

Zusammenfassung

Die Entwicklung der Ranvier'schen Schnürringe ist ein komplexer Prozess und erfordert definierte Interaktionen zwischen Axon und Gliazellen. Im peripheren Nervensystem spielen die myelinisierenden Schwann'schen Zellen eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Position der Ranvier'schen Schnürringe auf dem Axon. Gliomedin wurde als transmembranes Protein beschrieben, das auf den Spitzen der Mikrovilli Schwann'scher Zellen akkumuliert und mit seinen axonalen Rezeptoren NrCAM und Neurofascin interagiert. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass Gliomedin die Akkumulation von Proteinen auf der Axonoberfläche auslöst, die die Schnürringen ausbilden und dass eine Herunterregulation von Gliomedin durch siRNA die Ausbildung von Ranvier'schen Schnürringen verhindert.

Die biochemischen Analysen dieser Arbeit haben gezeigt, dass das transmembrane Gliomedin von der Zelloberfläche abgespalten wird und die C-terminale Olfactomedin-Domäne ebenfalls prozessiert werden kann. Im Zellkultursystem wurde Furin durch Inhibitorstudien als verantwortliche Protease für die Abspaltung der Ectodomäne identifiziert. Durch N-terminale Sequenzierung der Ectodomäne und gerichtete Mutagenese der Spaltstelle konnte die Nutzung der hochkonservierten Furin-Konsensussequenz bestätigt werden. Ebenfalls durch Inhibitorstudien, N-terminale Sequenzierung, gerichtete Mutagenese und einen *in vitro* BMP-1 Verdau konnte die BMP-1/TLD-ähnlichen Metalloprotease als Mediator der Olfactomedin-Domäne-Prozessierung identifiziert werden. Die Freisetzung der einzelnen Olfactomedin-Domänen resultiert in der Zusammenlagerung zu stabilen Multimeren. *In vivo* ist Gliomedin in allen Prozessierungsformen im Ischiasnerv nachgewiesen worden, wobei das Protein fest in der extrazellulären Matrix integriert ist, da eine Extraktion nur unter stark denaturierenden Bedingungen möglich war.

Die Interaktion zwischen Gliomedin und NrCAM wurde in Bindungsstudien bestätigt und die Bindungsstelle konnte für NrCAM wie auch für Neurofascin auf die Fibronectin Typ III Domänen eingegrenzt werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die membrangebundenen Heparansulfat-Proteoglykane die hauptsächliche Rezeptorklasse darstellt, über welche die Ectodomäne in der Lage ist, eine Zelladhäsion zu vermitteln. Darüber hinaus kann die Kollagen-Domäne von Gliomedin Perlecan in einer Heparansulfat-abhängigen oder unabhängigen Weise binden. Eine Analyse des Perlecan „SJ^{neo}-Mausmodells“ zeigte, dass die Lokalisation von Gliomedin am Ranvier'schen Schnürring verändert ist. Die Untersuchung eines Mausmodells mit Myelinisierungsdefekten bestätigte, dass die Lokalisation von Gliomedin ebenfalls von einer korrekten Myelinisierung der Axone abhängig ist.

Abstract

The development of Ranvier's nodes is a complex process which requires a well defined axoglial interaction. In the peripheral nervous system myelinating Schwann cells play an important role in determining the position of Ranvier's nodes along the axon. Gliomedin was identified as a transmembrane protein which accumulates at the tip of Schwann cell microvilli and interacts with its specific axonal receptors NrCAM and neurofascin. Gliomedin was shown to induce clustering of nodal components at the axonal surface in cell culture and eliminating gliomedin expression by RNA interference abolished node formation.

In this study biochemical analyses confirmed that the transmembrane gliomedin is shed from the cell surface and that the C-terminal olfactomedin domain is further processed. Using inhibitor studies, furin was shown to be responsible for the shedding of the ectodomain in cell culture. N-terminal sequencing of the ectodomain together with site directed mutagenesis confirmed the involvement of the highly conserved furin consensus sequence. In addition, the BMP-1/TLD-like metalloprotease was identified as responsible for further processing of the olfactomedin domain. Inhibitor studies, N-terminal sequencing, site directed mutagenesis and an *in vitro* BMP-1 cleavage assay further supported these findings. The released olfactomedin domains have a strong tendency to aggregate to higher, stable multimers. All different processed forms of gliomedin were detected in sciatic nerve tissue. The protein seems to be tightly anchored in the extracellular matrix since extraction was only possible under strongly denaturing conditions.

The interaction between gliomedin and NrCAM was confirmed in binding assays and the binding sites of both NrCAM and neurofascin for gliomedin could be localized to the fibronectin type III repeats.

In addition, membrane bound heparan sulfate proteoglycans were identified as the main receptors for cell binding to the ectodomain. Further experiments indicated that the collagenous domain of gliomedin also binds perlecan in both heparan sulfate dependent and independent manners. Analysis of the perlecan "SJ^{neo} mouse model" demonstrated, that localization of gliomedin at the Ranvier's nodes is altered. Further, in a mouse model with myelination defects, the deposition of gliomedin is dependent on the proper peripheral nerve myelination.