen fötalen und adulten menschlichen Geweben (darunter Herz, Plazenta, Skelettmuskel, Hoden, Hirn, Lunge u.v.m.). Die Expression von ADAM 17 konnte auch auf Monozyten, T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Black et al., 1997).

Zusammenfassend stellt die Familie der ADAMs eine weit verbreitete Gruppe transmembranaler Proteine dar, die dank ihrer verschiedenen Domänen, ihrer potentiellen Metalloproteinasen-Aktivität und ihrer Disintegrin-Funktion sowie möglichen Beteiligungen an Signaltransduktionen, viele Wechselwirkungen zu vermitteln im Stande sind.

#### **1.4.4. ADAMs und Hämatopoese**

Welche Rolle ADAMs im Rahmen der Hämatopoese spielen, ist unklar. Viele der oben erläuterten Funktionen der ADAMs weisen aber darauf hin, dass sie auch an Mechanismen der Hämatopoese, der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen, dem „Homing“ von Stammzellen aus dem peripheren Blut ins Knochenmark (im Rahmen von KM-Transplantationen) sowie der zytokininduzierten Mobilisierung der Stammzellen ins periphere Blut und bei der Immunantwort beteiligt sein könnten. In Organsystemen wie dem hämatopoetischen System, wo ein großer Zellumsatz stattfindet und in denen Wechselwirkungen zwischen Zellen und ECM eine wichtige Rolle spielen, kommt der Adhäsion von Zellen untereinander und an die ECM bzw. dem Loslösen von Zellen, eine große Bedeutung zu. Genauso sind proteolytische Ereignisse, die Platz für Neusynthese oder Zellwanderung zu schaffen, wichtige Grundvoraussetzungen für eine geregelte Hämatopoese. Interaktionen zwischen Knochenmark-Stroma und reifenden Blutzellen sind sehr wichtig für die kontrollierte Produktion gesunder Blutzellen. In diesem Zusammenhang könnten ADAMs, die beispielsweise von Leukozyten oder Endothelzellen exprimiert werden, in der Lage sein, Integrine zu binden und so an der Endothel-Zell-Erkennung beteiligt sein. Solche Interaktionen könnten dann über Signaltransduktionswege zu einer Metalloproteinasen-Freisetzung führen. Endothelzellen, die Proteine wie ADAM 15 exprimieren, könnten an der extravasalen Wanderung von Leukozyten oder der Thrombozytenaggregation beteiligt sein (Yamamoto et al., 1999).

Man kann sich auch vorstellen, dass bei der Entstehung von bösartigen Knochenmarkerkrankungen Strukturen, die solche Wechselwirkungen vermitteln, durch Fehlen oder Überproduktion, sowie Veränderungen der Funktion, eine entscheidende Rolle spielen.

### **1.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick in die Expression der ADAM Familie auf Zellen des humanen hämatopoetischen Systems zu bekommen.

Es wurden deshalb verschiedene ADAM-Vertreter ausgewählt, die bisher schon aus menschlichem Gewebe isoliert wurden und für die es erste Hinweise auf eine Expression in Zellen des humanen hämatopoetischen Systems sowie einer funktionellen Beteiligung an der Hämatopoese gab.

Bisher konnte die Expression von ADAM 9, 10, 11 und 15 nur auf malignen hämatopoetischen Zellen (leukämische, erythroleukämische Zellen, Myelom- und Lymphomzellen) gezeigt werden (Wu et al., 1997). ADAM 9 wurde außerdem auf reifen Leukozyten im peripheren Blut gefunden (Weskamp et al., 1996).

Die mRNA von ADAM 12 konnte von Abe und Mitarbeitern in mononukleären Vorstufen von Osteoklasten und Zellen der Myelopoese nachgewiesen werden, wobei deren Expression von der Stimulation durch Calzitriol abhängig war. ADAM 12 wurde außerdem auf murinen Stromazellen nachgewiesen (Abe et al., 1999). Die Expression von ADAM 17 konnte bisher auf reifen Monozyten, peripheren T-Zellen, Neutrophilen und Endothelzellen detektiert werden (Black et al., 1997).

Bisher kennt man nur wenige Fakten, die auf eine direkte Mitwirkung der ADAMs in der Hämatopoese schließen lassen. Die Bindung von monozytären Zellen und T-Zellen durch ADAM 15 über Integrine zeigt, dass ADAM 15 an wichtigen Adhäsionsvorgängen beteiligt ist (Nath et al., 1999). Die Beteiligung von ADAM 10 an der Aktivierung von Notch gibt ebenfalls Hinweise auf dessen Mitwirken bei der Hämatopoese, da sowohl Notch als auch sein Ligand Jagged-1 im primären Knochenmark, auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und auf Stromazelllinien nachgewiesen werden konnten (Varnum-Finney et al., 1998). Das von Makrophagen und Monozyten gebildete TNF- $\alpha$  wird durch ADAM 17 aktiviert (Black et al., 1997).

Zum Nachweis der Expression von ADAM 9, 10, 11, 12, 15 und 17 im humanen hämatopoetischen System wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Zelltypen des hämatopoetischen Systems untersucht. Dabei wurden zum Nachweis der ADAM-Expression zwei frühe CD 34+ Zelllinien verwendet, um Hinweise auf die Beteiligung der ADAMs an der frühen Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen zu erhalten. Stromazelllinien bieten eine gute Möglichkeit, nicht-hämatopoetische Zellen

des Knochenmark-„Microenvironment“ zu analysieren. Die Expression von ADAMs wurde deshalb auf drei verschiedenen etablierten Stromazelllinien untersucht.

Des Weiteren wurden primäre Knochenmarklangzeitkulturen mit in die Untersuchungen einbezogen, um einen Überblick über die Expression der ADAMs in diesem komplexeren System zu erhalten.

Die Expression von ADAM 17 in Endothelzellen (Black et al., 1997) und die Hochregulation von ADAM 15 in Arteriosklerosearealen (Herren et al., 1997) gaben Anlass, eine Knochenmark-Endothelzelllinie ebenfalls in die Versuchsreihe mit einzubeziehen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden vorwiegend von der Firma *Merck AG, Darmstadt*, sowie von der Firma *Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen* und der Firma *Roth, Karlsruhe* bezogen. Es wurden außerdem Reagenzien der Firma *Gibco/BRL, Eggenstein* und der Firma *Amersham-Pharmacia, Freiburg* eingesetzt.

Verwendet wurden des weiteren Zellkulturmedien und Medienzusätze der Firma *Seromed, Biochrom KG, Berlin*.

#### 2.1.2. Geräte

Zentrifugen:	Omnifuge 2.0 RS, <i>Heraeus sepatech, Stuttgart</i> Mikrozentrifuge Sigma 202 MK, <i>Sigma, Deisenhofen</i>
Mikroskope:	Axiovert 135, <i>Zeiss, Oberkochen</i> Axiophot mit Einrichtung zur Fluoreszenz- fotografie, <i>Zeiss, Oberkochen</i>
Spektralphotometer:	LS 500, <i>Dr. Lange, München</i>
Thermocycler:	PTC-100, <i>Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf</i> TRIO-Thermoblock, <i>Biometra, Göttingen</i> GeneAmp PCR System 2400, <i>Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt</i>
Agarose-Gelkammern:	DNA Pocket-Block UV, <i>Biozym Diagnostik GmbH Oldendorf</i> Minicell EC 370M, <i>E-C Apparates Cooperation</i>
UV-Transilluminator:	Fluolink, <i>Biometra, Göttingen</i>
Zytospin:	Zytospin 3, <i>Shandon Inc, Pittsburgh</i>
Western-Blot-Gelkammer:	SDS-PAGE, <i>Hoefer Scientific Instruments, San Francisco</i>
Blot-Kammer:	Mini Trans-Blot Cell Assembly, <i>Bio-Rad, München</i>

### 2.1.3. Molekulargewichtsstandards und DNA- Längenstandards

100 Basenpaar-DNA-Leiter, *Boehringer, Mannheim*

Rainbow-Marker, *Amersham-Pharmacia, Freiburg*

High-Range-Marker, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, *Bio-Rad, München*

### 2.1.4. PCR-Primer für ADAMs

Die Auswahl der Primer erfolgte mit dem über HUSAR zugänglichen Primerprogramm GCG in der EMBL-Datenbank in Heidelberg (Tabelle 2). Die Primer wurden von der Firma *MWG Biotech AG, Ebersberg* synthetisiert. Ein  $\beta$ -Aktin-Primerpaar wurde von Frau Ingeborg Steiert, Molekularbiologisches Labor der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2

<b>Bezeichnung, Synonym</b>	<b>Zugangsnummer EMBL</b>	<b>Position der Primerpaare Forward/Reverse</b>	<b>Amplifikat</b>
<b>ADAM 9, MDC 9</b>	D14665	bp 1730-1749 bp 2052-2033	323 bp
<b>ADAM 10, MADM</b>	Z48579	bp 1089-1108 bp 1384-1364	296 bp
<b>ADAM 11, MDC</b>	D17390	bp 1430-1450 bp 1687-1667	258 bp
<b>ADAM 12, Meltrin alpha</b>	AF023476	bp 2378-2397 bp 2753-2735	376 bp
<b>ADAM 15, Metargidin</b>	U41767	bp 1241-1259 bp 1609-1591	369 bp
<b>ADAM 17, TACE</b>	U69611	bp 1170-1187 bp 1537-1518	368 bp



### 2.1.5 Antikörper

#### **Erstantikörper:**

*Anti-ADAM 9:* Kaninchen anti-human MDC 9

*Anti-ADAM 15:* Kaninchen anti-human MDC 15

Die Antikörper gegen ADAM 9 und 15 wurden von Dr. Carl P. Blobel, Cellular Biochemistry and Biophysics Programm, Sloan-Kettering Institute, New York, NY 10021, USA, zur Verfügung gestellt.

*Anti-ADAM 10:* Kaninchen-Antiserum R70 gerichtet gegen die Peptidsequenz  
FDANQPEGKKC

Das Serum gegen ADAM 10 wurden von Dr. P. Glynn, MRC Toxicology Unit, University of Leicester, United Kingdom, zur Verfügung gestellt.

*Anti-Notch 1:* Ziege-Antiserum (polyklonales IgG), spezifisch gerichtet gegen  
humanes Notch 1, ohne Kreuzreaktionen mit Notch 2 und 3.

Dieses Serum wurde von der Firma *Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg* bezogen.

#### **Zweitantikörper:**

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, Cy3<sup>TM</sup>-markiert (*Dianova Immunotech, Hamburg*)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, FITC-markiert (*Dianova Immunotech, Hamburg*)

Kaninchen-Anti-Ziege, Cy3<sup>TM</sup>-markiert (*Dianova Immunotech, Hamburg*)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert (*Dianova Immunotech, Hamburg*)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert (*Amersham-Pharmacia, Freiburg*)

Esel-Anti-Ziege-IgG, HRP-konjugiert (*Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg*)

Esel-Anti-Ziege-IgG, AP-konjugiert (*Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg*)

### 2.1.6 Puffersysteme

PBS (Phosphate-Buffered-Saline): 10 mM di-Natriumhydrogenphosphat  
1.4 mM Kaliumdihydrogenphosphat  
2.7 mM Kaliumchlorid  
137 mM Natriumchlorid

## **2.2. Zellkulturen**

### **2.2.1. CD 34+ Zelllinien: KG1a, TF-1**

Die Zelllinie KG1a stammt aus langjährigem Laborbestand und wurde ursprünglich von ATCC (*American Type Culture Collection Manassas, VA, USA*) bezogen. Die Zelllinie TF-1 wurde von Dr. T. Kitamura, Department of Hematopoetic Growth Factors, Institute of Medical Science, University of Tokio, Japan zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien sind Suspensionszellen und wurden mit Zelllinienmedium kultiviert.

Bei der Zelllinie KG1a handelt es sich um eine aus dem Knochenmark eines AML-Patienten gewonnene myeloblastäre Zelllinie.

Die Zelllinie TF-1 ist eine faktorabhängige humane hämatopoetische Zelllinie, die zum Wachstum IL-3 oder GM-CSF benötigt (Kitamura et al., 1991). Dazu wurde dem Zelllinienmedium für TF-1 50 µl/ml konditionierter Überstand der IL-3 produzierenden Zelllinie 5637 zugegeben. Bei der Zelllinie 5637 handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie, die aus Blasenkarzinomzellen eines 68jährigen Mannes entstanden ist. Neben IL-3 produziert 5637 verschiedene andere Wachstumsfaktoren. Die Zelllinie 5637 wurde über *DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)*, bezogen.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen zuerst in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 5 ml Zelllinienmedium gegeben und nach erfolgreicher Anzucht in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 10 ml Zelllinienmedium überführt. Sie wurden 2-3mal pro Woche 1:2, bei schnellem Wachstum auch 1:4 geteilt. Dazu wurde die Suspension aus den Kulturflaschen in 15 ml Röhrchen überführt und bei 150 xg 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in frischem Zelllinienmedium resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen verteilt.

### **2.2.2. Stromazelllinien: L88/5, L87/4, HS-5**

Die humanen Stromazelllinien L88/5 und L87/4 sind adhärent wachsende Knochenmark-Stromazellen eines männlichen Patienten ohne hämatologische Erkrankung, die durch SV 40 Transformation entstanden sind. Sie weisen beide eine fibroblastenähnliche Morphologie auf (Thalmeier et al., 1994). Beide Zelllinien wurden

von Prof. Dr. Dörmer, GSF, Institut für experimentelle Hämatologie, München, zur Verfügung gestellt.

Die humane Knochenmark-Stromazelllinie HS-5 entstand durch Transformation mit dem Papilloma Virus E6/E7 aus primären Stromazellen. Sie weist ebenfalls eine fibroblastenähnliche Morphologie auf und sezerniert zahlreiche Wachstumsfaktoren (Roeklein and Torok-Storb, 1995). Die Zelllinie HS-5 wurde uns von Dr. Beverly Torok-Storb, Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA, zur Verfügung gestellt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen zuerst in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 5 ml Plus-Medium (HS-5 mit HS-5-Medium) gegeben und erst nach erfolgreicher Anzucht in grössere 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt. Die Stromazellen wuchsen adhärent am Flaschenboden und konnten, nachdem sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, zwei- bis dreimal pro Woche 1:2 geteilt werden. Die Zelllinie HS-5 konnte meist nur einmal pro Woche geteilt werden, es erfolgte jedoch ein regelmäßiger Wechsel des Mediums. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Zur Lösung der Zellen vom Flaschenboden wurde in die 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen 2 ml einer 0.025 %igen Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis die Zellen sich vom Flaschenboden lösten und vereinzelt vorlagen. Dann wurde Trypsin durch Zugabe von 10 ml des FCS-haltigen Kulturmediums blockiert und die im Medium suspendierten Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt. Es wurde nun wie bei den Suspensionszellen pelletiert und die Zellen auf Kulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

### **2.2.3. Knochenmark-Endothelzelllinie: HBME-1**

Die Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 wurde von Dr. Kenneth J. Pienta, University of Michigan Comprehensive Cancer Center, Department of Internal Medicine, Ann Arbor, Michigan, USA zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine aus humanem Knochenmark isolierte, mit SV 40 transfizierte Zelllinie. Bei dieser Zelllinie konnte beobachtet werden, dass Prostata-Karzinomzellen bevorzugt an HBME-1-Zellen adhäreren (Lehr and Pienta, 1998).

HBME-1 ist eine adhärent wachsende Zelllinie, die in Zelllinienmedium kultiviert und zweimal pro Woche 1:2 geteilt wurde. Sie wurde genauso behandelt wie die Stromazelllinien (s. 2.2.2.).

#### **2.2.4. Knochenmarklangzeitkulturen**

Knochenmarklangzeitkulturen können aus Knochenmarkaspiraten angelegt werden und betreiben nach Bildung einer adhärent wachsenden Stromazellschicht *in vitro* Hämatopoese (Dexter et al., 1984). Knochenmarkaspirate wurden von Dr. Christoph Faul, Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung II, zur Verfügung gestellt.

Das Aspirat wurde mit PBS verdünnt und auf ein vorgelegtes Percoll<sup>®</sup>-Kissen (Dichte: 1.077 g/ml) pipettiert. Anschließend wurde mit niedriger Beschleunigung und ohne Abbremsen 20 min bei 1500 xg zentrifugiert, so dass sich im Pellet vorwiegend reife Erythrozyten und Granulozyten befanden, während mononukleäre Zellen dem Percoll<sup>®</sup>-Kissen auflagen. Die mononukleären Zellen wurden abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und in Kulturflaschen mit Plus-Medium kultiviert. Ein Medienwechsel fand einmal pro Woche statt, wobei nur die Hälfte des Mediums ausgetauscht wurde. Die Stromazellschicht bildete sich nach 1-3 Wochen am Boden der Kulturflasche.

