

## Zusammenfassung

Synaptogenese wird durch das Zusammenspiel von aktivitäts-unabhängigen Prozessen, die neuronale Verbindungen spezifizieren und von aktivitäts-abhängigen Prozessen, welche die Feinabstimmung dieser ersten synaptischen Verbindungen bewerkstelligen, gekennzeichnet. Es sind eine Reihe von Proteinfamilien bekannt, die bei der Etablierung von frühen Verbindungen beteiligt sind. Studien deuten an, dass Proteine, die über neuronale Aktivität moduliert werden, vielversprechende Kandidaten für die Feinabstimmung von Synapsen sind. Wir waren daran interessiert solche Moleküle zu finden. Ein Screen bei dem Retinakulturen von Hühnchen mit KCl inkubiert wurden, identifizierte CALEB als ein aktivitäts-abhängig reguliertes Molekül.

Das Ziel meiner Arbeit war, es den Mechanismus der Herunterregulierung von CALEB zu untersuchen. Ich konnte in Experimenten mit biotinylierten Retinakulturen des Hühnchens, die mit KCl oder Agonisten für Glutamatrezeptoren inkubiert wurden, zeigen dass die Herunterregulierung von CALEB an der Zelloberfläche im Vergleich zu unbehandelten Kulturen innerhalb von fünf min verstärkt wird. Durch Veränderung der extrazellulären Kalziumkonzentration und die Verwendung von Calmodulin blockern konnte die Beteiligung von Kalzium für die Herunterregulierung gezeigt werden. Da CALEB wie HB-EGF und TGF- $\alpha$  ein Mitglied der EGF-Familie der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ist, bei denen es an der Zelloberfläche zu einer Ektodomänenabspaltung kommt, nahm ich an, dass der Herunterregulierung von CALEB ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt. Das Auffinden einer löslichen 18 kD großen Komponente im Überstand von KCl-inkubierten Kulturen, sowie eines membranständigen 36 kD großen Fragments in Retinakulturen von Hühnchen bestätigten meine Hypothese. Mittels Inkubation von Membranfraktionen konnte ich zeigen, dass die Abspaltung der CALEB-Ectodomäne durch die katalytische Aktivität von Membranproteasen erfolgt und in Gegenwart von Breitspektrum Metalloproteaseinhibitoren verhindert wird. Auf Grund ihrer Fähigkeit andere Mitglieder der EGF-Familie zu spalten, wurden die beiden ADAM Proteasen (A disintegrin and metalloprotease), ADAM 10 und ADAM 17 zur genaueren Untersuchung des Mechanismus der Abspaltung der CALEB-Ectodomäne untersucht. Die Blockierung von ADAM 10 und ADAM 17 mit pharmakologischen Inhibitoren verhinderte die Spaltung von CALEB. Darüberhinaus führte eine erhöhte Expression von ADAM 10 zu einer Abnahme des Hühner-CALEB Gesamtproteins im Vergleich zu COS-7 Zellen, die

dominant negatives ADAM 10 und Hühner-CALEB ko-exprimierten. Diese Ergebnisse unterstützten meine Annahme, dass die Metalloproteasen ADAM 10 und ADAM 17 CALEB spalten. Weitere Experimente ließen auf die Beteiligung der Erk-Kinase bei der Abspaltung der CALEB-Ectodomäne schließen.

Ich nahm an, dass eine Blockierung der Abspaltung der Ectodomäne über einen längeren Zeitraum hinweg zu einer Stagnation der CALEB Synthese führt, welche durch einen nach Ansammlung von nicht gespaltenem CALEB resultierenden Rückkopplungsmechanismus verursacht wird. Meine Annahme wurde widerlegt, als Kulturen, die mit KCl und TAPI (Metalloprotease-Blocker) inkubiert wurden im Vergleich zu unbehandelten Kulturen oder Kulturen, die nur mit TAPI inkubiert wurden eine Hochregulierung des CALEB Gesamtproteins nach 4 hr aufzeigten. Diese Hochregulierung konnte durch Blockierung der Proteintranslation verhindert werden.

Ein weiterer Aspekt meines Projekts war es, die Expression und Lokalisation von CALEB im visuellen System zu untersuchen, um mehr über die Funktion von CALEB während der Entwicklung herauszufinden. Die Anwesenheit des membrangebundenen CALEB-Fragments beginnend von E16 an in Western Blots könnte vermuten lassen, dass der Abspaltung der Ectodomäne eine Rolle bei der Synaptogenese, welche mit E12 einsetzt (Hering and Kroger, 1996), zukommt. In der Maus zeigten Deglykosylierungsexperimente, dass es sich bei CALEB um ein in hohem Maße glykosyliertes, Gehirn-spezifisches Protein handelt. Subzellulär wird CALEB mittels „post-synaptic density preparation“ in der „synaptischen junction Fraktion“ angereichert, was auf eine mögliche Rolle von CALEB in Synapsen hindeutet. Die entwicklungsabhängig regulierte Expression von CALEB, welche eine steile Abnahme um P10-12 in der Retina und zum selben Zeitpunkt im Colliculus superior ein Expressionsmaximum aufweist, lässt eine Funktion von CALEB vor Öffnung der Augen vermuten.

Meine Untersuchungen lassen vermuten, dass neuronale Aktivität zu einer Abspaltung der äußeren Domäne durch die katalytische Aktivität von Metalloproteasen führt. Die verbleibende, membrangebundene EGF-Domäne von CALEB könnte als Rezeptor für einen noch unbekanntem Liganden dienen, deren Zusammenspiel verschiedene Signalkaskaden aktivieren könnte. Das Expressionsprofil und die Lokalisation von CALEB bestätigen, dass es sich bei CALEB um ein gehirnspezifisches, glykosyliertes Transmembranprotein handelt, welchem eine Rolle während der Bildung und Erhaltung von Synapsen zukommen könnte.