

**Funktionelle Analyse der proteolytischen Spaltung  
von Adhäsionsmolekülen durch Disintegrin-ähnliche  
Metalloproteasen**



Kumulative Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Thorsten Maretzky

Kiel, November 2005

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2002 bis Oktober 2005 am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. P. Saftig durchgeführt.

Referent/in:.....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

Der Dekan

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
1.1	Zell-Adhäsionsmoleküle.....	3
1.1.1	Die Integrine .....	3
1.1.2	Die Selektine.....	4
1.1.3	Die Immunglobulin-Superfamilie.....	5
1.1.4	Die Cadherin-Superfamilie .....	7
1.2	Modelle der homotypischen Cadherin-Interaktion.....	13
1.3	Regulation der Cadherin-Interaktion.....	16
1.4	Die proteolytische Ektodomänen-Spaltung: „Shedding“ .....	18
1.5	Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen .....	19
<b>2</b>	<b>Fragestellungen</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1	Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM10 vermittelt die Spaltung von N-Cadherin und reguliert Zell-Zell-Adhäsion und „β-Catenin Signaling“ (Veröffentlichung 1).....	26
3.1.1	Konstitutives und induzierbares „Shedding“ von N-Cadherin durch die Metalloprotease ADAM10.....	27
3.1.2	Die N-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist erhöht in ADAM10-defizienten Fibroblasten.....	29
3.1.3	ADAM10 kolokalisiert mit N-Cadherin und beeinflusst dessen Verteilung in Fibroblasten.....	30
3.1.4	β-Catenin-Rekrutierung an der Zellmembran führt zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion in ADAM10-defizienten Zellen.....	31
3.2	Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM10 vermittelt die Spaltung von E-Cadherin und reguliert epitheliale Zell-Zell-Adhäsion, Migration und β-Catenin-Translokation (Veröffentlichung 2).....	32
3.2.1	Die Metalloprotease ADAM10 prozessiert das transmembrane Adhäsionsmolekül E-Cadherin sowohl konstitutiv als auch induzierbar in murinen embryonalen Fibroblasten und epithelialen Zellen.....	33
3.2.2	ADAM10 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin und β-Catenin.....	34
3.2.3	Der Einfluss von ADAM10 auf die Adhäsion, Migration und Proliferation von epithelialen Zellen.....	35

3.2.4	ADAM10-vermitteltes „E-Cadherin-Shedding“ kann <i>in vivo</i> nicht kompensiert werden.....	37
3.3	Das neuronale Adhäsionsmolekül L1 wird sequentiell durch zwei unterschiedlich aktivierte Metalloproteasen und den Presenilin/ $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert und reguliert die neuronale Zell-Adhäsion, Zell-Migration und das Neuritenwachstum (Veröffentlichung 3).....	37
3.3.1	Konstitutive und induzierbare Freisetzung von löslichem L1 .....	38
3.3.2	Die unterschiedliche Regulation des „L1-Sheddings“ .....	38
3.3.3	Die Abspaltung der C-terminalen Domäne von L1 aufgrund regulierter intramembraner Proteolyse .....	40
3.3.4	Veränderte Adhäsionseigenschaften L1-exprimierender Zellen durch ADAM10- und ADAM17-vermitteltes „Shedding“ .....	41
3.3.5	ADAM10 reguliert L1-abhängige haptotaktische Migration von Neuronen.....	42
3.3.6	ADAM10 und ADAM17 beeinflussen L1-abängiges Neuritenwachstum .....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1	Die ADAM10-vermittelte Spaltung von E- und N-Cadherin.....	44
4.2	Die Rolle des ADAM10-vermittelten „N-Cadherin-Sheddings“ in Signalprozessen und der Zell-Zell-Adhäsion .....	46
4.3	Die Bedeutung des ADAM10-vermittelten „E-Cadherin-Sheddings“ für die Zell-Zell-Adhäsion und die zelluläre Signaltransduktion in epithelialen Erkrankungen .....	48
4.4	Die differentielle Regulation des „L1-Sheddings“ .....	50
4.5	Funktion des ADAM10-vermittelten „Sheddings“ <i>in vivo</i> .....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>81</b>
	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>82</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>85</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>

# 1 Einleitung

Zellen sind die grundlegenden, strukturellen und funktionellen Bauelemente aller Lebewesen, und ihre differenzierte Anordnung und Funktion führt zur Vielfalt der Organismen. Ein wesentlicher Schritt in der Evolution von Einzellern zu mehrzelligen Organismen muss die Erlangung der Fähigkeit der einzelnen Zelle gewesen sein, mit anderen Zellen in direkten physischen und kommunikativen Kontakt zu treten. Alle mehrzelligen Organismen sind in Zellverbänden - den Geweben - organisiert, die sich zu größeren Funktionseinheiten, den Organen, verbinden. Spezifische Interaktionen zwischen einzelnen Zellen oder einer Zelle und der sie umgebenden extrazellulären Matrix kennzeichnen eine dynamische Gewebearchitektur und die Entstehung komplexer Strukturen. Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus Proteinen und Kohlenhydraten und füllt nicht nur den Raum zwischen den Zellen aus, sondern fördert deren Zusammenhalt maßgeblich.

Die Zell-Adhäsion ist ein grundlegend notwendiger Prozess, sei es für die Entwicklung von Einzellern zu Vielzellern im Laufe der Evolution oder die Ausbildung von Geweben und Organen während der Embryogenese. Die Adhäsion von Zellen ist nicht nur Bestandteil morphoregulatorischer Prozesse wie die Ausprägung der Zelldifferenzierung und der Erhalt der Gewebeintegrität<sup>1,2</sup>, sondern umfasst auch dynamische Vorgänge bei der Immunantwort<sup>3</sup> und der neuronalen Informationsverarbeitung<sup>4</sup>. Verantwortlich für die Zell-Adhäsion ist die kombinatorische Expression und Interaktion einer heterogenen Klasse von membranständigen Proteinen<sup>5</sup>. Diese Zell-Adhäsionsmoleküle sind transmembrane Glykoproteine, welche einerseits über ihren extrazellulären Anteil für das Anheften von Zellen sorgen und andererseits diesen Kontakt intrazellulär über das Zytoskelett verankern<sup>6</sup>.

Zell-Adhäsionsmoleküle sind ebenfalls an komplexen intrazellulären Prozessen beteiligt, die zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Diese intrazellulären Vorgänge können ihrerseits Affinität, Expressionsmuster und Spezifität von Oberflächen-Rezeptoren beeinflussen<sup>7-9</sup>. Ebenfalls erfüllen sie vielfältige Aufgaben bei der Morphogenese und Homöostase von Geweben und sind bei pathologischen Prozessen wie der Tumorgenese und Metastasierung von Bedeutung<sup>10,11</sup>. Um die Vielfalt der durch Zell-Adhäsionsmoleküle beeinflussten Vorgänge zu verstehen, werden im Folgenden die einzelnen Klassen dieser Moleküle genauer betrachtet.

## 1.1 Zell-Adhäsionsmoleküle

Aufgrund struktureller Merkmale bezüglich ihrer Primärstruktur lassen sich Zell-Adhäsionsmoleküle in vier Hauptfamilien und weitere kleinere Gruppen einteilen<sup>12</sup>. Zu den Hauptfamilien gehören die Integrine, die Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und die Gruppe der Cadherine. Weitere Gruppen sind z.B. die Syndekane<sup>13</sup> und die Disintegrine<sup>14</sup>. Zell-Adhäsionsmoleküle werden, abgesehen von ihrer Struktur, auch bezüglich ihrer Adhäsionsmechanismen voneinander abgegrenzt. Wegen des Einflusses von zweiwertigen Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$ ) auf die Funktion von einigen Zell-Adhäsionsmolekülen, wird zwischen einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Zell-Adhäsion unterschieden<sup>15</sup>. Darüber hinaus stellt man die homotypische Interaktion zwischen Molekülen gleichen Typs der heterotypischen Interaktion zwischen unterschiedlichen Molekülen gegenüber<sup>16</sup>. Im Folgenden werden hier die besonderen Merkmale der vier großen Gruppen von Zell-Adhäsionsmolekülen genauer beschrieben.

### 1.1.1 Die Integrine

Integrine sind die vorherrschenden Rezeptoren für die Zell-Matrix-Adhäsion und spielen bei Vertebraten außerdem eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion. Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Bisher wurden in Säugern 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, die gemeinsam eine Vielzahl von unterschiedlichen Integrinen bilden können<sup>17</sup>. Die durch Integrine vermittelte Zell-Adhäsion ist abhängig von zweiwertigen Kationen, die an der extrazellulären Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit binden<sup>18</sup>. Darüber hinaus zeigen Integrine eine heterotypische Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin (Fn) und mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie. Während einige Integrine nur einen oder wenige Liganden binden, weisen andere ein großes Spektrum an Liganden auf<sup>19</sup>. Intrazellulär sind fast alle Integrine über die  $\beta$ -Untereinheit und submembranäre Plaqueproteine wie  $\alpha$ -Aktinin, Vinculin, Talin und Paxillin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden<sup>20,21</sup>. Durch Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix bilden sich „Integrincluster“, wodurch es auf der zytoplasmatischen Seite zum Aufbau von Aktinfasern kommt. Diese Neuordnung von Aktinfasern zu größeren Fasern verstärkt wiederum die Integrinclusterbildung. Auf diese Weise bilden sich größere Aggregate aus EZM-Proteinen (EZM, extrazelluläre Matrix),

Integrinen und Zytoskelettproteinen, d.h. die Integrine „integrieren“ die EZM und das Zytoskelett, worauf die Namensgebung dieser Klasse von Glykoproteinen beruht.

### 1.1.2 Die Selektine

Die Selektinfamilie besteht aus nur drei Mitgliedern, dem L-Selektin (exprimiert auf Leukozyten), E-Selektin (ausschließlich exprimiert auf Zytokin-aktivierten Endothel-Zellen) und P-Selektin (exprimiert auf Thrombozyten und Endothelzellen)<sup>22,23</sup>. Selektine sind stark glykosylierte Adhäsionsmoleküle, deren extrazellulärer N-Terminus eine Lektin-Domäne, eine EGF-ähnliche (EGF, „Epidermal Growth Factor“) Domäne und eine Selektin-spezifische Konsensussequenz enthält. Die Lektin-Domäne bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an spezifische Kohlenhydratstrukturen<sup>24,25</sup>. Häufig interagieren Selektine über die sialylierten Saccharidstrukturen mit Glykoproteinen aus der Familie der Muzine. Diese membranständigen Glykokonjugate können von mehreren Selektinen gleichzeitig gebunden werden und weisen eine Sensitivität für O-Sialoglykoproteasen auf, die die einzelnen Lektine selektiv wieder abspalten können. Damit ermöglichen sie eine Regulation der Adhäsionsstärke zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Für P-Selektine ist des Weiteren eine Bindung an sulfatierte Proteoglykane, 3-sulfatierte Galaktosylceramide und Heparin bekannt<sup>26</sup>. Ein Ligand für P-Selektin ist der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), ein Muzin-ähnliches Protein, welches auf der Oberfläche einer Subpopulation von T-Lymphozyten lokalisiert ist<sup>27</sup>.

Selektine ermöglichen den initialen Kontakt von Leukozyten mit dem Endothel und spielen somit eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen<sup>28,29</sup>. Durch ihre Proteinstruktur und ihre speziellen molekularen Bindungseigenschaften initiieren sie die Leukozytenadhäsion; nach der transienten Bindung der korrespondierenden Liganden erfahren die Leukozyten aus dem fließenden Blutstrom eine „rollende Verlangsamung“ entlang der Gefäßwand. Anschließend vermitteln Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine wie LFA-1 („lymphocyte function-associated antigen-1“) oder Mac-1 („macrophage antigen-1“) die feste Bindung der Leukozyten am Endothel<sup>30</sup>.

### 1.1.3 Die Immunglobulin-Superfamilie

Bei den Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie handelt es sich um eine große heterogene Familie von transmembranen Zell-Adhäsionsmolekülen mit über 100 Mitgliedern innerhalb der Vertebraten<sup>31</sup>. Diese Proteine der Zelloberfläche vermitteln neben Antigenerkennung, Komplementbindung und Signalübertragung auch Funktionen zellulärer Adhäsion<sup>32</sup>. Charakterisieren lassen sich die Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie durch eine variierende Anzahl von Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) im Bereich des N-Terminus. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige homotypische und heterotypische Adhäsion. Das neuronale Zell-Adhäsions-Molekül NCAM („Neural Cell Adhesion Molecule“) zeigt beispielsweise auch homotypisches Bindungsverhalten, während Vertreter der ICAM-Subfamilie (ICAM, „Inter Cellular Adhesion Molecule“) eine heterotypische Interaktion mit Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten eingehen<sup>9</sup>. Abgesehen von einer Beteiligung bei der Immunantwort, spielen die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems<sup>33</sup>. Zudem sind Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie auch an pathologischen Prozessen wie Entzündungen und der Tumorinvasion beteiligt. Die Expression von verschiedenen Vertretern dieser Gruppe ist während der Melanomentstehung bei einer Vielzahl von Melanomen hochreguliert und geht mit der Trennung von Nävuszellen und Keratinozyten und dem Übergang von der radialen Wachstumsphase in die vertikale Wachstumsphase einher<sup>34</sup>.

#### 1.1.3.1 L1-Neuronales Zell-Adhäsionsmolekül

Das neuronale Zell-Adhäsionsmolekül L1 (L1-NCAM) mit einem Molekulargewicht von 220 kDa wird im Nervensystem als transmembranes Glykoprotein exprimiert<sup>35-37</sup> und ist das namensgebende Mitglied der L1-Unterfamilie der Immunglobulin-Superfamilie. Diese Zell-Adhäsionsmoleküle besitzen eine homologe Domänenstruktur, die bei den Wirbeltieren aus sechs Immunglobulineinheiten, fünf Fibronectin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne sowie einer stark konservierten intrazellulären Domäne besteht. Innerhalb der Wirbeltiere sind vier Vertreter der L1-Familie beschrieben: L1, Neurofascin, das „Neural glial Cell-Adhesion Molecule related Cell Adhesion Molecule“ (NrCAM) und das „Close Homolog of L1“ (CHL1)<sup>37-40</sup>. Diese vier Vertreter leiten sich vermutlich phylogenetisch von einem gemeinsamen Vorläufer ab. In Genomen verschiedener Arthropoden wurde nur eine



Form von L1 identifiziert, so könnten die vier L1-Mitglieder, ähnlich wie es für andere Genfamilien beschrieben ist, durch sequentielle Genomduplikation entstanden sein<sup>41</sup>. Allen L1-Mitgliedern gemeinsam ist eine Beteiligung an der Entwicklung des Nervensystems. Ihre Funktion besteht im allgemeinen in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten im Nervensystem. Dort sind sie außerdem an Prozessen wie Zellmigration, Myelinisierung, axonalem Wachstum und axonaler Wegfindung beteiligt<sup>38,42-45</sup>. Die L1-Mitglieder werden aber auch von einigen nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert, so wurde für L1 und NrCAM eine Expression in transformierten, metastasierenden Krebszellen gezeigt<sup>46</sup>. L1 wurde im Zentralen Nervensystem auf einer Gruppe von sich entwickelnden Neuronen, aber auch auf Axonen zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems nachgewiesen. Im peripheren Nervensystem wird L1 darüber hinaus von Schwann'schen Zellen exprimiert<sup>47,48</sup>. L1 ist in zahlreiche Prozesse des sich entwickelnden und adulten Nervensystems involviert wie der Zellmigration<sup>35,49</sup>, dem Axonwachstum<sup>50,51</sup>, der Axonfaszikulierung<sup>52</sup>, der Synaptogenese und der Myelinisierung von Neuronen<sup>53</sup>. Darüber hinaus steuert es Prozesse wie die Regenerierung von Nervenzellen<sup>54</sup> und fördert das Überleben von Neuronen. L1 wird auch eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisleistungen zugeschrieben<sup>55</sup>.

Die Funktionen von L1 scheinen vor allem durch homophile und heterophile Interaktionen vermittelt zu werden. Zu den heterophilen Bindungspartnern des L1-Moleküls zählen verschiedene Formen der Integrine<sup>56,57</sup> sowie Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin und zahlreiche Proteoglykane wie Neurokan und Phosphakan<sup>44,58-60</sup>. Weiterhin interagiert das L1-Molekül mit Liganden wie Contactin (F3/F11)<sup>61</sup>, CD166 (DM1-GRASP)<sup>62</sup> und TAG-1 („Transient Axonal Glycoprotein-1“, Axonin-1)<sup>52,63</sup>. Interaktionen mit L1 konnten auch für die Moleküle NCAM<sup>64</sup>, CD9<sup>65</sup> sowie für CD24 (Nectadin)<sup>66,67</sup> nachgewiesen werden. Ein klinisches Interesse an L1 erklärt sich durch die Entdeckung, dass Mutationen im L1-Gen zu einer x-chromosomal rezessiv vererbaren neurologischen Erkrankung, dem CRASH-Syndrom führen. Die Abkürzung CRASH steht für „corpus callosum hypoplasia, mental retardation, adducted thumbs, spasticity paraplegia and hydrocephalus“ und fasst die für diese Erbkrankheit charakteristischen Symptome zusammen<sup>68</sup>.

Bis heute wurden etwa 100 verschiedene pathogene Mutationen im L1-Gen identifiziert. Die Schwere der Krankheit variiert zwischen Patienten mit unterschiedlichen L1-Mutationen, aber auch zwischen Patienten mit derselben Mutation. Für das CRASH-Syndrom scheint damit eine einfache Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu fehlen. Um ein Tiermodell für die Krankheit zu etablieren, wurden transgene Mäuse mit einer Null-Mutation im L1-Gen hergestellt. Diese

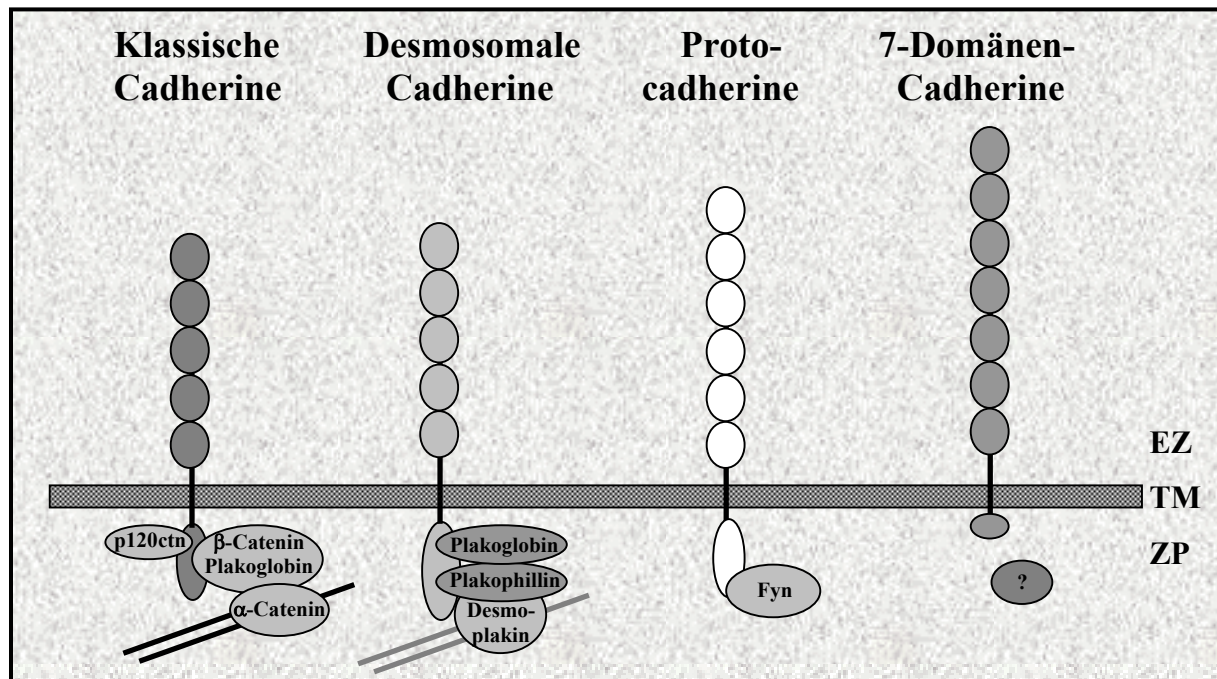
Mutante zeigt Defekte, die man auch bei Menschen mit L1-Mutationen feststellen kann. Die Tiere stellen damit ein Modell dar, um die molekularen und zellulären Mechanismen zu untersuchen, die zu der abnormen Entwicklung des Nervensystems von CRASH-Patienten führen<sup>69,70</sup>.

#### 1.1.4 Die Cadherin-Superfamilie

Cadherine („Ca-*adherine*“) sind Kalzium-bindende, glykosylierte Transmembranproteine, deren extrazellulärer Bereich durch eine Wiederholung von Cadherin-typischen Homologiedomänen (Cadherin-Domäne, „Cadherin repeat“) gekennzeichnet ist. Sie vermitteln eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, im allgemeinen homotypische Interaktion und werden in zahlreichen Geweben exprimiert<sup>71</sup>. Durch ihre Funktion bei der Zell-Adhäsion spielen die Cadherine neben der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten auch bei der embryonalen Morphogenese, der Erhaltung der Zellpolarität und bei der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. Bislang sind über 300 Cadherin-Sequenzen in Vertebraten bekannt, von denen allein im Menschen über 80 vorkommen<sup>72</sup>. Gemeinsam sind allen Cadherinen mehrere extrazelluläre Cadherin-Motive. Die Cadherin-Domäne weist große strukturelle Ähnlichkeit mit der Immunglobulin-Domäne auf und ist aus einer zylindrischen Anordnung eines  $\beta$ -Faltblattes aufgebaut, welches aus sieben antiparallelen Einzelsträngen („ $\beta$ -barrel“) besteht. Allerdings ist ein gemeinsamer Ursprung der Cadherin- und der Immunglobulindomäne fraglich, da weder Sequenzhomologien noch vergleichbare Genstrukturen vorliegen. Die Strukturähnlichkeit beider Domänen wird als ein Beispiel für die konvergente Evolution eines Proteinmoduls interpretiert<sup>73</sup>. Eine Cadherin-Domäne ist ca. 100 Aminosäuren lang, evolutiv sehr konserviert und besitzt negativ geladene Sequenzmotive, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, homophile Bindungen vermitteln. Über kurze, ca. zehn Aminosäuren lange Linkersequenzen, wiederholen sich diese Domänen tandemartig zwischen 5- bis 34-mal, wobei die Domänen beginnend am N-terminalen Ende durchnummeriert werden.

Die Ausrichtung der einzelnen Cadherin-Domänen scheint maßgeblich durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflusst zu werden. Diese zwischen den einzelnen Cadherin-Domänen liegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen zeichnen sich durch die konservierten Sequenzmotive LDRE, DXNDN und DXD aus. Diese Aminosäuren bilden am Übergang von zwei Cadherin-Domänen eine Art Tasche, in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die sauren Seitengruppen von Glutamin- und Asparaginsäure stabilisiert werden<sup>74</sup>. Mit Ausnahme des T-Cadherins („Truncated-

Cadherin“), welches über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist<sup>75</sup>, besitzen alle Cadherine eine Transmembrandomäne. Der sich anschließende zytoplasmatische Anteil variiert innerhalb der Cadherin-Superfamilie. In Abb. 1 sind vier der Cadherin-Subfamilien mit ihren jeweiligen zytoplasmatischen Verankerungen schematisch dargestellt.



**Abb. 1: Die Cadherin-Superfamilie.** Struktur und intrazelluläre Interaktionspartner von Vertretern der verschiedenen Cadherin-Subfamilien. Klassische und desmosomale Cadherine sind über Armadillo-Proteine mit dem Zytoskelett verbunden, während Mitglieder der Protocadherinfamilie mit der Fyn-Tyrosinkinase (Fyn) interagieren. Für die Vertreter der 7-D-Cadherine wurden bislang keine zytoplasmatischen Interaktionspartner gefunden. EZ: extrazellulär, TM: Transmembran und ZP: zytoplasmatisch. Verändert nach Gessner und Tauber, 2000.

Die Cadherine werden hinsichtlich besonderer Strukturmerkmale wie der Anzahl der Cadherin-Domänen, aber auch aufgrund der zytoplasmatischen Domäne und der Größe eines Cadherins sowie anhand von Gen-Clustern in verschiedene Subfamilien unterteilt<sup>76,77</sup>: die desmosomalen Cadherine, Protocadherine, Proteinkinase-Cadherine, Fat-ähnliche Cadherine, 7-Domänen-Cadherine und die klassischen Cadherine. Im Folgenden wird kurz auf die wesentlichen Merkmale der einzelnen Subfamilien eingegangen, bevor die klassischen Cadherine genauer betrachtet werden.

#### 1.1.4.1 Desmosomale Cadherine

Desmosomale Cadherine sind am Aufbau von Desmosomen (*Macula adhaerens*) beteiligt und werden in Desmogleine und Desmocolline unterteilt, von denen bislang jeweils drei Vertreter

bekannt sind<sup>78</sup>. Sie besitzen wie klassische Cadherine extrazellulär fünf Cadherin-Domänen, aber ihre zytoplasmatischen Anteile zeigen nur eine partielle Homologie zu denen der klassischen Cadherine<sup>79</sup>. Die Armadillo-Proteine Plakoglobin und Plakophilin verknüpfen die desmosomalen Cadherine mit dem Intermediärfilament. Desmocollin und Desmoglein interagieren in einer homo- und heterotypischen Weise<sup>80</sup> und bilden zusammen mit Plakoglobin einen Komplex, der hinreichend für die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsion in Zellkultur-Experimenten ist<sup>81</sup>.