#### **2.2.5. Kontrollzelllinie: K562 für RT-PCR**

Die Expression von ADAM 9, 10, 11 und 15 konnte von Wu und Mitarbeitern mittels RT-PCR auf der Zelllinie K562 nachgewiesen werden (Wu et al., 1997) und wurde hier als Positivkontrolle eingesetzt.

Die erythroblastäre Zelllinie K562 stammt aus dem Knochenmark einer CML-Patientin. Es handelt sich um Suspensionszellen, die wie die Zelllinien KG1a und TF-1 in Zelllinienmedium kultiviert und genauso wie diese behandelt wurden. Die Zelllinie K562 war ebenfalls von ATCC bezogen worden.

### 2.2.6. Kulturbedingungen

Die verwendeten Zellkulturen wurden bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid-Gehalt kultiviert.

Die Pflege der Zellen und der Medienwechsel erfolgte unter sterilen Bedingungen mit sterilen, autoklavierten Lösungen.

### 2.2.7. Kulturmedien

#### 2.2.7.1. Zelllinienmedium, für KG1a, TF-1 und HBME-1

10 % fötales Kälberserum (FCS)

1 % Penicillin / Streptomycin ( $10^4$  U/ml)

in RPMI-1640

Für die Zelllinie TF-1 wurde dem Zelllinienmedium 50 µl/ml konditioniertes Medium der Zelllinie 5637 hinzugefügt.

#### 2.2.7.2. Plus-Medium, für die Stromazelllinien und KM-Langzeitkulturen

12.5 % FCS

12.5 % Pferdeserum (PS)

$10^{-6}$  M Hydrocortison

1 % Penicillin/Streptomycin

in RPMI-1640

#### 2.2.7.3. HS-5 Medium, für die Zelllinie HS-5

5 % FCS

1 % L-Glutamin (2 mM)

1 % Natrium Pyruvat (1mM)

1 % Penicillin/Streptomycin ( $10^4$  U/ml)

in RPMI-1640

Alle Seren wurden bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert, mit den anderen Zusätzen durch einen Mikrofilter steril filtriert und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.2.8. Einfrieren von Zelllinien**

Es wurden ca. 10 ml Zellsuspension 5 min mit 150 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Einfriermedium (20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid in RPMI) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden dann 1 Stunde auf Eis inkubiert, über Nacht bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag zur Lagerung bei -70 °C gebracht. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### **2.2.9. Auftauen von Zelllinien**

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zelllinien wurden zum schnellen Auftauen in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt und, nachdem sie fast aufgetaut waren, in 10 ml des entsprechenden vorgewärmten Medium aufgenommen. Die nun durch das warme Medium vollständig aufgetaute Suspension wurde bei 150xg 5 min pelletiert, einmal mit Medium gewaschen und anschließend in Kulturflaschen überführt.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung aus den adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte nach Chomczynski und Sacchi (1987) aus einer 75 ml-Kulturflasche, die mit einer konfluenten Zellschicht bewachsen war und einmal mit PBS gewaschen wurde. Danach wurde 1 ml frisch angesetzte Denaturierungslösung (s.u.) direkt zugegeben und das Lysat zur Homogenisierung und Scherung der DNA zehnmal mit einer Pipette auf- und abpipettiert.

Die Suspensionszellen wurden zuerst pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet ebenfalls mit 1 ml Denaturierungslösung in gleicher Weise homogenisiert.

Die Homogenate wurden mit 0.2 ml 2 M Na-Acetat gut gemischt und anschließend mit 1 ml Phenol und 0.2 ml eines Chloroform/Isoamylalkohol (49:1)-Gemisches versetzt, gut gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert.

Zur Trennung der Phasen wurde das Gemisch für 30 min bei 6000xg und 4 °C zentrifugiert. Die obere RNA enthaltende wässrige Phase wurde abpipettiert, in ein 2 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20 °C für 30 min.

Die RNA wurde anschließend bei 10000 xg und 4 °C 10 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde in 300 µl Denaturierungslösung aufgenommen und in einem frischen Reaktionsgefäß wiederum mit demselben Volumen Isopropanol 30 min bei -20 °C gefällt, danach mit 10000 xg bei 4 °C 10 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen.

Anschließend wurde das Pellet mit 75 % Ethanol bei Raumtemperatur 10 min zur Lösung der Salze inkubiert, mit 10000 xg 4 °C 5 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Das trockene Pellet wurde in 50 µl aqua bidest aufgenommen. Es wurde sofort mit dem DNase-Verdau fortgeföhren.

Lösungen:

- 2 M Na-Acetat pH 4.0
- Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 Vol/Vol)
- 100 % Isopropanol
- 75 % Ethanol
- ROTI-Phenol, mit H<sub>2</sub>O equilibriert

Denaturierungslösung:

- 4 M Guanidiniumthiocyanat
- 25 mM Na-Citrat pH 7.0
- 0.1 M 2-Mercaptoethanol
- 0.5 % N-Laurosarkosin (Sarkosyl)

### 2.3.2. DNase-Verdau und Konzentrationsbestimmung

Um DNA-Verunreinigungen zu entfernen, wurde im Anschluß an die RNA-Isolierung direkt ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde die in 50 µl aufgenommene RNA mit folgenden Reagenzien versetzt:

44.4 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat 1:1000 in aqua bidest)

3.3 µl 3 M Na-Acetat pH 5.2

0.5 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>

1.8 µl DNase (17.5 U/ml)

Reaktionsvolumen: 100 µl.

Es wurde gut gemischt, kurz abzentrifugiert und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Zur Fällung wurde der Ansatz mit 10 µl 3 M Na-Acetat und 250 µl 100 % Ethanol versetzt und 30 min bei -70 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 10000xg bei 4 °C 15 min lang zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde die RNA 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit einem Spektralphotometer. Dazu wurden von der RNA nach DNase-Verdau 5 µl mit 495 µl DEPC-Wasser verdünnt (Verdünnung 1:100). Es wurden Extinktionswerte gegen den Leerwert (DEPC-Wasser) bei 260, 280 und 320 nm gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml, die Konzentration doppelsträngiger DNA 50 µg/ml, die von Oligonukleotiden 30 µg/ml. Bei 280 nm wird der Proteingehalt, bei 320 nm die Löslichkeit der RNA gemessen. Der Quotient aus den Extinktionen von 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der RNA-Proben an und sollte nicht unter 1.8 liegen.

### **2.3.3. Reverse Transkription**

Um die mRNA-Expression der zu untersuchenden Zellen mittels PCR nachzuweisen, muß die mRNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Der Vorgang der reversen Transkription erfolgte mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der M-MLV reversen Transkriptase (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase). Diese synthetisiert unter Anwesenheit aller Nukleotide sowie Oligo (dT)<sub>12-18</sub>-Primern einen kompletten cDNA-Strang.



Reaktionsansatz:	1 µg RNA 4 µl 5-fach First Strand Buffer 2 µl DDT (Dithiotreitol) 0.1 M 1 µl dNTP-Mix 20 mM 1 µl Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (Polydesoxythymidin) 1 µl M-MLV RT (200 U/µl) DEPC-Wasser ad 20 µl
Reaktionsvolumen:	20 µl
5-fach First Strand Buffer:	250 mM Tris/HCl pH 8.3 375 mM KCl 80 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP-Mix:	20 mM dATP 20 mM dTTP 20 mM dCTP 20 mM dGTP

Dieser Ansatz wurde auf Eis pipettiert, dann im Thermoblock 1 h bei 37 °C und 10 min bei 94 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt, oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine sehr effektive Methode, um *in vitro* große Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz zu erzeugen. Diese können anschließend in einer Agarose-Gel-Elektrophorese durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden.

Die Vervielfältigung (Amplifikation) erreicht man durch einen dreistufigen Prozeß. Man benötigt dazu zwei synthetische, komplementäre Oligonukleotidprimer, die die gesuchte DNA-Sequenz erkennen und begrenzen, außerdem eine DNA-Probe mit der Zielsequenz, die zwischen dem Primerpaar liegt, eine thermostabile DNA-Polymerase (hier: Taq-Polymerase, aus *Thermophilus aquaticus* gewonnene hitzestabile DNA-

Polymerase), die einer Temperatur von ca. 95 °C standhält, sowie die vier Desoxyribonukleotide.

Die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz erfordert eine Reihe von Zyklen, wovon jeder Zyklus aus drei aufeinanderfolgenden Schritten besteht. Der erste Schritt ist die thermische Denaturierung der DNA-Probe. Durch Erhöhung der Temperatur auf ca. 94 °C für 1 min kommt es zur Strangtrennung. Für den zweiten Schritt, die Renaturierung, läßt man die Temperatur auf 56-60 °C abkühlen. Nach der Temperatursenkung paaren sich die Primer mit komplementären Sequenzen in der DNA-Probe. Beim dritten Schritt liegt die Temperatur bei ca. 72 °C, dem optimalen Bereich für die katalytische Funktion der Taq-Polymerase. Die DNA-Synthese beginnt an den 3'-Hydroxy-Enden der Primer.

Während des Syntheseschritts im ersten Zyklus werden die neuen, von den Primern ausgehenden DNA-Stränge über das Ende der zum zweiten Primer komplementären Sequenz hinaus verlängert. Diese neu entstandenen Stränge bilden „lange Matritzen“, die im zweiten Zyklus verwendet werden können. Während des zweiten Zyklus werden die ursprünglichen DNA-Stränge und die im ersten Zyklus synthetisierten Stränge wieder denaturiert und dann mit den Primern hybridisiert.

Eine zweite Syntheserunde erzeugt wieder lange Matritzen, aber auch einige DNA-Stränge, die an einem Ende einen Primer aufweisen, am anderen Ende eine Sequenz, die komplementär zum zweiten ist („kurze Matritzen“). Während des dritten Zyklus hybridisieren kurze und lange Matritzen, sowie die ursprünglichen Stränge mit den Primern und werden repliziert. Während den darauffolgenden Zyklen sammeln sich bevorzugt die kurzen Matritzen an, bis diese Stränge im dreißigsten Zyklus bis zu einer Million mal häufiger sind als die ursprünglichen oder die langen Matritzen.

Reaktionsansatz: 1 µg cDNA (aus der reversen Transkription)  
1.5 µl von jedem Primer (10 pmol/µl)  
1 µl dNTP-Mix (20 mM je Nukleotid)  
5 µl Taq 10-fach Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM)  
1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)  
DEPC-Wasser ad 50 µl

Reaktionsvolumen: 50 µl

Reagenzien: Primer für ADAM 9, 10, 11, 12, 15, 17: siehe unter 2.1.4., Verdünnung und Konzentrationsbestimmung nach Herstellerangaben.

Taq-Polymerase 10-fach Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 8.3  
500 mM KCl  
0.1 % Gelatine

Der Reaktionsansatz wurde in kleine, spezielle PCR-Cups für den Thermocycler PTC-100 auf Eis pipettiert und fest verschlossen.

Reaktionszyklen: 1 mal 1 min bei 94 °C (Denaturierung)  
34 mal 40 s bei 94 °C (Denaturierung)  
40 s bei 58 °C (Annealing)  
1 min bei 72 °C (Extension)  
1 mal 10 min bei 72 °C  
anschließend langsame Abkühlung auf 4 °C.

Die Proben wurden dann entweder direkt in einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt oder bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 2.3.5. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2 %igen Agarose Gel. Dazu wurde 1 g Agarose abgewogen und mit 50 ml TBE-Puffer in einem Mikrowellengerät bei 600 W ca. 3 min erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Danach wurde die Gellösung auf ca. 50 °C abgekühlt und anschließend mit einem

Kamm für die Proben in die Gelkammer gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entnommen und die Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer so gefüllt, dass der Flüssigkeitsspiegel ca. 0.5 cm über der Geloberfläche stand.

Danach wurden die durch den Kamm entstandenen Geltaschen mit jeweils 10 µl des PCR-Produktes, vermischt mit 2 µl 6-fach DNA-Laufpuffer, gefüllt. In eine weitere Geltasche wurde als Längenstandard 5 µl einer 100 bp DNA-Leiter, ebenfalls mit 2 µl Laufpuffer vermischt, gegeben.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 und 300 mA für ca. 2 Stunden.

Um die Amplifikate sichtbar zu machen, wurde das Gel 10 min in einer 1 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt, anschließend 20 min unter fließendem Wasser entfärbt und dann unter einem UV-Transilluminator analysiert und fotografiert.

Reagenzien:	1x TBE-Puffer:	90 mM Tris/HCl pH 8.3 90 mM Borsäure 2 mM EDTA
	6-fach DNA-Laufpuffer:	10 mM Natriumphosphat pH 7.0 50 % Glycerin 0.25 % Bromphenolblau
	Ethidiumbromidbad:	100 ml aqua bidest 0.1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml)

### 2.3.6. Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die Sequenz der PCR-Produkte zu bestimmen, wurde die Didesoxynukleotidmethode nach Sanger und Mitarbeitern (1977) verwendet. Dabei werden Didesoxynukleotide in einen wachsenden DNA-Strang eingebaut. Didesoxynukleotide besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, so dass die Strangsynthese abbricht.

Jedes Desoxinukleotid ist an ein andersfarbiges Chromophor gekoppelt (siehe Terminator-Mix). Nach elektrophoretischer Trennung der chromophor-markierten Bruchstücke kann mittels eines Computerprogrammes die Intensität der gekoppelten Chromophore gemessen und in ein Diagramm aufgenommen werden.

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die fotografierten Banden nach der Gelelektrophorese unter dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und in Eppendorf-Cups gegeben. Um Strangbrüche zu vermeiden, mußte dies möglichst schnell erfolgen. Die Gelstückchen wurden gewogen, die DNA mit dem Gene-Clean-Kit der Firma *Quiagen, Hilden* nach Angaben des Herstellers aus dem Gel herausgelöst und aufgereinigt, in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentrationen photometrisch mit dem Spektralphotometer (s. unter 2.3.2) bestimmt.

Es wurden anschließend 500 ng des aufgereinigten PCR-Produktes zur Sequenzierung eingesetzt.

Reaktionsansatz: 1.5-2.5 µl PCR-Produkt (je nach Konzentration)  
0.8 µl je Primer  
2.0 µl Terminator-Mix  
DEPC-Wasser ad 10 µl

Reaktionsvolumen: 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde in spezielle PCR-Reaktionsgefäße auf Eis pipettiert.

Reaktionszyklen: 25 mal 10 s bei 96 °C  
5 s bei 50 °C  
4 min bei 58 °C  
dann Abkühlung auf 4 °C.

Terminator-Mix: (Firma Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt)

A-Dye Terminator markiert mit dichloro[R6G]

C-Dye Terminator markiert mit dichloro[ROX]

G-Dye Terminator markiert mit dichloro[R119]

T-Dye Terminator markiert mit dichloro[TAMRA]

Desoxynukleotidtriphosphate: dATP, cCTP, dITP, dUTP

thermostabile Taq-Polymerase

MgCl<sub>2</sub>

Tris/HCl, pH 9.0

Nach dem Cycle-Sequencing wurde das Sequenzierungsprodukt wiederum aufgereinigt. Dies wurde mit Centri-Sep Säulen der Firma *Princeton Separations, Adelphia, New Jersey, USA*, nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde von Frau Ingeborg Steiert, Molekularbiologisches Labor der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, durchgeführt.

## **2.4. Immunologische Methoden**

### **2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung werden Antigene durch spezifische Antikörper (Erstantikörper) erkannt. Die Bindung des Antikörpers an sein Antigen wird durch einen zweiten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper (Zweitantikörper), der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht.

Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden für die Immunfluoreszenzfärbung in 24-Well-Kulturschalen auf Glasplättchen kultiviert. Nachdem sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurde das Kulturmedium abpipettiert, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit -20 °C kaltem Methanol 5 min fixiert. Danach wurde nochmals zweimal 5 min mit PBS gewaschen und, falls nicht sofort verwendet, bei -20 °C gelagert. Bei sofortiger Verwendung wurden die Glasplättchen vorsichtig aus den 24-Well-Platten herausgenommen und auf Objektträgern befestigt.

Die Suspensionszelllinien wurde in einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS mittels Zytospin auf Objektträger gebracht. Die nun kreisförmig auf Objektträgern haftenden Zellen wurden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert oder sofort zur Immunfluoreszenzfärbung mit  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  kaltem Methanol 5 min fixiert und danach zweimal mit PBS gewaschen.

