



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Zur Rolle des Transmembranproteins Leda-1/Pianp im Melanom
und im Zentralnervensystem**

Autor: Manuel Winkler
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Doktorvater: Prof. Dr. S. Goerdts

Das Typ-1-Transmembranprotein Leda-1/Pianp wurde zuerst in Leberendothelzellen im Rahmen einer Genexpressionsanalyse identifiziert. Es ist hochkonserviert zwischen Mensch, Maus und Ratte und wird prädominant im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert. Leda-1/Pianp ist ein Sialoglykoprotein, das vor seiner Lokalisierung in der Zellmembran durch Furin-ähnliche Proprotein-Konvertasen gespalten wird. Leda-1/Pianp befindet sich in polarisierten Epithelzellen mit E-Cadherin in Adhärenzverbindungen in der basolateralen Zellmembran. Es beeinflusst die epitheliale Barriere und scheint an der Regulation von Adhärenzverbindungen, über eine Hemmung der Prozessierung von E-Cadherin durch den γ -Sekretase-Komplex, beteiligt zu sein. Zudem ist Leda-1/Pianp ein Ligand des inhibitorischen Immunrezeptors PIR α . Im Rahmen der LPS-vermittelten Immunantwort von Makrophagen wird das Ligand-Rezeptor-Paar Leda-1/Pianp und PIR α gegenläufig reguliert.

Das einzige bekannte Homolog von Leda-1/Pianp, Ajap1, wirkt in Epithelzellen als Regulator von Adhärenzverbindungen und beeinflusst die intrinsische Apoptose. In Tumoren, insbesondere in Gliomen, fungiert Ajap1 am ehesten als Tumorsuppressor. Es beeinflusst Adhäsion, Migration und Invasion *in vitro* und das Tumorwachstum *in vivo*. Im ZNS spielt Ajap1 als Untereinheit des GABA β -Rezeptorkomplexes bei der inhibitorischen Neurotransmission eine Rolle. Während für Ajap1 bereits mehrere Funktionen beschrieben wurden, ist die Funktion von Leda-1/Pianp noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden Expression und Prozessierung von Leda-1/Pianp weiter charakterisiert sowie seine Rolle im Melanom und im ZNS untersucht.

Die Untersuchung immortalisierter Zelllinien per Western-Blot ergab eine physiologische Proteinexpression von Leda-1/Pianp in den murinen Melanomzelllinien B16-F1, B16-F10, MelanRet, MM 384 und MM 1274. Die höchste Expression fand sich in B16-Melanomzellen. In der Immunfluoreszenz war Leda-1/Pianp insbesondere in der Zellmembran von B16-Zellen nachweisbar. Hier kolokalisierte Leda-1/Pianp partiell mit N-Cadherin, hingegen nicht mit Paxillin. Dies deutet auf ein Vorkommen in Adhärenzverbindungen jedoch nicht in fokalen Adhäsionen hin. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Leda-1/Pianp dem Prozess des Ectodomain-Shedding unterliegt, unter Beteiligung der Sheddasen Adam10 und Adam17. In Kombination mit weiteren Versuchen wurde die Sequenz der proteolytischen Prozessierung von Leda-1/Pianp erkennbar. Die Prozessierungssequenz besteht aus der Spaltung durch Proprotein-Konvertasen, dem Ectodomain-Shedding und der intramembranären Proteolyse durch den γ -Sekretase-Komplex.

Für die funktionellen Untersuchungen von Leda-1/Pianp wurden per RNA-Interferenz erfolgreich monoklonale B16-F10-Zelllinien mit persistentem Gen-Knockdown von Leda-1/Pianp generiert. Dazu wurden B16-F10-Zellen mit shRNA-Plasmiden liposomal transfiziert und anschließend stabile Klone mittels *limiting dilution cloning* generiert. In den funktionellen Untersuchungen *in vitro* war kein Einfluss von Leda-1/Pianp auf Proliferation und Migration in B16-F10-Zellen nachweisbar. Im B16-Melanom-Mausmodell war das Tumorwachstum nach s. c.-Injektion nicht unterschiedlich, jedoch ergaben sich Hinweise auf einen Einfluss von Leda-1/Pianp auf die Lungenmetastasierung nach i. v.-Injektion. Die Aussagekraft der Versuche ist aufgrund der starken Heterogenität der Klone hingegen eingeschränkt. In den verhaltensbiologischen Versuchen demonstrierten die Leda-1-KO-Mäuse ein verändertes Angst- und Stressverhalten. Dies zeigte sich im Open-Field-Test auf einer freien Fläche, im Novel-Object-Exploration-Test im Bezug auf ein Objekt und bei der Untersuchung der Motorik in nur am ersten Tag unterschiedlichen Leistungsparametern. Weiterhin ergaben sich Hinweise auf ein Defizit der Präpulsinhibition (PPI) ohne Unterschiede bei der Stärke der Schreckreaktion. Im Novel-Object-Recognition-Test wurde kein Einfluss von Leda-1/Pianp auf den Bereich Lernen und Gedächtnis nachgewiesen. Der Novel-Object-Relocation-Test war nicht erfolgreich. Insgesamt deuten die

Ergebnisse auf eine Funktion von Leda-1/Pianp im ZNS hin, die für das Angstverhalten und die Stressbewältigung relevant ist.

In anderen Versuchen zum Angst- und Stressverhalten konnte diese Hypothese gestützt werden und Veränderungen der sozialen Interaktion sowie ein Defizit bei der kontextuellen Furchtkonditionierung bei den Leda-1-KO-Mäusen nachgewiesen werden. Im Fall einer kürzlich beschriebenen humanen Leda-1/Pianp-Defizienz trat eine Entwicklungsstörung mit mentaler Retardierung, Dismorphien, bilateralem Kryptorchismus, niedrigem Testosteronspiegel und zentraler Hypotonie auf.

Insgesamt wurden das Vorkommen und die Prozessierung von Leda-1/Pianp weiter charakterisiert und eine bedeutende Rolle im ZNS der Maus nachgewiesen. Zudem ergaben sich Hinweise auf eine Rolle von Leda-1/Pianp bei der Metastasierung des Melanoms.