#### 1.1.4.2 7-Domänen-Cadherine

Die 7-Domänen-Cadherine (7-D-Cadherine) besitzen als gemeinsame Strukturmerkmale sieben Cadherin-Domänen und einen kurzen, etwa 25 Aminosäuren umfassenden, zytoplasmatischen Anteil<sup>82</sup>. Das LI („Liver Intestine“-) und das Ksp („Kidney specific“-) Cadherin sind die bislang einzigen Mitglieder dieser Familie<sup>83,84</sup>. Als erster Vertreter der 7-D-Cadherine wurde das LI-Cadherin aus der Ratte identifiziert<sup>83</sup>. LI-Cadherin wird vorwiegend im Darm exprimiert<sup>85</sup> und zeigt eine basolaterale Verteilung entlang der Zell-Zell-Kontaktfläche benachbarter Enterozyten, ist aber von spezialisierten Membranbereichen wie der *Zonula occludens* („Tight Junctions“), der *Zonula adhaerens* („Adherens Junction“) und der *Macula adhaerens* ausgeschlossen<sup>83</sup>. Dies gilt nicht für klassische und desmosomale Cadherine. LI-Cadherin ist nicht wie klassische Cadherine zytoplasmatisch über Catenine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden, vermittelt aber dennoch Zell-Zell-Aggregation<sup>86</sup>. Diese zelladhäsive Wirkung des LI-Cadherins ist unabhängig von etwaigen zytoplasmatischen Interaktionen, da auch ein nur über einen GPI-Anker mit der Membran verbundener extrazellulärer Bereich des LI-Cadherins Zellen zur Aggregation bringt<sup>86</sup>. Zudem konnten zytoplasmatische Bindungspartner des LI-Cadherins bislang nicht identifiziert werden.

Mit der Identifizierung des Ksp-Cadherins aus der Kaninchen-Niere wurde ein weiteres Mitglied der 7-D-Cadherine entdeckt<sup>84</sup>. Wie LI-Cadherin zeigt auch Ksp-Cadherin ein gewebespezifisches Expressionsmuster und eine vergleichbare subzelluläre Verteilung. Das Ksp-Cadherin ist in der basolateralen Membran aller Epithelzellen der Nierentubuli und des Sammelrohres lokalisiert, es ist jedoch nicht in den Glomeruli der Niere nachzuweisen<sup>87</sup>. Transkripte des Ksp-Cadherins sind im Laufe der Embryonalentwicklung auch in der Lunge der Maus zu finden<sup>88</sup> und lassen auf eine Beteiligung des Ksp-Cadherins bei der Differenzierung von Geweben schließen. Untersuchungen zur Expression und subzellulären Lokalisation von LI-Cadherin in der Darmmucosa bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

weisen eine verminderte Expression von LI-Cadherin auf, insbesondere in Bereichen schlechter Differenzierung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass LI-Cadherin in gastrointestinalen Karzinomen vermindert exprimiert wird. Die molekularen Ursachen der verminderten Expression sind noch nicht geklärt<sup>89</sup>.

#### 1.1.4.3 Protocadherine

Protocadherine stellen mit etwa 70 Vertretern in Säugern die größte Subfamilie der Cadherin-Superfamilie dar<sup>90</sup>. Sie besitzen bis zu sieben (meist sechs) Cadherin-Domänen und einen zytoplasmatischen Bereich, der keine Homologie zu dem der klassischen Cadherine aufweist. Die als „Cadherin-related-Neuronal-Receptors“ (CNR) bezeichneten Mitglieder der Protocadherin-Subfamilie interagieren intrazellulär mit der Fyn-Tyrosinkinase aus der Src-Familie<sup>91</sup>. Mit der Entdeckung von 52 humanen Protocadherinen, die in drei Genclustern ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Protocadherine) arrangiert sind, gewinnen die Protocadherine zunehmend an Bedeutung. Eine mögliche Funktion wird im Zusammenhang mit der Informationsverarbeitung des Zentralen Nervensystems diskutiert<sup>92</sup>. Zudem sind Vertreter der Protocadherine an der kontrollierten Segmentierung des Mesoderms zu den Somiten beteiligt. Die Bildung der Spalte zwischen zwei Somiten wird durch ein räumlich alternierendes Genexpressionsmuster im präsomitischen Mesoderm angekündigt. Zellen, die beginnen, den posterioren Anteil eines neuen Somiten zu bilden, schalten einen Gensatz ein, während die Zellen, die den anterioren Anteil des nachfolgenden Somiten bilden werden, einen Satz anderer Gene exprimieren. Hierbei koordinieren unter anderem paraxiale Protocadherine die Polarität der Zellen im Mesoderm und fungieren als Zell-Adhäsionsmoleküle. Darüber hinaus aktivieren sie über einen bislang unbekanntem Signalweg „c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen“ (JNKs)<sup>93-95</sup>.

#### 1.1.4.4 Klassische Cadherine

Die über 20 bekannten klassischen Cadherine besitzen N-Terminal ein Propeptid, welches im Laufe ihrer Biosynthese durch Endoproteasen abgespalten wird<sup>96,97</sup> und fünf extrazelluläre Cadherin-Domänen<sup>71</sup>. Sie lassen sich aufgrund eines konservierten HAV-Sequenzmotives in der ersten Cadherin-Domäne weiter unterteilen<sup>71</sup>. Während die klassischen Cadherine des Typs 1 das HAV-Motiv besitzen, ist dies bei den klassischen Cadherinen des Typs 2 nicht der Fall. Ein Unterschied im Adhäsionsverhalten der beiden Cadherin-Typen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden<sup>98,99</sup>. Auf der Zellmembran bilden klassische Cadherine parallele *Cis*-

Dimere. In dieser Konformation vermögen diese, eine *Trans*-Dimerisierung mit einem identischen Cadherin-Dimer benachbarter Zellen zu bilden und überbrücken so den extrazellulären Raum zwischen den Zellen. Der Transmembrandomäne folgt ein etwa 150 Aminosäuren umfassender zytoplasmatischer Anteil, der hochkonservierte Abschnitte enthält<sup>100</sup>. Über diese konservierten intrazellulären Domänen interagieren die klassischen Cadherine über verschiedene Interaktionspartner. Einer dieser Bereiche beinhaltet ein Bindungsmotiv für die sogenannten Armadillo-Proteine  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin) und wird auch als Catenin-Bindungssequenz bezeichnet<sup>101</sup>. Ein weiteres Armadillo-Protein, p120ctn, bindet membrannah an die zytoplasmatische Domäne der klassischen Cadherine und scheint deren Bindungsstärke über die Modulation der GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 zu regulieren<sup>102</sup>.

Die klassischen Cadherine sind über  $\alpha$ -Catenin, welches an  $\beta$ -Catenin bindet, mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft und beeinflussen über die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin auch den Wnt-Signalweg<sup>103,104</sup>. Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist in verschiedene Differenzierungsereignisse während der embryonalen Entwicklung involviert und spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Wnt-Signale transmittieren in den Zellkern durch die zytosolische Komponente  $\beta$ -Catenin. In der Abwesenheit von Wnt wird  $\beta$ -Catenin konstitutiv in den Proteasomen degradiert. In Gegenwart von Wnt ist  $\beta$ -Catenin stabilisiert und kann mit den HMG-Box-Transkriptionsfaktoren (HMG, „High Mobility Group“) der „Lymphoid Enhancer binding Factor/T-Cell-Factor-Familie“ (LEF/TCF-Familie) assoziieren. Der Komplex aus LEF/TCF/ $\beta$ -Catenin aktiviert spezifische Wnt-Zielgene. Die klassischen Cadherine vermitteln einerseits eine eher „diffuse“ Adhäsion entlang der gesamten Zell-Zell-Kontaktfläche, andererseits konzentrieren sie sich in diskreten Kontaktzonen, den *Zonulae adherens* („Adherens Junctions“<sup>105</sup>). Diese spezifischen Membrankontakte stabilisieren die Zellen in einem Epithelverband über das Aktin-Zytoskelett und führen zu einer Trennung von apikalen und basolateralen Membranbereichen<sup>72</sup>. Hierdurch wird eine Polarisierung der Zellen induziert<sup>106</sup>. Zu der Familie der klassischen Cadherine gehören neben dem plazentalen-, retinalen- und vaskular/endothelialen-Cadherin das epitheliale- und das neuronale-Cadherin, welche hier im Folgenden genauer beschrieben werden.

#### 1.1.4.4.1 Epitheliales-Cadherin

Epitheliales-Cadherin (E-Cadherin, Uvomorulin<sup>107</sup>) gilt als Hauptvertreter der klassischen Cadherine. Das Gen, lokalisiert auf Chromosom 16q22.1, umfasst 16 Exons, welche ca.

100 kb genomische DNA umspannen. Das Protein besteht aus einer 80 kDa großen extrazellulären Domäne, einer 15 kDa großen transmembranen sowie einer ebenfalls 15 kDa großen zytoplasmatischen Domäne, die in direkter Verbindung mit Funktionsproteinen des Zytoskeletts steht. Es wird in zahlreichen Epithelien exprimiert und besitzt eine zentrale Funktion in der Embryogenese. Schon in der frühen Embryonalentwicklung werden in der Zygote maternale E-Cadherin-Transkripte und E-Cadherin-Protein bereitgestellt, bevor die zygotische Transkription mit dem Zwei-Zell-Stadium einsetzt<sup>108,109</sup>. E-Cadherin ist in der Präimplantationsphase für die Kompaktierung im Acht-Zell-Stadium unerlässlich, wobei E-Cadherin an der Zelloberfläche an den Zell-Zellkontakten der Blastomeren konzentriert wird<sup>110</sup>. Die bisher leicht zusammengehaltenen Zellen erhöhen dabei die Adhäsionskraft untereinander und formen eine dicht gepackte Morula. Während sich der Eizylinder bildet, exprimieren zunächst alle Zellen Cadherin, doch zu Beginn der Gastrulation wird E-Cadherin in Zellen des Epiblasten, die die epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) durchlaufen, bei der Bildung des Mesoderms abgeschaltet<sup>111,112</sup>. Die Expression im Ektoderm und im Entoderm bleibt währenddessen erhalten<sup>113,114</sup>. Kurz darauf, wenn die Neurulation im Ektoderm eingeleitet wird, schalten die Zellen, die zu Neuroektoderm differenzieren, E-Cadherin ab und beginnen stattdessen N-Cadherin zu exprimieren<sup>115,116</sup>. Außerdem ist der E-Cadherin-Catenin-Komplex wichtig für die Ausbildung der epidermalen Polarität, die Kontrolle der Proliferation und für Mechanismen der Kontaktinhibition.

Für E-Cadherin konnte erstmals eine heterophile Interaktion mit  $\alpha$ E $\beta$ 7-Integrin, welches auf intraepithelialen Lymphozyten lokalisiert ist, gezeigt werden<sup>117,118</sup>. E-Cadherin vermittelt so eine Bindung von intraepithelialen Lymphozyten an die Enterozyten des Dünndarmepithels. E-Cadherin-defiziente Mäuse zeigen eine pränatale Letalität und sterben während der Implantation der Blastozyste in die mütterliche Schleimhaut. In diesem Entwicklungsstadium sind die Ausbildung von trophoektodermalen Epithelien und die Formung des Blastozoels gestört<sup>119</sup>. Eine gestörte Expression von E-Cadherin in Zellen ist zudem ein wesentlicher Bestandteil der Tumorentwicklung und Zellmetastasierung. So wurde der Verlust von E-Cadherin mit erhöhter Malignität von Tumoren und niedrigeren Überlebensraten in Verbindung gebracht<sup>10</sup>.

#### 1.1.4.4.2 Neuronales-Cadherin

Das neuronale-Cadherin (N-Cadherin) wurde zuerst im Muskel und in neuronalen Geweben entdeckt, wo es unter anderem das Neuritenwachstum und die Synaptogenese reguliert<sup>77</sup>.

Weitere Funktionen in unterschiedlichen Organen wie z.B. der Einfluss auf die Entwicklung der Retina oder die Nephrogenese wurden beschrieben<sup>120,121</sup>. N-Cadherin-vermittelte Adhärenzverbindungen spielen daneben eine zentrale Rolle in der kardialen Morphogenese. Neben der mechanischen Verbindung des Kardiomyozytenverbandes werden weitere wesentliche Funktionen von N-Cadherin diskutiert. Verschiedene Studien belegen den Zusammenhang zwischen N-Cadherin und Zelldifferenzierung, Morphogenese, Myofibrillogenese sowie der Neubildung von Glanzstreifen mit dem nachfolgenden Einbau von „gap junctions“. Darüber hinaus unterstützt N-Cadherin die Zellmotilität und fördert die Invasion und Metastasierung von Melanomzellen. Der Cadherin-Wechsel („switch“) von E- zu N-Cadherin in Melanomzellen fördert die Interaktion von Melanomzellen mit Zellen des Stromas wie den Fibroblasten sowie mit Endothelzellen<sup>122</sup>. So führt die N-Cadherin-Expression in verschiedenen Brustkrebszellen zu einer Zunahme der Invasivität und in Plattenepithelkarzinomzellen zu einem wenig adhäsiven Phänotyp wie er typisch für invasive Tumorzellen ist<sup>123-125</sup>. Vermutet wird eine Wechselwirkung zwischen N-Cadherin-exprimierenden Tumorzellen und dem Endothelium, was zu einer gesteigerten Blutversorgung der Tumorzellen und damit zu einem gesteigerten Wachstum führt<sup>126,127</sup>. Andere Ergebnisse wiederum zeigen eine deutliche Korrelation zwischen dem Verlust der N-Cadherin-Expression bei höhergradig malignen Karzinomen und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen<sup>128</sup>.

## 1.2 Modelle der homotypischen Cadherin-Interaktion

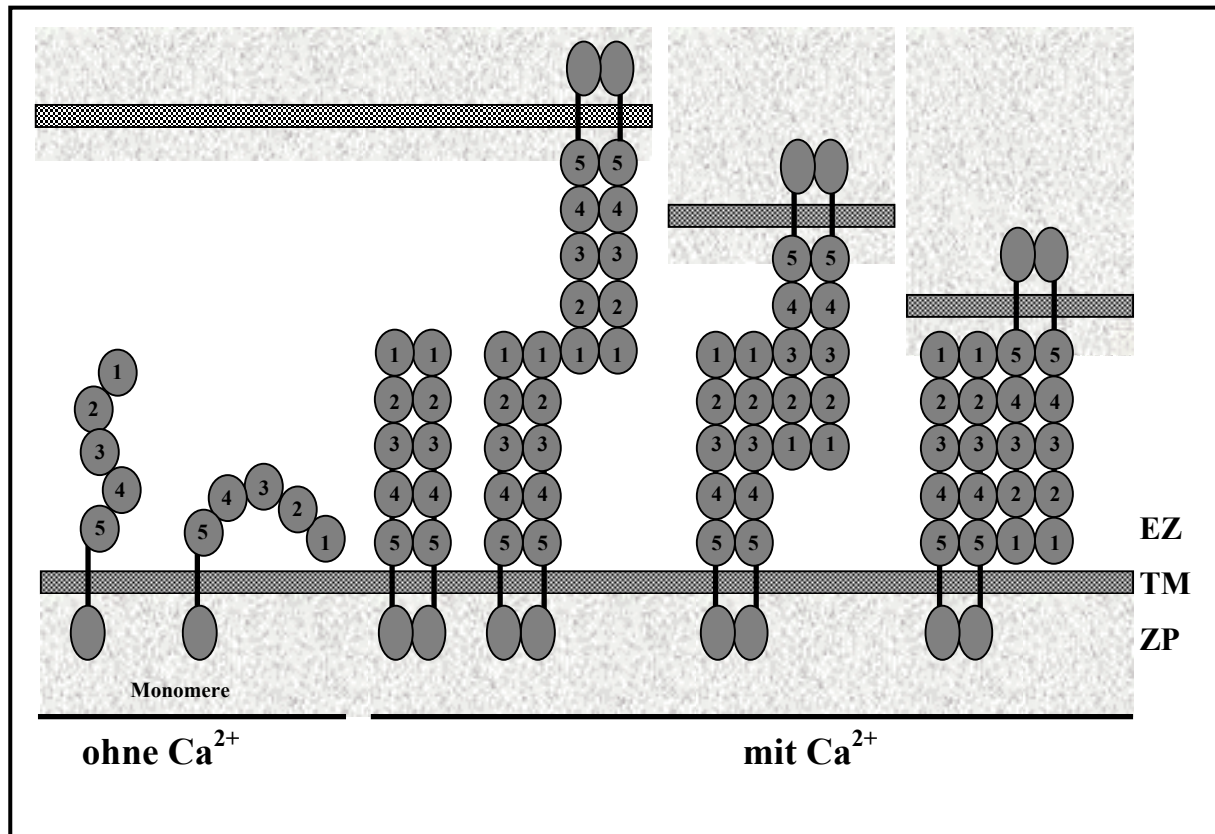
Ein Grundprinzip der Funktion der Cadherine innerhalb der Gruppe der Zell-Adhäsionsmoleküle besteht in der Eigenschaft, homotypische Adhäsion zwischen Zellen zu vermitteln. Der Mechanismus der homotypischen Cadherin-Interaktion ist nicht eindeutig aufgeklärt, allerdings werden für klassische Cadherine unterschiedliche Modelle dieser Interaktion diskutiert<sup>129-131</sup>.

Die Entdeckung, dass Zellpopulationen, die unterschiedliche klassische Cadherine exprimieren, separate Aggregate bilden können, lieferte einen ersten Hinweis für eine homotypische Interaktion zwischen Cadherinmolekülen<sup>132</sup>. Interaktionen zwischen den extrazellulären Domänen sind aufgrund der dreidimensionalen Struktur in zwei verschiedenen Konfigurationen möglich. Diese beiden Interaktionstypen wurden „strand-dimer“ und „adhesion dimer“ genannt<sup>73</sup>. Hierbei konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, dass Cadherine lateral über ihre extrazellulären Bereiche parallel dimerisieren (*Cis*-Dimere oder



„strand dimer“), und dass diese *Cis*-Dimere Voraussetzung für die Adhäsionsvermittlung sind<sup>73,133-135</sup>. Somit sind die *Cis*-Dimere als funktionelle Einheiten der Cadherine anzusehen, die eine Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion über die Bildung sogenannter *Trans*-Dimere („adhesive dimer“) durch antiparallele Interaktion mit einem *Cis*-Dimer auf der gegenüberliegenden Zelle erst ermöglichen. Unklarheit besteht aber darüber, welche Cadherin-Domänen für die laterale Interaktion und welche für die Ausbildung von *Trans*-Dimeren verantwortlich sind. Abb. 2 fasst die Bildung homotypischer Cadherin-Dimere und den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Konformation der Cadherin-Ektodomäne am Beispiel eines klassischen Cadherins schematisch zusammen. Untersuchungen des Adhäsionsverhaltens von chimären Proteinen, die aus unterschiedlich großen extrazellulären Anteilen von E- und P-Cadherin bestehen, führten zu der Annahme, dass die erste Cadherin-Domäne (EC1) für die Spezifität der Adhäsion hauptsächlich verantwortlich ist<sup>136</sup>.

Insbesondere wurde dem in klassischen Cadherinen des Typs I konservierten HAV-Motiv eine besondere Rolle zugeschrieben<sup>137</sup>, jedoch zeigen neuere Arbeiten, in denen dieses Sequenzmotiv mutiert oder deletiert wurde, dass das HAV-Motiv die homotypische Interaktion nicht beeinflusst<sup>138,139</sup>.



**Abb. 2: Modell der Cadherin-Interaktion.** Erst bei Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen weisen Cadherin-Ektodomänen eine rigide, perlschnurartige Konformation auf, die eine parallele Dimerisierung zu *Cis*-Dimeren ermöglicht. *Cis*-Dimere bilden bei weiterer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration antiparallele *Trans*-Dimere mit *Cis*-Dimeren auf einer gegenüberliegenden Zelle aus. Hierbei sind verschiedene Überlappungsgrade möglich. Die Zahlen von 1 bis 5 markieren die Cadherin-Domänen. EZ: extrazellulär, TM: transmembran und ZP: zytoplasmatisch. Verändert nach Alberts, 2004.

Die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der von Cadherinen vermittelten Zellaggregation konnte auf eine direkte Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an E-Cadherin zurückgeführt werden<sup>140</sup>, die eine Konformationsänderung des extrazellulären Anteils zur Folge hat<sup>141</sup>. Hierbei erfolgt die Ausbildung von *Cis*-Dimeren schon bei geringeren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 500 µM, während eine *Trans*-Dimerisierung erst bei Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von über 1 mM stattfindet<sup>142</sup>. Ob auch physiologisch die Adhäsionsfähigkeit von Cadherinen über die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert wird, bleibt fraglich. Es gibt allerdings Hinweise, dass dies zumindest für neuronale Zellkontakte möglich ist. Für Nervenzellen des Hippocampus wurde beschrieben, dass eine elektrische Aktivität an den Synapsen zu einer transienten Senkung der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt, welche wiederum das Lösen von Cadherin-vermittelten Kontakten zwischen prä- und postsynaptischer Membran begünstigt<sup>4</sup>.

Durch Röntgenstrukturanalysen von Cadherin-Einzeldomänen erhoffte man sich ein detaillierteres Bild der Cadherin-Interaktion. Die Strukturdaten lieferten jedoch

widersprüchliche Ergebnisse. So zeigte die Kristallstruktur der ersten Cadherin-Domäne des N-Cadherins sowohl eine parallele als auch eine antiparallele Anordnung der Einzeldomänen, so dass die EC1 als verantwortlich für die Ausbildung von *Trans*-Dimeren angesehen wurde<sup>73</sup>. Die parallele Interaktion zu einem *Cis*-Dimer wurde dem Tryptophan 2 der EC1 eines Cadherin-Monomers zugeschrieben, welches in eine hydrophobe Tasche der EC1 des benachbarten Cadherin-Monomers bindet. Das bereits beschriebene HAV-Motiv hingegen soll an der antiparallelen Bindung (*Trans*-Dimere) zweier EC1-Domänen beteiligt sein. Interessanterweise zeigen die Kristallstrukturen der ersten beiden Domänen von E- und N-Cadherin diese antiparallele Anordnung nicht<sup>74,143</sup>. Trotz zahlreicher Arbeiten bezüglich der Struktur und Funktion von Cadherinen gibt es noch kein einheitliches Modell zum Mechanismus der homotypischen Cadherin-Interaktion. Die Wichtigkeit der ersten Cadherin-Domäne ist zwar unbestritten, jedoch lassen sich die Adhäsionseigenschaften der Cadherine nicht hierauf beschränken. Diesbezüglich stellt sich die Frage nach der Bedeutung einer unterschiedlichen Anzahl von Cadherin-Domänen wie sie bei anderen Cadherin-Familien auftritt. So variiert die Anzahl der Cadherin-Domänen innerhalb der Cadherin-Superfamilie zwischen 2 und 34<sup>77</sup>.

### 1.3 Regulation der Cadherin-Interaktion

Die Adhäsionsfunktionen der Cadherine sind ein reguliert dynamischer Prozess der Zellen, die sich nicht nur an die sich ständig verändernde Umgebung anpassen, sondern auch dynamische morphogenetische Prozesse wie Zellteilung und Migration umsetzen müssen<sup>144</sup>. Hierfür müssen Kontakte zwischen Zellen schnell auf- und abgebaut werden. Als Beispiele seien hier nur die Kontrolle des parazellulären Durchtritts von Makromolekülen und Lymphozyten durch das Endothel<sup>145</sup> und die Beteiligung von Cadherinen bei der Keimblattentstehung während der Embryonalentwicklung erwähnt<sup>146</sup>.

Ein klassisches Beispiel einer Segregation von frühen Gewebsschichten ist die Trennung des Neuralrohres von dem darüberliegenden Ektoderm, wobei die Zellen des entstehenden Nervenepithels beginnen, N-Cadherin anstelle von E-Cadherin zu exprimieren<sup>115</sup>. In adulten Wirbeltieren hat die Frage nach der Regulation der Cadherine auch mit der beobachteten Repression in Tumorzellen bzw. der Inhibition des Tumorwachstums nach der Überexpression von E-Cadherin an Bedeutung gewonnen. Die Regulation der Zell-Adhäsion auf molekularer Ebene kann auf verschiedene Arten erfolgen; zum einen durch Signaltransduktionswege, welche die Expression, Lokalisation und Funktion der

Adhäsionsmoleküle beeinflussen, zum anderen durch eine Modulation des Interaktionsmechanismus selbst wie einer Änderung der Spezifität oder der Adhäsionsstärke<sup>147,148</sup>.