Die auf Objektträger kreisförmig aufgebraachten Zellen bzw. Glasplättchen wurden mit einem „PAP-Fettstift“ (Dianova-Immunotech, Hamburg) umfahren, um ein Wegfließen der aufzubringenden Lösungen zu verhindern.

Die spezifischen Erstantikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen (1:100, 1:250, 1:800 und 1:2000) in PBS mit 0.1 % BSA (bovine serum albumin) verdünnt. Je 200  $\mu$ l dieser Lösung wurde auf jeweils ein Glasplättchen bzw. ein Zytospin-Feld langsam und vorsichtig aufpipettiert und in einer abgedunkelten feuchten Kammer 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Erstantikörperverdünnung vorsichtig abgesaugt und die Objektträger in derselben Weise mit PBS dreimal 5 min gewaschen.

Anschließend folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur. Der Cy3<sup>TM</sup>-konjugierte Antikörper wurde mit PBS und 0.1 % BSA 1:1000 verdünnt. Dieser Lösung wurde, zur Färbung der Zellkerne, DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid) in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml hinzugefügt. Die Zellkerne erscheinen mit diesem Farbstoff nach UV-Anregung blau. Um das Auftragen unspezifischer Fluorochrompartikel zu vermeiden, wurde die Lösung vor dem Auftragen auf die Objektträger kurz abzentrifugiert und der Überstand verwendet. Anschließend wurde nochmals dreimal 5 min gewaschen.

Die markierten und gewaschenen Zellen wurden auf den Objektträgern mit Elvanol (Klein et al., 1988) eingedeckelt. In dem verwendeten Elvanol war die Substanz DABCO (1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octan) gelöst, die ein Ausbleichen der Färbung verhindern soll.

Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper inkubiert. Hierbei konnte in keinem Fall eine spezifische Anfärbung detektiert werden.

Die Objektträger wurden bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und nach dem Aushärten des Elvanol im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

Für den Einsatz des Kaninchenserums gegen ADAM 10 wurde von Dr. Paul Glynn (University of Leicester) empfohlen, zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers

eine Peptid-Blockierung als zusätzliche Kontrolle durchzuführen. Das dazu benötigte 11 mer Peptid (FDANQPEGKKC) wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Hubert Kahlbacher, Naturwissenschaftliches Medizinisches Institut, Tübingen synthetisiert. Für die Peptidblockierung wurden das Peptid in einer Konzentration von 10 µg/µl eingesetzt und mit dem Antikörper vor dessen Verwendung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann wie oben beschrieben fortgefahren.

#### **2.4.2. Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS):**

Diese Methode diente der Sortierung und Anreicherung von CD34+ Zellen aus humanem Knochenmark, um sie in Doppelfluoreszenzfärbungen einzusetzen. Dazu wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isolierte mononukleäre Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und mit Blockierungsreagenz für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen der Zellen in MACS-Puffer erfolgte die Koppelung mit einem Erstantikörper (Maus-Anti-CD34-IgG) für 20 min bei 4 °C. Nach erneutem Waschschrift wurde der Ansatz mit dem Zweitantikörper (Anti-Maus-IgG, Eisenpartikel-konjugiert) inkubiert (20 min bei 4 °C). Nach erneutem Waschgang wurde der Ansatz durch ein Drahtnetz gedrückt und auf eine äquilibrierte Säule (MiniMACS-Methode der Firma *Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach*) mit Magnetfeld zur selektiven Bindung der markierten Zellen aufgetragen. Zellen, die nicht mit dem Antikörper markiert waren, wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt, die markierten CD34+ Zellen wurden anschließend nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld eluiert. Eine Überprüfung der Reinheit erfolgte durch FACS-Analyse.

MACS-Puffer:        PBS  
                          0.5 % BSA  
                          5 mM EDTA



### 2.4.3. Western-Blot

Bei der Western-Blot-Analyse werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, mittels eines Blot-Verfahrens auf eine Membran transferiert und anschließend durch spezifische Antikörper auf der Oberfläche der Membran detektiert. Diese spezifische Antikörperbindung (Erstantikörper) an die auf die Membran transferierten Proteine wird durch einen enzymmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen, welcher durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht wird.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit einer Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).

Für die Elektrophorese wurden Zell-Lysate hergestellt. Dazu wurden die Suspensionszellen einer dicht gewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit jeweils 1 ml Lysepuffer (mit Protease-Inhibitoren) versetzt, gut gemischt und auf Eis 1 h inkubiert. Der konfluent gewachsene Zellrasen der adhären wachsenden Zelllinien wurde einmal gewaschen, die Zellen anschließend mit 1 ml Lysepuffer vom Boden der Kulturflasche gelöst und lysiert und danach ebenfalls 1 h auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die lysierten Zellen 15 min bei 1200 xg zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Cups pipettiert. Eine Aufbewahrung der Lysate bei -20 °C war an dieser Stelle möglich.

Pro Ansatz wurde nun zum Auftragen auf das Gel 20 µl Proben-Auftragspuffer zum Extrakt gegeben. Als Längenstandards wurden 10 µl Rainbow-Marker mit 10 µl Proben-Auftragspuffer gemischt, sowie 20 µl High-Range-Marker mit 20 µl Auftragspuffer.

Die Ansätze wurden 5 min im Heizblock bei 95 °C denaturiert und im Anschluß wurde das Gel beladen.

Lösungen:

Lysepuffer:	150 mM NaCl
	50 mM Tris-Puffer pH 7.4
	10 mM EDTA
	1 % NP 40

+ Protease-Inhibitoren:

2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

2 µg/µl Aprotinin

1 µg/µl Leupeptin

2x Proben-Auftragspuffer: 0.1 M Tris-HCl pH 6.8  
6 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)  
0.2 M DTT (Dithiothreitol)  
40 % Glycerin  
0.1 % Bromphenolblau

Auf Empfehlung von Dr. Paul Glynn (Leicester) wurde zum Nachweis der ADAMs nicht das gesamte Zelllysate, sondern die Glykoproteinfraktion der Zellen eingesetzt. Dazu wurde Conavalin A-gekoppelte Sepharose (Pharmacia Biotech) verwendet. Diese ConA-Sepharose bindet reversibel Zuckerreste und somit nur glykosylierte Proteine. Im sog. „Batch-Verfahren“ wurde zu 1 ml Zellextrakt 50 µl Con A Sepharose (50 %) gegeben, der Ansatz mindestens 1 h oder besser über Nacht bei 4 °C langsam bewegt. Anschließend wurde der Extrakt kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die an das Conavalin A gekoppelten Glykoproteine einmal mit PBS gewaschen. Durch Aufkochen im Auftragspuffer wurden die Glykoproteine von der Con-A-Sepharose gelöst.

#### ***SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:***

Zur Trennung der Proteine wurden 10 %ige Trenngele hergestellt. Dazu wurde das Gel zwischen die beiden senkrecht stehenden Glasplatten der Western-Blot-Gelkammer bis 3 cm unter dem oberen Rand der Glasplatten gegossen, so dass noch Platz für das Sammelgel blieb. Bis das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde es mit einer dünnen Schicht Butanol überschichtet, um zu verhindern, dass Sauerstoff die Polymerisierungsreaktion verhindert.

Nach Aushärten des Trenngels wurde das Butanol wieder vorsichtig abgenommen, ein

4 %iges Sammelgel darüber gegossen und ein Probenkamm für die Geltaschen zum Auftragen der Proben eingesetzt. Mit dem Sammelgel erreicht man, dass die Proben sich beim Übertritt ins Trenngel konzentrieren und somit schärfere Banden entstehen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und an ein Kühlwassersystem angeschlossen. Nach Beladen des Gels mit 40 µl der denaturierten Probe pro Spur sowie den Längenstandards, erfolgte die elektrophoretische Trennung bei 300 V und 80 mA für ca. 1.5 h.

Lösungen:

Trenngel: 10 % (Endkonzentration) einer Stammlösung Acrylamid/  
Bisacrylamid (30 %/0.15 % )  
0.375 M Tris/HCl pH 8.8  
0.1 % SDS  
1 mM EDTA  
0.025 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)  
0.18 % TEMED (N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin)

Sammelgel: 4 % (Endkonzentration) einer Stammlösung Acrylamid/  
Bisacrylamid (10 %/0.5 %)  
0.125 M Tris/HCl pH 6.8  
0.1 % SDS  
1 mM EDTA  
0.05 % APS  
0.3 % TEMED

Elektrophoresepuffer: 50 mM Tris-Base pH 8.6  
380 mM Glycin  
0.1 % SDS

Transfer der Proteine mittels Nassblot auf eine Nitrozellulose-Membran:

Die Nitrozellulose-Membran besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität. Um die Proteine auf die Membran zu transferieren, wurden die folgenden Lagen in 1x Transferpuffer getränkt und blasenfrei übereinander geschichtet:

3x Whatman 3 MM Papier (*Schleicher und Schuell, Dassel*)  
Acrylamidgel aus Elektrophorese  
Nitrozellulose-Membran (*Schleicher und Schuell, Dassel*)  
3x Whatman 3 MM Papier

Diese Lagen wurden blasenfrei in die Haltekassette eingespannt und senkrecht in die Blot-Kammer gestellt. Anschließend wurde die Kammer mit Transferpuffer gefüllt, ein elektrisches Feld angelegt (100 V, 300 mA) und 70 min geblottet. Während des Transfers war ein Kühlsystem angeschlossen.

Transferpuffer :     25 mM Tris pH 8.3  
                          192 mM Glycin

### ***Blockierung:***

Bevor die Proteine nun mit spezifischen Antikörpern detektiert werden konnten, mussten die unspezifischen Membranbindungsstellen der Nitrozellulose-Membran blockiert werden. Dazu wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierungslösung gelegt.

Blockierungslösung:     5 % BSA (Rinderserumalbumin) in TTBS

TBS (Tris gepufferte Salzlösung):

50 mM Tris pH 7.6

154 mM NaCl

TTBS:                    TBS + 0.05 % Tween 20

Nach der Blockierung wurde die Spur der Nitrozellulose-Membran, auf die der High-Range-Marker geblottet wurde, abgeschnitten, 1 min mit Amidoschwarz (0.1 %) gefärbt, 30 min mit 20 % Isopropanol und 10 % Essigsäure entfärbt, in aqua bidest

gewaschen und getrocknet. Die restliche Membran wurde gleichzeitig 3mal 5 min in TTBS gewaschen.

### ***Detektion der Analyse:***

Der Erstantikörper wurde 1:100 in TTBS verdünnt und mit der Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Diese Folie wurde für 3 h bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wurde 3mal 5 min in TTBS gewaschen.

Dann wurde der Zweitantikörper 1:400 mit TTBS verdünnt, ebenfalls mit der Membran in Plastikfolie eingeschweißt und bei Raumtemperatur 1 h bewegt, danach wieder 3mal 5 min mit TTBS gewaschen. Es wurden zwei verschiedene Detektionssysteme angewandt:

#### *A. Farbreaktion mit alkalischer Phosphatase:*

Die Membran, an die nun der AP-konjugierte Zweitantikörper gebunden hatte, wurde für ca. 10-15 min (bis zur Bildung spezifischer Banden) in eine Substratlösung getaucht. Diese wurde hergestellt, indem eine Substrat-Tablette der Firma *Sigma Chemie* (Sigma Fast 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro blue Tetrazolium Tablets) in 10 ml aqua bidest gelöst wurde. Die Reaktion wurde bei optimalem Verhältnis der spezifischen Banden zu unspezifischem Hintergrund mit TTBS abgestoppt. Da die Farbreaktion innerhalb kurzer Zeit an Intensität verliert, sollten die Membranen möglichst umgehend fotografiert werden.

#### *B. Meerrettich-Peroxidase-Reaktion mit Chemilumineszenz (ECL™)-Detektion:*

Diese Methode beruht auf der Bildung einer Acridinium-Ester-Verbindung, die mit der Peroxidase intensive Chemilumineszenz produziert, was zur Schwärzung eines Röntgenfilmes führt.

Die Membran, die nun an HRP (horseradish peroxidase)-konjugierte Zweitantikörper gebunden hatte, wurde 10-15 min in die Substratlösung (Lumigen PS-3 acridan der Firma *Amersham-Pharmacia, Freiburg*) getaucht. Danach wurde die Membran sofort zwischen zwei Folien in eine Fotokassette gelegt. Anschließend wurde ein Film (Hyperfilm™ ECL™ der Firma *Amersham-Pharmacia, Freiburg*) aufgelegt und dies

abhängig von optimalen Schwärzungs- bzw. Hintergrundverhältnissen nach erfolgter Entwicklung zwischen 5 und 30 min mehrmals wiederholt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis der mRNA-Expression verschiedener ADAMs auf Zellen des humanen Knochenmarkes.

Die mRNA-Expression von ADAM 9, ADAM 10, ADAM 11, ADAM 12, ADAM 15 und ADAM 17 wurde bei CD34+ hämatopoetischen Zelllinien, Knochenmark-endothelien, nicht-hämatopoetischen Knochenmark-Stromazelllinien sowie bei primären Stromazellen des Knochenmarks durch RT-PCR-Analysen untersucht. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt, detektiert und anschließend sequenziert.

Abbildung 2 zeigt die Lage der einzelnen Primer für die untersuchten ADAMs:

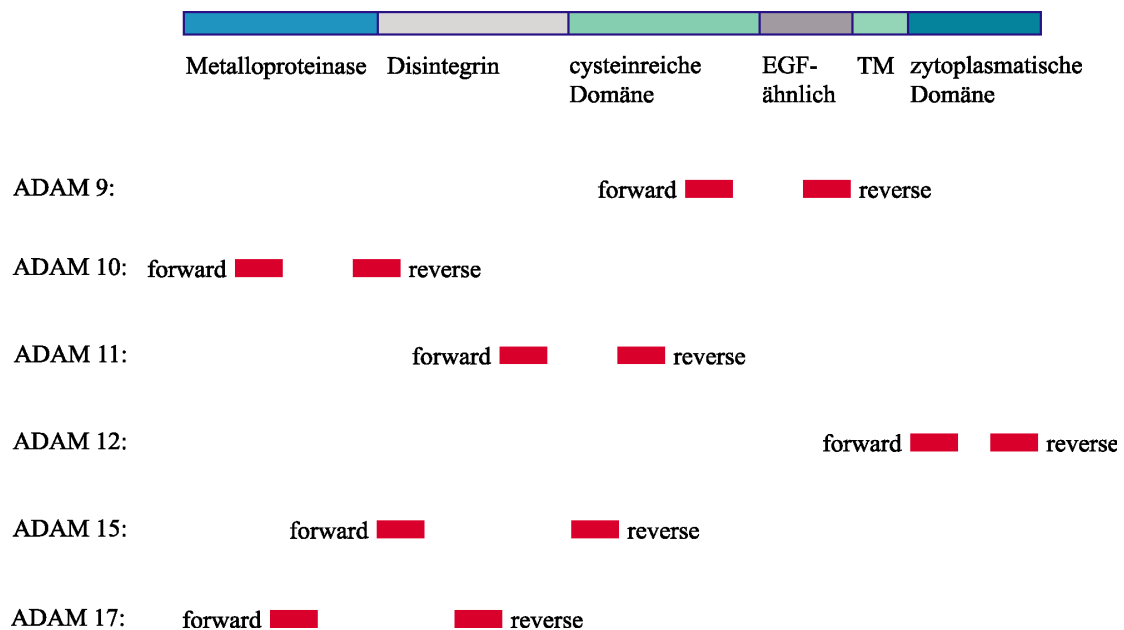


Abb. 2: Schema der Lage der Primer bezüglich der Domänen einzelner ADAMs. Die Domänen der ADAMs sind schematisch dargestellt. „Forward“ und „reverse“ Primer sind jeweils rot eingezeichnet. Man erkennt, welches Fragment innerhalb welcher Domäne amplifiziert wird. TM = Transmembrandomäne.

### 3.1.1. RT-PCR-Analyse mit den CD 34+ Zelllinien KG1a und TF-1

Man erkennt bei beiden Zelllinien deutliche Signale folgender Amplifikationsprodukte: ADAM 9 mit 323 Basenpaaren, ADAM 10 mit 296 bp, ADAM 11 mit 258 bp, ADAM 15 mit 369 bp und ADAM 17 mit 368 bp. Signale für PCR-Amplifikationsprodukte von ADAM 12 konnten bei beiden Zelllinien nicht detektiert werden. Als Funktionskontrolle für die cDNA wurde ein  $\beta$ -Aktin-Primer mit einem Amplifikationsprodukt von 316 bp eingesetzt (Abb. 3a/3b).

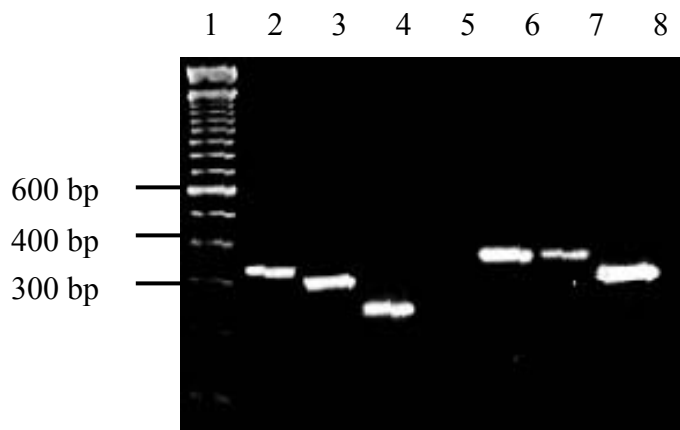


Abb. 3a

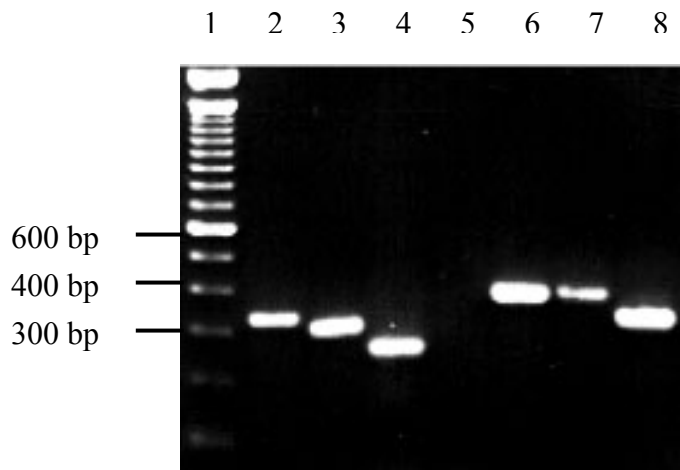


Abb. 3b

*Abb. 3: Expression verschiedener ADAMs auf CD34+ Zellen.*

Aus den Zelllinien KG1a (Abb. 3a) und TF-1 (Abb. 3b) wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primerpaaren für humanes ADAM 9 (Spur 2), ADAM 10 (Spur 3), ADAM 11 (Spur 4), ADAM 12 (Spur 5), ADAM 15 (Spur 6), ADAM 17 (Spur 7) und  $\beta$ -Aktin (Spur 8) in einer PCR amplifiziert. In Spur 1 wurde eine 100 Basenpaar-Leiter aufgetragen.



### 3.1.2. RT-PCR-Analyse mit den Knochenmark-Stromazelllinien L87/4, L88/5 und HS-5

Wie auch bei den CD34+ hämatopoetischen Zelllinien lassen sich bei den verwendeten Stromazelllinien L88/5, L87/4 und HS-5 Amplifikationsprodukte für ADAM 9, ADAM 10, ADAM 11, ADAM 15 und ADAM 17 nachweisen. ADAM 12 wird auch in Stromazelllinien nicht synthetisiert. In Abb. 4 sind nur die Ergebnisse für L88/5 und HS-5 gezeigt, die Ergebnisse für L87/4 wurden nicht abgebildet.

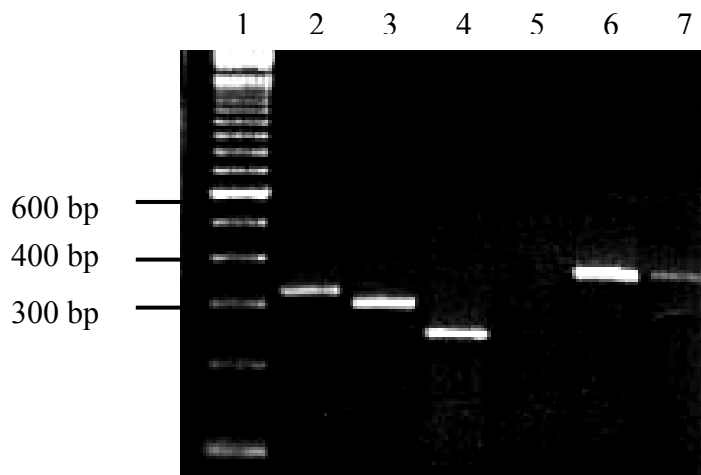


Abb. 4a

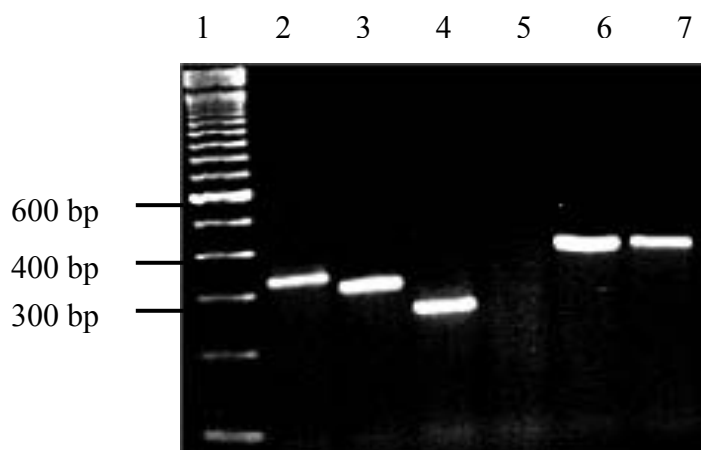


Abb. 4b

*Abb. 4: Expression verschiedener ADAMs auf Stromazellen.*

Nach der Isolierung von RNA aus den Zelllinien L88/5 (Abb. 4a) und HS-5 (Abb. 4b), wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primerpaaren für folgende humane ADAM-Vertreter in einer PCR amplifiziert: ADAM 9 (Spur 2), ADAM 10 (Spur 3), ADAM 11 (Spur 4), ADAM 12 (Spur 5), ADAM 15 (Spur 6) und ADAM 17 (Spur 7). Eine 100 Basenpaar-Leiter wurde in Spur 1 aufgetragen.

### 3.1.3. RT-PCR-Analyse mit der Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1

Gegenüber den etablierten Knochenmark-Stromazelllinien zeigt die Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster der untersuchten ADAMs. Es konnten nur Signale bei ADAM 10 und ADAM 15 detektiert werden, ADAM 9, ADAM 11, ADAM 12 und ADAM 17 waren dagegen nicht nachweisbar (Abb. 5).

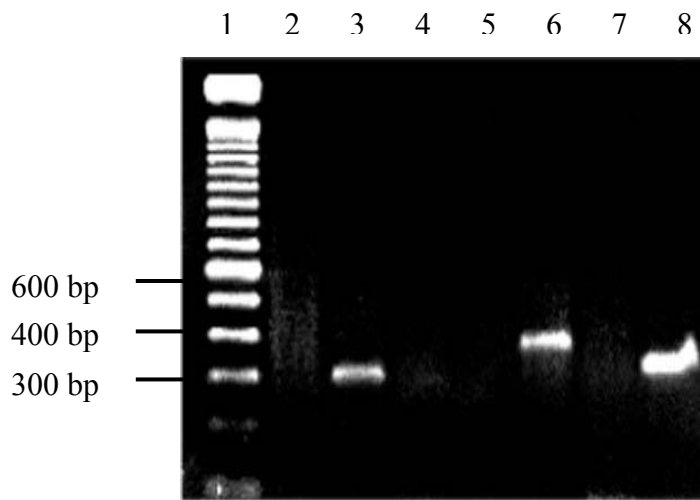


Abb. 5

*Abb. 5: Expression verschiedener ADAMs in der KM-Endothelzelllinie HBME-1.*

Aus der Zelllinie HBME-1 wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primer-paaren für humanes ADAM 9 (Spur 2), ADAM 10 (Spur 3), ADAM 11 (Spur 4), ADAM 12 (Spur 5), ADAM 15 (Spur 6), ADAM 17 (Spur 7) und  $\beta$ -Aktin (Spur 8) in einer PCR amplifiziert. Auf Spur 1 ist eine 100-Basenpaar-Leiter gezeigt.

### 3.1.4. RT-PCR-Analyse mit Knochenmark-Langzeitkulturen

Die adhärenente Stromazellschicht aus Knochenmark-Langzeitkulturen setzt sich hauptsächlich aus verschiedenen Stromazellen, aber auch aus adhärenenten Makrophagen zusammen.

Es wurde daher erwartet, dass bei einer RT-PCR-Analyse der Knochenmark-langzeitkulturen ein zu den etablierten Stromazelllinien vergleichbares Ergebnis erzielt würde. Signale für ADAM 9, ADAM 10, ADAM 15 und ADAM 17 wurden erwartungsgemäß detektiert. Überraschenderweise ließ sich aber ADAM 11 nicht nachweisen. Das auch bei den Stromazellen fehlende Signal für ADAM 12 konnte hier ebenfalls nicht detektiert werden (Abb. 6).

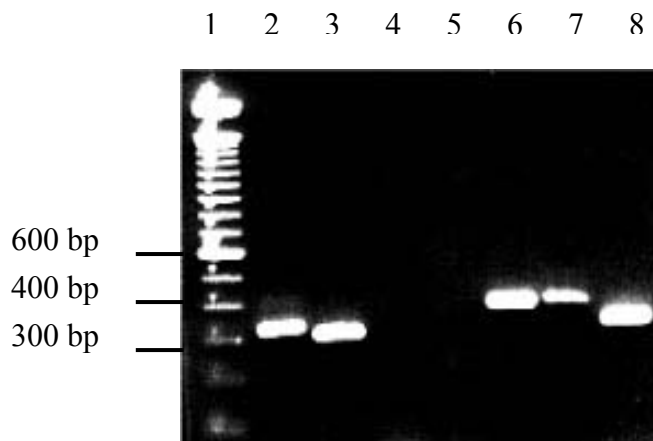


Abb. 6

*Abb. 6: Expression verschiedener ADAMs auf primären Knochenmark-Stromazellen.*

Aus Knochenmarklangzeitkulturen wurde RNA isoliert und nach reverser Transkription mit spezifischen Primerpaaren für humanes ADAM 9 (Spur 2), ADAM 10 (Spur 3), ADAM 11 (Spur 4), ADAM 12 (Spur 5), ADAM 15 (Spur 6), ADAM 17 (Spur 7) und  $\beta$ -Aktin (Spur 8) mittels PCR amplifiziert. Spur 1 zeigt eine 100 Basenpaar-Leiter.

### 3.1.5. Überblick über die mRNA Expression von Zellen des humanen Knochenmarkes

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mRNA von ADAM 10 und ADAM 15 bei allen in dieser Studie untersuchten Zelltypen des humanen Knochenmarkes nachzuweisen waren und keiner dieser Zelltypen aufgrund der vorliegenden PCR-Ergebnisse ADAM 12 exprimierte (Tabelle 3).

ADAM 9 und ADAM 17 fanden sich bei allen Stromazellen und den 34+ Zelllinien. Dagegen zeigte die humane Knochenmark-Endothelzelllinien ein sehr restringiertes Expressionsmuster für die untersuchten ADAMs.

In Tabelle 3 sind die Daten aus den RT-PCR-Analysen zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 3

	<b>ADAM 9</b>	<b>ADAM 10</b>	<b>ADAM 11</b>	<b>ADAM 12</b>	<b>ADAM 15</b>	<b>ADAM 17</b>
<b>KG1a</b>	+	+	+	-	+	+
<b>TF-1</b>	+	+	+	-	+	+
<b>L 88/5</b>	+	+	+	-	+	+
<b>L87/4</b>	+	+	+	-	+	+
<b>HS-5</b>	+	+	+	-	+	+
<b>HBME-1</b>	-	+	-	-	+	-
<b>LTMC</b>	+	+	-	-	+	+

### 3.1.6. Sequenzierung der RT-PCR-Amplifikationsprodukte

Um die Identität der amplifizierten PCR-Produkte zu überprüfen, wurden die DNA-Sequenzen der aufgereinigten PCR-Produkte am automatischen PE Applied Biosystems Cycle Sequencing-Gerät ermittelt. Hierbei ergab sich für die PCR-Produkte von ADAM 9, ADAM 15 und ADAM 17 eine 100 %ige Übereinstimmung mit publizierten Sequenzen, während bei ADAM 10 und ADAM 11 eine 99 %ige Übereinstimmung (276 von 277, bzw. 225 von 227 Nukleotiden stimmten überein) detektiert werden konnte. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend subkloniert und stehen für künftige Experimente zur Verfügung.

Als typisches Beispiel ist in Abbildung 7 das Sequenzierungsmuster für ADAM 9 gezeigt.

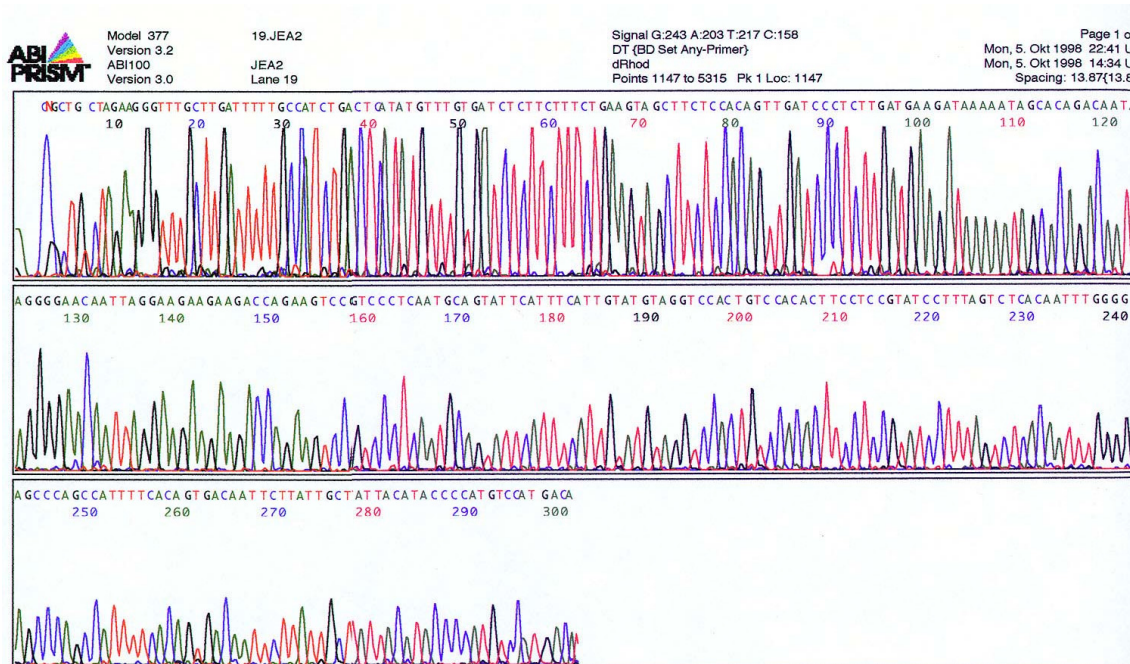


Abb. 7: Sequenzierungsmuster von ADAM 9.

Man erkennt die Nukleotidsequenz der Sequenzierung des Amplifikationsproduktes von ADAM 9. Es wurde von Position 7 bis Position 302 gelesen. Diese 296 Nukleotide stimmten mit 296 Nukleotiden der publizierten ADAM 9 mRNA-Sequenz (Position 2321-2026/EMBL-Nr. D14665) überein.

### **3.2 Nachweis der Proteinexpression von ADAM 9, ADAM 10 und ADAM 15 auf Zellen des humanen Knochenmarkes.**

Die Untersuchung der Proteinexpression auf Zellen des humanen Knochenmarkes wurde für ADAM 9, ADAM 10 und ADAM 15 durchgeführt, da für diese Vertreter der ADAM-Familie im Rahmen internationaler Kooperationen geeignete Antiseren zur Verfügung standen.

Die Antiseren gegen ADAM 9 und ADAM 15 waren nach Angaben des Labors, in dem sie hergestellt wurden (Dr. C. Blobel, New York) für Immunfluoreszenzfärbungen nicht geeignet. Deshalb wurden diese beiden ADAM-Vertreter ausschließlich in Western-Blot-Analysen untersucht. Mit dem Antiserum gegen ADAM 10 konnte die Proteinexpression sowohl mit Western-Blot-Analysen als auch mit Immun-

fluoreszenzfärbungen analysiert werden, da das zur Verfügung stehende Antiserum für beide Methoden tauglich war.