Zu den extrazellulären Signalen, die auf die Funktion der Cadherine einen Einfluss ausüben, gehören Wachstumsfaktoren, Peptidhormone, Gap-Junction-vermittelte Kommunikation und cholinerge Rezeptor-Agonisten. Diese Mannigfaltigkeit der extrazellulären Signale findet wahrscheinlich eine Entsprechung in einer größeren Zahl an möglichen Signalwegen in der Zelle. Das bisher am besten untersuchte Regulationsprinzip beinhaltet die Regulation über den Phosphorylierungszustand der Cadherine und assoziierter Proteine. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) zu einem verstärkten Effekt auf die durch E-Cadherin vermittelte Kompaktion von Blastozysten führte<sup>149</sup>. Bei der Vielzahl von Signaltransduktionswegen, an denen die PKC beteiligt ist, war es allerdings bisher noch nicht möglich, alle Zielproteine der PKC zu identifizieren. Unabhängig voneinander konnte eine inhibitorische Funktion von Tyrosin-Phosphorylierung auf Cadherine gezeigt werden. So zeigten Zellen, die mit Inhibitoren gegen Tyrosin-Phosphatasen wie z.B. Vanadat behandelt wurden, eine Schwächung der adhäsiven Funktion der Cadherine<sup>150</sup>. Eine unregulierte Expression der viralen Proteintyrosinkinase v-src führte in Zellkulturexperimenten zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung von Cateninen innerhalb des Cadherin-Catenin-Komplexes und einer damit einhergehenden reduzierten Adhäsion<sup>151</sup>. Es zeigte sich, dass nicht nur die Cadherine selbst, sondern auch  $\beta$ -Catenin in den Zellen vermehrt phosphoryliert wurde. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin lässt auf eine zentrale Rolle von  $\beta$ -Catenin in der auf Tyrosin-Phosphorylierung beruhenden Signaltransduktion schließen<sup>152</sup>.

Eine Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin wurde auch nach der Stimulation von Epithelzellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor „Epidermal Growth Factor“ (EGF) und „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) festgestellt. Ein weiterer wesentlicher Regulationsmechanismus der durch Cadherine vermittelten Zell-Adhäsion ist deren Anzahl auf der Zelloberfläche gesteuert durch die Expressionsrate. So haben Änderungen der Expressionsrate von Cadherinen auch Veränderungen der Zell-Adhäsionsstärke zur Folge<sup>153,154</sup>. Allerdings kann die Zelladhäsivität auch bei gleichbleibender Expressionsrate der Cadherine moduliert werden<sup>155,156</sup>. Dies ist durch das sogenannte „laterale Clustering“ möglich. Die Dimerisierung zweier benachbarter Cadherinmoleküle zu *Cis*-Dimeren, den funktionellen Einheiten der Cadherine<sup>135,157</sup>, aber auch die Konzentration von Adhäsionsmolekülen in spezialisierten Membranbereichen<sup>158,159</sup>, verstärkt die Adhäsivität

zwischen Zellen. Ein alternativer Mechanismus zur schnellen Veränderung der Cadherinfunktion ist entweder durch die Modulierung der Affinitätseigenschaften von Cadherinmolekülen oder durch eine Ko-Expression von Cadherinen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften gegeben. Dieser Mechanismus war bis vor wenigen Jahren experimentell nur schwer zugänglich. Erst mit Anwendung neuerer biophysikalischer Methoden wie der Rasterkraftmikroskopie („Atomic Force Microscopy“, AFM), der Verwendung optischer Pinzetten („laser tweezer“) oder der Plasmon-Resonanz („Surface Plasmon Resonance“, SPR) können Bindungsstärken, Lebensdauer und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von Cadherin-Interaktionen genauer untersucht werden<sup>160-162</sup>.

#### **1.4 Die proteolytische Ektodomänen-Spaltung: „Shedding“**

Zahlreiche der hier vorgestellten Transmembranproteine existieren nicht nur membrangebunden, sondern zusätzlich als lösliche, funktionell aktive Proteine, die durch regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne dieser Moleküle entstehen. Die Abspaltung extrazellulärer Bereiche (Ektodomänen) membranständiger Proteine wird häufig durch einen als limitierte Proteolyse oder „Shedding“ bezeichneten Spaltungsprozess vermittelt, der durch verschiedene Gruppen von Proteasen durchgeführt werden kann, die zusammengefasst als Sheddasen oder Sekretasen bezeichnet werden. Diese Form der posttranslationalen Regulation von Proteinen in einen extrazellulären und einen intrazellulären Anteil stellt einen entscheidenden Mechanismus der Regulation der Aktivität und der Funktion zahlreicher Vertreter der Zytokine ( $\text{TNF-}\alpha$ <sup>163</sup>), der Adhäsionsmoleküle (L-Selektin<sup>164,165</sup>) sowie von Wachstumsfaktoren ( $\text{TGF-}\alpha$ <sup>164</sup>) und Rezeptoren ( $\text{TNF-Rezeptor}$ <sup>164</sup>,  $\text{IL6-Rezeptor}$ <sup>166,167</sup>) dar.

Die physiologischen Konsequenzen des „Sheddings“ sind vielfältig: Werden durch diesen Vorgang beispielsweise Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt, können Zellen an Responsivität verlieren. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die so entstandenen löslichen Rezeptorformen systemisch verbreitet werden und agonistisch oder antagonistisch wirken<sup>168</sup>. Ein gut verstandenes Beispiel ist das „Shedding“ des IL-6-Rezeptors. Die lösliche Form des IL-6 Rezeptors (sIL-6R) spielt eine zentrale Rolle in der IL-6-vermittelten Signaltransduktion, da er nach Bindung von IL-6 solche Zellen aktivieren kann, die nur die signaltransduzierende gp130-Untereinheit, nicht aber die ligandenbindende  $\alpha$ -Kette des IL-6R exprimieren<sup>169</sup>. Dieser als „Trans-Signaling“ bezeichnete Vorgang ist ebenfalls für Interleukin-11 (IL-11) und den „Ciliary Neurotrophic Factor“ (CNTF) gezeigt worden<sup>168</sup>.

Eine weitere Funktion löslicher Rezeptoren kann in der Stabilisierung ihrer Liganden und damit der Verlängerung ihrer Halbwertszeit im Plasma bestehen<sup>170-173</sup>. Eine wichtige Rolle spielt das „Shedding“ des L-Selektins während der Immunantwort beim Einwandern von Leukozyten in entzündliches Gewebe und bei der Rezirkulation von Lymphozyten in periphere Lymphgewebe, indem es zu einer vorübergehenden Aufhebung des Zellkontakts zum Endothel führt und somit die charakteristische rollende Bewegung der Leukozyten erlaubt<sup>174,175</sup>.

Eine besondere Bedeutung kommt der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) von der Zelloberfläche zu. Dabei entstehen mehrere extrazelluläre Fragmente wie das 42 Aminosäuren umfassende Amyloid-beta (AP- $\beta$ ) Peptid, welches an der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beteiligt ist<sup>176</sup>. Eine APP-ähnliche Prozessierung wird auch für Notch, einem evolutionär konservierten Protein, welches die Entwicklung und Neurogenese zahlreicher Spezies bestimmt, beschrieben. Diese Prozessierung stellt wiederum den Auslöser zur proteolytischen Spaltung des intrazellulären Teils von Notch durch einen Presenilin-Komplex dar<sup>177</sup>. Darauf folgt die Translokation in den Zellkern und mittels des evolutionär konservierten Transkriptionsfaktors „suppressor of hairless“ (Su(H), RBPjk in der Maus) zur Aktivierung von Helix-Loop-Helix-Protein-kodierenden Genen (z.B. *hes-5*).

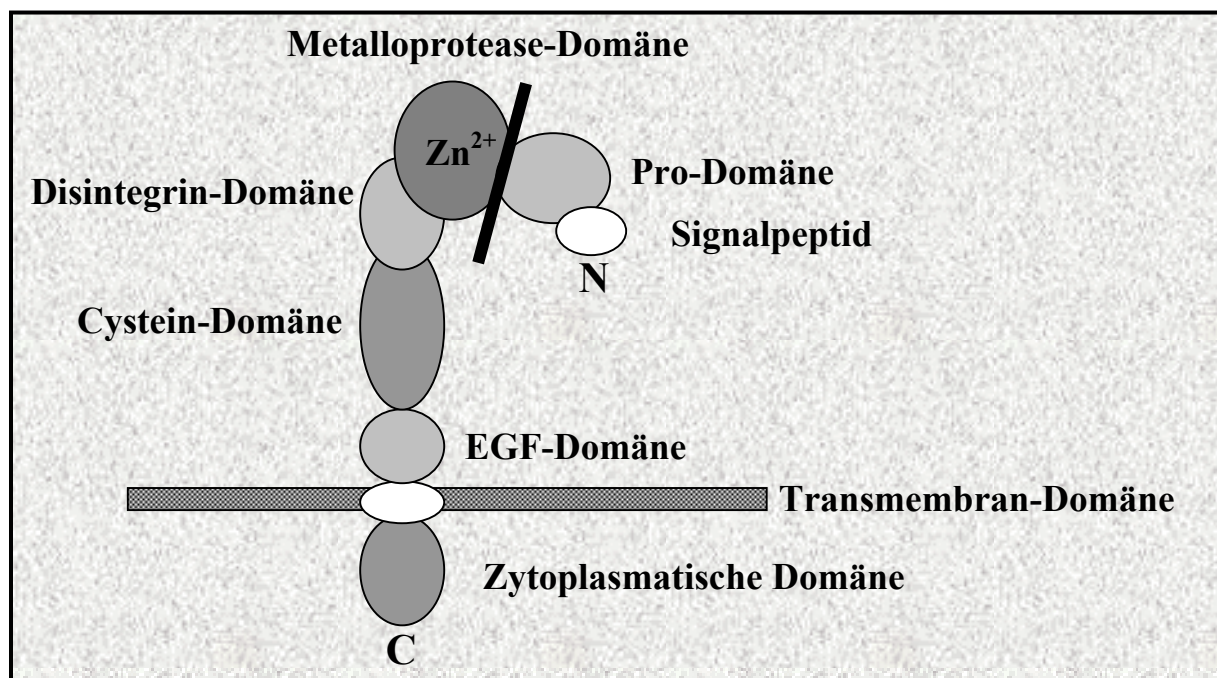
Auch für die Zell-Adhäsionsmoleküle E-Cadherin, N-Cadherin und L1 wurde das Vorkommen löslicher Ektodomänen gezeigt<sup>178-180</sup>. Die größte Gruppe von Proteasen, die „Shedding“ vermitteln, sind die nachfolgend vorgestellten Typ I transmembranen Proteine aus der Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen.

## 1.5 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (ADAMs) zählen zu einer weit verbreiteten Familie von Zink-(Zn<sup>2+</sup>)-abhängigen Metalloproteasen, die in einem weiten Spektrum von Organismen, vom Fadenwurm über die Fruchtfliege bis zum Menschen, gefunden worden sind<sup>181,182</sup>. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sowohl eine Disintegrindomäne, als auch eine Metalloproteasedomäne enthalten. Die Bezeichnung „Disintegrin“ stammt von den ursprünglich aus Schlangengift isolierten gleichnamigen Proteinen und bezieht sich auf deren Eigenschaft, die durch Integrine vermittelte Bindung von Blutplättchen an Fibrin zu inhibieren<sup>181,183</sup>. Zusammen mit den Matrixmetalloproteasen (MMPs) und den Schlangengift-

Metalloproteasen (SVMPs) bilden die ADAMs die Superfamilie der Metzinkine<sup>184,185</sup>. Sie sind sowohl in wesentliche physiologische Prozesse wie Fertilisation, Myoblastenfusion und Neurogenese involviert, als auch maßgeblich an pathologische Prozessen wie z.B. der alzheimerischen Erkrankung und der Tumorgenese beteiligt<sup>181,186,187</sup>.

Es handelt sich bei diesen Proteasen um membranständige Typ I Glykoproteine, die folgendermaßen aufgebaut sind (Abb. 3): Einer N-terminalen Pro-Domäne schließt sich eine katalytische Domäne an, gefolgt von einer Disintegrin-ähnlichen und einer Cystein-reichen Domäne, einer transmembranen und schließlich einer zytoplasmatischen Domäne<sup>181,188</sup>. Bei manchen, aber nicht allen ADAMs, folgt auf die Cystein-reiche Domäne noch eine dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Domäne<sup>181</sup>.



**Abb. 3 Schematischer Aufbau der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen.** Auf eine Pro-Domäne folgt eine katalytische Domäne mit gebundenem Zn<sup>2+</sup>. Es schließen sich eine Disintegrin-ähnliche sowie eine Cystein-reiche Domäne an, gefolgt von einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne. Die dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche EGF-Domäne ist nur bei manchen, aber nicht allen ADAMs vorhanden. Um in einen katalytisch aktiven Zustand überführt zu werden, muss die Prodomäne, welche über einen Cysteinrest das Zn<sup>2+</sup> gebunden hält, abgespalten werden.

Inzwischen konnten bereits über 30 Mitglieder dieser ADAMs identifiziert werden, von denen nach aktuellem Wissensstand nur 17 eine funktionelle katalytischen Domäne mit Zinkbindungsmotiv (im Einzelbuchstaben-Code mit X als beliebiger Aminosäure: HEXHXXGXXH) aufweisen und damit wahrscheinlich eine proteolytische Funktion ausüben.<sup>93-95</sup> Zu diesen proteolytisch aktiven Metalloproteasen, deren essentielle

physiologische und pathophysiologische Bedeutung sich immer mehr herausstellt, zählen neben ADAM8, 9, 12, 15, 17, 19 und 28 die Proteasen ADAM10 (MADAM/Maus, SUP-17/*C. elegans*, KUZ/kuzbanian *Drosophila*) und ADAM17 („TNF $\alpha$ -Converting Enzyme“, TACE), die hier nachfolgend näher vorgestellt werden sollen<sup>181,189,190</sup>.

Die Metalloprotease ADAM10 wurde 1989 aus Rinderhirn als MBP-degradierendes (MBP, „myelin basic protein“) Enzym isoliert<sup>191</sup> und nach seiner Klonierung als ADAM klassifiziert<sup>192</sup>. Exprimiert wird ADAM10 in verschiedenen Geweben, darunter Lunge, Herz, Niere und besonders hoch aber im Gehirn<sup>5</sup>. Auf zellulärer Ebene konnte ADAM10 in der Plasmamembran und im Golgi-Apparat detektiert werden<sup>193</sup>. ADAM10 liegt zunächst als immature Form mit einem Molekulargewicht von etwa 98 kDa vor. Die Regulation der proteolytischen Aktivität erfolgt möglicherweise durch ein „Cystein-switch-Motiv“ innerhalb der Prodomäne, bestehend aus einem konservierten Cystein-Rest, über dessen freie Thiolgruppe das im katalytischen Zentrum komplexierte Zink-(II)-Ion zusätzlich koordiniert wird<sup>181</sup>. Erst nach Abspaltung des aminoterminalen Propeptids durch die Proprotein-Convertase 7 oder Furin an einer Furinproteasespaltungsstelle wird die 62-64 kDa große katalytisch aktive Form von ADAM10 generiert<sup>194</sup>.

Durch *in vitro*-Studien und Überexpression von ADAM10 gelang es, TNF- $\alpha$ -Konvertase-Aktivität<sup>195</sup> sowie  $\alpha$ -Sekretaseaktivität bei der Spaltung des „Amyloid Precursor Proteins“ (APPs<sup>196-198</sup>) nachzuweisen. Zur Klärung der möglichen Beteiligung von ADAM10 an der APP-Proteolyse und zur Analyse weiterer bislang unbekannter *in vivo*-Funktionen von ADAM10 wurde ein ADAM10-defizienter Mausstamm durch gezielte Genausschaltung des ADAM10-Genes mittels homologer Rekombination hergestellt. Die ADAM10-defizienten Mäuse zeigen eine pränatale Letalität am Embryonaltag 9,5 und weisen Entwicklungsstörungen auf, die auf eine Beeinträchtigung des Notch-Signalweges hinweisen. Grundlegende Merkmale des ADAM10-defizienten Embryos sind hierbei unter anderem: ein verkürztes Vorderhirn, eine abnormale Biegung des Rautenhirns, eine reduzierte Entwicklung des ersten Branchialbogens, ein unnatürlich vergrößerter Herzbeutel bei gleichzeitig verzögerter Entwicklung des Herzens und eine gestörte Bildung des Neuralrohrs und der Somiten. Aufgrund dieser frühen Letalität der ADAM10-defizienten Mäuse wurden zahlreiche Untersuchungen an aus diesen Tieren gewonnenen Fibroblasten (MEFs, murine embryonale Fibroblasten) durchgeführt<sup>199</sup>.

Die Untersuchungen zur Bedeutung von ADAM10 als  $\alpha$ -Sekretase an verschiedenen Fibroblasten-Zelllinien der ADAM10-defizienten Mäuse weisen sowohl für die konstitutive



als auch für die induzierbare APP-Spaltung eine starke Varianz auf. Diese Daten schließen nicht völlig aus, dass ADAM10 an der Proteolyse von APP beteiligt sein kann. Es erscheint aber wahrscheinlich, dass verschiedene Proteasen sich funktionell ersetzen und als APP- $\alpha$ -Sekretase wirken können. Obwohl es nicht möglich war, mit ADAM10-defizienten Fibroblasten deren physiologische Relevanz als  $\alpha$ -Sekretase von APP eindeutig zu belegen, konnte jedoch mit diesen Zellen die Bedeutung von ADAM10 bei der Spaltung des zellulären Prion-Proteins (PrP<sup>200</sup>), des Interleukin-6-Rezeptors (IL6-R<sup>201</sup>), des Chemokins Fraktalkin<sup>202</sup> und des Notch-1-Rezeptors<sup>199</sup> demonstriert werden.

Als erste Metalloprotease der ADAM-Familie, die bei „Sheddingprozessen“ eine Rolle spielt, wurde ADAM17 entdeckt<sup>203</sup>. ADAM17 ist maßgeblich an der Prozessierung von TNF- $\alpha$  und TNF-Rezeptoren von der Zelloberfläche beteiligt und wird daher auch als „TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme“ bezeichnet. Dies wurde übereinstimmend sowohl in zellulären TNF- $\alpha$ -Spaltungsversuchen mit nativer ADAM17 als auch durch gezieltes Ausschalten des ADAM17-Gens gezeigt<sup>163,164</sup>. Daneben spaltet ADAM17 noch viele weitere Transmembranproteine wie die „Transforming Growth Factor- $\alpha$ “ (TGF- $\alpha$ )-Proform<sup>204</sup>, den TNF- $\alpha$ -2-Rezeptor<sup>205</sup>, den IL6-Rezeptor<sup>206</sup>, den Notch-1-Rezeptor<sup>207</sup>, das APP<sup>208</sup>, den HER4/erbB4-Rezeptor<sup>209</sup>, das L-Selektin<sup>164</sup> und das PrP<sup>200</sup>. Damit sind mit TNF- $\alpha$ , PrP, IL6-Rezeptor, Notch-1-Rezeptor, Fraktalkin und vielleicht auch APP eine Reihe von Substraten bekannt, die sowohl durch ADAM10 als auch durch ADAM17 gespalten werden können.

Obwohl die Spaltungssequenzen transmembraner Moleküle nicht konserviert sind, gibt es inzwischen Hinweise, dass die Abspaltung ihrer Ektodomäne auf gemeinsamen Wirkmechanismen beruhen. Signalmoleküle wie die Proteinkinase C, Kalzium/Calmodulin-Kinasen und Rezeptortyrosinkinasen scheinen an der Aktivierung dieser Proteasen beteiligt zu sein<sup>210</sup>. Hierbei ist der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) ein Aktivator der PKC, ein häufig verwendeter „Shedding-Induktor“. Moleküle wie der IL6-Rezeptor<sup>201,204,211</sup>, TGF- $\alpha$ <sup>190,204</sup>, L-Selektin<sup>164,204</sup>, APP<sup>204,208</sup> oder auch das transmembrane Chemokin CX3CL1 werden nach PMA-Stimulation verstärkt von der Zelloberfläche abgespalten. Man unterscheidet daher zwischen zwei Formen des „Sheddings“, einerseits dem basalen oder konstitutiven „Shedding“ und andererseits der induzierten Proteolyse.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die transmembranen Adhäsionsmoleküle E- und N-Cadherin nicht nur membrangebunden existieren, sondern auch durch proteolytische

Abspaltung in eine lösliche, funktionell aktive Form überführt werden können, die sowohl an der Regulierung der Zell-Adhäsion als auch an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt sind<sup>120,212-214</sup>. Die Abspaltung der extrazellulären Domäne des N-Cadherins konnte mit verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren, darunter auch den „Tissue Inhibitors of Metalloproteases“ (TIMPs), reduziert werden. TIMPs sind eine Familie natürlich vorkommender Proteine, die die proteolytische Aktivität der Metalloproteasen regulieren und so zur Bewahrung der Balance zwischen Matrixdestruktion und -formation beitragen. Bis heute sind vier strukturell sehr homologe TIMPs bekannt<sup>215</sup>. Sie besitzen zwölf konservierte Cysteinreste, die sechs Disulfidbindungen ausbilden. Dabei entsteht eine ausgeprägte Domänenstruktur mit sechs Schleifen. Für die spezifische Bindung der TIMPs an die MMPs werden die drei N-terminalen Schleifen verantwortlich gemacht. Die Hemmung erfolgt durch die Bindung der TIMPs an das katalytische Zinkion. TIMP-1, -2, und -4 werden in löslicher Form sezerniert, wohingegen TIMP-3 an die extrazelluläre Matrix assoziiert vorliegt<sup>216</sup>. TIMP-1 und TIMP-2 zeigen inhibitorische Wirkung gegenüber allen MMPs. Auch die Aktivitäten der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen werden durch TIMPs reguliert. So inhibiert TIMP-1 z.B. die Metalloprotease ADAM10, nicht aber ADAM17, während TIMP-3 eine regulatorische Wirkung auf eine Vielzahl der ADAMs wie z.B. ADAM12, ADAM13, ADAM17, ADAM19, ADAM28 und ADAM33 hat<sup>171,204,217-221</sup>. Auf die Metalloproteasen ADAM8 und ADAM9 hingegen konnten keine inhibitorischen Effekte durch TIMPs gezeigt werden<sup>222</sup>. Darüber hinaus fördern TIMPs die Adhäsion von Fibroblasten. Hierbei wurde beobachtet, dass diese TIMP-vermittelte Stabilisierung der fokalen Adhäsion mit einer erhöhten Expression von N-Cadherin auf der Zelloberfläche korrelierte<sup>223</sup>.

Weiterhin konnte für das N-Cadherin gezeigt werden, dass das in der Zellmembran verbleibende Fragment einer weiteren proteolytischen Prozessierung innerhalb der Membran unterliegt, die zur intrazellulären Freisetzung eines weiteren Spaltproduktes führt. Dieses kann auf noch ungeklärte Weise zu einer Degradierung des transkriptionalen Koaktivators „CREB-Binding Protein“ (CBP) führen<sup>224</sup>. Der Prozess der zunächst extrazellulären und anschließend intramembranen Spaltung wird als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) oder „RIPping“ bezeichnet<sup>224</sup>. Diese Beobachtungen, besonders mit der Tatsache kombiniert, dass auch andere RIP-Substrate durch ähnliche Proteasen gespalten werden, führte zu der Annahme, dass ein Mitglied der ADAM-Familie an der Spaltung von E- und N-Cadherin beteiligt sein könnte.

Ein weiteres, in dieser Arbeit untersuchtes transmembranes Molekül, ist das neuronale Adhäsionsmolekül L1. L1 spielt nicht nur für die Migration neuronaler Zellen, sondern auch für Tumormetastasierung eine wichtige Rolle. Neben einer membrangebundenen 220 kDa-Form konnten weitere lösliche L1-Formen detektiert werden, die durch die regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne des Moleküls entstehen<sup>225,226</sup>. Lösliche Formen des L1-Moleküls konnten in den Überständen von Gehirnhomogenaten der Maus<sup>37,227,228</sup>, der Ratte<sup>229</sup> und des humanen Kleinhirns<sup>230</sup> nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden lösliche L1-Fragmente in Zellkulturüberständen von humanen und murinen Tumorzelllinien detektiert<sup>179,226,231</sup>. Eine Dysregulation der Spaltung des Zell-Adhäsionsmoleküls scheint in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen involviert zu sein. So wurden nicht nur im Serum von an Ovar- oder Uteruskarzinomen, an Nierentumoren<sup>232</sup> und an Neuroblastomen<sup>233</sup> erkrankten Patienten, sondern auch in der Zerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten erhöhte Mengen löslicher L1-Fragmente gefunden<sup>234</sup>.

In bisherigen Studien konnte eine Beteiligung von Metalloproteasen an der Prozessierung von L1 gezeigt werden. In diesen Arbeiten wurden stabil mit L1 transfizierte CHO-Zellen (CHO, chinesische Hamster-Ovarien) mit den Breitspektrum-Metalloprotease-Inhibitoren BB-3103 und GM6001 behandelt. Beide Inhibitoren reduzierten sowohl unter konstitutiven, als auch unter PMA-induzierten Bedingungen konzentrationsabhängig die Produktion von löslichem L1. Transfektionsexperimente mit dominant negativem ADAM10 ergaben ein im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen verringertes konstitutives „L1-Shedding“. Diese Ergebnisse und der zusätzliche Befund, dass durch Überexpression von ADAM10 in Androgen-Rezeptor Brust-Tumor-Zelllinien ein erhöhtes „L1-Shedding“ beobachtet werden konnte, wiesen auf ADAM10 als die für das konstitutive „L1-Shedding“ verantwortliche Protease hin, ohne allerdings die Frage nach dem genauen Mechanismus des induzierbaren „Sheddings“ zu beantworten.