### 3.2.1. Nachweis der ADAM 9 Expression

In der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinextrakte der Zelllinien KG1a, TF-1, L88/5 und L87/4 zeigten nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit dem Antiserum gegen humanes ADAM 9 deutliche Banden bei 84 kDa und bei 110 kDa (Abb.8). Bei der 84 kDa-Bande handelt es sich um die erwartete reife Form von ADAM 9 nach Abspaltung der Prodomäne. Das Antiserum erkannte außerdem die unreife Pro-Form von ADAM 9 bei 110 kDa. Eine zusätzliche Bande bei 190 kDa, die auch schon im Labor von Dr. Carl Blobel (New York) beobachtet worden war, stellt möglicherweise ein Aggregat von ADAM 9 mit  $\alpha_2$ -Makroglobulin dar (Abb. 8). Die Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 zeigte ebenfalls eine Bande bei 84 kDa (nicht abgebildet).

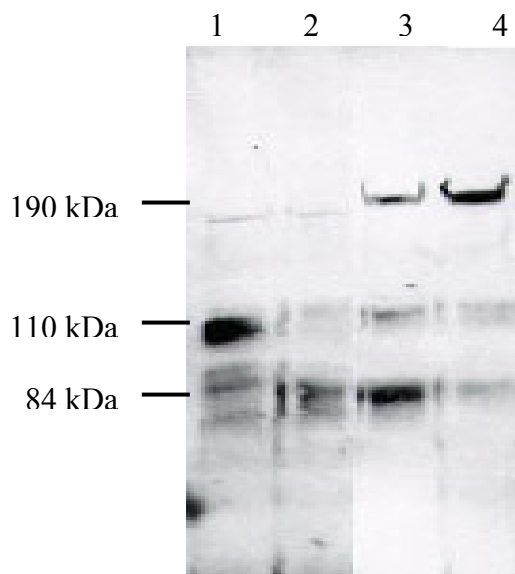


Abb. 8

*Abb. 8: Proteinexpression von ADAM 9 auf CD34+ Zellen und Stromazellen.*

Zellysate von KG1a (Spur 1), TF-1 (Spur 2), L87/4 (Spur 3), und L88/5 (Spur 4) wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit dem Antiserum erkennt man bei allen vier Zelllinien Banden bei 84 kDa (reifes ADAM 9), bei 110 kDa (Pro-ADAM 9) und 190 kDa (Bindung von ADAM 9 an  $\alpha_2$ -Makroglobulin).

### 3.2.2. Nachweis der ADAM 15 Expression

Für die Western-Blot-Analyse mit Antiserum gegen ADAM 15 wurden Zellysate der CD34+ Zelllinien KG1a und TF-1, der Stromazelllinien L88/5, L87/4 und HS-5 (Abb. 9) sowie der Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 (nicht abgebildet) in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und der Inkubation mit dem Antiserum gegen ADAM 15 konnte für alle untersuchten Zelllinien das für ADAM 15 erwartete 110 kDa Protein detektiert werden. Diese Bande stellt die reife Form von ADAM 15 dar. Dies zeigt, dass nicht nur die in der PCR nachgewiesene ADAM 15-mRNA von den untersuchten Zelllinien synthetisiert wird, sondern dass bei allen Zelllinien auch eine Proteinexpression stattfindet.

Eine weitere Bande bei 220 kDa, bei der es sich möglicherweise wie bei ADAM 9 um eine Bindung von ADAM 15 an  $\alpha_2$ -Makroglobulin handelt, wurde ebenfalls detektiert. Bei der Zelllinie KG1a erschien eine weitere Bande bei 80 kDa, deren Identität bisher nicht geklärt werden konnte (Abb. 9/Spur 1).

Zur Kontrolle der Spezifität der Western-Blot-Analyse mit dem ADAM-15 Antiserum wurde parallel ein Western Blot mit dem Präimmunserum durchgeführt. Erwartungsgemäß konnten keine Banden mit dem Präimmunserum detektiert werden (nicht abgebildet).

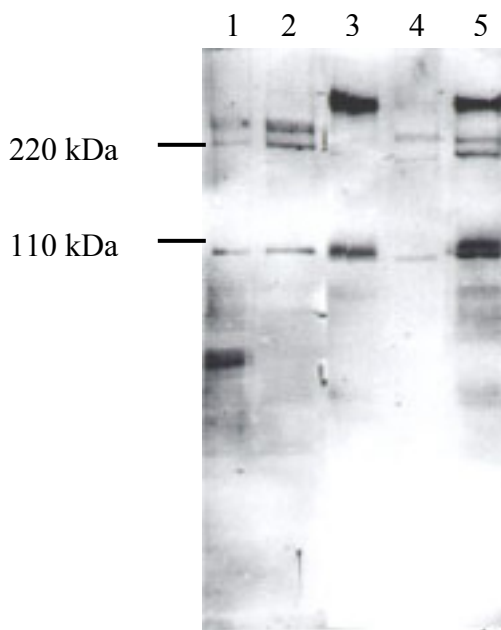


Abb. 9

*Abb. 9: Nachweis der Proteinexpression von ADAM 15 auf hämatopoetischen CD34+ Zelllinien und Stromazelllinien.*

In einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden Zellysate von KG1a (Spur 1), TF-1 (Spur 2), L88/5 (Spur 3), HS-5 (Spur 4) und L87/4 (Spur 5) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit dem Antiserum gegen ADAM 15 detektiert. Bei allen untersuchten Zelllinien erkennt man deutliche Banden bei 110 kDa (ADAM 15 Protein).

### 3.2.3. Nachweis der ADAM 10 Expression

Zum Nachweis der Proteinexpression von ADAM 10 auf den CD34+ Zelllinien KG1a und TF-1, der Stromazelllinie L88/5 und der Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 wurde aus den Zellysaten eine Glykoproteinfraktion mit Concavalin A-gekoppelter Sepharose hergestellt. Nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit dem Antiserum gegen humanes ADAM 10 inkubiert. Bei den Zelllinien KG1a und TF-1 ließen sich zwei Banden bei 100 kDa und 62 kDa nachweisen, wobei die Banden für TF-1 deutlicher waren (Abb. 10). Dieselben Banden konnten auch für die Stromazellen und die Knochenmark-Endothelzelllinie detektiert werden (nicht abgebildet). Die 62 kDa-Bande entspricht dem erwarteten ADAM 10 Protein. Diese Ergebnisse bestätigen die in den RT-PCR-Analysen detektierte Expression von ADAM 10.

Die 100 kDa-Bande wurde bei allen Western-Blot-Analysen mit dem ADAM 10 Antiserum gefunden. Ihre Identität konnte jedoch bisher nicht geklärt werden (Abb. 10).

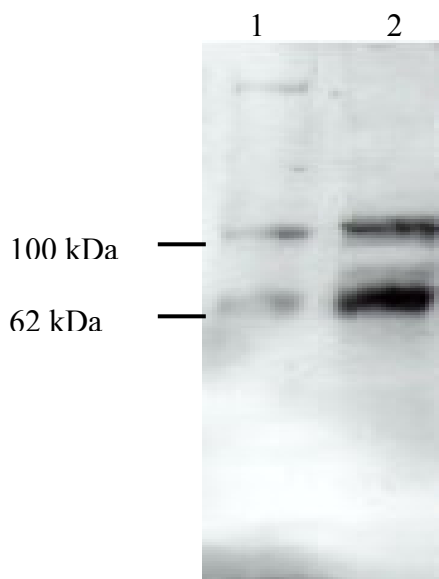


Abb. 10

*Abb. 10.: Expression von ADAM 10 auf CD34+ Zellen.*

Nach der Herstellung einer Glykoproteinfraktion aus den Zellysaten von KG1a (Spur 1) und TF-1 (Spur 2) wurden diese in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit dem Antiserum gegen ADAM 10 erkennt man bei beiden Zelllinien deutliche Banden bei 62 kDa (ADAM 10 Protein) und 100 kDa.



Die Proteinexpression von ADAM 10 auf hämatopoetischen Zellen konnte zusätzlich mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht werden. Dazu wurden die CD34+ Zelllinien durch Zytospinpräparation auf Objektträger aufgebracht, während die Stroma- und Endothelzellen auf Glasplättchen kultiviert wurden. Nach Inkubation mit dem ADAM 10-Antiserum wurden die gebundenen Antikörper mit einem Cy3<sup>TM</sup>-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht.

Gemäß den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen konnten bei der Immunfluoreszenzfärbung sowohl für die CD34+ Zelllinien KG1a (Abb. 11a) und TF-1 (Abb. 11b) als auch für die Stromazelllinien L88/5 (nicht abgebildet), L87/4 (Abb. 11c), HS-5 (Abb. 11e) und die Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 (Abb. 11g) der Nachweis der ADAM 10-Expression erbracht werden.

Zur Überprüfung der Spezifität der Signale wurde das Antiserum gegen ADAM 10 mit einem 11mer Peptid blockiert, gegen das das Serum gerichtet war. Die Signale erschienen deutlich abgeschwächt, eine komplette Blockierung konnte jedoch auch bei höherer Konzentration des Peptides nicht vollständig erreicht werden. Beispiele zeigen die Abb. 11d, 11f und 11h.

Zusammenfassend konnte für ADAM 10 und ADAM 15 der Nachweis erbracht werden, dass die in der RT-PCR nachgewiesene mRNA-Expression in CD34+ Zellen, Knochenmark-Stromazellen und Knochenmark-Endothelien zu einer Expression der Proteine führt. Bei ADAM 9 konnte dies für Stromazellen und CD34+ Zellen gezeigt werden.

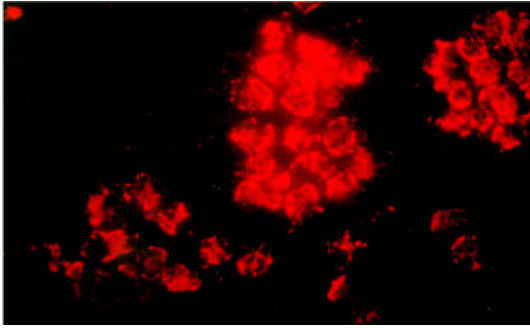


Abb. 11a

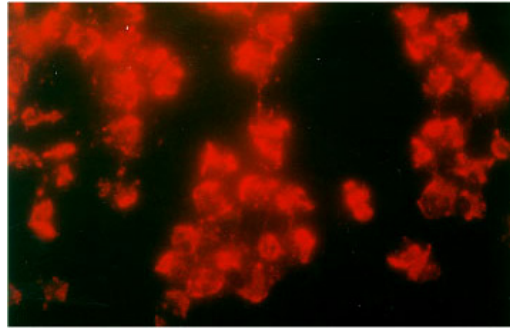


Abb. 11b

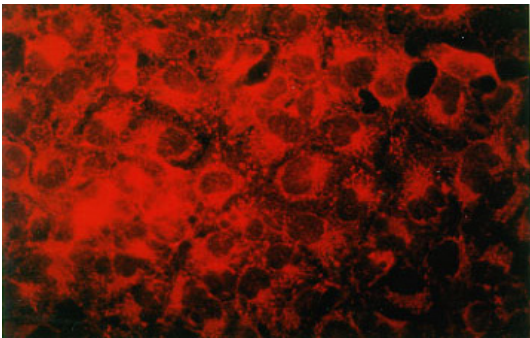


Abb. 11c

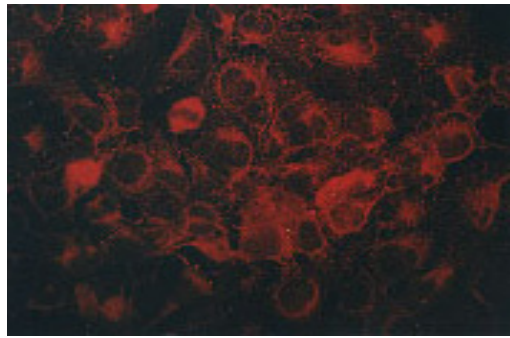


Abb. 11d

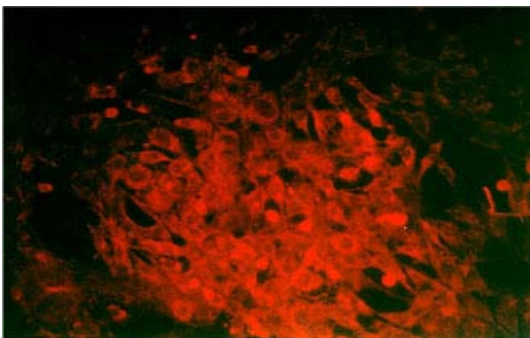


Abb. 11e

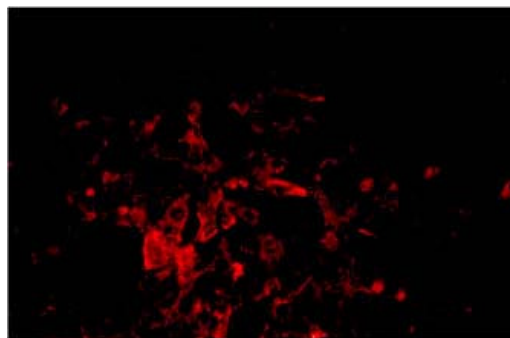


Abb. 11f

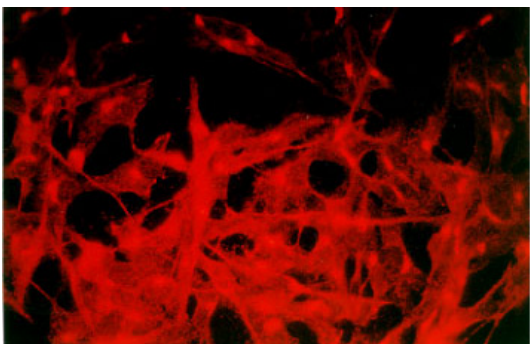


Abb. 11g

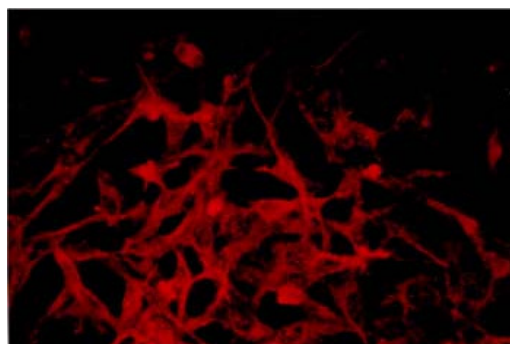


Abb. 11h

*Abb. 11a-11h: Expression von ADAM 10 auf den Zelllinien KG1a, TF-1, L87/4, HS-5 und HBME-1.*

Die Abbildungen zeigen indirekte Immunfluoreszenzfärbungen der CD34+-Zelllinien KG1a (Abb. 11a) und TF-1 (Abb. 11b), den Stromazelllinien L87/4 (Abb. 11c/d) und HS-5 (Abb. 11e/f), sowie der Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 (Abb. 11g/h) mit Antiserum gegen humanes ADAM 10.

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Suspensionszelllinien KG1a und TF-1 erfolgte nach Zytospinpräparation und Inkubation mit dem Antiserum gegen humanes ADAM 10. Der Nachweis der Expression von ADAM 10 auf den adhärent wachsenden Zelllinien L87/4, HS-5 und HBME-1 erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung der auf Glasplättchen kultivierten, konfluent gewachsenen Zellrasen mit Antiserum gegen ADAM 10. Nach Detektion mit einem Cy3<sup>TM</sup>-markierten Zweitantikörper sind starke zelluläre Signale zu erkennen (Abb. 11a/b/c/e/g).

Deutlich schwächere Signale erschienen nach Blockade des Antiserums mit einem 11mer Peptid (Abb. 11 d/f/h).

### **3.3 Nachweis der Proteinexpression von Notch-1 auf Zellen des humanen Knochenmark**

Die Untersuchung der Proteinexpression von Notch-1, das von ADAM 10 prozessiert werden kann, auf Zellen des humanen Knochenmarkes wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Notch 1, der nicht mit Notch-2 oder Notch-3 kreuzreagiert, durchgeführt.

#### **3.3.1. Nachweis der Notch-1 Expression**

In der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinextrakte der Zelllinien KG1a, TF-1, L88/5 und L87/4 zeigten nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit dem Antiserum gegen humanes Notch 1 deutliche Banden bei 120 kDa (Abb. 12). Bei dieser 120 kDa-Bande handelt es sich um ein Spaltprodukt vom 300 kDa-Vorläuferprotein Notch, das auch von anderen Arbeitsgruppen als das auf der Zelloberfläche exprimierte Protein beschrieben wurde. Es besteht aus dem intrazellulären Anteil von Notch sowie der transmembranären Domäne und einem kleinen extrazellulären Anteil des Proteins. Eine schwächere Bande bei 200 kDa konnte bei KG1a und L87/4 ebenfalls detektiert werden, bei der es sich wahrscheinlich um den verbleibenden extrazellulären Anteil von Notch handelt (Logeat et al., 1998) (Abb. 12).