## 2 Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die proteolytische Regulation verschiedener transmembraner Proteine durch die Metalloprotease ADAM10 und weiterer Metalloproteasen untersucht werden. Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war hierbei ein in Vorarbeiten generiertes ADAM10-defizientes Mausmodell und die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur Rolle von ADAM10 bei der APP- und Notch-Prozessierung. Mit Hilfe ADAM10-defizienter Embryonen und daraus abgeleiteter Zelllinien sollten weitere Aufschlüsse über die *in vivo*-Funktionen dieser wichtigen Metalloprotease erhalten werden.

Zudem sollten weitere putative Substrate der Metalloprotease ADAM10 identifiziert und deren Regulation durch verschiedene Stimulations- und Inhibitionsexperimente analysiert werden. Durch spezifische Hemmung weiterer Metalloproteasen sollte die beobachtete Redundanz zwischen verschiedenen ADAM-Metalloproteasen untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, welche Faktoren für die Regulation der Protease-Aktivität von Bedeutung sind.

Da zahlreiche potentielle ADAM10-Substrate nicht endogen in den zur Verfügung stehenden murinen embryonalen Fibroblasten vorkommen, sollte die Prozessierung dieser Proteine auch in epithelialen bzw. neuronalen Zellen untersucht werden. Um den Einfluss von ADAM10 und anderen ADAMs zu analysieren, sollten die Proteasen in diesen Zellen mittels Vektor-basierter siRNA herunterreguliert werden. Während die Bedeutung der extrazellulär freigesetzten Spaltprodukte durch funktionelle Untersuchungen erfolgte, sollten die potentiell zusätzlich intrazellulär auftretenden Fragmente auf einen möglichen Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege untersucht werden.

### 3 Ergebnisse

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit sind in drei Veröffentlichungen erschienen:

#### Veröffentlichung 1

Reiss K, Marezky T\*, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P.  
ADAM10 cleavage of N-Cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. EMBO J. 2005 Feb 23;24(4):742-52. (\*gleichberechtigter Erstautor)

#### Veröffentlichung 2

Marezky T, Reiss K\*, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P.  
ADAM10 mediates E-Cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 28;102(26):9182-7. (\*gleichberechtigte Erstautorin)

#### Veröffentlichung 3

Marezky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K.  
L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin/ $\gamma$ -Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion, Cell Migration, and Neurite Outgrowth. Mol Cell Biol. 2005 Oct;25(20):9040-53.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Publikationen ausführlich dargestellt. Methoden, die eine detaillierte Beschreibung erfordern, werden in Fußnoten aufgeführt.

#### 3.1 Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM10 vermittelt die Spaltung von N-Cadherin und reguliert Zell-Zell-Adhäsion und „ $\beta$ -Catenin Signaling“ (Veröffentlichung 1)

Das transmembrane Adhäsionsmolekül N-Cadherin existiert nicht nur membrangebunden, sondern zusätzlich als lösliches, funktionell aktives Protein, wobei Letzteres aus dem ersten durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne hervorgeht, ein Vorgang, der als „Shedding“ bezeichnet wird (siehe auch Einleitung, 1.4). Während die lösliche Variante sowohl an der Signaltransduktion der Zelle als auch am Wachstum von Neuriten bei der Embryogenese beteiligt ist, vermittelt die in der Membran gebundene Form die Adhärenz dieser Zellen.

Während frühere Studien zeigten, dass die proteolytische Spaltung von N-Cadherin durch eine Metalloprotease-Aktivität vermittelt wird, blieb die für dieses „Shedding“

verantwortliche Protease jedoch unbekannt. Jene zu identifizieren und außerdem mehr über die biologische Funktion der membrangebundenen und löslichen Form dieses Adhäsionsmoleküls zu erfahren, war Ziel der nachfolgenden Experimente.

### 3.1.1 Konstitutives und induzierbares „Shedding“ von N-Cadherin durch die Metalloprotease ADAM10

Ein Ziel dieser Arbeit war der Nachweis des membranassoziierten Voll-Längenproteins (VL) und seiner intrazellulären C-terminalen Fragmente (CTF) sowie der löslichen N-terminalen Form von N-Cadherin (NTF) im Western-Blot. Hierzu wurden verschiedene Antikörper (AK) gegen murines und humanes N-Cadherin in murinen embryonalen Fibroblasten und verschiedenen neuronalen Zelllinien getestet, wobei ein von der „Developmental Studies Hybridoma Bank“ (DSHB) hergestelltes Antiserum die größte Sensitivität gegen die extrazelluläre Domäne von N-Cadherin zeigte. Da dieses Antiserum gegen die extrazelluläre Domäne von N-Cadherin gerichtet war, gelang mit diesem die Detektion der löslichen Form in den Zellüberständen. Die Detektion der membrangebundenen Form und der C-terminalen Fragmente von N-Cadherin in den Zelllysaten gelang mit einem monoklonalen Antikörper der Firma BD Bioscience. In den Lysaten fanden sich Banden bei ca. 135 kDa (VL) und 40 kDa (CTF) und in den Überständen eine Bande bei ca. 80 kDa (NTF).

In den folgenden Experimenten sollte der Mechanismus, der zur Entstehung von löslichem N-Cadherin führt, in verschiedenen ADAM-defizienten und neuronalen Zelllinien untersucht werden.

Dazu dienten von uns als *Sheddingassays*<sup>A</sup> bezeichnete Versuche. Das Prinzip der *Sheddingassays* bestand darin, dass murine embryonale Fibroblasten oder neuronale Zelllinien, für einen definierten Zeitraum in An- oder Abwesenheit von verschiedenen

---

<sup>A</sup> Durchführung der *Sheddingassays*: Murine embryonale Fibroblasten oder neuronale Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu ca. 90% Konfluenz angezogen. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 37°C-warmem sterilem Phosphate Buffered Saline (PBS) wurden 600 µl serum-freies Medium pro Vertiefung hinzugefügt. Die Verwendung von Serum-freiem Medium war notwendig, weil Vorversuche ergeben hatten, dass das im Serum enthaltene Albumin die Detektion von N-Cadherin im Western-Blot erschwerte. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiten stimuliert oder unstimuliert belassen. Bei Einsatz des Metalloprotease-Inhibitors GI254023X wurden die Zellen über Nacht mit dem Inhibitor vorinkubiert, um eine möglichst effektive Blockade der Metalloprotease-Aktivität zu erreichen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellüberstände abgenommen, zentrifugiert (Entfernung von Zelldebris) und mit einem Protease-Inhibitor-Mix versetzt. Für eine Detektion des löslichen N-Cadherins im Western-Blot mussten die Überstände ca. 10fach konzentriert werden, was mit Hilfe von Konzentratoren erreicht wurde. Die Zelllysate wurden durch Abkratzen der Zellen auf Eis in 60 µl Lysispuffer (PBS, 1% Triton-X-100, Protease-Inhibitor-Mix) pro Probe hergestellt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis unter Schütteln wurden die Lysate abzentrifugiert und wie die Überstände bei -20°C bis zur Analyse in der Gelelektrophorese gelagert.

Stimulantien inkubiert wurden, und im Anschluss daran die Zellpellets auf ihren Gehalt an C-terminalen Fragmenten im Western-Blot analysiert wurden. Der Einfluss des Metalloprotease-Inhibitors GI254023X<sup>B</sup> auf unstimulierte oder stimulierte Zellen sollte erste Informationen über die Beteiligung von Metalloproteasen an der Entstehung von löslichem N-Cadherin liefern.

Zur Identifizierung der N-Cadherin spaltenden Metalloprotease wurden verschiedene ADAM-defiziente und BACE-defiziente Fibroblasten auf den Gehalt von C-terminalen Fragmenten untersucht. Nur in den ADAM10-defizienten Fibroblasten war eine deutliche Reduktion des C-terminalen Fragmentes zu beobachten (Abb. 1B, Veröffentl. 1). Zudem konnten diese Befunde auch in neuronalen Zelllinien bestätigt werden, in denen mittels RNA-Interferenz ADAM10 herunterreguliert wurde. Um RNA-Interferenz gegen das humane ADAM10 mit Hilfe eines Plasmides, welches über einen längeren Zeitraum siRNA transkribiert, zu vermitteln, wurden entsprechende Sequenzen in den Vektor pSuper kloniert. Western-Blot-Analysen zeigen eine Reduktion des ADAM10-Proteinspiegels bei gleichzeitig verminderter N-Cadherin-Prozessierung (Abb. 3A bis 3C, Veröffentl. 1). Die Größe der detektierten Fragmente entsprach derjenigen, die für das N-Cadherin in embryonalen retinalen Geweben bestimmt worden war<sup>120</sup>. Da viele Membranproteine durch Metalloproteasen sowohl konstitutiv als auch infolge derer Aktivierung proteolytisch geschnitten werden, wurde der Einfluss von verschiedenen Stimuli auf das „N-Cadherin-Shedding“ untersucht. Im Western-Blot zeigte sich für die verwendeten Stimuli eine gegenüber den unbehandelten Proben deutliche Zunahme des C-terminalen Fragmentes in den Zelllysaten der stimulierten Zellen (Abb. 2A, Veröffentl. 1). Diese auf den Stimulationseffekt zurückzuführende Zunahme wurde als induziertes „Shedding“ definiert, im Gegensatz zu der konstitutiven Proteolyse der unstimulierten Zellen. Sowohl das konstitutive als auch das induzierte „N-Cadherin-Shedding“ war deutlich in den ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten

---

<sup>B</sup> Um die Identität der am „Shedding“ beteiligten Proteasen näher einzugrenzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Metalloprotease-Inhibitoren (GI254023X und GW280264X) eingesetzt, die die Aktivität von ADAM10 bzw. ADAM17 blockieren<sup>235</sup>. Diese bei GlaxoSmithKline (GSK) in Stevenage, UK, entwickelten und uns im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellten Inhibitoren wirken durch eine Hydroxamat-Gruppe, die das Zink-Ion der katalytischen Domäne der Metalloproteasen bindet und so deren Aktivität hemmt. Als ein Maß für die Wirksamkeit von Inhibitoren enzymatischer Reaktionen gelten die sogenannten IC<sub>50</sub>-Werte. IC<sub>50</sub> steht für „Inhibitor Concentration 50%“ und bezeichnet diejenige Inhibitorkonzentration, die zu halbmaximaler Inhibition des jeweiligen Enzyms führt. Im Falle von GI254023X und GW280264X wurde die Inhibition der Spaltung von speziellen Peptiden durch die Ektodomänen von rekombinantem humanem ADAM17 oder ADAM10 gemessen<sup>236</sup>. Die IC<sub>50</sub>-Werte von GI254023X und GW280264X verdeutlichen, dass GW280264X ADAM10 und ADAM17 vergleichbar gut inhibiert, GI254023X dagegen nur ADAM10 bzw. ADAM17 mit 100fach reduzierter Wirksamkeit.

reduziert. Das durch Ionomycin induzierte „Shedding“ konnte ebenfalls durch den ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X inhibiert werden (Abb. 1B, Veröffentl. 1).

Die Untersuchungen von verschiedenen ADAM-defizienten Fibroblasten, Inhibitorstudien, RNA-Interferenz-Experimente, ADAM10-Überexpression und Stimulationsversuche zeigen insgesamt, dass ADAM10 nicht nur unter konstitutiven Bedingungen für die Prozessierung verantwortlich ist, sondern die N-Cadherin-Spaltung durch verschiedene Stimuli induziert werden kann. Insbesondere war es möglich, diese Befunde in neuronalen Zellen zu bestätigen.

### **3.1.2 Die N-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist erhöht in ADAM10-defizienten Fibroblasten**

Die extrazelluläre Domäne der membranständigen Form von N-Cadherin vermittelt die Adhäsion von Zellen. Ungeklärt war bisher die Frage, ob „Shedding“ von N-Cadherin zu einer signifikanten Verminderung der Aggregations- und Adhäsionseigenschaften N-Cadherin-exprimierender Zellen führt. Untersuchungen des Aggregationsverhaltens ADAM10-defizienter Fibroblasten zeigten, dass die Zell-Zell-Adhäsion zwischen ADAM10-defizienten Fibroblasten wesentlich ausgeprägter war, als die zwischen Wildtyp-Fibroblasten. Mehr als doppelt so viele Aggregate ließen sich nach mechanischer Vereinzelung konfluenter Zell-Monolayer im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle messen. Da N-Cadherin an der Aggregation von Zellen maßgeblich beteiligt ist, sollte die Zelloberflächenexpression in den ADAM10-defizienten Zellen im Vergleich zu den der Wildtyp-Kontrolle untersucht werden. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie war es möglich, die Expression des membranständigen N-Cadherins auf der Zelloberfläche von den verschiedenen Fibroblasten quantitativ zu erfassen und Unterschiede zu verfolgen. Bestätigte sich die Hypothese des ADAM10-vermittelten „N-Cadherin-Sheddings“, sollte die verminderte Freisetzung von löslichen N-Cadherin-Fragmenten mit einer Zunahme der membranassoziierten Form auf der Zelloberfläche der ADAM10-defizienten Fibroblasten korrelieren und damit zu einem zunehmenden Signal im Durchflußzytometer führen<sup>C</sup>. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie bestätigten diese Hypothese einer erhöhten Zelloberflächenexpression von N-Cadherin.

---

<sup>C</sup> Präparation der Zellen für die Durchflußzytometrie: Nach Beendigung des „Sheddingassays“ wurden die Zellen abgenommen, mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend vorsichtig auf Eis in PBS abgekratzt. Nach Inkubation der Fibroblasten mit einem N-terminalen N-Cadherin-Antikörper gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des Moleküls bzw. einer Isotyp-Kontrolle wurden die Zellen mit einem Fluoreszeinthiocyanat (FITC)-gekoppelten Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Resuspendierung in PBS wurde das Fluoreszenzsignal der markierten Zellen im Durchflußzytometer gemessen.



Darüber hinaus sollten *Adhäsionsassays*<sup>D</sup> Aufschluss über einen möglichen Einfluss von ADAM10-vermitteltem „N-Cadherin-Shedding“ auf das Adhäsionsverhalten von Fibroblasten geben. In diesen Versuchen wurden ADAM10-defiziente bzw. Wildtyp-Fibroblastenzelllinien mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert und zu entsprechenden Fibroblasten gegeben, die entweder unbehandelt oder mit EGTA bzw. mit inhibierendem N-Cadherin-Antikörper GC4 behandelt waren. Nach Entfernen der ungebundenen Zellen durch Waschen mit PBS wurde die Anzahl der auf den Fibroblasten verbliebenen Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes bestimmt.

Zunächst war festzustellen, dass in Abwesenheit von EGTA oder GC4 die Anzahl der an die Fibroblasten bindenden Zellen um ein Vielfaches höher war als die, die an mit EGTA oder GC4 vorbehandelten Zellen adhärten (Abb. 4C, Veröffentl. 1). Dies verdeutlichte, dass die Adhärenz maßgeblich durch N-Cadherin bzw. Kalzium-abhängige Oberflächenmoleküle vermittelt wurde. Auffallend war jedoch, dass die ADAM10-defizienten Zellen in den Experimenten eine wesentlich ausgeprägtere Zell-Zell-Adhäsion aufwiesen, als die entsprechenden Wildtyp-Fibroblasten. So war eine 30% höhere Adhäsion der ADAM10-defizienten Zellen im Vergleich zur entsprechenden Wildtyp-Kontrolle zu beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das durch die Metalloprotease ADAM10 vermittelte „N-Cadherin-Shedding“ zu einer deutliche Verminderung der Adhäsionseigenschaften der Fibroblasten führte.

### **3.1.3 ADAM10 kolokalisiert mit N-Cadherin und beeinflusst dessen Verteilung in Fibroblasten**

Um zu klären, ob das ADAM10-vermittelte „N-Cadherin-Shedding“ auch *in vivo* eine relevante Bedeutung hat, sollte zunächst die Interaktion dieser beiden Moleküle in Immunfärbungen näher untersucht werden. Eine Kolokalisation von ADAM10 und N-Cadherin im Trans-Golgi-Netzwerk und an der Zelloberfläche ist für verschiedene Zelltypen

---

<sup>D</sup> Durchführung der *Adhäsionsassays*: Wildtyp- und ADAM10 defiziente Fibroblasten wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von GC4 bzw. EGTA inkubiert. Danach wurden Fibroblasten, die mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert worden waren, in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung zu den adhären wachsenden Fibroblasten gegeben. Um eine möglichst gleichmäßige und schnelle Adhäsion der Zellen zu erreichen, wurde die Platte bei 100g für drei Minuten zentrifugiert. Nach anschließender Inkubation der Zellen bei 37°C für 20 Minuten und zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz der adhären Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet bzw. mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgeräts genau bestimmt. Um Dauer und Stärke der Adhärenz zu erfassen, wurde die Fluoreszenz zum Teil nach jedem Waschschrift gemessen.

beschrieben worden<sup>237,238</sup>. Immunzytochemische Färbungen von Wildtyp-Fibroblasten und ADAM10-defizienten Zellen zeigten, dass die Immunreaktivität von N-Cadherin auf der Zelloberfläche von ADAM10-defizienten Zellen wesentlich stärker war, als auf entsprechend gefärbten Wildtyp-Fibroblasten (Abb. 5A, Veröffentl. 1). Ein ähnliches Bild ergab sich auch nach Behandlung von Wildtyp-Fibroblasten mit dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X. Diese Ergebnisse, verbunden mit der Tatsache, dass ADAM10 und N-Cadherin ko-immunpräzipitieren (Abb. 5B, Veröffentl. 1), deuten auf eine Interaktion dieser Moleküle hin. Des Weiteren zeigten immunhistochemische Färbungen von 9,5 Tage alten murinen Embryonen eine Kolo-kalisation von ADAM10 und N-Cadherin in verschiedenen Regionen des Embryos (Abb. 5C, Veröffentl. 1). Um die Verteilung von N-Cadherin in ADAM10-defizienten Embryos näher zu untersuchen, wurde ein „Whole Mount Staining“ des Embryos durchgeführt<sup>E</sup>. Der einzige zu beobachtende Unterschied war eine verminderte N-Cadherin-Expression in den Somiten der ADAM10-defizienten Embryonen.

#### **3.1.4 $\beta$ -Catenin-Rekrutierung an der Zellmembran führt zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion in ADAM10-defizienten Zellen**

$\beta$ -Catenin und das homologe Protein Armadillo sind beteiligt an der Wnt/wingless-Signaltransduktion und von entscheidender Bedeutung während der Embryogenese<sup>239</sup>.  $\beta$ -Catenin existiert in der Zelle sowohl als zytoplasmatisches als auch als membranassoziiertes Protein. Während der zytoplasmatische Pool von  $\beta$ -Catenin durch Wnt und „Adenomatous Polyposis Coli Proteine“ reguliert wird, ist der membrangebundene Teil mit klassischen Cadherinen an der Zellmembran assoziiert.

Um zu prüfen, ob ein vermindertes „N-Cadherin-Shedding“ den Pool von  $\beta$ -Catenin in der Zelle beeinflusst, sollten immunzytochemische Färbungen Aufschluss über den Gehalt und die Verteilung von N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin in den Fibroblasten geben. Während  $\beta$ -Catenin in Wildtyp-Zellen vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert war, zeigten die ADAM10-defizienten Zellen eine Korrelation von erhöhter Akkumulation von N-Cadherin und

---

<sup>E</sup> Das Expressionsmuster des endogenen N-Cadherins wurde mit Hilfe der sogenannten indirekten „Whole-Mount“-Immunocytochemie in verschiedenen Embryonen untersucht. Diese Methode hat gegenüber histologischen Schneideverfahren den Vorteil, die Verteilung der N-Cadherins innerhalb des gesamten Embryos wiederzugeben. Embryonen wurden nach kurzem Erhitzen in eiskaltem Methanol für 30 min inkubiert, in einer 0,1% haltigen Triton PBS-Lösung rehydriert und hiernach mit N-terminalen N-Cadherin AK behandelt. Nach dreimaligem Waschen der Embryonen in PBS und Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Antikörper wurden die Embryonen mit einer Diaminobenzidin-Lösung gefärbt.

$\beta$ -Catenin an der Zellmembran (Abb. 6, Veröffentl. 1). Ko-Immunpräzipitationen von N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin bestätigten eine erhöhte Assoziation dieser Moleküle in ADAM10-defizienten Zellen (Abb. 7A, Veröffentl. 1). Lösliches  $\beta$ -Catenin bindet an Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie und reguliert Zellzyklus-kontrollierende Gene wie das Cyclin D1. Um zu prüfen, ob die veränderte  $\beta$ -Catenin-Verteilung in den ADAM10-defizienten Zellen zu einer veränderten Steuerung TCF-abhängiger Proteine führt, wurden Luziferase-basierte *TCF-Reporter-Assays* durchgeführt<sup>F</sup>. Die Untersuchungen zeigten, dass die durch  $\beta$ -Catenin vermittelte transkriptionale Aktivität im Vergleich zur entsprechenden Wildtyp-Kontrolle um ein 6-faches in den ADAM10-defizienten Zellen erniedrigt war (Abb. 7B, Veröffentl. 1). Western-Blot-Analysen von ADAM10-defizienten Zellen und Embryonen zeigten, dass die Expression von  $\beta$ -Catenin-Zielgenen wie Cyclin D1 und c-jun im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle deutlich reduziert waren (Abb. 7C und D, Veröffentl. 1). Um die Relevanz von ADAM10 in der  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion zu untersuchen, wurden ADAM10-defiziente Zellen mit ADAM10 retransfiziert und die Expression von  $\beta$ -Catenin-Zielgenen mittels Western-Blot analysiert. Nach Überexpression von ADAM10 ließ sich konzentrationsabhängig eine Zunahme der  $\beta$ -Catenin-Zielgene c-myc, Cyclin D1 und c-jun beobachten (Abb. 7E, Veröffentl. 1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ADAM10 nicht nur die N-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst, sondern ebenfalls maßgeblich an der Regulierung der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt ist.

### **3.2 Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM10 vermittelt die Spaltung von E-Cadherin und reguliert epitheliale Zell-Zell-Adhäsion, Migration und $\beta$ -Catenin-Translokation (Veröffentlichung 2)**

E-Cadherin ist eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle in epithelialen Geweben und scheint in der Tumorentstehung von elementarer Bedeutung zu sein. Während die extrazelluläre Domäne homophile Bindungen vermittelt, tritt der zytoplasmatische Teil von E-Cadherin mit verschiedenen Molekülen in Wechselwirkung. Über  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin wird der Cadherin/Catenin-Proteinkomplex an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt. E-Cadherin kommt

---

<sup>F</sup> Durchführung von *Luciferaseassays*: Wildtyp- und ADAM10-defiziente Fibroblasten wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 6-Loch-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 50% kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit  $\beta$ -Catenin/TCF-transkribierenden TOP-FLASH oder Kontroll-FOP-FLASH-Reporter-Plasmiden transfiziert und die TCF-abhängige Luciferaseaktivität nach 48 Stunden mit einem Luminometer gemessen.

außer in membranständiger auch in löslicher Form vor. Frühere Untersuchungen beschrieben für die Entstehung dieser löslichen Form einen Mechanismus der limitierten Proteolyse. Die „Shedding-Protease“ war jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Protease, die für das „Shedding“ verantwortlich ist, näher zu charakterisieren und zu prüfen, ob Signaltransduktionswege von  $\beta$ -Catenin-Zielgenen durch das „Shedding“ von E-Cadherin beeinflusst werden.

### **3.2.1 Die Metalloprotease ADAM10 prozessiert das transmembrane Adhäsionsmolekül E-Cadherin sowohl konstitutiv als auch induzierbar in murinen embryonalen Fibroblasten und epithelialen Zellen**

Ausgangspunkt für die Untersuchungen war ebenfalls das bereits oben vorgestellte ADAM10-defiziente Mausmodell. Zunächst sollte die Frage geklärt werden, welche Proteasen an der Proteolyse des E-Cadherins beteiligt sind. Aufgrund der frühen Letalität der ADAM10-defizienten Mäuse stehen für diese „Shedding-Analysen“ keine ADAM10-defizienten E-Cadherin-exprimierenden Zelllinien zur Verfügung. Da Fibroblasten E-Cadherin nicht endogen exprimieren wurden diese mit E-Cadherin-kodierendem Plasmid transfiziert und das „Shedding“ mittels Western-Blot untersucht. Detektiert wurden die membrangebundene Form und die intrazellulären Fragmente von E-Cadherin in den Zelllysaten der Fibroblasten mit einem monoklonalen Antikörper der Firma BD Bioscience. In den Lysaten fanden sich Banden bei ca. 120 kDa (VL) und 37 kDa (CTF). Die lösliche Form des E-Cadherins wurde in den Überständen bei ca. 75 kDa (NTF) detektiert.

Zur Identifizierung der E-Cadherin-spaltenden Metalloprotease wurde das „Shedding“ in verschiedenen ADAM-defizienten und epithelialen Zelllinien untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass nur in den ADAM10-defizienten Fibroblasten eine deutliche Reduktion des C-terminalen Fragmentes zu beobachten war (Abb. 1B, Veröffentl. 2). Die Größe des detektierten C-terminalen-Fragments von ca. 37 kDa entsprach derjenigen, die für das C-terminale E-Cadherin in verschiedenen Tumorzelllinien bestimmt worden war<sup>240</sup>.

Da wie oben beschrieben viele Membranproteine durch Metalloproteasen sowohl konstitutiv als auch aktiviert proteolytisch gespalten werden, wurde hier ebenfalls der Einfluss von verschiedenen Stimuli auf das „E-Cadherin-Shedding“ untersucht. Im Western-Blot zeigte sich für die verwendeten Stimuli eine gegenüber den unbehandelten Proben deutliche Zunahme des C-terminalen Fragmentes in den Zelllysaten der stimulierten Zellen (Abb. 1D, Veröffentl. 2). Sowohl das konstitutive als auch das induzierte „E-Cadherin-Shedding“ war

deutlich in den ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten reduziert. Um das „Shedding“ in Zellen zu untersuchen, die endogen E-Cadherin exprimieren, wurden verschiedene epitheliale Zelllinien mittels Inhibitorstudien, RNA-Interferenz-Experimenten, ADAM10-Überexpression und Stimulationsversuchen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass auch in den endogen exprimierenden epithelialen Zellen ADAM10 nicht nur unter konstitutiven Bedingungen für diese Prozessierung maßgeblich verantwortlich ist, sondern die E-Cadherin-Spaltung durch verschiedene Stimuli induziert werden kann. (Abb. 2A bis 2F, Veröffentl. 2).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass die Metalloprotease ADAM10 sowohl an der konstitutiven Spaltung, als auch an der induzierbaren Proteolyse von E-Cadherin beteiligt ist. Insbesondere war es möglich, diese Befunde in epithelialen Zelllinien mittels RNA-Interferenz-Experimenten zu bestätigen.

### **3.2.2 ADAM10 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin und $\beta$ -Catenin**

Die durch E-Cadherin vermittelte interzelluläre Adhäsion von epithelialen Zellen wird durch die zytoplasmatische Bindung von  $\beta$ -Catenin stabilisiert. Das „Shedding“ von E-Cadherin führt zu einer Aufhebung der adhäsiven Mechanismen und einer Verlagerung von membrangebundenen  $\beta$ -Catenin ins Zytoplasma. Um zu prüfen, ob die Metalloprotease ADAM10 an diesem Prozess beteiligt ist, wurden epitheliale Zellen mit Ionomycin stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin gefärbt. Ionomycin-induziertes „E-Cadherin-Shedding“ führte zu einer Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten und einer Lokalisationsänderung von membrangebundenem  $\beta$ -Catenin. Wird die Aktivität von ADAM10 mit dem Metalloproteas-Inhibitor GI254023X inhibiert, führte dies zu einer verminderten Translokalisierung von  $\beta$ -Catenin in das Zytoplasma (Abb. 3, Veröffentl. 2). Die Ergebnisse zeigen, dass die Metalloprotease ADAM10 entscheidend an der Regulation von epithelialen Zell-Zell-Kontakten und der Translokalisierung von  $\beta$ -Catenin in epithelialen Zellen beteiligt ist.

### 3.2.3 Der Einfluss von ADAM10 auf die Adhäsion, Migration und Proliferation von epithelialen Zellen

Um den funktionellen Einfluss von ADAM10 zu untersuchen, wurden Zell-Adhäsionsstudien, Migrationassays und Proliferationsexperimente durchgeführt. *Zell-Zell-Adhäsionsassays*<sup>G</sup> zeigten, dass die ADAM10-vermittelte Proteolyse entscheidend an der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion beteiligt ist. In diesen Versuchen wurden Zellen der humanen Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert und zu entsprechenden Keratinozyten gegeben, die entweder unbehandelt, mit EGTA bzw. inhibierenden E-Cadherin-Antikörper DECMA1 oder mit PMA bzw. PMA und den Metalloprotease-Inhibitoren GM6001 oder GI254023X behandelt waren. Nach Entfernen der ungebundenen Zellen durch Waschen mit PBS wurde die Anzahl der auf den Fibroblasten haften gebliebenen Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes bestimmt.

Zunächst war festzustellen, dass in Abwesenheit von EGTA oder DECMA1 die Anzahl der an die Keratinozyten bindenden Zellen um ein Vielfaches höher war als die, die an mit EGTA oder DECMA1 vorbehandelten Zellen adhärten (Abb. 4A, Veröffentl. 2). Dies verdeutlichte, dass die Adhärenz maßgeblich durch E-Cadherin bzw. Kalzium-abhängige Oberflächenmoleküle vermittelt wurde. Eine durch PMA induzierte Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion konnte ebenfalls durch den Metalloprotease-Inhibitor GM6001 und den ADAM10-Inhibitor GI254023X aufgehoben werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das durch die Metalloprotease ADAM10 vermittelte „E-Cadherin-Shedding“ zu einer deutlichen Verminderung der Adhäsionseigenschaften der Fibroblasten führte.

Weiterhin sollten *in vitro-Wundheilungsversuche*<sup>H</sup> den Einfluss von ADAM10 auf die Migration von epithelialen Zellen zeigen. Diese Versuche stellen ein stark vereinfachtes

---

<sup>G</sup> Durchführung der *Adhäsionsassays*: Epitheliale HaCaT-Keratinozyten wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von GI254023X oder GM6001 bzw. DECMA1, EGTA oder PMA inkubiert. Danach wurden Keratinozyten, die mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert worden waren, in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung zu den adhären wachsenden Fibroblasten gegeben. Um eine möglichst gleichmäßige und schnelle Adhäsion der Zellen zu erreichen, wurde die Platte bei 100g für drei Minuten zentrifugiert. Nach anschließender Inkubation der Zellen bei 37°C für 20 Minuten und zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz der adhären Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet bzw. mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes genau bestimmt. Um Dauer und Stärke der Adhärenz zu erfassen, wurde die Fluoreszenz zum Teil nach jedem Waschschrift gemessen.

<sup>H</sup> Durchführung der *in vitro Wundheilungsversuche*: HaCaT-Zellen wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 6-Loch-Platten ausgesät, mit ADAM10-kodierenden Vektor oder Kontrollplasmid transfiziert und bis zur Konfluenz kultiviert. Um bei den Migrationsstudien einen Proliferationseffekt der Zellen auszuschließen, wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 Stunden mit 100 mM Hydroxyurea vorinkubiert. Eine zellfreie „Wunde“ wurde mit einer 10µl-Pipettenspitze erzeugt. Nach verschiedenen Zeiten unter

Modell für eine Zellwanderung *in vivo* dar. Während innerhalb des Assays die Zellen nur in zwei Dimensionen wandern können, erfolgt eine Wanderung von Zellen *in vivo* stets in einem dreidimensionalen System. Dennoch lässt das Ergebnis des Versuchs prinzipiell Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der Zellen zu und macht eine Aussage darüber, ob das Migrationspotential der Zellen durch eine Transfektion von ADAM10 zu beeinflussen ist. In sogenannten „Scratch-Assays“ oder *in vitro*-Wundheilungs-Experimenten wurde der Einfluss von dem ADAM10-vermittelten „E-Cadherin-Shedding“ auf die Zellwanderung untersucht. Hierzu wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze einem konfluenten Zellrasen eine „Verletzung“ zugeführt, um das Migrationsverhalten der Zellen über die Zeit zu beobachten. Hierbei stellte sich heraus, dass ADAM10-transfizierte HaCaT-Zellen wesentlich beweglicher waren als untransfizierte Zellen und den „Scratch“ nach ca. 12 Stunden nahezu komplett geschlossen hatten, während die untransfizierten Zellen lediglich 50% der „Wunde“ geschlossen hatten (Abb. 4B, Veröffentl. 2). Um den Einfluss von löslichem E-Cadherin zu untersuchen, wurden Mediumüberstände von ADAM10-transfizierten Zellen auf untransfizierte Zellen gegeben. Hierbei stellte sich heraus, dass diese Überstände ebenfalls zu einer Beschleunigung des Wundverschlusses führten. Dieser Effekt konnte durch Immunpräzipitation von löslichem E-Cadherin nahezu aufgehoben werden (Abb. 4C, Veröffentl. 2). Diese Ergebnisse zeigen, dass ADAM10-vermitteltes „E-Cadherin-Shedding“ selbst und auch durch ADAM10 entstandenes lösliches E-Cadherin die Migration der HaCaT-Zellen maßgeblich regulieren kann.

Da die Re-Epithelialisierung der Epidermis ebenfalls abhängig von der Proliferationsrate der Keratinozyten ist, sollte der Einfluss von ADAM10 auf die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidin-Assays untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass ADAM10-transfizierte Zellen eine um 50% erhöhte Proliferationsrate als untransfizierte Zellen hatten (Abb. 4D, Veröffentl. 2). Um zu prüfen, ob es hierbei auch zu einer veränderten Expression von Zell-Zyklus-regulierenden Genen kommt, wurde die Expression des  $\beta$ -Catenin-Zielgens Cyclin D1 untersucht. Es bestätigte sich, dass die Transfektion von ADAM10 in HaCaT-Zellen zu einer dosisabhängigen Expression von Cyclin D1 führt (Abb. 4E, Veröffentl. 2). Die Ergebnisse zeigen, dass ADAM10 nicht nur die Migration der Zellen beeinflusst, sondern auch ihre Proliferation durch die Translokation von  $\beta$ -Catenin und der damit verbundenen Signaltransduktion reguliert.

---

Standardzellkulturbedingungen wurde die Migration der Zellen in den einzelnen Vertiefungen fotografisch mit einem Phasen-Kontrastmikroskop dokumentiert.

### **3.2.4 ADAM10-vermitteltes „E-Cadherin-Shedding“ kann *in vivo* nicht kompensiert werden**

Um eine mögliche Relevanz des ADAM10-vermittelten „E-Cadherin-Sheddings“ *in vivo* näher zu untersuchen, wurden Zellextrakte von ADAM10-defizienten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen mittels Western-Blot analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass in den ADAM10-defizienten Embryonen eine deutliche Reduktion des „E-Cadherin-Sheddings“ zu beobachten war (Abb. 5A, Veröffentl. 2). Um die Verteilung von E-Cadherin in ADAM10-defizienten Embryonen näher zu untersuchen, wurde ein „Whole Mount Staining“ der Embryonen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Menge an E-Cadherin Voll-Längen Protein in den ADAM10-defizienten Embryonen drastisch erhöht war (Abb. 5B, Veröffentl. 2). Der Befund, dass E-Cadherin im ADAM10-defizienten Embryo nicht prozessiert wird, weist zusätzlich auf eine essentielle *in vivo*-Relevanz im Organismus hin. Diese wird durch immunhistochemische Untersuchungen, die eine Ko-Expression von ADAM10 und E-Cadherin in der humanen Epidermis zeigen, zusätzlich unterstützt (nicht gezeigt).

### **3.3 Das neuronale Adhäsionsmolekül L1 wird sequentiell durch zwei unterschiedlich aktivierte Metalloproteasen und den Presenilin/ $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert und reguliert die neuronale Zell-Adhäsion, Zell-Migration und das Neuritenwachstum (Veröffentlichung 3)**

Das L1-Adhäsionsmolekül wurde als neuronales Adhäsionsmolekül mit wichtiger Funktion beim Wachstum von Neuriten beschrieben. Es existiert in zwei Formen, einer membrangebundenen und einer löslichen, wobei letztere aus der ersten durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne hervorgeht. Während die lösliche Variante bei Neuronen Neuritenwachstum und neuronale Differenzierung induziert, vermittelt die in der Membran verankerte Variante die Adhärenz dieser Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von löslichem L1 einerseits konstitutiv erfolgt, andererseits aber auch zum Beispiel durch PMA induziert werden kann. Es wurde gezeigt, dass an dieser Spaltung der extrazellulären Domäne eine Metalloprotease, vermutlich ein Mitglied der ADAM-Familie, beteiligt ist<sup>179,231</sup>.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der L1-Proteolyse und die daran beteiligten Proteasen näher zu untersuchen. Dabei ging es auch um die Frage, ob die konstitutive und induzierte Freisetzung von L1 durch unterschiedliche Proteasen vermittelt wird.



### 3.3.1 Konstitutive und induzierbare Freisetzung von löslichem L1

Die ersten Versuche dienten der Etablierung eines Systems, in dem konstitutives und induzierbares „Shedding“ von L1 verlässlich beobachtet werden konnte. Hierzu wurden verschiedene Antikörper gegen humanes L1 getestet, wobei eine Kombination der Antikörper 324 und 555 die größte Sensitivität zeigte. Da diese gegen die extrazelluläre Domäne von L1 gerichtet waren (AK 324 bindet an der sechsten Ig-Domäne und AK 555 an den Fn-Domänen), gelang sowohl die Detektion der membrangebundenen Form in den Zelllysaten, als auch die der löslichen Form in den Zellüberständen. In den Lysaten fand sich eine Bande bei ca. 220 kDa und in den Überständen eine bei ca. 200 kDa. Die Detektion der membrangebundenen Form und der intrazellulären C-terminalen Fragmente von L1 in den Zelllysaten gelang mit einem monoklonalen Antikörper der Firma Covance.

In den folgenden Experimenten sollte der Mechanismus, der zur Entstehung von löslichem L1 führte, näher untersucht werden. L1-transfizierte Wildtyp-Fibroblasten wurden für einen definierten Zeitraum in An- oder Abwesenheit von PMA inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellüberstände auf ihr Gehalt an löslichem L1 im Western-Blot oder mit Hilfe eines „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays“ (ELISAs) analysiert. Die Zugabe des Zink-Chelators EDTA zu unstimulierten oder PMA-behandelten Zellen sollte erste Informationen über die Beteiligung von Metalloproteasen an der Entstehung von löslichem L1 liefern. Im Western-Blot zeigte sich eine Zunahme des löslichen L1-Moleküls im Zellüberstand der PMA-stimulierten Zellen gegenüber den unbehandelten Proben (Abb. 3A, Veröffentl. 3). Diese auf den PMA-Effekt zurückzuführende Zunahme wurde als induziertes „Shedding“ definiert, im Gegensatz zu dem konstitutiven der unstimulierten Zellen. Die Größe des detektierten L1-Fragments von ca. 200 kDa entsprach derjenigen, die für das lösliche L1 in verschiedenen Tumoren gezeigt worden war<sup>231,241,242</sup>. Sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte „L1-Shedding“ wurde durch EDTA inhibiert (Abb. 1B und 4A, Veröffentl. 3). Die Inhibition der Produktion von löslichem L1 durch EDTA zeigt die Beteiligung von Metalloproteasen an beiden Formen des „Sheddings“.

### 3.3.2 Die unterschiedliche Regulation des „L1-Sheddings“

Um die Identität der am „L1-Shedding“ beteiligten Proteasen näher einzugrenzen, wurden in weiteren Experimenten zwei Metalloprotease-Inhibitoren (GI254023X und GW280264X) eingesetzt, die selektiv die Aktivität von ADAM10 bzw. ADAM17 blockieren<sup>123</sup>. Die

Analyse von Zellüberständen im Western-Blot ergab, dass GI254023X einen wesentlich größeren Effekt auf das konstitutive „L1-Shedding“ hat, während der Inhibitor GW280264X zu einer verstärkten Reduktion des induzierbaren „L1-Sheddings“ führte (Abb. 1B und 3A, Veröffentl. 3). Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass ADAM10 an dem konstitutiven „Shedding“ von L1 beteiligt ist, während ADAM17 möglicherweise zu dem durch PMA induzierten „Shedding“ von L1 beiträgt. Zur weiteren Analyse der Rolle von ADAM10 und ADAM17 für die Spaltung von L1 wurden murine embryonale Wildtyp-Fibroblasten und verschiedene ADAM-defiziente Fibroblasten auf ihr „L1-Shedding-Verhalten“ untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Anteil an löslichem L1 in dem Kulturmedium der ADAM10-defizienten, unstimulierten Zellen vermindert war (Abb. 2A, Veröffentl. 3). Auf der anderen Seite ließ sich das „L1-Shedding“ in ADAM17-defizienten Fibroblasten nicht durch PMA induzieren (Abb. 2A und 4B, Veröffentl. 3).

Insgesamt ergab sich folgendes Bild zur proteolytischen Regulation von L1: Durch die Aktivität von Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen kommt es zur Abspaltung der Ektodomäne des auf der Zelloberfläche exprimierten L1-Moleküls und damit zur Bildung eines löslichen Fragments. Dieser als „Shedding“ bezeichnete Vorgang findet in den untersuchten Zelllinien (primäre-Neurone, H4-Zellen, murine embryonale Fibroblasten) konstitutiv statt. Die Behandlung der Zellen mit PMA führte zu einer Verstärkung des „Sheddings“, d.h. zu einer vermehrten Produktion des löslichen Fragments bei gleichzeitiger Abnahme der membranständigen Form. Der Einsatz von Inhibitoren, die ADAM10, aber kaum ADAM17 hemmen (GI254023X), resultierte in einer Reduktion des konstitutiven, nicht aber des PMA-induzierten „Sheddings“. Letzteres wurde nur durch den ADAM17-Inhibitor GW280264X blockiert, wobei das konstitutive „Shedding“ nicht weiter verringert wurde als durch den ADAM10-Inhibitor GI254023X alleine. Die Überexpression von ADAM10 in ADAM10-defizienten Zellen verstärkte die Produktion von löslichem L1 und in murinen ADAM10-defizienten Fibroblasten wurde nur die konstitutive, nicht aber die durch PMA induzierte Spaltung des L1-Moleküls vermindert. Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass ADAM10 die wichtigste Protease für das konstitutive „Shedding“ von L1 ist, während ADAM17 sehr wahrscheinlich zu dem durch PMA induzierten „Shedding“ von L1 beiträgt.

### 3.3.3 Die Abspaltung der C-terminalen Domäne von L1 aufgrund regulierter intramembraner Proteolyse

Western-Blot-Analysen von Zelllysaten L1-exprimierender Fibroblasten zeigten neben der membranständigen 220 kDa großen Form zwei C-terminale Fragmente von L1 bei ca. 32 kDa (CTF1) und ca. 28 kDa (CTF2). Das Auftreten von mindestens zwei Proteolyseschritten, bei welchen die extrazelluläre Domäne des L1-Moleküls nahe der Plasmamembran entfernt und ein weiteres Fragment durch einen vielleicht folgenden Schnitt in der Transmembranregion erzeugt und in das Zytoplasma abgegeben wird, erinnert an einen als „Regulierte Intramembran Proteolyse“ bezeichneten Mechanismus<sup>243</sup>.

Eine zentrale Rolle in der regulierten intramembranen Proteolyse von Typ I Transmembranproteinen nimmt der im hydrophoben Milieu der Plasmamembran wirkende  $\gamma$ -Sekretasekomplex ein. Der 400-600 kDa umfassende Komplex setzt sich aus den Proteinen Nicastrin, APH-1, Pen-2 und den Presenilinen zusammen<sup>244</sup>. Das katalytische Zentrum wird an der Kontaktstelle zweier aneinander grenzender Presenilinproteine durch zwei konservierte, intramembranständige Aspartylreste gebildet. Die Schnittstellenpräzision und die Substratspezifität der  $\gamma$ -Sekretase sind jedoch gering. Daher konnten für eine stetig wachsende Zahl von Substraten, zu denen das „Amyloid Precursor Protein“<sup>245</sup> und Notch als die Bekanntesten zählen, unterschiedlich prozessierte, zytoplasmatische Fragmente beschrieben werden<sup>246</sup>. Wird nun die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase gehemmt, akkumulieren die extrazellulär prozessierten Transmembranproteine an der Plasmamembran, während die Erzeugung weiterer löslicher zytoplasmatischer Fragmente unterbunden wird.

Zur Untersuchung der weiteren Prozessierung von L1 wurde ein murines Zellkultursystem gewählt, in dem die Expression der katalytisch aktiven Komponenten des  $\gamma$ -Sekretasekomplex, die Preseniline (PS) 1 und 2, verhindert wurde<sup>247,248</sup>. Falls das Molekül L1 ebenfalls durch regulierte intramembrane Proteolyse prozessiert wird, sollte dementsprechend in den Proteinlysaten L1-exprimierender PS1/2-defizienter Fibroblasten eine äquivalente Veränderung des CTF-detektierten Signalmusters im Western-Blot zu erkennen sein. Western-Blot-Analysen von L1-transfizierten PS1/2-defizienten Fibroblasten zeigten eine signifikant erhöhte Akkumulation des 32 kDa-Transmembran-Fragments bei gleichzeitigem Verlust des zytoplasmatischen 28 kDa-Fragments (Abb. 3, Veröffentl. 3). Die Ergebnisse zeigen, dass im Rahmen der RIP das L1-Transmembranfragment durch die spezifische Interaktion mit der  $\gamma$ -Sekretase zu einem kleineren zytoplasmatischen Fragment prozessiert wird.

### 3.3.4 Veränderte Adhäsionseigenschaften L1-exprimierender Zellen durch ADAM10- und ADAM17-vermitteltes „Shedding“

Das Molekül L1 vermittelt  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig Zell-Adhäsion durch homophile oder heterophile Interaktionen. Um zu prüfen, ob ADAM10- und ADAM17-vermitteltes „Shedding“ von L1 zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsionseigenschaften L1-exprimierender Zellen führt, wurden *substratspezifische Adhäsionsassays*<sup>1</sup> durchgeführt.

In diesen Versuchen wurden L1-exprimierende Zellen der humanen neuronalen Zelllinie H4, die entweder unstimuliert, mit PMA oder den Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X behandelt bzw. mit ADAM10 oder siRNA gegen ADAM10 transfiziert waren, mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert und auf mit rekombinanten L1 gecoateten 96-Loch Platten gegeben. Nach Entfernen der ungebundenen Zellen durch Waschen mit PBS wurde die Anzahl der auf den 96-Loch Platten verbliebenen Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes bestimmt. Zunächst war festzustellen, dass auf den mit BSA beschichteten Platten die Anzahl der bindenden H4-Zellen um ein Vielfaches niedriger war als die, die auf den mit L1 beschichteten Platten adhärten. Dies verdeutlichte, dass ein Großteil der Adhärenz über homophile L1-Bindungen stattfand. Nach Vorbehandlung der Zellen mit PMA reduzierte sich die Zahl der bindenden H4-Zellen auf L1-beschichteten Platten deutlich. Die Behandlung von H4-Zellen mit den Inhibitoren GI254023X und GW280264X führte zu einer Zunahme adhärenter Zellen, obwohl bei gleichzeitiger PMA-Stimulation der ADAM17-Inhibitor GW280264X einen größeren Effekt auf den PMA-induzierten Rückgang der Adhäsion hatte, während GI254023X einen höheren Effekt auf die Adhäsionseigenschaften der unstimulierten Zellen hatte (Abb. 3, Veröffentl. 3).

Die Ergebnisse zeigen, dass „L1-Shedding“ eine deutliche Verminderung der Adhäsionseigenschaften L1-exprimierender Zellen zur Folge hat, und dass die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 ausreichend sind, um diese Eigenschaften wieder zu verbessern.

---

<sup>1</sup> Durchführung der *substratspezifischen Adhäsionsassays*: 96-Loch-Platten wurden mit 2 µg/ml L1 Lösung bzw. 2 µg/ml BSA-Lösung als Kontrolle über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu Versuchsbeginn wurde das Shedding von L1 in H4-Zellen durch Stimulation mit PMA (200 ng/ml) induziert, und zwar für eine Stunde in Gegenwart oder Abwesenheit der Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X oder GW280264X. Danach wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert und in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in die Vertiefungen der gecoateten 96-Loch Platten gegeben. Um eine möglichst gleichmäßige und schnelle Adhäsion der H4-Zellen zu erreichen, wurde die Platte bei 100g für drei Minuten zentrifugiert. Nach anschließender Inkubation der Zellen bei 37°C für 20 Minuten und zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz der adhärenter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet bzw. mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes bestimmt. Um Dauer und Stärke der Adhärenz zu erfassen, wurde die Fluoreszenz zum Teil nach jedem Waschschritt gemessen.

### 3.3.5 ADAM10 reguliert L1-abhängige haptotaktische Migration von Neuronen

Zellkulturversuche haben gezeigt, dass L1 die Migration von Nervenzellen und das Auswachsen sowie die Faszikulierung von Axonen unterstützt. Um den Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf die Migration von neuronalen Zellen zu untersuchen, wurden *haptotaktische Migrationsassays*<sup>J</sup> durchgeführt. Hierzu wurden die Unterseiten von Transwellfiltern eines 24-Loch-Transwell-Systems mit rekombinatem L1 oder BSA beschichtet. Die neuronalen Zellen wurden in Versuchsmedium mit oder ohne Zugabe der beiden Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X in die obere Kammer gegeben. Nach 48-stündiger Migrationszeit wurde die Anzahl der in die untere Kammer transmigrierten Zellen bestimmt. Die Analyse der transmigrierten Zellen ergab, dass GI254023X einen wesentlich größeren Effekt auf die Migration der neuronalen Zellen hatte, als der Inhibitor GW280264X (Abb. 6C, Veröffentl. 3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Metalloprotease ADAM10 maßgeblich an der regulierten L1-abhängigen haptotaktischen Migration von Neuronen beteiligt ist.