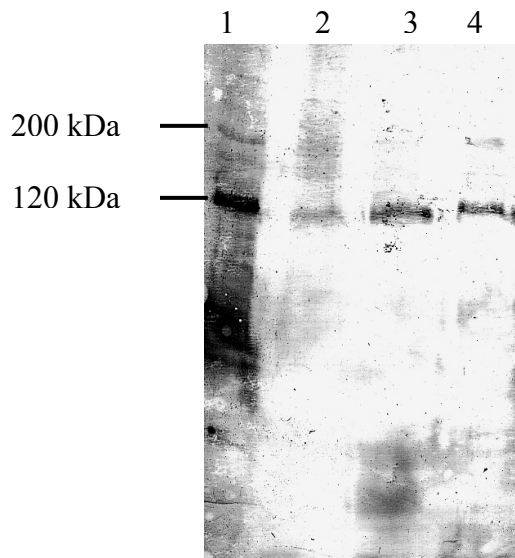


Abb. 12

*Abb. 12: Proteinexpression von Notch auf CD34+ Zellen und Stromazellen.*

Zellysate von KG1a (Spur 1), TF-1 (Spur 2), L88/5 (Spur 3), und L87/4 (Spur 4) wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit dem Antiserum erkennt man bei allen vier Zelllinien Banden bei 120 kDa (Spaltprodukt von Notch) und bei 200 kDa (Spaltprodukt von Notch).

Die Proteinexpression von Notch auf CD34+ Zellen aus humanem Knochenmark konnte zusätzlich mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht werden.

CD34+ Zellen aus humanem Knochenmark wurden dazu mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MiniMACS) angereichert und anschließend durch Zytospinpräparation auf Objektträger aufgebracht. Nach Inkubation mit dem Notch-Antiserum wurden die gebundenen Antikörper mit einem Cy3<sup>TM</sup>-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Bei dieser Immunfluoreszenzfärbung konnte der Nachweis der Notch-1 Expression auf CD34+ Progenitorzellen des humanen Knochenmarkes erbracht werden (Abb. 13a). Die Lokalisation der Notch-Proteine ist hierbei fast ausschließlich membranständig.

Des weiteren wurden Doppelfärbungen mit Notch und ADAM 10 angefertigt. Dabei wurden nach Inkubation mit den Antiseren gegen Notch und ADAM 10 die gebundenen Notch-Antikörper mit einem Cy3<sup>TM</sup>-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht (Abb. 13a), während für ADAM 10 als Zweitantikörper FITC-konjugierte Antikörper verwendet wurden (Abb. 13b). Die überlagerten Signale zeigen, dass ADAM 10 und Notch kolokalisiert sind.

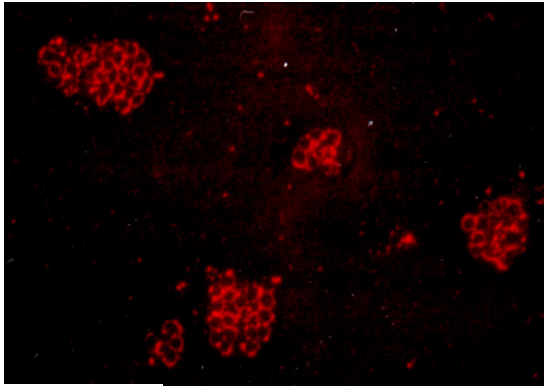


Abb. 13a

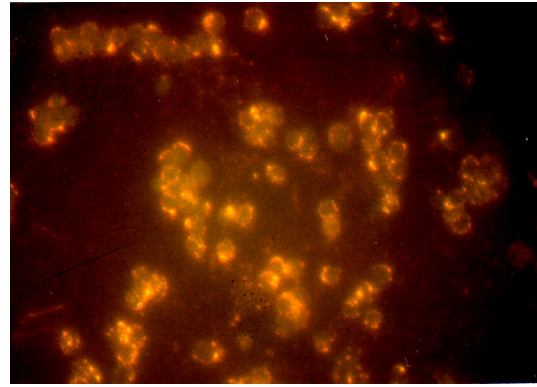


Abb. 13b

*Abb. 13a und 13b: Expression von Notch auf CD 34+ Zellen des humanen Knochenmarkes.*

Die Abbildungen zeigen indirekte Immunfluoreszenzfärbungen von CD 34+ Zellen aus humanem Knochenmark mit Antiserum gegen humanes Notch-1 (Abb. 13a). Man erkennt nach Inkubation mit dem Cy3<sup>TM</sup>-markierten Zweitantikörper deutliche membranständige Signale. In Abb. 13b ist eine Doppelfärbung mit Antiseren gegen humanes Notch-1 und ADAM 10 dargestellt. Man erkennt nach Inkubation mit den Cy3<sup>TM</sup>-markierten bzw. FITC-markierten Zweitantikörper gelbe Signale, die durch Addition der einzelnen Signale entstehen.

#### 4. Diskussion

Die Reifung hämatopoetischer Zellen im Knochenmark setzt streng regulierte Adhäsions- und Deadhäsions-Mechanismen voraus, da unter normalen Bedingungen fast ausschließlich terminal differenzierte Blutzellen in den peripheren Blutstrom gelangen. Verschiedene Genfamilien von Zelladhäsionsmolekülen sind an diesem komplexen Prozess beteiligt, jedoch ist noch kaum etwas über die Familie der membranständigen ADAMs bei diesem Reifungsprozess bekannt. Mitglieder der ADAM-Familie können über ihre funktionellen Disintegrin- und Metalloproteinase-Domänen an der Regulation adhäsiver Interaktionen beteiligt sein. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Expression verschiedener ADAMs auf Zelltypen des humanen Knochenmarkes untersucht. Hierzu zählten nicht-hämatopoetische Stroma- und Endothelzellen des Knochenmarkes sowie frühe CD34+ Progenitorzellen. Bei diesen Studien, die sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die Mitglieder der ADAM-Familie im humanen hämatopoetischen System weit verbreitet sind, was auf eine funktionelle Beteiligung dieser Moleküle schließen lässt. Erste direkte Hinweise auf eine mögliche Funktion von ADAM 10 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen lieferten Ko-Lokalisationsexperimente mit Notch, welches bei der Differenzierung der Progenitorzellen eine Rolle spielt und von ADAM 10 prozessiert werden kann.

Alle Zellen des Blutes entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle, die in der CD34+ Zellpopulation des Knochenmarkes vorhanden ist. Da diese Population aber nur einen geringen Prozentsatz aller reifenden hämatopoetischen Zellen des Knochenmarkes ausmacht, wurden zwei CD34+ hämatopoetische Zelllinien, TF-1 und KG1a, modellhaft verwendet, um die Expression von ADAMs auf frühen Progenitorstufen mittels RT-PCR zu analysieren. Hierbei zeigte sich, dass mit Ausnahme von ADAM 12 alle untersuchten ADAMs (ADAM 9, 10, 11, 15, 17) detektiert werden konnten. Die Sequenzierung der Amplifikate bestätigte die Expression dieser ADAMs in den verwendeten Zelllinien. Für ADAM 9, 10 und 15 standen Antikörper zur Verfügung, mit denen die entsprechenden Antigene im Western Blot mit Lysaten der CD34+ Zelllinien nachgewiesen werden konnten. Neben den

erwarteten Banden für die nicht-prozessierte und die prozessierte Form der ADAMs wurden mit sämtlichen Antikörpern noch zusätzliche hochmolekulare Banden detektiert, deren Identität bis heute nicht exakt bestimmt werden konnte. Jedoch wurden diese hochmolekularen Banden auch in den Labors, aus denen die Antikörper stammten, bei anderen, nicht-hämatopoetischen Zelltypen entdeckt (Carl Blobel, New York; Paul Glynn, Leicester; persönliche Mitteilungen), sodass wir hierbei von einer spezifischen (Kreuz)-Reaktion ausgehen dürfen. Trotzdem bleibt es eine dringliche Aufgabe für die Zukunft, die Identität dieser Banden aufzuklären.

Neben den CD34<sup>+</sup> Zelllinien konnte ADAM 10 auch auf primären CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen des Knochenmarkes nachgewiesen werden. Dies gelang nach MACS-Isolierung von CD34<sup>+</sup> Zellen aus Knochenmarkaspirat mittels Immunfluoreszenzfärbung. Auf eine RT-PCR Analyse von gereinigten CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen wurde allerdings verzichtet, da trotz der hohen Anreicherungsrate mit der MACS-Technologie immer noch ein geringer Prozentsatz von verunreinigenden Zellen übrigbleibt, die ein falsch positives Ergebnis in der sensitiven PCR Analyse ergeben könnten. Insgesamt jedoch weisen die Ergebnisse mit den CD34<sup>+</sup> Zelllinien und den primären CD34<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarkes auf ein breites Expressionspektrum von ADAMs auf humanen hämatopoetischen Progenitorzellen hin.

Ein ähnlich breites Expressionsspektrum auf malignen hämatopoetischen Zelllinien fanden Wu und Mitarbeiter, die die Expression von ADAM 9, 10, 11 und 15 untersuchten (Wu et al., 1997). Eine Überprüfung der in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen ergab, dass es sich bei dem als ADAM 12 bezeichneten ADAM in Wahrheit um ADAM 9 handelte. Als Untersuchungsobjekt wurde eine Myelomzelllinie sowie lymphatische, erythoide und promonozytäre Zelllinien verwendet. Der erbrachte Nachweis aller untersuchten ADAMs auf diesen Zelllinien zeigte, dass die ADAMs auch während der weiteren Entwicklung hämatopoetischer Zellen exprimiert sein können. In gereiften humanen Blutzellen konnten bislang ADAM 17 auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten sowie ADAM 9 und 15 allgemein auf Leukozyten (ohne hierbei die einzelnen Zelltypen zu spezifizieren) nachgewiesen werden (Weskamp et al., 1996; Krätschmar et al., 1996; Black et al., 1997). Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass auch ADAM 19, welches in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, auf humanen Monozyten exprimiert sein

kann (Fritsche et al., 2000). Insgesamt gesehen liegen aber noch wenige Daten zur Expression von ADAMs auf peripheren Blutzellen vor.

Etablierte Stromazelllinien können als Modell für Funktionen von Stromazellen *in vivo* herangezogen werden, da sie einen bestimmten Typ der heterogenen Stromazellen des Knochenmarkes repräsentieren können. Es handelt sich bei den Knochenmarkstromazelllinien um morphologisch unterscheidbare, fibroblastenähnliche Zellen, die in der Lage sind, zahlreiche Zytokine und andere Moleküle, die für die Zellkommunikation von Bedeutung sind, zu synthetisieren.

In dieser Arbeit wurden die Knochenmarkstromazelllinien L88/5, L87/4 und HS-5 verwendet, um die Expression von ADAMs auf nicht-hämatopoetischen Zellen des Knochenmark- „Microenvironment“ zu analysieren. Hierbei wurde dasselbe Expressionsmuster wie bei den CD 34+ Zelllinien gefunden. Die mRNA von ADAM 9, 10, 11, 15 und 17 konnte detektiert werden, für ADAM 12 gelang dies nicht. Western Blot-Analysen mit ADAM 9 und 15 erbrachten den Nachweis der Proteinexpression, wobei dieselben zusätzlichen hochmolekularen Banden wie bei den CD 34+ Zellen detektiert wurden. Immunfluoreszenzfärbungen auf konfluent gewachsenem Zellrasen der Stromazelllinien mit dem Antikörper gegen ADAM 10 zeigten ebenfalls deutliche Signale. Diese Ergebnisse zeigen, dass das bislang untersuchte Expressionsspektrum der ADAM-Familie auf CD34+ Zelllinien und Stromazelllinien identisch ist.

Knochenmarklangzeitkulturen, die aus Knochenmarkaspiraten generiert werden, können nach Ausbildung einer adhärennten Stromazellschicht eine *in vitro* Hämatopoese unterhalten. Diese Kulturen stellen ein wesentlich komplexeres System als klonierte Stromazellen dar. Das Expressionsmuster der Knochenmarklangzeitkulturen stimmte mit dem der Stromazelllinien weitgehend überein, mit dem Unterschied, dass ADAM 11 in Knochenmarklangzeitkulturen wider Erwarten nicht detektiert werden konnte. Ob die Expression von ADAM 11 in den Stromazelllinien einen artifiziellen Befund, der durch die Immortalisierung dieser Zellen hervorgerufen wurde, darstellt, bedarf weiterer Abklärung.

Die Ergebnisse stellen den ersten Nachweis von Proteinen der ADAM-Familie auf humanen Knochenmarkstromazellen dar. Auf murinen Stromazellen wurde bislang aus der gesamten ADAM-Familie erst ADAM 12 untersucht (Abe et al., 1999). In dieser Studie wurde ADAM 12 mittels RT-PCR nachgewiesen, was in unseren



Untersuchungen nicht gelang. Allerdings könnte es sich bei diesen divergierenden Ergebnissen um Spezies-spezifische Unterschiede handeln.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen Ergebnisse vor, die die Expression von ADAM 15 und 17 auf Endothelzellen sowie die Hochregulation von ADAM 15 in Arteriosklerose-arealen zeigten (Black et al., 1997; Herren et al., 1997). Um der Frage nachzugehen, ob ADAMs auch auf Endothelzellen des humanen Knochenmarkes exprimiert werden, wurde die Knochenmark-Endothelzelllinie HBME-1 in die Untersuchungen miteinbezogen. Hierbei zeigte sich, verglichen mit den anderen untersuchten Zelltypen des Knochenmarkes, ein wesentlich eingeschränkteres Expressionsmuster. So konnte mittels RT-PCR nur die Expression von ADAM 10 und 15 detektiert werden, nicht aber die Expression von ADAM 17. Mit Antikörpern gegen ADAM 10 und 15 gelang in Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot-Analysen der Nachweis der Protein-Expression der entsprechenden Antigene auf der Knochenmark-Endothelzelllinie. Die Untersuchung von Herren und Mitarbeitern hatte gezeigt, dass ADAM 15 auf Nabelschnurendothelzellen, die in Zellkultur wuchsen, nachzuweisen war. Allerdings konnte diese Arbeitsgruppe *in vivo* keinerlei Expression von ADAM 15 auf Endothelzellen nachweisen. Es wurde lediglich eine Hochregulation des ADAM 15 Proteins in arteriosklerotisch veränderten Endothelzellen festgestellt, deren Bedeutung noch unklar ist (Herren et al., 1997). Ob ADAM 15 auch auf Blutgefäßzellen im nativen Knochenmark exprimiert ist, muss noch auf entsprechenden Gewebeschnitten untersucht werden. Black und Mitarbeiter konnten bei der ursprünglichen Charakterisierung von ADAM 17 die Expression dieses ADAMs auf humanen Endothelzellen nachweisen, wobei allerdings nicht genauer spezifiziert wurde, aus welchem Gewebe die untersuchten Endothelzellen stammten (Black et al., 1997). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Knochenmark-Endothelzelllinie zeigte keinerlei Expression von ADAM 17, die RT-PCR-Analysen waren negativ.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass alle untersuchten ADAMs mit Ausnahme von ADAM 12 von CD 34+ Zelllinien und Stromazelllinien exprimiert werden, primäre Knochenmarklangzeitkulturen mit Ausnahme der ADAM 11-Expression dasselbe Expressionsmuster aufweisen, wohingegen die Knochenmark-Endothelzelllinie nur ADAM 10 und 15 exprimiert. ADAM 9, 10, 11, 15 und 17 sind damit im humanen hämatopoetischen System weit verbreitet, wohingegen ADAM 12

nicht detektiert werden konnte. Um einen systemischen Fehler bei der Analyse auszuschließen, wurde das Primerpaar auf seine Funktion hin mehrfach überprüft. Andere Arbeitsgruppen konnten ADAM 12 in verschiedenen Tumorzelllinien (Gilpin et al., 1998) und murinen Zellen der Hämatopoese (Abe et al., 1999) nachweisen. ADAM 12 scheint nach den hier vorliegenden Erkenntnissen im gesunden humanen hämatopoetischen System keine Rolle zu spielen.

Mit Ausnahme von ADAM 11 weisen alle in dieser Arbeit untersuchten Mitglieder der ADAM-Familie eine Zink-Bindungsstelle und eine katalytisch aktive Konsensussequenz auf, was auf eine potentiell aktive Proteasefunktion schließen lässt. Dabei konnte bislang für ADAM 9, ADAM 10, ADAM 12 und ADAM 17 der Nachweis erbracht werden, dass sie auch tatsächlich als aktive Metalloproteinasen fungieren. ADAM 9 ist in der Lage, *in vitro* Gelatine,  $\beta$ -Casein und Fibronectin katalytisch zu spalten (Schwettmann and Tschesche, 2000). ADAM 10 spaltet Kollagen Typ IV *in vitro* (Millichip et al., 1997) und zeigt ebenfalls eine katalytische Aktivität bei der Prozessierung von Notch und TNF- $\alpha$  (Lunn et al., 1997; Dallas et al., 1999). Die katalytische Aktivität von ADAM 12 konnten Loechel und Mitarbeiter mit der *in vitro*-Spaltung von  $\alpha_2$ -Makroglobulin nachweisen (Loechel et al., 1998). ADAM 17 aktiviert durch Abspaltung der Ektodomäne TNF- $\alpha$  (Black et al., 1997) sowie Adhäsionsmoleküle (Peschon et al., 1998).

Inwieweit eine aktive Metalloproteinasen-Funktion der ADAMs im hämatopoetischen System eine Rolle spielt, ist bisher noch völlig unklar. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine Ko-Expression von ADAM 10 und Notch auf frühen CD 34+ Progenitorzellen der Hämatopoese. Notch ist an der Differenzierung früher Progenitorzellen beteiligt, es muss hierzu allerdings proteolytisch prozessiert werden. Die nachgewiesene Ko-Lokalisation von ADAM 10 und Notch auf Zellen der frühen Hämatopoese gibt erste Hinweise darauf, dass Notch, aktiviert durch ADAM 10, bei der Differenzierung früher hämatopoetischer Zellen eine Rolle spielen könnte. Eine Ko-Lokalisation von ADAM 10 und Notch fanden Dallas und Mitarbeiter auch auf ossären Zellen (Dallas et al., 1999). Ko-Lokalisationen sind aber nur ganz indirekte Hinweise für eine funktionelle Beteiligung von ADAM 10 an der Prozessierung von Notch. Eine direkte Beteiligung konnte allerdings für das *Drosophila*-Homolog von ADAM 10,

Kuzbanian, gezeigt werden (Qi et al., 1999). In diesem Zusammenhang sind auch neuere Untersuchungen von Brou und Mitarbeitern von Interesse. Ihre Ergebnisse aus Experimenten mit monozytären Vorläuferzellen weisen auf eine Beteiligung von ADAM 17 bei der Aktivierung von Notch hin (Brou et al., 2000). Auch bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnten wir ADAM 17 und Notch auf frühen Zellen der Hämatopoese nachweisen. Ko-Lokalisationsexperimente mit ADAM 10 und ADAM 17 konnten allerdings bislang noch nicht durchgeführt werden, da die entsprechend geeigneten Antikörper noch nicht zur Verfügung standen. Die Ergebnisse von Brou und Mitarbeitern geben jedoch Anlass, diesen Sachverhalt auf frühen Progenitorzellen weiter zu untersuchen.

Eine Aktivierung von membranständigen Proteinen durch Abspaltung ihrer Ektodomäne wird auch als „Ectodomain shedding“ bezeichnet und wurde bei verschiedenen Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Adhäsionsproteinen beobachtet (Schlöndorff and Blobel, 1999; Blobel, 2000; Mullberg et al., 2000). Metalloproteinasen, die für diese Abspaltungen verantwortlich sind, werden auch als Sheddasen bezeichnet. Hierzu gehören unter anderen auch ADAM 9, ADAM 10 und ADAM 17. So konnte für ADAM 9 die Aktivierung des Wachstumsfaktors HB-EGF gezeigt werden (Izumi et al., 1998). ADAM 10 ist wie ADAM 17 an der Prozessierung des proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  beteiligt (Black et al., 1997; Lunn et al., 1997; Millichip et al., 1997; Moss et al., 1997; Dallas et al., 1999). Das Vorläuferprotein von Amyloid (APP= Amyloid precursor protein) wird ebenfalls von ADAM 10 durch Abspaltung der Ektodomäne aktiviert (Fahrenholz et al., 2000). ADAM 10 aktiviert auf diese Weise auch das Zelladhäsionsmolekül L1, das eine wichtige Rolle bei der axonalen Ausbreitung und Zellmigration im Nervensystems spielt (Mechtersheimer et al., 2001). ADAM 17 kann außerdem am Zelladhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) und am Zytokin TRANCE (= TNF-related activation-induced cytokine) als Sheddase tätig werden (Peschon et al., 1998; Lum et al., 1999). Diese Beispiele zeigen, dass die in dieser Arbeit untersuchten ADAMs in der Lage sind, verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle zu spalten und dadurch zu aktivieren. Die genannten Molekülgruppen sind wichtige Bestandteile des hämatopoetischen Systems. Stromazellen des Knochenmarkes

produzieren eine Vielzahl von Zytokinen. Die Tatsache, dass die vorliegenden Ergebnisse den Nachweis fast aller untersuchten ADAMs auf Stromazellien ergaben, legt die Annahme nahe, dass eine Aktivierung membranständiger Zytokine durch einzelne Mitglieder der ADAM-Familie erfolgen kann.

Integrine spielen bei der Reifung hämatopoetischer Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle. Sie vermitteln Wechselwirkungen zwischen Progenitorzellen und extrazellulärer Matrix, können aber auch für direkte Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich sein. Disintegrine können diese Funktionen stören. Ein direkter Nachweis einer Disintegrin-Funktion bei ADAMs konnte von einigen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, die die Bindung verschiedener Integrine an ADAMs zeigen konnten. Allerdings weist nur ADAM 15 in seiner Disintegrin-Domäne die Integrinerkennungssequenz RGD der SVMPs auf, alle anderen untersuchten ADAMs beinhalten in ihrer Disintegrin-Domäne diese Sequenz nicht. Sie sind aber trotzdem in der Lage, verschiedene Integrine RGD-unabhängig zu binden (Krätzschar et al., 1996; Wolfsberg and White, 1996; Chen et al., 1999; Koji et al., 2000; Nath et al., 2000; Shi et al., 2000; Zhou et al., 2001). Insgesamt wurden bisher Interaktionen von sechs verschiedenen Integrinen mit Mitgliedern der ADAM-Familie beschrieben. ADAM 9 fungiert als Adhäsionsmolekül für  $\alpha v \beta 5$ -Integrin (Zhou et al., 2001), bindet aber auch an  $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin (Nath et al., 2000). Die Disintegrindomäne von ADAM 12 und ADAM 15 interagieren RGD-unabhängig mit  $\alpha 9 \beta 1$ -Integrin (Koji et al., 2000), und ADAM 15 fungiert als Zelladhäsionsmolekül auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen über die Interaktion mit  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin (Nath et al., 1999) und  $\alpha v \beta 3$ -Integrin (Zhang et al., 1998).

Inzwischen gibt es erste Untersuchungen, die die Funktion der anderen Domänen der ADAMs zu klären versuchen. Experimente von Iba und Mitarbeitern zeigten, dass ADAM 12 über seine cysteinreiche Domäne die Zelladhäsion durch Bindung an Syndecane fördern kann (Iba et al., 2000). Dieselbe cysteinreiche Domäne von ADAM 12 ist außerdem für Interaktionen mit dem IGFBP (=insulin-like growth factor binding protein) verantwortlich (Shi et al., 2000). Weiterhin konnte man im zytoplasmatischen Anteil von ADAM 12 eine Interaktion mit  $\alpha$ -Actinin-2 nachweisen (Galliano et al., 2000). Diese Interaktion ist für die Fusion von Myoblasten von Bedeutung.

Von den ADAMs, die Gegenstand dieser Arbeit waren, sind lediglich die Funktionen von ADAM 17, ADAM 12 sowie Kuzbanian, dem *Drosophila*-Homolog von ADAM 10, näher untersucht worden. Diese Analysen betreffen Systeme wie das zentrale Nervensystem (Kuzbanian), die Muskelzellreifung (ADAM 12) oder die Regulation von Entzündungs- und Autoimmunprozessen (ADAM 17). Welche funktionelle Rolle den ADAMs im Rahmen der normalen Hämatopoese zukommt, wurde bislang nicht untersucht. Betrachtet man aber die weite Verbreitung der ADAMs auf Zellen des humanen hämatopoetischen Systems und ihre bisher nachgewiesenen Funktionen in anderen Organsystemen, drängen sich zahlreiche Fragen und Spekulationen über die Rolle der ADAMs im Rahmen der Hämatopoese auf.

Der normale Reifungsprozess hämatopoetischer Zellen setzt voraus, dass die Zellen mit dem „Microenvironment“ interagieren. Solche Interaktionen werden u.a. von Integrinen vermittelt. ADAMs, die in der Lage sind, bestimmte Integrine zu binden, könnten die Interaktionen von hämatopoetischen Zellen und extrazellulärer Matrix modulieren. Die Bindung von Integrinen im Rahmen der Endothel-Zell-Erkennung könnte auch beim „Homing“ von Stammzellen in das Knochenmark, auf dem die Knochenmarkstransplantation beruht, eine Rolle spielen.

Ein Mechanismus, an dem das *Drosophila*-Homolog von ADAM 10, Kuzbanian, beteiligt ist, ist die laterale Hemmung. Ein solcher Mechanismus könnte auch bei der geregelten Differenzierung von hämatopoetischen Zellen eine Rolle spielen; dies wiederum könnte durch ADAM 10 vermittelt werden. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Aktivierung von Notch bei *Drosophila* auf die Mitwirkung von Kuzbanian angewiesen ist (Pan and Rubin, 1997; Black and White, 1998; Logeat et al., 1998; Qi et al., 1999). Die in dieser Arbeit gezeigte Ko-Expression von humanem ADAM 10 und Notch auf frühen Progenitorzellen der Hämatopoese deutet darauf hin, dass dies hier möglicherweise ebenfalls der Fall ist.

Das von Makrophagen und Monozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen und Autoimmunprozessen gebildete TNF- $\alpha$  wird durch ADAM 17 aktiviert. Die Aktivierung anderer Zytokine, die im Rahmen der Stammzellmobilisierung eine Rolle spielen (z.B. stem cell factor; G-CSF), könnten ebenfalls durch Vertreter der ADAM Familie aktiviert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass ADAM 17 weitere Zytokine und Faktoren, die im Rahmen der Zellreifung im Knochenmark benötigt werden, zu

aktivieren vermag. Damit könnte ADAM 17 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu reifen Blutzellen spielen, indem es die von Stromazellen sezernierten Zytokine aktivieren könnte.

Sowohl die Proteinase- als auch die Disintegrin-Funktionen der ADAMs könnten aber auch einen Einfluss auf die Entstehung maligner Erkrankungen des humanen Knochenmarks haben, wenn die durch sie vermittelten Prozesse gestört werden. Solche Mechanismen würden dann zu einer unkontrollierten Neubildung von unreifen, dysfunktionalen Zellen führen. ADAM 11 wurde als mögliches Tumorsuppressorgen beschrieben und könnte somit bei der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen wichtig sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression einer Reihe von Mitgliedern der ADAM-Familie auf funktionell verschiedenen Zellen des humanen Knochenmarkes in detaillierter Weise gezeigt werden. Welche Rolle die ADAMs jedoch dabei auf diesen unterschiedlichen Zelltypen genau spielen, ist noch völlig ungeklärt und bedarf sicher zahlreicher zukünftiger Untersuchungen. Die ADAM-Familie hat in den letzten Jahren stetig zugenommen und es werden fortwährend neue Mitglieder dieser Familie entdeckt (<http://www.uta.fi/%7Eloiiika/ADAMs/HADAMs.htm>). Eine den ADAMs nahe verwandte Familie von Metalloproteinase- und Disintegrinen, allerdings mit Thrombospondin-Motiven, wird als ADAM-TS bezeichnet. Von diesen Molekülen ist bekannt, dass sie bei der Embryonalentwicklung und der Angiogenese eine Rolle spielen können (Kuno et al., 1999; Tang, 2001). Detaillierte Untersuchungen über Expression und Funktion der ADAM-TS Familie im humanen hämatopoetischen System liegen aber ebenfalls noch nicht vor.

## **5. Zusammenfassung**

Die Reifung von Blutzellen im humanen Knochenmark geschieht durch ein Zusammenspiel von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und verschiedenen Stromazellen des Knochenmarkes. Das hämatopoetische „Microenvironment“ kann durch Wechselwirkungen zwischen den Zellen über proteolytische Prozesse sowie über geregelte Adhäsionsvorgänge die Differenzierung der pluripotenten Stammzelle zur reifen Blutzelle beeinflussen. Für diese Leistungen werden eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen benötigt. Eine Gruppe membranständiger Proteine, die bezüglich ihrer Rolle bei der Reifung hämatopoetischer Zellen im humanen Knochenmark nur wenig untersucht sind, ist die Disintegrin- und Metalloproteinasen-Familie ADAM. Diese Proteinfamilie, Ende der 80er Jahre entdeckt, zählt inzwischen über 30 Mitglieder. ADAMs besitzen eine Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-Domäne, eine EGF-ähnliche Domäne sowie einen zytoplasmatischen Anteil.

Die vorliegende Arbeit gibt einen Einblick in die Expression der ADAM-Familie auf Zellen des hämatopoetischen Systems. Es wurden sechs verschiedene Mitglieder (ADAM 9, 10, 11, 12, 15 und 17) ausgewählt, für die es erste Anhaltspunkte für eine funktionelle Beteiligung an der Hämatopoese gab. Für einen sinnvollen Überblick über die Expression dieser ADAM-Vertreter im hämatopoetischen System wurden zwei hämatopoetische CD 34+ Zelllinien, verschiedene etablierte Stromazelllinien sowie eine Knochenmark-Endothelzelllinie verwendet. Knochenmarklangzeitkulturen wurden ebenfalls in die Versuchsreihe miteinbezogen.

Der Nachweis der mRNA-Expression wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Sequenzierung erbracht. Um die Proteinexpression nachzuweisen, wurden mit Antikörpern gegen ADAM 9, 10 und 15 sowohl Western-Blot-Analysen als auch Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die untersuchten ADAMs in der Mehrzahl der untersuchten Zellen nachweisbar sind. ADAM 9, 10, 11, 15 und 17 werden in CD34+ Zellen und verschiedenen Stromazelllinien als mRNA exprimiert. Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass diese mRNA bei ADAM 9, 10 und 15 auch zur Proteinexpression führt. Die Endothelzelllinie zeigte ein restriktiveres Expressionsmuster, wohingegen in primären Knochenmarklangzeitkulturen die Expression von ADAM 9, 10, 15 und 17 nachgewiesen werden konnte. Erste Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung der ADAMs auf hämatopoetischen Vorläuferzellen ergaben sich durch die Koexpression von ADAM 10 und Notch auf CD34+ Progenitoren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals ein breites Expressionsspektrum der ADAMs im humanen hämatopoetischen System, dessen funktionelle Bedeutung künftig zu klären sein wird.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe, E., Mocharia, H., Yamate, T., Manolagas, S.C. (1999)  
Meltrin- $\alpha$ , a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation.  
*Calcific. Tissue Int.* 64, 508-515.
- Akashi, K., Traver D., Miyamoto, T., Weissmann, I.L. (2000)  
A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all lineages.  
*Nature* 400, 193-197.
- Basbaum, C.B., Werb, Z. (1996)  
Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 731-738.
- Birkedal-Hansen, H. (1995)  
Proteolytic remodeling of extracellular matrix.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 728-735.
- 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., Cerretti, D.P. (1997)  
A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells.  
*Nature* 385, 729-633.
- Black, R.A., White, J.M. (1998)  
ADAMs: focus on the protease domain.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 654-659.
- Blobel, C.P. (2000)  
Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 606-612.
- Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M. (1990)  
Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence.  
*J. Cell Biol.* 111, 69-78.
- Blobel, C.P., White, J.M. (1992)  
Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 760-765.



Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M. (1992)

A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion.

*Nature* 356, 248-252.

Bode, W., Grams, F., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., Stocker, W. (1996)

The metzincin-superfamily of zinc-peptidases.

*Adv. Exp. Med. Biol.* 389, 1-11.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., Le Bail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Blaxk, R.A., Israel, A. (2000)

A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of disintegrin-metalloprotease TACE.

*Mol. Cell* 5, 207-216.

Calderwood, D.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (2000)

Integrins and actin filaments: reciprocal regulation as cell adhesion and signaling.

*J. Biol. Chem.* 275, 22607-22610.

Chabannon, C., Torok-Storb, B. (1992)

Stem cell-stromal cell interactions.

*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 177, 123-136.

Chantry, A., Gregson, N.A., Glynn, P. (1989)

A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterisation.