### 3.3.6 ADAM10 und ADAM17 beeinflussen L1-abhängiges Neuritenwachstum

Das neuronale Adhäsionsmolekül L1 ist nicht nur an der Migration von Zellen, der Synaptogenese und der Myelinisierung beteiligt, sondern fördert durch seine homophilen Bindungseigenschaften auch das Wachstum von Neuriten. Um zu prüfen, welchen Einfluss die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 auf das L1-abhängige Neuritenwachstum haben, wurden Mikroexplantate von postnatalem murinem Cerebellum in Gegenwart der Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X oder GW280264X auf Poly-L-Lysin (PLL) oder rekombinatem L1 kultiviert und die Länge der Neuronen bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass beide Inhibitoren nur einen geringen Effekt auf das Wachstum der Neuriten auf PLL hatten. Im Gegensatz hierzu zeigte sich, dass das Wachstum der Neuriten auf rekombinatem L1 als Substrat deutlich durch die Zugabe der Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X oder

---

<sup>J</sup> Durchführung der *haptotaktischen Migrationsassays*: Die Unterseiten von Transwellfiltern eines 24-Loch-Transwell-Systems wurden mit 2 µg/ml rekombinatem L1 oder 2 µg/ml BSA für 90 Minuten beschichtet. Anschließend wurden  $3 \times 10^5$  EGL-Zellen von sechs Tage alten Mäusen in Versuchsmedium mit oder ohne Zugabe der beiden Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X in die obere Kammer gegeben. Nach 48-stündiger Migrationszeit bei 37°C wurde die Anzahl der in die untere Kammer transmigrierten Zellen bestimmt. Hierzu wurde Zellen die nicht migrierten, mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Die auf die Unterseite der Membran gewanderten Zellen wurden mit Kristall-Violet-Lösung gefärbt und anschließend mehrfach mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden dann mit 10% Essigsäure entfärbt und diese Lösung bei 595 nm im ELISA-Reader quantifiziert.

GW280264X inhibiert war (Abb. 6A und 6B, Veröffentl. 3). Hierbei hatte der ADAM17-spezifische Inhibitor GW280264X einen wesentlich stärkeren Effekt als der ADAM10-Inhibitor GI254023X. Diese Daten zeigen, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 an dem L1-abhängigen Neuritenwachstum beteiligt sind.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die proteolytischen Spaltungsmechanismen der neuronalen Membranproteine L1 und N-Cadherin sowie die Prozessierung des epithelialen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin untersucht und beschrieben. Neben der Identifikation der für die Spaltung der Moleküle verantwortlichen Proteasen war auch die Frage nach der biologischen Funktion dieser Prozessierung und insbesondere die Untersuchung der Zell-Zell-Interaktion auf der Ebene der molekularen Vermittlung von Zelladhärenz und die intrazelluläre Signalweiterleitung von Interesse.

Während zu Beginn der Arbeit bereits einige Informationen zur Spaltung von L1 vorlagen, gab es für die Prozessierung der Cadherine in dieser Hinsicht noch keine genaueren Erkenntnisse. Für das Molekül L1 war bekannt, dass die membranassoziierte Form durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne in eine lösliche, aktive Form überführt werden kann. Die dafür verantwortlichen Proteasen waren aber nur zum Teil identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zum Spaltungsmechanismus dieser transmembranen Adhäsionsmoleküle sowie mögliche Konsequenzen für dessen *in vivo*-Funktion sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

### 4.1 Die ADAM10-vermittelte Spaltung von E- und N-Cadherin

Cadherine sind Kalzium-bindende, transmembrane Adhäsionsproteine, welche an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Durch ihre Funktion bei der Zell-Adhäsion spielen die Cadherine neben der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten auch bei der embryonalen Morphogenese, der Erhaltung der Zellpolarität und bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Klassische Cadherine wie E-Cadherin oder N-Cadherin bilden in derselben Zelle parallele *Cis*-Dimere. In dieser Konformation vermögen diese eine *Trans*-Dimerisierung mit einem identischen Cadherin-Dimer in der gegenüberliegenden Zelle zu bilden und überbrücken so den extrazellulären Raum zwischen den beiden Zellen. Mit der intrazellulären Domäne interagieren die klassischen Cadherine über verschiedene Interaktionspartner (z.B. Catenin) mit dem Aktin-Zytoskelett, um so den Gewebeverbänden Festigkeit zu verleihen.

Die transmembranen Adhäsionsmoleküle E- und N-Cadherin existieren aber nicht nur membrangebunden, sondern zusätzlich als lösliches, funktionell aktives Protein, wobei letzteres aus dem ersten durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne hervorgeht.

Während frühere Studien zeigten, dass die proteolytische Spaltung von E- und N-Cadherin durch eine Metalloprotease-Aktivität vermittelt wird, blieb die für dieses „Shedding“ verantwortliche Protease jedoch unbekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Metalloprotease ADAM10 ganz entscheidend an der proteolytischen Spaltung von E-Cadherin und N-Cadherin beteiligt ist. Mittels Analyse von ADAM10-defizienten Fibroblasten, Inhibitorstudien, RNA-Interferenz-Experimenten und ADAM10-Überexpression konnte gezeigt werden, dass ADAM10 unter konstitutiven Bedingungen für diese Prozessierung verantwortlich ist. Für eine Vielzahl membranständiger Moleküle ist ein konstitutiver und induzierbarer Spaltungsmechanismus beschrieben worden, wobei für viele Proteine eine differentielle Regulation des „Sheddings“ durch ADAM10 und ADAM17 gezeigt wurde. Interessanterweise ist ADAM10 nicht nur an der konstitutiven Cadherin-Spaltung beteiligt, sondern kann auch durch unterschiedliche Stimuli wie PMA oder Ionomycin induziert werden. Ionomycin, ein Kalzium-Ionophor, verursachte eine rapide Freisetzung an löslichem Cadherin innerhalb weniger Minuten. In den Zellüberständen transfizierter MEF-Zellen konnte bereits nach wenigen Minuten die Akkumulation von löslichem Cadherin mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Influx von Kalzium in Zellen ein entscheidender Prozess bei der Wundheilung ist<sup>249,250</sup>. Die hier vorgestellten Ergebnisse könnten einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis dieses Mechanismus auf zellulärer Ebene darstellen.

Inzwischen wurden von uns weitere Cadherine identifiziert, die einer der E- oder N-Cadherin-ähnlichen Prozessierung zu unterliegen scheinen. Hier ist besonders hervorzuheben, dass neben diesen klassischen Cadherinen auch andere Vertreter dieser Gruppe wie die Protocadherine durch Metalloproteasen prozessiert werden. Erste Ergebnisse zeigen, dass Breitband-Metalloprotease-Inhibitoren und spezifische ADAM10-Inhibitoren zu einer Reduktion der Proteolyse der  $\gamma$ -Protocadherine führen. Diese Daten geben bereits einen ersten Hinweis darauf, dass ADAM10 an dieser Prozessierung beteiligt sein könnte. Weitere Untersuchungen sollen die Frage der funktionellen Bedeutung dieser Proteolyse für Zell-Adhäsion, Aggregation, Apoptose und Synapsenbildung klären. Somit könnten weitere Erkenntnisse über die Regulation der Funktion der Protocadherine und über den Einfluss von ADAM10 auf die Spaltung dieses wichtigen Zell-Adhäsionsmoleküls erlangt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse könnten für einen generellen „Sheddingmechanismus“ innerhalb der Gruppe der Cadherine sprechen.



#### 4.2 Die Rolle des ADAM10-vermittelten „N-Cadherin-Sheddings“ in Signalprozessen und der Zell-Zell-Adhäsion

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige neuronale Adhäsionsmolekül N-Cadherin hat pleiotrope Effekte während der Embryonalentwicklung einschließlich der Somitogenese, Herzmorphogenese und der Neuralrohrentwicklung<sup>212,251,252</sup>. Hierbei fördert es unter anderem die Zellaggregation, die Axonbündelung und das Wachstum von Axonen<sup>213,253</sup>. Neben der Identifizierung von ADAM10 als essentielle Protease für die N-Cadherin-Spaltung, konnten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene funktionelle Aspekte dieser Proteolyse aufgeklärt werden. Mittels verschiedener Zell-Adhäsionsassays konnte gezeigt werden, dass die ADAM10-vermittelte Proteolyse entscheidend die N-Cadherin-vermittelte Zell-Adhäsion neuronaler Zellen reguliert. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass ADAM10 auch an der dynamischen Vernetzung neuronaler Zellen *in vivo* beteiligt sein könnte. Dieser Prozess, der auch als „Synaptische Plastizität“ bezeichnet wird, ist die Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge<sup>254</sup>. Dabei werden im Bereich der Synapsen interzelluläre Kontakte aufgebaut, verfestigt oder auch gelöst. Die strukturellen Veränderungen an den Verbindungsstellen der Neuronen, an denen N-Cadherin maßgeblich beteiligt ist, werden fortlaufend von schnellen, biochemischen Modifikationen begleitet<sup>255,256</sup>. Diese Optimierung der Nervenverknüpfungen könnte durch die ADAM10-vermittelte Prozessierung von N-Cadherin beeinflusst werden.

Weiterhin zeigten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass die Immunreaktivität von N-Cadherin auf der Zelloberfläche von ADAM10-defizienten Fibroblasten wesentlich stärker war, als auf entsprechend gefärbten Wildtyp-Fibroblasten. Während diese Befunde, verbunden mit der Tatsache, dass ADAM10 und N-Cadherin ko-immunpräzipitieren, auf eine Interaktion dieser Moleküle hindeuten, stellt sich die *in vivo*-Situation im Embryo komplexer dar. In vergleichenden Untersuchungen der Verteilung von N-Cadherin in Wildtyp- und ADAM10-defizienten Embryonen war der einzige zu beobachtende Unterschied eine verminderte N-Cadherin-Expression in den Somiten der ADAM10-defizienten Embryonen. Trotz der phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen den ADAM10- und N-Cadherin-defizienten Embryonen bezüglich ihrer frühen Letalität, der beeinträchtigten Somitogenese, Herzmorphogenese und der Neuralrohrentwicklung<sup>237</sup> lassen sich die Phänotypen von ADAM10- und N-Cadherin-defizienten Embryonen nur bedingt miteinander vergleichen. Allerdings könnte die Metalloprotease ADAM10 durch die Prozessierung von N-Cadherin während der Embryogenese am Abbau multipler Synapsenbindungen beteiligt sein. Hierbei entwickeln sich zunächst multiple Synapsen zwischen Motoneuronen und Muskelfasern, die

im Laufe der weiteren Entwicklung zu einem Großteil eliminiert werden, bis im adulten Organismus genau eine neuromuskuläre Endplatte pro Muskelfaser existiert<sup>254</sup>. Da die Metalloprotease ADAM10 in der Prozessierung mehrerer entwicklungsbiologisch relevanter Proteine beteiligt ist, lassen die hier dargestellten Ergebnisse darauf schließen, dass der Phänotyp der ADAM10-defizienten Maus höchstwahrscheinlich durch ein Fehlen des „Sheddings“ mehrerer endogener Substrate zustande kommt<sup>199,241,257</sup>.

In der Entwicklung von Organismen sind verschiedene Migrations- und Differenzierungsvorgänge mit dem Wechsel der zellulären Cadherin-Ausstattung verbunden<sup>122,258</sup>. Aber auch Tumorzellen besitzen zum Teil verschiedene Cadherine auf ihrer Oberfläche. So legen Literaturdaten dar, dass verschiedene Karzinomzellen - unabhängig vom Vorhandensein von E-Cadherin - andere Cadherine wie z.B. N- und P-Cadherin exprimieren<sup>259-261</sup>. Das Abschalten oder die funktionelle Inaktivierung von E-Cadherin führt zu einer höheren Mobilität und Invasivität von Karzinomzellen, da letztere nach dem Verlust der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion oft nicht mehr im Gewebeverband zurückgehalten werden<sup>10,262</sup>. Ähnliche Befunde konnten im Zusammenhang mit der Expression von N-Cadherin in Rhabdomyosarkoma-Gewebe gemacht werden<sup>263</sup>. Der Befund, dass ADAM10-vermitteltes „Shedding“ von N-Cadherin die Expression dieses Moleküls auf der Zellmembran reguliert, könnte eine wichtige Voraussetzung für die Migration von Tumoren sein. ADAM10 ist jedoch nicht nur für die Abspaltung der Ektodomäne dieser Proteine verantwortlich, sondern liefert mit dem in der Zellmembran verbleibenden Fragment auch das Ausgangsprodukt für die nachfolgende Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Durch diese weitere Proteolyse kommt es wiederum zur Freisetzung des C-terminal gebundenen  $\beta$ -Catenins, welches auf die Signaltransduktion der Zelle Einfluss nimmt und zu einer erhöhten Expression von Proto-Onkogenen wie z.B. *c-myc*, *Cyclin D1* und *c-jun* führt. Ein weiteres grundlegendes Konzept der molekularen Karzinogenese besteht darin, dass die Kooperation mehrerer aktivierter Onkogene notwendig ist, um einen malignen Phänotyp auszubilden<sup>264</sup>. Die hier vorliegenden Daten belegen, dass ADAM10 durch die Prozessierung der Cadherine ganz entscheidend die Expression von Proto-Onkogenen in der Zelle reguliert. Hierbei hat sich gezeigt, dass ADAM10 die Expression von typischen  $\beta$ -Catenin-Zielgenen wie z.B. *c-myc*, *Cyclin D1* und *c-jun* und damit auch weitere Zellfunktionen beeinflussen kann. Zusammenfassend könnten die hier vorgestellten Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis des invasiv-metastatischen Verhaltens einiger Tumorzellen darstellen.

Zukünftige Studien könnten zeigen, welche funktionelle Bedeutung die Metalloprotease ADAM10 für die Regulation der Migration und Invasion von Karzinomzellen haben könnte.

#### **4.3 Die Bedeutung des ADAM10-vermittelten „E-Cadherin-Sheddings“ für die Zell-Zell-Adhäsion und die zelluläre Signaltransduktion in epithelialen Erkrankungen**

Während der frühen Embryonalentwicklung laufen viele molekulare Prozesse wie etwa Signaltransduktionskaskaden ab, die zur Musterbildung und Achsendeterminierung des Zellhaufens der Präimplantationsstadien führen. Hierbei ist die korrekte Regulation von E-Cadherin zur Etablierung von homophiler Zell-Adhäsion notwendig<sup>265,266</sup>. Trotz der Bedeutung von E-Cadherin bei der Embryogenese im intakten Organismus sowie der veränderten Expression bei der Tumorentstehung, ist jedoch über die Regulation bisher wenig bekannt. Die Funktion von E-Cadherin bei der Zell-Adhäsion muss modulierbar sein, um den Aufgaben der verschiedenen Zelltypen gerecht zu werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hindeuten, dass bei diesen Prozessen posttranslationale Modifikationen von entscheidender Bedeutung sind. Die hier dargestellten Daten lassen vermuten, dass die ADAM10-vermittelte Proteolyse entscheidend die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion nicht nur *in vitro* sondern auch möglicherweise *in vivo* während der Entwicklung des Embryos regulieren könnte.

Auch pathophysiologische Prozesse wie die Wundheilung der Haut setzen sowohl Zellwanderung als auch die Remodellierung der EZM voraus. Beide Prozesse sind für die damit verbundene Reepithelialisierung und Wiederherstellung des darunter liegenden Bindegewebes verantwortlich und setzen somit eine kontrollierte Synthese bzw. Kontrolle proteolytischer Aktivitäten voraus. Für die kutane Wundheilung der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass hierbei wahrscheinlich Progelatinase A durch MT1-MMP und Progelatinase B durch Stromelysin-1 aktiviert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Wundheilung zeigen, dass die Metalloprotease ADAM10 ebenfalls die Migration der Zellen reguliert. Diese Befunde könnten auf einen möglichen Einfluss von ADAM10 auf den Aufbau und die Erhaltung der strukturellen Integrität der Haut hindeuten. *In vivo*-Wundheilungs-Untersuchungen könnten den Einfluss von ADAM10 auf die Wundheilung zeigen. Inzwischen haben weitere Zellkulturversuche mit primären humanen Keratinozyten einen Einfluss inflammatorischer Zytokine auf das ADAM10-vermittelte „E-Cadherin-Shedding“ gezeigt. Immunhistochemische Untersuchungen und Immunoblot-Analysen von Hautproben verschiedener humaner Hauterkrankungen (Ekzeme, Melanom

u.w.) zeigen Unterschiede in der Expression und Prozessierung der Proteine. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Prozessierung von E-Cadherin durch ADAM10 sowohl in gesunden Geweben als auch in epithelialen Erkrankungen von Bedeutung sein könnte. Nachfolgende Untersuchungen im Mausmodell könnten weitere Erkenntnisse über eine *in vivo*-Relevanz dieser Interaktion von ADAM10 und E-Cadherin auf die epidermale Permeabilitätsbarriere geben. Wundheilungsstudien am Mausmodell könnten hier weitere Hinweise auf die Bedeutung von ADAM10 für die epidermale Integrität und Regeneration liefern.

Auch für verschiedene Tumore ist gezeigt worden, dass die Freisetzung der extrazellulären E-Cadherin-Domäne erhöht ist<sup>267-269</sup>. E-Cadherin spielt hier eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung und im besonderen bei der Metastasierung<sup>270,271</sup>. Während dieses Vorgangs werden durch die Tumorzellen sowohl ständig neue Verbindungen zu dem sie umgebenden Gewebe gebildet als auch wieder aufgelöst. Während der frühen Phase der Metastasenbildung müssen die Tumorzellen sich aus dem sie umgebenden Gewebe lösen, während sie im Laufe der weiteren Schritte neue Bindungen z.B. zu den vaskulären Endothelzellen in den Zielorganen eingehen, um dort Tochtergeschwülste zu bilden. Eine Fehlfunktion im Bereich der E-Cadherin-vermittelten interzellulären Bindungen kann im Tumorgewebe durch verschiedene Pathomechanismen verursacht werden: Eine Herunterregulation der E-Cadherin-Expression kann durch Hypermethylierung der Promotorregion (5' CpG-Insel) des *E-Cadherin*-Gens erfolgen<sup>272</sup>. In Tumoren wird häufig eine Heterogenität der verminderten Expression des E-Cadherins beschrieben. Hierfür kann zum einen eine echte zelluläre Heterogenität verantwortlich sein, zum anderen auch eine instabile E-Cadherin-Expression der Tumorzellen, die zum Teil auch von Milieubedingungen abhängen kann<sup>273-275</sup>. Überdies ist das kontrollierte Wechselspiel von Proteolyse und Adhäsions-abhängigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen für die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von entscheidender Bedeutung. Hierbei führt auch ein vermehrter proteolytischer Abbau des E-Cadherin-Moleküls zu einer erhöhten Metastasierung der Tumorzellen<sup>276</sup>. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse könnte die Spaltung von E-Cadherin durch die Metalloprotease ADAM10 auch bei der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen. Die Spaltung von E-Cadherin durch ADAM10 könnte hierbei die epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung fördern. Diese scheint ein wesentliches Charakteristikum von invasiven Tumorzellen zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ADAM10 durch die Prozessierung von E-Cadherin nicht nur die Zell-Adhäsion beeinflusst, sondern ganz entscheidend die Signaltransduktion und die Lokalisierung von  $\beta$ -Catenin innerhalb der

Zelle steuern kann. In Tumoren könnte eine erhöhte Prozessierung von E-Cadherin durch ADAM10 nicht nur die E-Cadherin-vermittelte Zell-Adhäsion beeinflussen, sondern auch zu einer veränderten Lokalisierung von  $\beta$ -Catenin beitragen, was möglicherweise die Invasivität und metastatische Potenz der Tumorzellen beeinflusst<sup>277,278</sup>.

#### 4.4 Die differentielle Regulation des „L1-Sheddings“

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit war, dass das transmembrane L1-Molekül durch die Aktivität von mindestens zwei Vertretern der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen prozessiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von L1 sowohl konstitutiv erfolgt, als auch durch den Phorbolster PMA induzierbar ist, und dass hierbei ADAM10 und ADAM17 weitgehend separate Aufgaben übernehmen. Während ADAM10 als die wichtigste Protease für das konstitutive „Shedding“ identifiziert werden konnte, ist ADAM17 vermutlich an der durch PMA-induzierten Spaltung der Moleküle beteiligt. Die Rolle von ADAM10 wurde vor allem durch den Einsatz von ADAM10-Inhibitoren in verschiedenen Zelllinien sowie durch Transfektion von L1 in ADAM10-defiziente Zellen deutlich. Allerdings hatte die Ausschaltung der ADAM10-Aktivität keinen Einfluss auf die nach PMA-Stimulation vermehrte L1-Freisetzung, welche nur durch die Inhibition von ADAM17 wirksam reduziert wurde. Damit war gezeigt, dass das transmembrane L1 differentiell durch ADAM10 und ADAM17 reguliert wird. Mittlerweile ist für eine Vielzahl transmembraner Moleküle ein konstitutiver und induzierbarer Spaltungsmechanismus beschrieben worden, wobei als Induktoren meistens Phorbolster wie PMA eingesetzt wurden. Interessanterweise stellte man in vielen Fällen, ähnlich wie bei L1, eine differentielle Regulation beider Formen des „Sheddings“ durch ADAM10 und ADAM17 fest, so zum Beispiel für das PrP<sup>200</sup>, das APP<sup>208</sup> oder das Chemokin Fraktalkin<sup>202</sup>. Dennoch scheint eine solche Aufgabenteilung der Metalloproteasen nicht unbedingt die Regel zu sein, da andere Beispiele wie das N-Cadherin oder E-Cadherin zeigen, dass konstitutives und induzierbares „Shedding“ auch von derselben Protease vermittelt werden kann.

Festzuhalten bleibt jedoch auch, dass unabhängig von den verwendeten Stimuli, weder die Inhibitoren noch ADAM10-defiziente Zellen eine vollständige Blockierung der L1-Spaltung bewirken konnten. Es ist daher wahrscheinlich, dass noch andere, bisher nicht identifizierte Metalloproteasen zur Produktion von löslichem L1 beitragen könnten. Um dies näher zu untersuchen, könnten bereits generierte Zelllinien mit Mehrfachdefizienzen für bestimmte Mitglieder der ADAM-Familie verwendet werden, zum Beispiel murine ADAM9/10/15-

defiziente Fibroblasten<sup>279</sup>. Eine weitere wichtige Frage besteht darin, auf welche Weise die Metalloproteasen ihr Substrat erkennen und ob möglicherweise Erkennungs- und Spaltstelle voneinander verschieden sind. Sehr wahrscheinlich ist in den meisten Fällen nicht die Primärsequenz, sondern vielmehr die räumliche Struktur und damit die Zugänglichkeit bestimmter Domänen des Substrats entscheidend für die Ektodomänenabspaltung. Obwohl in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass mit ADAM10 und ADAM17 mindestens zwei Metalloproteasen in das „Shedding“ von L1 involviert sind, bleibt noch unklar, ob die Proteasen dieselbe oder unterschiedliche Spaltstellen nutzen. Die innerhalb dieser Arbeit vorgestellten Western-Blot-Daten für L1 lassen zunächst nur ein einziges lösliches Fragment von ca. 200 kDa vermuten und zwar unabhängig davon, ob es sich um konstitutives oder induziertes „Shedding“ handelt. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass für Proteine dieser Größenordnung Differenzen von nur wenigen kDa mit Hilfe der Western-Blot-Technik nicht aufgelöst werden können und dass im Falle der transmembranen L1-Form die Glykolysierung der extrazellulären Domäne zu einer diffusen Bande führt, die eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts zusätzlich erschwert. Aus diesem Grund könnten weitere Arbeiten die Identifikation der Spaltstellen von L1 mit Hilfe von Proteinsequenzierungstechniken oder mittels Massenspektrometrie sein.

In den vergangenen Jahren gewann für einige Zelloberflächenproteine wie z.B. CD44<sup>280</sup>, Notch<sup>177</sup> oder APP<sup>281</sup> ein neuer Mechanismus der Weiterleitung von Signalen aus der Umgebung an das Innere einer Zelle zunehmend an Bedeutung. Im Gegensatz zu der bisherigen Hypothese, dass die Übertragung von Einflüssen und Stimuli aus dem Umfeld einer Zelle über Rezeptoren in der Plasmamembran und die Weitergabe an das Innere einer Zelle mittels „second messenger-Systemen“ erfolgt, werden die von aktivierten Membranrezeptoren aufgenommenen Signale durch die regulierte Proteolyse des Rezeptormoleküls in der Transmembrandomäne weitergeleitet. Dieser als „Ripping“ bezeichnete Prozess führt zu der Entstehung intrazellulärer von der Membran gelöster bioaktiver Fragmente<sup>243</sup> und stellt eine völlig neue Dimension der Signaltransduktion dar. Der nach der Abspaltung des extrazytosolischen - des luminalen oder extrazellulären - Proteinanteils eines Transmembranproteins entstandene Membranstumpf dient als Substrat für „intramembrane-cleaving proteases“ (iCLiPs). Für die Spaltung von Membranproteinen des Typs 1 ist die sogenannte, den Aspartylproteasen zugehörige,  $\gamma$ -Sekretase verantwortlich. Das Zell-Adhäsionsmolekül L1 zählt ebenfalls zu der Gruppe der Typ I Membranproteine und wird durch die Spaltung seiner extrazellulären Domäne in der Nähe des Membranankers moduliert.