*J. Biol. Chem.* 264, 21603-21607.

Chen, M.S., Almeida, E.A., Huovila, A., Takahashi, Y., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., White, J.M. (1999)

Evidence that distinct states of the integrin  $\alpha 6 \beta 1$  interact with laminin and an ADAM.

*J. Cell Biol.* 144, 549-561.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

*Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Coulombel, L., Roseblatt, M., Gaugler, M.H., Leroy, C., Vainchenker, W. (1992)

Cell-cell matrix and cell-cell interactions during hematopoietic differentiation.

*Bone Marrow Transplant.* 9, 19-22.

Dallas, D.J., Genever, P.G., Patton, A.J., Millichip, M.I., McKie, N., Skerry, T.M. (1999)

Localisation of ADAM 10 and Notch receptors in bone.  
*Bone* 25, 9-15.

Dedhar, S. (1999)

Integrins and signal transduction.  
*Curr. Opin. Hematol.* 6, 37-43.

Dexter, T.N., Spooncer, E., Simmons, P., Allen, T.D. (1984)

Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience.  
*In: Long-term marrow culture.* Wright, D.G., Greenberger, J.S., editors. Alan R. Liss., Inc., 76-95.

Eckes, B., Zigrino, P., Kessler, D., Holtkotter, O., Shephard, P., Mauch, C. (2000)  
Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis.  
*Matrix Biol.* 19, 325-332.

Emi, M., Katagiri, T., Harada, Y., Saito, H., Inazawa, J., Ito, I., Kasumi, F., Nakamura, Y. (1993)

A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers.  
*Nature Genet.* 5, 151-157.

Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G.M., Goodman, C.S. (1995)

The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13233-13238.

Fahrenholz, F., Gilbert, S., Kojro, E., Lammich, S., Postina, R. (2000)

Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 215-222.

Fassina, G., Ferrari, N., Brigati, C., Benelli, R., Sant, L., Noonan, D.M., Albir, A. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities.

*Clin. Exp. Metastasis* 18, 111-120.

Faull, R.J., Ginsberg, M.H. (1996)

Inside-out signaling through integrins.  
*J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 1091-1097.

Fox, J.W., Bjarnason, J.B. (1995)

Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom.  
*Methods Enzymol.* 248, 368-387.

- Friedl, P., Brocker, E.B., Zanker, K.S. (1998)  
Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocyte and tumor cells.  
*Cell Adhes. Commun.* 6, 225-236.
- Fritsche, J., Moser, M., Faust, S., Peuker, A., Büttner, R., Andreesen, R., Kreutz, M. (2000)  
Molecular cloning and characterization of human metalloprotease Disintegrin - a novel marker for dendritic cell differentiation.  
*Blood* 96, 732-739.
- Galliano, M.F., Huet, C., Frygeliuss, J., Polgren, A., Wewer, U.M., Engvall, E. (2000)  
Binding of ADAM 12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha-actinin-2, is required for myoblast fusion  
*J. Biol. Chem.* 275, 13933-13939.
- Gilpin, B.J., Loechel, F., Mattei, M.G., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U.M. (1998)  
A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) provokes myogenesis in vivo.  
*J. Biol. Chem.* 273, 157-166.
- Gordon, M.Y., Riley, G.P., Watt, S.M., Greaves, M.F. (1987)  
Compartmentalization of haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment.  
*Nature* 326, 403-405.
- Greenberger, J.S. (1991)  
The hematopoietic microenvironment.  
*Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 11, 65-84.
- Hay, E.D. (1991)  
Cell Biology of extracellular matrix.  
2<sup>nd</sup> edn. New York, Plenum Press.
- Herren, B., Raines, E.W., Ross, R. (1997)  
Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo.  
*FASEB J.* 11, 173-180.
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., Glynn, P. (1996)  
Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types.  
*Biochem. J.* 317, 45-50.
- Howard, L., Nelson, K.K., Maciewicz, R.A., Blobel, C.P. (1999)  
Interaction of the metalloprotease disintegrin MDC 9 and MDC 15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1.  
*J. Biol. Chem.* 274, 31693-31699.

- Huovila, A.P.J., Almeida, E.A.C., White, J.M. (1996)  
ADAMs and cell fusion.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 692-699.
- Hynes, R.O. (1992)  
Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.  
*Cell* 69, 11-25.
- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B.J., Loechel, F., Wewer, U.M. (1999)  
Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) supports tumor cell adhesion.  
*Am. J. Path.* 154, 1489-1501.
- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Frohlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J.k., Sanderson, R.D., Brakebusch, C., Fässler, R., Wewer, U.M. (2000)  
The cystein-rich domains of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta 1 integrin-dependant cell spreading.  
*J. Cell Biol.* 149, 1143-1156.
- Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Kratzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y.M., Baron, R., Blobel, C.P. (1998)  
Cloning and initial characterization of mouse meltrin  $\alpha$  and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells.  
*J. Biol. Chem.* 273, 4180-4187.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., Mekada, E. (1998)  
A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- $\gamma$ /ADAM9 and PKC $\alpha$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor.  
*EMBO J.* 17, 7260-7272.
- Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B., Fox, J.W. (1996)  
Snake venom metallo-proteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins.  
*Toxicon* 34, 1269-1276.
- Kang, Q., Cao, Y., Zolkiewska, A. (2001)  
Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85 $\alpha$  activates phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells.  
*J. Biol. Chem.* 276, 24466-24472.
- Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M., Huovila, A.P. (2000)  
Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differential expressed in the adult CNS.  
*Mol. Cell. Neurosci.* 15, 547-60.

- Katagiri, T., Harada, Y., Emi, M., Nakamura, Y. (1995)  
Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing.  
*Cytogenet. Cell Genet.* 68, 39-44.
- Kitamura, T., Takaku, F., Miyajima, A. (1991)  
IL-1 upregulates the expression of cytokine receptors on a factor-dependent human hemopoietic cell line, TF-1.  
*Int. Immunol.* 3, 571-577.
- Klein, G. (1995)  
The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment.  
*Experientia* 51, 914-926.
- Klein, G., Langegger, M., Goridis, C., Ekblom, P. (1988)  
Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney.  
*Development* 102, 749-761.
- Koji, E., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X.P., Takada, Y. (2000)  
RGD-independent binding of integrin  $\alpha 9\beta 1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction.  
*J. Biol. Chem.* 275, 43922-43930.
- Kondo, M., Weissmann, I.L., Akashi, K. (1997)  
Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in bone marrow.  
*Cell* 91, 661-672.
- van Kooyk, Y., Figdor, C.G. (2000)  
Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 542-547.
- Krätzschmar, J., Lum, L., Blobel, C.P. (1996)  
Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence.  
*J. Biol. Chem.* 271, 4593-4596.
- Kreis, T., Vale, R. (1999)  
Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins.  
Oxford University Press.
- Kuno, K., Terashima, Y., Masushima, K. (1999)  
ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix.  
*J. Biol. Chem.* 274, 18821-18826.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilber, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. (1999)

Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin and metalloprotease.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 3922-3927.

Lehr, J.E., Pienta, K.J. (1998)

Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line.

*J. Natl. Cancer Inst.* 90, 118-123.

Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U.M. (1998)

Human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) is an active metalloprotease.

*J. Biol. Chem.* 273, 16993-16997.

Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., Wewer, U.M. (1999)

Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain.

*J. Biol. Chem.* 274, 13427-13433.

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israel, A. (1998)

The Notch 1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8108-8112.

Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorf, J., Tempst, P., Choi, Y., Blobel, C.P. (1999)

Evidence for a role of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival.

*J. Biol. Chem.* 274, 13613-13618.

Lunn, C., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P., Narula, S., Lundell, D. (1997)

Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNF $\alpha$  convertase.

*FEBS Lett.* 400, 333-335.

McDonnell, S., Morgan, M., Lynch, C. (1999)

Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes.

*Biochem. Soc. Trans.* 27, 734-740.

McNeill, H. (2000)

Sticking together and sorting things out: adhesion as a force in development.

*Nat. Rev. Genet.* 1, 100-108.

Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Fogel, M., Lemmon, V., Altevogt, P. (2001)

Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins.

*J. Cell Biol.* 155, 661-674.

- Metcalf, D. (1998)  
Regulatory mechanisms controlling hematopoiesis: principles, problems.  
*Stem Cells* 16, 3-11.
- Millichip, M.I., Dallas, D.J., Wu, E., Dale, S., McKie, N. (1997)  
The metallo-disintegrin ADAM 10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 594-598.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Warner, J., Willard, D., Becherer, J.D. (1997)  
Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ .  
*Nature* 385, 733-736.
- Mullberg, J., Althoff, K., Jostock, T., Rose-John, S. (2000)  
The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology.  
*Eur. Cytokine Netw.* 11, 27-38.
- Myles, D.G., Kimmel, L.H., Blobel, C.P., White, J.M., Primakoff, P. (1994)  
Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4195-4198.
- Nath, D., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Warn, A., Hutchinson, G.R., Yamada, K.M., Docherty, A.J., Murphy, G. (1999)  
Interaction of metargidin (ADAM-15) with  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins on different haemopoietic cells.  
*J. Cell Sci.* 112, 579-587.
- Nath, D., Slocombe, M., Webster, A., Stephens, P.E., Cocherty, A.J.P., Murphy, G. (2000)  
Meltrin  $\gamma$  (ADAM 9) mediates cellular adhesion through  $\alpha 6\beta 1$  integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility.  
*J. Cell Sci.* 113, 2319-2328.
- Niewiarowski, S., McLane, M.A., Kloczewiak, M., Stewart, G. J. (1994)  
Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors.  
*Sem. Hematol.* 31, 289-300.
- Nye, J.S. (1997)  
Developmental signaling: notch signals Kuz it's cleaved.  
*Curr. Biol.* 7, 716-720.

- Pakianathan, D.R. (1995)  
Extracellular matrix proteins and leukocyte function.  
*J. Leukoc. Biol.* 57, 699-702.
- Pan, D., Rubin, G.M. (1997)  
Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis.  
*Cell* 90, 271-280.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J., Black, R.A. (1998)  
An essential role for ectodomain shedding in mammalian development.  
*Science* 282, 1281-1284.
- Primakoff, P., Hyatt, H., Tredick-Kline, J. (1987)  
Identification and purification of a sperm surface Protein with potential role in sperm-egg membrane fusion.  
*J. Cell Biol.* 104, 141-149.
- Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S. (1999)  
Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian.  
*Science* 283, 91-94.
- Ravanti, L., Kahari, V.M. (2000)  
Matrix metalloproteinases in wound repair.  
*Int. J. Mol. Med.* 6, 391-407.
- Roberts, R., Gallagher J., Spooncer, E., Allen T.D., Bloomfield, F., Dexter, T.M. (1988)  
Heparansulphate growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis.  
*Nature* 332, 376-378.
- Roecklein, B.A., Torok-Storb, B. (1995)  
Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes.  
*Blood* 85, 997-1005.
- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P. Blobel, C.P. (1998)  
Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity.  
*J. Biol. Chem.* 274, 3531-3540.



- Rooke, J., Pan, D., Xu, T., Rubin, G.M. (1996)  
KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis.  
*Science* 273, 1227-1231.
- Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A. (1997)  
Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteinases.  
*J. Biol. Chem.* 272, 24588-24593.
- Ruoslahti, E. (1996)  
RGD and other recognition sequences for integrins.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697-715.
- Ruoslahti, E., Yamagushi, Y. (1991)  
Proteoglycans as modulators of growth factor activities.  
*Cell* 64, 867-869.
- Sagane, K., Yamazaki, K., Mizui, Y., Tanaka, I. (1999)  
Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM 11, ADAM 22 and ADAM 23.  
*Gene* 236, 79-86.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schlöndorff, J., Blobel, C.P. (1999)  
Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding.  
*J. Cell Sci.* 112, 3603-3617.
- Schwettmann, L., Tschesche, H. (2000)  
Cloning and expression in *pichia pastoris* of metalloprotease domain of ADAM 9 catalytically active against fibronectin.  
*Protein Expr. Purif.* 21, 65-70.
- Sherry, B., Cerami, A. (1988)  
Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, autocrine control of inflammatory responses.  
*J. Cell Biol.* 107, 1269-1277.
- Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U.M., Murphy, L.J. (2000)  
ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor binding protein-3.  
*J. Biol. Chem.* 275, 18574-18580.

Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., Bode, W. (1995)

The metzincins - topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4, 823-840.

Tang, B.L. (2001)

ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 33-44.

Thalmeier, K., Meissner, P., Reisbach, G., Falk, M., Brechtel, A., Dörmer, P. (1994)  
Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood* 83, 1799-1807.

Varnum-Finney, B., Purton, L.E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K.A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G., Artavanis-Tsakonas, S., Bernstein, I.D. (1998)

The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 91, 4084-4091.

Verfaillie, C., Hurley, R., Bhatia, R., McCarthy, J.B. (1994)

Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit. Rev. Hematol.* 16, 201-224.

Weskamp, G., Kratzschmar, J., Reid, M.S., Blobel, C.P. (1996)

MDC 9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J. Cell Biol.* 132, 717-726.

Whetton, A.D., Spooncer, E. (1998)

Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 721-726.

Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G., White, J.M. (1995)

ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* 131, 275-278.

Wolfsberg, T.G., White, J.M. (1996)

ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol.* 180, 389-401.

Wolfsberg, T.G., White, J.M. (1998)

ADAM metalloproteinases.

*In: Handbook of Proteolytic Enzymes.* Edited by Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. London: Academic Press, 1310-1313.

Wu, E., Croucher, P.I., McKie, N. (1997)

Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 437-442.

Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y. I. Fujisawa-Sehara, A. (1995)

A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion.

*Nature* 377, 652-656.

Yamamoto, S., Higuchi, Y., Yoshiyama, K., Shimizu, E., Kataoka, M., Hijiya, N., Matsuura, K. (1999)

ADAM family proteins in the immune system.

*Immunol. Today* 20, 278-284.

Zhang, X.-P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y. (1998)  
Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin  $\alpha v \beta 3$ .

*J. Biol. Chem.* 273, 7345-7350.

Zhou, M., Graham, R., Russell, G., Croucher, P.I. (2001)

MDC-9 (ADAM-9/Meltrin  $\gamma$ ) functions as an adhesion molecule by binding the  $\alpha v \beta 5$  integrin.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 574-580.

Zhu, G.Z., Lin, Y., Myles, D.G., Primakoff, P. (1999)

Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilisation.

*Gene* 234, 227-237.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<u>A</u> <u>D</u> isintegrin <u>A</u> nd <u>M</u> etalloprotease
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
Con A	Concavalin A
CSF	Colony Stimulating Factor
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAPI	4', 6-Diamino-2-phenylindol- dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDT	Dithiotreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
mA	Milliampere
MACS	Magnetisch Aktivierte Zellsortierung
MADM	Mammalian Disintegrin Metalloproteinase
MDC	Metalloproteinase Disintegrin Cysteinrich
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	Membrane Type MMP

---

Na	Natrium
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SV	Simian Virus
SVMP	Snake Venom Metalloproteinase
TACE	TNF-alpha Converting Enzyme
TBE	Tris Borate EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Necrosis Factor
TTBS	Tween-TBS
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Lebenslauf

*Name:* Jeannette Sy  
*Geburtsdatum:* 10. Februar 1973  
*Geburtsort:* Balingen

*Eltern:* Dietrich Sy, Maschinenbautechniker  
Ursula Sy geb. Weimer, Kauffrau

*Schulbildung:* August 1979 - Juli 1983 Grundschule im Aischbach  
in Tübingen  
August 1983 - Juli 1992 Wildermuth-Gymnasium in Tübingen  
Abschluss: Abitur

*Krankenpflegepraktikum:* 01.08.1992 - 30.09.1992  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Universität Tübingen

*Ausbildung:* 01.10.1992 - 30.10.1994  
Staatlich anerkannte Lehranstalt  
für technische Assistenten in der Medizin  
Tübingen  
Abschluss: Medizinisch technische Labor-Assistentin

*Studium der Medizin:* Beginn: Sommersemester 1995  
Ärztliche Vorprüfung: 26.03.1997  
Erstes Staatsexamen: 24.03.1998  
Zweites Staatsexamen: 11.09.2000  
Praktisches Jahr: 23.10.2000-21.09.2001  
an den städtischen Kliniken Esslingen:  
23.10.2000 - 11.02.2001 im Fach Chirurgie  
12.02.2001 - 03.06.2001 im Fach Pädiatrie  
05.06.2001 – 21.09.2001 im Fach Innere Medizin  
Drittes Staatsexamen: 20.11.2001

Seit Januar 2002 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Kinder  
und Jugendliche in Esslingen.