Interessanterweise wird auch, wie die Daten dieser Arbeiten zeigen, das neuronale Adhäsionsmolekül L1 durch eine  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität weiter prozessiert. Das Ergebnis führte zu der Frage, welche Funktion die lösliche intrazelluläre Domäne von L1 im Zytoplasma einer Zelle ausübt und wie sie Einfluss auf die von L1-vermittelten Prozesse nehmen kann. In einer Vielzahl der bereits untersuchten Substrate der iCLiPs wie z.B. APP und Notch wurde gezeigt, dass die durch den Mechanismus der RIP von der Membran gelösten zytoplasmatischen Domänen der Proteine nach ihrer Freisetzung in den Zellkern transportiert werden und dort an der Regulation der Transkription von Genen beteiligt sind<sup>282</sup>. Immunzytochemische Untersuchungen und Immunpräzipitationsexperimente mit Kernfraktionen könnten klären, ob es zu einer Translokation der intrazellulären Spaltprodukte in den Zellkern kommt und ob dieses einen Einfluss auf die Genregulation haben könnte.

Zudem zeigen aktuelle Untersuchungen, dass die Spaltung von L1 für das L1-stimulierte Neuritenwachstum von Bedeutung ist<sup>283</sup>. Hierbei kann die extrazelluläre Domäne von L1 durch *Trans*-Interaktionen in anderen Zellen L1-stimuliertes Neuritenwachstum auslösen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung der extrazellulären Domäne des Moleküls und deren Freisetzung essentiell für das L1-abhängige Neuritenwachstum ist. In Anwesenheit der Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X, die eine inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung des löslichen Fragmentes von L1 ausüben, konnte eine signifikante Reduktion des L1-induzierten Neuritenwachstums nachgewiesen werden. Die Prozessierung neuronaler Zell-Adhäsionsmoleküle scheint für den Prozess des Neuritenwachstums von essentieller Bedeutung zu sein. Nicht nur die Prozessierung des Zell-Adhäsionsmoleküls NCAM, sondern auch lösliche Fragmente des Moleküls CHL-1<sup>284</sup> und des Proteins DCC („deleted in colorectal carcinoma“)<sup>285</sup> sind in den Prozess des Neuritenwachstums involviert. Der posttranslationale Mechanismus der regulierten Prozessierung eröffnet einer Nervenzelle die Möglichkeit, die für den Prozess des Neuritenwachstums charakteristischen massiven und sehr kurzfristigen Modulationen von Zelloberflächenproteinen zu gewährleisten.

Im Zentralen Nervensystem gehört insbesondere der Hippocampus zu den Orten synaptischer Veränderungen. Proteolytische Modifikationen von Proteinen des synaptischen Spaltes sind ein Bestandteil des Regulationssystems des Prozesses der Langzeitpotenzierung, der durch synaptische Plastizität charakterisiert wird. Auch das Zell-Adhäsionsmolekül L1, das in den Vorgang der synaptischen Plastizität involviert zu sein scheint<sup>55</sup>, konnte im synaptischen Spalt lokalisiert werden<sup>286</sup>. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Prozessierung des Zell-Adhäsionsmoleküls L1 zu einer aktivitätsabhängigen Modulation des synaptischen Spaltes

führt und sie somit für das mit dem Hippocampus verknüpfte räumliche Lernen eine essentielle Rolle spielen könnte.

Neben der Beteiligung von L1 am Neuritenwachstum und der Migration von Neuronen wurde die Expression von L1 und die Bildung von L1-Spaltprodukten auch in verschiedenen Tumoren wie z.B. Melanom, Neuroblastom, Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Gliom und bei der monozytären Leukämie nachgewiesen<sup>179,226,231,287-290</sup>. Über die Rolle von L1 ist hierbei noch wenig bekannt, vermutlich beeinflusst L1 aber die Progredienz dieser Tumore. In vielen Karzinomen des Uterus und der Ovarien wird die Metalloprotease ADAM10 mit L1 ko-exprimiert, außerdem korreliert die Anwesenheit von ADAM10 im Tumorgewebe mit löslichem L1 im Serum der Patienten. Darüber hinaus wurde das 32 kDa große zytoplasmatische Spaltfragment von L1 in Tumorlysaten nachgewiesen<sup>291,292</sup>. Diese Daten zeigen, dass L1 *in vivo* gespalten wird und dass die Metalloprotease ADAM10 möglicherweise in die membranproximale Spaltung von L1 involviert ist. Wie die Daten dieser Arbeit zeigen wird die Abgabe von L1 durch die Blockade der Aktivität der spaltenden Proteasen ADAM10 und ADAM17 reduziert und damit auch das Migrationspotential der Zellen beeinträchtigt. Übertragen auf die Situation im Tumorpatienten könnte dies bedeuten, dass vermehrt abgegebenes L1 die Migration der Tumorzellen auf Proteinen der EZM fördert und damit die Bildung von Metastasen begünstigt. Tatsächlich korreliert eine hohe Konzentration von löslichem L1 im Serum der Patienten mit besonders aggressiven Tumoren und einer schlechten Prognose<sup>292</sup>. Damit stellen sowohl L1 als auch ADAM10 mögliche neue Angriffspunkte für die Therapie von verschiedenen Karzinomen dar.

#### **4.5 Funktion des ADAM10-vermittelten „Sheddings“ *in vivo***

Die Natur bedient sich des posttranslationalen Mechanismus der regulierten Proteolyse von Transmembranproteinen um die Diversität und somit auch die Vielfältigkeit der Funktionen dieser Proteine in einem großen Maße zu erhöhen. Die Modulation der extrazellulären Domäne eines Proteins durch regulierte Prozessierung, der daraus resultierenden Spaltung in der Transmembrandomäne und die Freisetzung der intrazellulären Domäne scheint ein fundamentaler Prozess zu sein. So ermöglicht die Prozessierung von Zell-Adhäsionsmolekülen in einem sehr hohen Maße die Modulation der Funktion des Proteins, das durch diese posttranslationale Modifikation von einem Zell-Adhäsionsmolekül mit einem auto- oder parakrinen Wirkungsmechanismus in einen Bestandteil der extrazellulären Matrix mit weitreichenden und nicht nur auf eine einzige Zelle und ihre Umgebung beschränkten



Einfluss umgewandelt werden kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das ADAM10-vermittelte „Shedding“ von verschiedenen Zell-Adhäsionsmolekülen zeigen eine essentielle Bedeutung der Metalloprotease ADAM10 für die Regulation zahlreicher Funktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Signaltransduktion und der Migration von Zellen. ADAM10-defiziente Mäuse zeigen eine pränatale Letalität am Embryonaltag 9,5 und weisen Entwicklungsstörungen auf, die auf eine Beeinträchtigung des Notch-Signalweges hinweisen. In früheren Studien konnte anhand von *in situ*-Hybridisierungsanalysen gezeigt werden, dass eine ADAM10-Defizienz zu einer reduzierten Expression des Notch-Zielgens *hes-5* im Neuralrohr und einer erhöhten Expression des Notch-Liganden *dll-1* führt<sup>199</sup>. Die ADAM10-defizienten Embryonen weisen ein gegenüber Wildtyp-Mäusen vermindertes Wachstum, eine Unterentwicklung des Herzens und eine Verformung des Neuralrohres auf. Weitere Entwicklungsstörungen, die ebenfalls Ähnlichkeit mit dem Notch-Phänotyp aufweisen, werden an der Segmentierungsstörung der Somiten deutlich, die zum Teil über mehrere Segmente verschmolzen sind<sup>199</sup>.

Die hier erhobenen Daten, dass weder N- noch E-Cadherin im ADAM10-defizienten Embryo prozessiert werden, weisen zusätzlich auf eine *in vivo*-Relevanz dieser Interaktionen hin. Während die Akkumulation von E-Cadherin im Organismus möglicherweise zu einer Veränderung des Zellwachstums und einer erhöhten Apoptoserate führen kann, stellt sich die Situation für das N-Cadherin innerhalb der Embryonen komplizierter dar. Da die Metalloprotease ADAM10 für die Prozessierung weiterer entwicklungsbiologisch relevanter Moleküle wie Notch oder EGF verantwortlich ist, lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die veränderte Verteilung von N-Cadherin im ADAM10-defizienten Embryo eine komplexe Situation darstellt, und eine Kombination aus dem beeinträchtigtem „Shedding“ mehrerer Substrate sein könnte. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der Phänotyp der ADAM10-defizienten Maus höchstwahrscheinlich durch ein Fehlen des „Sheddings“ mehrerer endogener Substrate zustande kommt.

Weitere Befunde dieser Arbeit zeigen, dass nicht nur die hier untersuchten Cadherine sondern auch das L1-Molekül nach der Abspaltung der extrazellulären Domäne eine weitere Prozessierung der in der Zellmembran verbleibenden Fragmente durch eine  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität erfährt. Diese Ergebnisse führen zu der Frage, welche Funktionen die löslichen intrazellulären Domänen dieser Moleküle im Zytoplasma einer Zelle ausüben können. In einer Vielzahl der bereits untersuchten Substrate der iCLiPs wie z.B. APP und Notch wurde gezeigt, dass die durch den Mechanismus der RIP von der Membran gelösten zytoplasmatischen Domänen der Proteine nach ihrer Freisetzung in den Zellkern transportiert

werden und dort an der Regulation der Transkription von Genen beteiligt sind. Möglicherweise führt auch die Spaltung der Membranfragmente der hier untersuchten Moleküle, die durch „Shedding“ der extrazellulären Domänen entstehen, und der daraus folgenden Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne, zur Entstehung von in Signaltransduktionsprozessen involvierten und möglicherweise an Regulationsvorgängen im Zellkern beteiligten Mediatoren.

Aktuelle Untersuchungen belegen, dass Adhäsionsmoleküle wie z.B. L1 oder N-Cadherin nicht nur physiologisch von großer Bedeutung sind, sondern eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren spielen und besonders in der Peripherie, der „invasiven Front“ dieser Gewebe exprimiert werden. So geht das Auftreten von löslichen L1-Fragmenten an der invasiven Front von Tumoren einher mit der Expression der Metalloprotease ADAM10 in dieser Region<sup>293</sup>. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, dass ADAM10 das Adhäsionsmolekül L1 prozessiert, könnten dazu beitragen, neue Therapieansätze zur Behandlung von Tumoren zu entwickeln. So wäre ein gezielter Einsatz von spezifischen Metalloprotease-Inhibitoren hier vorstellbar. Zu bedenken wäre allerdings, dass auch physiologische Prozesse, die durch die Metalloprotease ADAM10 vermittelt werden, inhibiert würden. Eine eventuelles Auftreten von Nebenwirkungen und negativen Interaktionen der Inhibitoren wäre hierbei zu berücksichtigen. Auch die Art der Dosierung und das schlechte Löslichkeitsprodukt dieser Inhibitoren in Wasser wäre problematisch. Künftige Untersuchungen könnten zeigen, ob sich L1-Spaltprodukte als Tumormarker für die Diagnostik einsetzen lassen und ob L1 als Ansatzpunkt für die Tumor-Therapie in Frage kommt.

## 5 Zusammenfassung

Aktuelle Untersuchungen zeigen für eine zunehmende Anzahl sezernierter Proteine, dass diese durch Abspaltung („Shedding“) von bestimmten Plasmamembranproteasen freigesetzt werden und in löslicher Form eine wichtige Funktion bei Signaltransduktionsprozessen (parakrine, juxtakrine und autokrine Signale) ausüben. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die gezielte Ausschaltung der bei diesen Prozessen beteiligten Metalloprotease ADAM10 in der Maus zur frühzeitigen Letalität der Tiere am Embryonaltag E 9,5 und einem der Notch1-defizienten Maus-ähnlichen Phänotyp führt. Die Embryonen zeigen bereits in diesem Entwicklungsstadium eine Reihe phänotypischer Auffälligkeiten, die unter anderem durch pathologische Veränderungen des Zentralen Nervensystems, der Somitenbildung und des kardiovaskulären Systems gekennzeichnet sind. Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von ADAM10 als  $\alpha$ -Sekretase bei der Spaltung des amyloiden Vorläuferproteins APP lieferten ein sehr heterogenes Bild mit einer weitgehend unveränderten APP-Prozessierung in den defizienten murinen Fibroblasten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war es, mit Hilfe ADAM10-defizienter Embryonen und daraus abgeleiteter Zelllinien weitere Aufschlüsse über die *in vivo*-Funktionen dieser wichtigen Metalloprotease zu erhalten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Substrate der Metalloprotease ADAM10 zu identifizieren. Außerdem sollte untersucht werden, welchen Regulationsmechanismen die Prozessierung dieser Membranproteine unterliegt.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war die Identifizierung der Metalloprotease ADAM10 als das essentielle Enzym für die E- und N-Cadherin-Prozessierung. Zahlreiche wichtige Befunde führten hierbei zur Klärung der funktionellen Bedeutung dieses Prozesses. Die Analyse von ADAM10-defizienten Fibroblasten, Inhibitorstudien, ADAM10-Überexpression und Stimulationsversuchen zeigten, dass ADAM10 nicht nur unter konstitutiven Bedingungen für diese Prozessierung verantwortlich ist, sondern die ADAM10-vermittelte Cadherin-Spaltung durch verschiedene Stimuli induziert werden kann. Insbesondere war es möglich, diese Befunde in entsprechenden Zelltypen (neuronale Zellen bzw. epitheliale Zellen) zu bestätigen. Neben der Identifizierung von ADAM10 als der essentiellen Protease für die E- und N-Cadherin-Spaltung konnten verschiedene funktionelle

Aspekte dieser Proteolyse im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden. Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsionsassays zeigten, dass die ADAM10-vermittelte Proteolyse entscheidend die E- bzw. N-Cadherin-vermittelte Adhäsion reguliert. ADAM10 ist jedoch nicht nur für die Abspaltung der Ektodomäne dieser Proteine verantwortlich, sondern liefert mit dem in der Zellmembran verbleibenden Fragment auch das Ausgangsprodukt für die nachfolgende Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Durch diese weitere Proteolyse kommt es wiederum zur Freisetzung des C-terminal-gebundenen  $\beta$ -Catenins, welches auf die Signaltransduktion der Zelle Einfluss nimmt. Mittels Immunoblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass ADAM10 durch die Prozessierung der Cadherine ganz entscheidend die Signaltransduktion der Zelle reguliert. ADAM10 beeinflusst die Expression von typischen  $\beta$ -Catenin-Zielgenen und damit auch weitere Funktionen wie die Zellproliferation. Der Befund, dass weder E- noch N-Cadherin im ADAM10-defizienten Embryo prozessiert werden, weist zusätzlich auf eine *in vivo*-Relevanz der Befunde hin.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war die Identifizierung des differentiell regulierten „Sheddings“ des neuronalen Zell-Adhäsionsmoleküls L1 aus der Immunglobulinsuperfamilie durch mindestens zwei Vertreter der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen, nämlich ADAM10 und ADAM17. Durch den Einsatz von Inhibitoren mit einem definierten Wirkungsprofil, die in der Lage waren, die Aktivität der beiden Proteasen differentiell zu hemmen, konnte gezeigt werden, dass ADAM10 die wichtigste Protease für die konstitutive Spaltung von L1 ist. Dieser Befund wurde durch einen Vergleich des „Shedding-Verhaltens“ in Wildtyp- und ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten bestätigt. Auf der anderen Seite wurde auch deutlich, dass ADAM10 nicht an der durch PMA induzierten gesteigerten Freisetzung von L1 beteiligt ist. Inhibitorstudien und Untersuchungen von ADAM17-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten wiesen darauf hin, dass für einen großen Teil dieser induzierten Spaltung ADAM17 verantwortlich ist. Insgesamt ist jedoch nicht auszuschließen, dass in geringem Maße auch noch andere, bisher nicht identifizierte Proteasen, zum „Shedding“ von L1 beitragen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ADAM10 und ADAM17 nicht nur für die Abspaltung der Ektodomäne dieses Moleküls verantwortlich sind, sondern mit dem in der Zellmembran verbleibenden Fragment auch das Ausgangsprodukt für eine nachfolgende Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex liefern. Neben der Identifizierung von ADAM10 und ADAM17 als die essentiellen Proteasen für die differentiell regulierte L1-Spaltung, konnten verschiedene funktionelle Aspekte dieser

Proteolyse aufgeklärt werden. Zell-Substrat-Adhäsionsassays zeigten, dass ADAM10- und ADAM17-vermitteltes „L1-Shedding“ nicht nur zu verminderten Adhäsionseigenschaften L1-exprimierender Zellen führt, sondern auch entscheidend die Migration und das Auswachsen von Neuriten beeinflusst.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten für die hier untersuchten Zell-Adhäsionsmoleküle, dass diese durch limitierte Proteolyse von der Metalloprotease ADAM10 freigesetzt werden. Diese Prozessierungen beeinflussen sowohl entscheidende Funktionen bei Signaltransduktionsprozessen, als auch die Zell-Migration und die Zell-Zell-Adhäsion. Zukünftige Untersuchungen könnten zeigen, welchen Einfluss die ADAM10-vermittelte Proteolyse während der Wundheilung, der embryonalen Entwicklung und der Tumormetastasierung haben könnte.

## 6 Summary

Current studies show that an increasing number of secreted proteins are generated by ectodomain cleavage (shedding) mediated by certain membran proteases. These soluble forms perform important functions in signal transduction processes (paracrine, juxtacrine and autocrine signals). Former studies have shown that the “knock-out” of the metalloprotease ADAM10 in the mouse leads to early lethality of the animals at embryonic day E 9.5 and to a phenotype very similar to the one of the Notch1-deficient mouse. Already in this embryonic stage the embryos show a number of phenotypical features, which are characterized by pathological changes of the central nervous system, the development of the somites and the cardiovascular system. Analyses of a possible role of ADAM10 as an  $\alpha$ -secretase processing the amyloid precursor protein APP supplied a very heterogeneous picture with a largely unchanged APP-processing in the ADAM10-deficient fibroblasts.

The main focus of this work was to gain insight into the *in vivo* functions of this important metalloprotease by means of ADAM10-deficient embryos and ADAM10-deficient cells. A further goal of this work was to identify potential substrates of the metalloprotease ADAM10. Additionally, the regulatory mechanisms that determine the processing of these membran proteins should be analysed.

A substantial result of this work was the identification of the metalloprotease ADAM10 as the major enzyme for the processing of E-cadherin and N-cadherin. Numerous important results could clarify the functional meaning of this process. The analysis of ADAM10-deficient fibroblasts, inhibitor studies, ADAM10 overexpression and stimulation experiments showed that ADAM10 is not only responsible for the constitutive processing, but also for the stimulated shedding, induced through different stimuli. In particular, it was possible to confirm these results in appropriate cell types (neural cells and epithelial cells). Besides the identification of ADAM10 as the essential protease for the E-cadherin and N-cadherin shedding, different functional aspects of this proteolysis could be demonstrated in this work. Cell-cell adhesion assays and cell substrate adhesion assays showed that the ADAM10-mediated proteolysis crucially regulates the E-cadherin and N-cadherin mediated adhesion. However ADAM10 is not only responsible for the release of the ectodomain of these proteins, but also leads to the generation of a transmembrane fragment that can be further processed by the  $\gamma$ -secretase-complex. The latter releases the C-terminal-bound  $\beta$ -Catenin, which exerts

influence on the signal transduction of the cell. By means of immunoblot analysis it could be shown that ADAM10 crucially regulates the signal transduction of the cell by the processing of the cadherins. ADAM10 regulates the expression of typical  $\beta$ -Catenin downstream genes, thereby influencing further functions like cell-proliferation. The result that neither E-cadherin nor N-cadherin are processed in the ADAM10-deficient embryo additionally points to an *in vivo* relevance of these results.

Moreover, another result of this work was the identification of the differentially regulated shedding of the neuronal cell adhesion molecule L1 by at least two members of the disintegrin and metalloprotease family, namely ADAM10 and ADAM17. By using inhibitors with a defined inhibitory profile, that are able to inhibit the activity of the two proteases differentially, it could be shown that ADAM10 is the most important protease for the constitutive shedding of L1. This result was confirmed by comparing of the L1-shedding in wild-type and ADAM10-deficient fibroblasts. On the other hand it also became clear that ADAM10 is not involved in the increased release of L1 induced by PMA. Inhibitor studies and analysis of ADAM17-deficient fibroblasts showed that ADAM17 is the major protease responsible for the induced shedding. Altogether it can not to be ruled out that yet other, so far unidentified proteases, additionally contribute to the shedding of L1. Furthermore, it could be shown that ADAM10 and ADAM17 are not only responsible for the shedding of the ectodomain of this molecule, but also for the generation of a transmembrane L1-fragment, that is further processed by the  $\gamma$ -secretase-complex. Besides the identification of ADAM10 and ADAM17 as the essential proteases for the differentially regulated L1-shedding, different functional aspects of these interactions could be demonstrated. Cell substrate adhesion assays showed that ADAM10 and ADAM17-mediated L1-shedding lead to decreased adhesive properties of L1-expressing cells and they are also crucial for neuronal migration and neurite outgrowth.

Altogether the presented data of this work show that the cell adhesion molecules examined in this work are released by limited proteolysis of the metalloprotease ADAM10. These processings affect crucial functions including signal transduction processes, cell migration and cell-cell adhesion. Moreover, these results implicate that such interactions might be important for processes like woundhealing, embryonic development or also tumor metastasis.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Gumbiner, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357 (1996).
2. Nelson, W.J. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258, 948-955 (1992).
3. Tseng, S.Y. & Dustin, M.L. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 575-580 (2002).
4. Murase, S. & Schuman, E.M. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 549-553 (1999).
5. Chothia, C. & Jones, E.Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 823-862 (1997).
6. Jamora, C. & Fuchs, E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4, E101-E108 (2002).
7. Buckley, C.D., Rainger, G.E., Bradfield, P.F., Nash, G.B. & Simmons, D.L. Cell adhesion: more than just glue (review). *Mol. Membr. Biol.* 15, 167-176 (1998).
8. Juliano, R.L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 283-323 (2002).
9. Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. & Juliano, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50, 197-263 (1998).
10. Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 11-26 (1994).
11. Christofori, G. & Semb, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73-76 (1999).
12. Hynes, R.O. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9, M33-M37 (1999).
13. Zimmermann, P. & David, G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* 13 Suppl, S91-S100 (1999).
14. Blobel, C.P. & White, J.M. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 760-765 (1992).
15. Takeichi, M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* 75, 464-474 (1977).



16. Edelman, G.M. Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. *Exp. Cell Res.* 161, 1-16 (1985).
17. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687 (2002).
18. Diamond, M.S. & Springer, T.A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol.* 4, 506-517 (1994).
19. Eble, J.A. The molecular basis of integrin-extracellular matrix interactions. *Osteoarthritis. Cartilage.* 9 Suppl A, S131-S140 (2001).
20. Dogic, D., Eckes, B. & Aumailley, M. Extracellular matrix, integrins and focal adhesions. *Curr. Top. Pathol.* 93, 75-85 (1999).
21. Turner, C.E. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2, E231-E236 (2000).
22. McEver, R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 581-586 (2002).
23. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259-3287 (1996).
24. Imai, Y., True, D.D., Singer, M.S. & Rosen, S.D. Direct demonstration of the lectin activity of gp90MEL, a lymphocyte homing receptor. *J. Cell Biol.* 111, 1225-1232 (1990).
25. Lasky, L.A. *et al.* Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* 56, 1045-1055 (1989).
26. Wang, J.G. & Geng, J.G. Affinity and kinetics of P-selectin binding to heparin. *Thromb. Haemost.* 90, 309-316 (2003).
27. Pouyani, T. & Seed, B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* 83, 333-343 (1995).
28. Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A. & Engel, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9, 866-873 (1995).
29. Vestweber, D. & Blanks, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 79, 181-213 (1999).
30. Springer, T.A. & Anderson, D.C. The importance of the Mac-1, LFA-1 glycoprotein family in monocyte and granulocyte adherence, chemotaxis, and migration into inflammatory sites: insights from an experiment of nature. *Ciba Found. Symp.* 118, 102-126 (1986).
31. Walsh, F.S. & Doherty, P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 425-456 (1997).

32. Carlos, T.M. & Harlan, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101 (1994).
33. Cunningham, B.A. Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 628-633 (1995).
34. Bogenrieder, T. & Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22, 6524-6536 (2003).
35. Lindner, J., Rathjen, F.G. & Schachner, M. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305, 427-430 (1983).
36. Grumet, M. & Edelman, G.M. Heterotypic binding between neuronal membrane vesicles and glial cells is mediated by a specific cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 98, 1746-1756 (1984).
37. Rathjen, F.G. & Schachner, M. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* 3, 1-10 (1984).
38. Rathjen, F.G., Wolff, J.M., Chang, S., Bonhoeffer, F. & Raper, J.A. Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 51, 841-849 (1987).
39. Volkmer, H., Leuschner, R., Zacharias, U. & Rathjen, F.G. Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *J. Cell Biol.* 135, 1059-1069 (1996).
40. Holm, J. *et al.* Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1613-1629 (1996).
41. Hortsch, M. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol. Cell Neurosci.* 15, 1-10 (2000).
42. Lemmon, V., Farr, K.L. & Lagenaur, C. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603 (1989).
43. Brummendorf, T., Kenwrick, S. & Rathjen, F.G. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 87-97 (1998).
44. Brummendorf, T. & Rathjen, F.G. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 584-593 (1996).
45. Hortsch, M. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17, 587-593 (1996).
46. Primiano, T. *et al.* Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* 4, 41-53 (2003).

47. Seilheimer,B. & Schachner,M. Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J. Cell Biol.* 107, 341-351 (1988).
48. Martini,R., Xin,Y. & Schachner,M. Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture. *Glia* 10, 70-74 (1994).
49. Asou,H., Miura,M., Kobayashi,M., Uyemura,K. & Itoh,K. Cell adhesion molecule L1 guides cell migration in primary reaggregation cultures of mouse cerebellar cells. *Neurosci. Lett.* 144, 221-224 (1992).
50. Fischer,G., Kunemund,V. & Schachner,M. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* 6, 605-612 (1986).
51. Lagenaur,C. & Lemmon,V. An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 7753-7757 (1987).
52. Kunz,S., Ziegler,U., Kunz,B. & Sonderegger,P. Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation. *J. Cell Biol.* 135, 253-267 (1996).
53. Wood,P.M., Schachner,M. & Bunge,R.P. Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.* 10, 3635-3645 (1990).
54. Martini,R. & Schachner,M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell Biol.* 106, 1735-1746 (1988).
55. Luthi,A., Mohajeri,H., Schachner,M. & Laurent,J.P. Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 46, 1-6 (1996).
56. Ruppert,M., Aigner,S., Hubbe,M., Yagita,H. & Altevogt,P. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J. Cell Biol.* 131, 1881-1891 (1995).
57. Ebeling,O. *et al.* L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur. J. Immunol.* 26, 2508-2516 (1996).
58. Friedlander,D.R. *et al.* The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 125, 669-680 (1994).
59. Kadmon,G. & Altevogt,P. The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* 61, 143-150 (1997).
60. Kamiguchi,H. & Lemmon,V. Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J. Neurosci. Res.* 49, 1-8 (1997).

61. Brummendorf,T. *et al.* The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10, 711-727 (1993).
62. DeBernardo,A.P. & Chang,S. Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J. Cell Biol.* 133, 657-666 (1996).
63. Kuhn,T.B., Stoeckli,E.T., Condrau,M.A., Rathjen,F.G. & Sonderegger,P. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* 115, 1113-1126 (1991).
64. Kadmon,G., Kowitz,A., Altevogt,P. & Schachner,M. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 110, 193-208 (1990).
65. Schmidt,C., Kunemund,V., Wintergerst,E.S., Schmitz,B. & Schachner,M. CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J. Neurosci. Res.* 43, 12-31 (1996).
66. Kadmon,G. *et al.* Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 993-1004 (1995).
67. Sammar,M., Aigner,S. & Altevogt,P. Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta* 1337, 287-294 (1997).
68. Fransen,E. *et al.* CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur. J. Hum. Genet.* 3, 273-284 (1995).
69. Fransen,E. *et al.* L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum. Mol. Genet.* 7, 999-1009 (1998).
70. Fransen,E., Van Camp,G., D'Hooge,R., Vits,L. & Willems,P.J. Genotype-phenotype correlation in L1 associated diseases. *J. Med. Genet.* 35, 399-404 (1998).
71. Geiger,B. & Ayalon,O. Cadherins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 307-332 (1992).
72. Tepass,U., Truong,K., Godt,D., Ikura,M. & Peifer,M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 91-100 (2000).
73. Shapiro,L. *et al.* Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327-337 (1995).
74. Nagar,B., Overduin,M., Ikura,M. & Rini,J.M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360-364 (1996).
75. Ranscht,B. & Dours-Zimmermann,M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 7, 391-402 (1991).

76. Angst,B.D., Marcozzi,C. & Magee,A.I. The cadherin superfamily. *J. Cell Sci.* 114, 625-626 (2001).
77. Nollet,F., Kools,P. & Van Roy,F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299, 551-572 (2000).
78. Garrod,D.R., Merritt,A.J. & Nie,Z. Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 537-545 (2002).
79. Koch,P.J. & Franke,W.W. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 682-687 (1994).
80. Chitaev,N.A. & Troyanovsky,S.M. Direct Ca<sup>2+</sup>-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 138, 193-201 (1997).
81. Marcozzi,C., Burdett,I.D., Buxton,R.S. & Magee,A.I. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 4), 495-509 (1998).
82. Gessner,R. & Tauber,R. Intestinal cell adhesion molecules. Liver-intestine cadherin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 136-143 (2000).
83. Berndorff,D. *et al.* Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J. Cell Biol.* 125, 1353-1369 (1994).
84. Thomson,R.B. *et al.* Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J. Biol. Chem.* 270, 17594-17601 (1995).
85. Angres,B., Kim,L., Jung,R., Gessner,R. & Tauber,R. LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development. *Dev. Dyn.* 221, 182-193 (2001).
86. Kreft,B. *et al.* LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. *J. Cell Biol.* 136, 1109-1121 (1997).
87. Thomson,R.B. & Aronson,P.S. Immunolocalization of Ksp-cadherin in the adult and developing rabbit kidney. *Am. J. Physiol* 277, F146-F156 (1999).
88. Wertz,K. & Herrmann,B.G. Kidney-specific cadherin (cdh16) is expressed in embryonic kidney, lung, and sex ducts. *Mech. Dev.* 84, 185-188 (1999).
89. Grotzinger,C. *et al.* LI-cadherin: a marker of gastric metaplasia and neoplasia. *Gut* 49, 73-81 (2001).
90. Frank,M. & Kemler,R. Protocadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 557-562 (2002).
91. Uemura,T. The cadherin superfamily at the synapse: more members, more missions. *Cell* 93, 1095-1098 (1998).

92. Wu,Q. & Maniatis,T. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* 97, 779-790 (1999).
93. Kim,S.H., Jen,W.C., De Robertis,E.M. & Kintner,C. The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. *Curr. Biol.* 10, 821-830 (2000).
94. Kim,S.H., Yamamoto,A., Bouwmeester,T., Agius,E. & Robertis,E.M. The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* 125, 4681-4690 (1998).
95. Yamamoto,A. *et al.* Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spadetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development* 125, 3389-3397 (1998).
96. Ozawa,M. & Kemler,R. Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J. Cell Biol.* 111, 1645-1650 (1990).
97. Haussinger,D. *et al.* Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J.* 23, 1699-1708 (2004).
98. Kimura,Y. *et al.* Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev. Biol.* 169, 347-358 (1995).
99. Aiba,S., Nakagawa,S., Ozawa,H. & Tagami,H. Different expression of E-cadherin by two cutaneous gamma/delta TcR+ T-cell subsets, V gamma 5- and V gamma 5+ gamma/delta TcR+ T cells. *J. Invest Dermatol.* 105, 379-382 (1995).
100. Ozawa,M., Ringwald,M. & Kemler,R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4246-4250 (1990).
101. Stappert,J. & Kemler,R. A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adhes. Commun.* 2, 319-327 (1994).
102. Anastasiadis,P.Z. & Reynolds,A.B. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 604-610 (2001).
103. Gumbiner,B.M. Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11, 551-564 (1993).
104. Orsulic,S., Huber,O., Aberle,H., Arnold,S. & Kemler,R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 8), 1237-1245 (1999).
105. Boller,K., Vestweber,D. & Kemler,R. Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 100, 327-332 (1985).
106. Boyer,B., Valles,A.M. & Edme,N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1091-1099 (2000).

107. Schuh,R. *et al.* Molecular cloning of the mouse cell adhesion molecule uvomorulin: cDNA contains a B1-related sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 1364-1368 (1986).
108. Ogou,S., Okada,T.S. & Takeichi,M. Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* 92, 521-528 (1982).
109. Ohsugi,M. *et al.* Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development. *Dev. Dyn.* 206, 391-402 (1996).
110. Collins,J.E. & Fleming,T.P. Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time. *Trends Biochem. Sci.* 20, 307-312 (1995).
111. Burdsal,C.A., Damsky,C.H. & Pedersen,R.A. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* 118, 829-844 (1993).
112. Huber,O., Bierkamp,C. & Kemler,R. Cadherins and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 685-691 (1996).
113. Butz,S. & Larue,L. Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues. *Cell Adhes. Commun.* 3, 337-352 (1995).
114. Nose,A., Nagafuchi,A. & Takeichi,M. Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *EMBO J.* 6, 3655-3661 (1987).
115. Hatta,K., Takagi,S., Fujisawa,H. & Takeichi,M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev. Biol.* 120, 215-227 (1987).
116. Hatta,K. & Takeichi,M. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* 320, 447-449 (1986).
117. Cepek,K.L. *et al.* Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372, 190-193 (1994).
118. Higgins,J.M. *et al.* Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin. *J. Cell Biol.* 140, 197-210 (1998).
119. Larue,L., Ohsugi,M., Hirchenhain,J. & Kemler,R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8263-8267 (1994).
120. Paradies,N.E. & Grunwald,G.B. Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J. Neurosci. Res.* 36, 33-45 (1993).

121. Nouwen,E.J., Dauwe,S., van,d.B., I & De Broe,M.E. Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int.* 44, 147-158 (1993).
122. Peinado,H., Portillo,F. & Cano,A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365-375 (2004).
123. Islam,S., Carey,T.E., Wolf,G.T., Wheelock,M.J. & Johnson,K.R. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 135, 1643-1654 (1996).
124. Hazan,R.B., Kang,L., Whooley,B.P. & Borgen,P.I. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes. Commun.* 4, 399-411 (1997).
125. Nieman,M.T., Prudoff,R.S., Johnson,K.R. & Wheelock,M.J. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell Biol.* 147, 631-644 (1999).
126. Voura,E.B., Sandig,M. & Siu,C.H. Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc. Res. Tech.* 43, 265-275 (1998).
127. Sandig,M., Voura,E.B., Kalnins,V.I. & Siu,C.H. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 351-364 (1997).
128. Heicappell,R. Cadherins in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 19, 1501-1504 (1999).
129. Alattia,J.R., Kurokawa,H. & Ikura,M. Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 359-367 (1999).
130. Koch,A.W., Bozic,D., Pertz,O. & Engel,J. Homophilic adhesion by cadherins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 275-281 (1999).
131. Leckband,D. & Sivasankar,S. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 587-592 (2000).
132. Nose,A., Nagafuchi,A. & Takeichi,M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54, 993-1001 (1988).
133. Briehner,W.M., Yap,A.S. & Gumbiner,B.M. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J. Cell Biol.* 135, 487-496 (1996).
134. Chitaev,N.A. & Troyanovsky,S.M. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J. Cell Biol.* 142, 837-846 (1998).
135. Takeda,H., Shimoyama,Y., Nagafuchi,A. & Hirohashi,S. E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat. Struct. Biol.* 6, 310-312 (1999).



136. Nose,A., Tsuji,K. & Takeichi,M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61, 147-155 (1990).
137. Blaschuk,O.W., Sullivan,R., David,S. & Pouliot,Y. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev. Biol.* 139, 227-229 (1990).
138. Kitagawa,M. *et al.* Mutation analysis of cadherin-4 reveals amino acid residues of EC1 important for the structure and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 358-363 (2000).
139. Renaud-Young,M. & Gallin,W.J. In the first extracellular domain of E-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved His-Ala-Val motif, are required for adhesion. *J. Biol. Chem.* 277, 39609-39616 (2002).
140. Ringwald,M. *et al.* The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion. *EMBO J.* 6, 3647-3653 (1987).
141. Pokutta,S., Herrenknecht,K., Kemler,R. & Engel,J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur. J. Biochem.* 223, 1019-1026 (1994).
142. Pertz,O. *et al.* A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* 18, 1738-1747 (1999).
143. Tamura,K., Shan,W.S., Hendrickson,W.A., Colman,D.R. & Shapiro,L. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* 20, 1153-1163 (1998).
144. Webb,D.J., Parsons,J.T. & Horwitz,A.F. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4, E97-100 (2002).
145. Vestweber,D. Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 587-593 (2002).
146. Detrick,R.J., Dickey,D. & Kintner,C.R. The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron* 4, 493-506 (1990).
147. Gumbiner,B.M. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* 148, 399-404 (2000).
148. Yap,A.S., Briehar,W.M. & Gumbiner,B.M. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 119-146 (1997).
149. Winkel,G.K., Ferguson,J.E., Takeichi,M. & Nuccitelli,R. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev. Biol.* 138, 1-15 (1990).
150. Behrens,J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 15-30 (1999).

151. Matsuyoshi,N. *et al.* Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J. Cell Biol.* 118, 703-714 (1992).
152. Hamaguchi,M. *et al.* p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J.* 12, 307-314 (1993).
153. Angres,B., Barth,A. & Nelson,W.J. Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. *J. Cell Biol.* 134, 549-557 (1996).
154. Steinberg,M.S. & Takeichi,M. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 206-209 (1994).
155. Briehel,W.M. & Gumbiner,B.M. Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of *Xenopus* animal caps. *J. Cell Biol.* 126, 519-527 (1994).
156. Vestweber,D., Gossler,A., Boller,K. & Kemler,R. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 124, 451-456 (1987).
157. Briehel,W.M., Yap,A.S. & Gumbiner,B.M. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J. Cell Biol.* 135, 487-496 (1996).
158. Adams,C.L., Chen,Y.T., Smith,S.J. & Nelson,W.J. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* 142, 1105-1119 (1998).
159. Burridge,K. & Chrzanowska-Wodnicka,M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 463-518 (1996).
160. Baumgartner,W., Golenhofen,N., Grundhofer,N., Wiegand,J. & Drenckhahn,D. Ca<sup>2+</sup> dependency of N-cadherin function probed by laser tweezer and atomic force microscopy. *J. Neurosci.* 23, 11008-11014 (2003).
161. Baumgartner,W. *et al.* Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4005-4010 (2000).
162. Sivasankar,S., Briehel,W., Lavrik,N., Gumbiner,B. & Leckband,D. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 11820-11824 (1999).
163. Black,R.A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385, 729-733 (1997).
164. Peschon,J.J. *et al.* An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281-1284 (1998).
165. Hafezi-Moghadam,A. & Ley,K. Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 939-948 (1999).

166. Mullberg, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* 23, 473-480 (1993).
167. Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S. & Mullberg, J. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 267, 2624-2631 (2000).
168. Mullberg, J., Althoff, K., Jostock, T. & Rose-John, S. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur. Cytokine Netw.* 11, 27-38 (2000).
169. Kallen, K.J. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 323-343 (2002).
170. Rose-John, S. & Heinrich, P.C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* 300 ( Pt 2), 281-290 (1994).
171. Hooper, N.M., Karran, E.H. & Turner, A.J. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321 ( Pt 2), 265-279 (1997).
172. Fernandez-Botran, R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J.* 5, 2567-2574 (1991).
173. Fernandez-Botran, R. & Vitetta, E.S. Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. *J. Exp. Med.* 174, 673-681 (1991).
174. Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G.I., Jutila, M.A. & Kishimoto, T.K. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92, 809-818 (1998).
175. Walcheck, B. *et al.* Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 380, 720-723 (1996).
176. Nunan, J. & Small, D.H. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 483, 6-10 (2000).
177. de Strooper, B. *et al.* A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522 (1999).
178. Steinhilber, U. *et al.* Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 4972-4980 (2001).
179. Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C. & Altevogt, P. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 16), 2667-2675 (1999).
180. Murphy, F. *et al.* N-Cadherin cleavage during activated hepatic stellate cell apoptosis is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Comp Hepatol.* 3 Suppl 1, S8 (2004).
181. Schlondorff, J. & Blobel, C.P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 21), 3603-3617 (1999).

182. Moss,M.L., White,J.M., Lambert,M.H. & Andrews,R.C. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov. Today* 6, 417-426 (2001).
183. Gould,R.J. *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 168-171 (1990).
184. Bode,W. *et al.* The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 389, 1-11 (1996).
185. Killar,L., White,J., Black,R. & Peschon,J. Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878, 442-452 (1999).
186. Black,R.A. & White,J.M. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 654-659 (1998).
187. Primakoff,P. & Myles,D.G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 16, 83-87 (2000).
188. Moss,M.L. & Lambert,M.H. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem.* 38, 141-153 (2002).
189. Moss,M.L. & Lambert,M.H. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem.* 38, 141-153 (2002).
190. Zheng,Y., Saftig,P., Hartmann,D. & Blobel,C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to TNF $\alpha$  shedding and of the function of the TNF $\alpha$  ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNF $\alpha$  convertase (TACE/ADAM17). *J. Biol. Chem.* (2004).
191. Chantry,A., Gregson,N.A. & Glynn,P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 264, 21603-21607 (1989).
192. Howard,L., Lu,X., Mitchell,S., Griffiths,S. & Glynn,P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem. J.* 317 ( Pt 1), 45-50 (1996).
193. Dallas,D.J. *et al.* Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone. *Bone* 25, 9-15 (1999).
194. Anders,A., Gilbert,S., Garten,W., Postina,R. & Fahrenholz,F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 15, 1837-1839 (2001).
195. Lunn,C.A. *et al.* Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNF $\alpha$  convertase. *FEBS Lett.* 400, 333-335 (1997).
196. Fahrenholz,F., Gilbert,S., Kojro,E., Lammich,S. & Postina,R. Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 215-222 (2000).

197. Kojro,E., Gimpl,G., Lammich,S., Marz,W. & Fahrenholz,F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5815-5820 (2001).
198. Lammich,S. *et al.* Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3922-3927 (1999).
199. Hartmann,D. *et al.* The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2615-2624 (2002).
200. Vincent,B. *et al.* The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* 276, 37743-37746 (2001).
201. Matthews,V. *et al.* Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* 278, 38829-38839 (2003).
202. Hundhausen,C. *et al.* The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102, 1186-1195 (2003).
203. Gearing,A.J. *et al.* Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557 (1994).
204. Arribas,J. *et al.* Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271, 11376-11382 (1996).
205. Solomon,K.A., Pesti,N., Wu,G. & Newton,R.C. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J. Immunol.* 163, 4105-4108 (1999).
206. Althoff,K. *et al.* Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem. J.* 353, 663-672 (2001).
207. Brou,C. *et al.* A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207-216 (2000).
208. Buxbaum,J.D. *et al.* Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765-27767 (1998).
209. Rio,C., Buxbaum,J.D., Peschon,J.J. & Corfas,G. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* 275, 10379-10387 (2000).
210. Merlos-Suarez,A., Fernandez-Larrea,J., Reddy,P., Baselga,J. & Arribas,J. Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J. Biol. Chem.* 273, 24955-24962 (1998).

211. Mullberg, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* 23, 473-480 (1993).
212. Nakagawa, S. & Takeichi, M. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 125, 2963-2971 (1998).
213. Bixby, J.L. & Zhang, R. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 110, 1253-1260 (1990).
214. Utton, M.A., Eickholt, B., Howell, F.V., Wallis, J. & Doherty, P. Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. *J. Neurochem.* 76, 1421-1430 (2001).
215. Fassina, G. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin. Exp. Metastasis* 18, 111-120 (2000).
216. Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. & Thorgeirsson, U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74, 111-122 (1997).
217. Crowe, P.D. *et al.* A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 1205-1210 (1995).
218. Hargreaves, P.G. *et al.* Human myeloma cells shed the interleukin-6 receptor: inhibition by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and a hydroxamate-based metalloproteinase inhibitor. *Br. J. Haematol.* 101, 694-702 (1998).
219. Borland, G., Murphy, G. & Ager, A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 2810-2815 (1999).
220. Fitzgerald, M.L., Wang, Z., Park, P.W., Murphy, G. & Bernfield, M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J. Cell Biol.* 148, 811-824 (2000).
221. Mohammed, F.F. *et al.* Abnormal TNF activity in Timp3(-/-) mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat. Genet.* 36, 969-977 (2004).
222. Amour, A. *et al.* The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett.* 524, 154-158 (2002).
223. Ho, A.T., Voura, E.B., Soloway, P.D., Watson, K.L. & Khokha, R. MMP inhibitors augment fibroblast adhesion through stabilization of focal adhesion contacts and up-regulation of cadherin function. *J. Biol. Chem.* 276, 40215-40224 (2001).
224. Marambaud, P. *et al.* A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114, 635-645 (2003).

225. Richter-Landsberg, C., Lee, V.M., Salton, S.R., Shelanski, M.L. & Greene, L.A. Release of the NILE and other glycoproteins from cultured PC12 rat pheochromocytoma cells and sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 43, 841-848 (1984).
226. Montgomery, A.M. *et al.* Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J. Cell Biol.* 132, 475-485 (1996).
227. Faissner, A. *et al.* Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO J.* 4, 3105-3113 (1985).
228. Sadoul, K., Sadoul, R., Faissner, A. & Schachner, M. Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 50, 510-521 (1988).
229. Liljelund, P., Ghosh, P. & van den Pol, A.N. Expression of the neural axon adhesion molecule L1 in the developing and adult rat brain. *J. Biol. Chem.* 269, 32886-32895 (1994).
230. Wolff, J.M. *et al.* A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 263, 11943-11947 (1988).
231. Gutwein, P. *et al.* Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15490-15497 (2000).
232. Meli, M.L. *et al.* Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 83, 401-408 (1999).
233. Hoefnagel, C.A. *et al.* A comparison of targeting of neuroblastoma with mIBG and anti L1-CAM antibody mAb chCE7: therapeutic efficacy in a neuroblastoma xenograft model and imaging of neuroblastoma patients. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 359-368 (2001).
234. Nybroe, O., Dalseg, A.M. & Bock, E. A developmental study of soluble L1. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8, 273-281 (1990).
235. Ludwig, A. *et al.* Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 8, 161-171 (2005).
236. Rabinowitz, M.H. *et al.* Design of selective and soluble inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE). *J. Med. Chem.* 44, 4252-4267 (2001).
237. Radice, G.L. *et al.* Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev. Biol.* 181, 64-78 (1997).
238. Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M. & Huovila, A.P. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol. Cell Neurosci.* 15, 547-560 (2000).
239. Nelson, W.J. & Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487 (2004).

240. Ito, K. *et al.* Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* 18, 7080-7090 (1999).
241. Gutwein, P. *et al.* ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17, 292-294 (2003).
242. Mechtersheimer, S. *et al.* Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155, 661-673 (2001).
243. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. & Goldstein, J.L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398 (2000).
244. de Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12 (2003).
245. Weidemann, A. *et al.* Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126 (1989).
246. Weidemann, A. *et al.* A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825-2835 (2002).
247. de Strooper, B. *et al.* Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390 (1998).
248. Herreman, A. *et al.* Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 11872-11877 (1999).
249. Stanisstreet, M. Calcium and wound healing in *Xenopus* early embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 67, 195-205 (1982).
250. Tran, P.O., Tran, Q.H., Hinman, L.E. & Sammak, P.J. Co-ordination between localized wound-induced Ca<sup>2+</sup> signals and pre-wound serum signals is required for proliferation after mechanical injury. *Cell Prolif.* 31, 155-170 (1998).
251. Linask, K.K. *et al.* N-cadherin/catenin-mediated morphoregulation of somite formation. *Dev. Biol.* 202, 85-102 (1998).
252. Linask, K.K., Knudsen, K.A. & Gui, Y.H. N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Dev. Biol.* 185, 148-164 (1997).
253. Chen, Q., Chen, T.J., Letourneau, P.C., Costa, L.F. & Schubert, D. Modifier of cell adhesion regulates N-cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 25, 281-290 (2005).
254. Waites, C.L., Craig, A.M. & Garner, C.C. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 251-274 (2005).



255. Bi,G. & Poo,M. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 139-166 (2001).
256. Berninger,B. & Bi,G.Q. Synaptic modification in neural circuits: a timely action. *Bioessays* 24, 212-222 (2002).
257. Maretzky,T. *et al.* ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 9182-9187 (2005).
258. Radisky,D.C. Epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 118, 4325-4326 (2005).
259. Luo,J., Lubaroff,D.M. & Hendrix,M.J. Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res.* 59, 3552-3556 (1999).
260. Mialhe,A. *et al.* Expression of E-, P-, n-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *J. Urol.* 164, 826-835 (2000).
261. Knudsen,K.A. *et al.* Lack of correlation between serum levels of E- and P-cadherin fragments and the presence of breast cancer. *Hum. Pathol.* 31, 961-965 (2000).
262. Takeichi,M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 806-811 (1993).
263. Soler,A.P., Johnson,K.R., Wheelock,M.J. & Knudsen,K.A. Rhabdomyosarcoma-derived cell lines exhibit aberrant expression of the cell-cell adhesion molecules N-CAM, N-cadherin, and cadherin-associated proteins. *Exp. Cell Res.* 208, 84-93 (1993).
264. Polsky,D. & Cordon-Cardo,C. Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22, 3087-3091 (2003).
265. Larue,L., Ohsugi,M., Hirchenhain,J. & Kemler,R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8263-8267 (1994).
266. Riethmacher,D., Brinkmann,V. & Birchmeier,C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 855-859 (1995).
267. Shirahama,S., Furukawa,F., Wakita,H. & Takigawa,M. E- and P-cadherin expression in tumor tissues and soluble E-cadherin levels in sera of patients with skin cancer. *J. Dermatol. Sci.* 13, 30-36 (1996).
268. Shariat,S.F., Matsumoto,K., Casella,R., Jian,W. & Lerner,S.P. Urinary levels of soluble e-cadherin in the detection of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur. Urol.* 48, 69-76 (2005).
269. Juhasz,M. *et al.* Dual role of serum soluble E-cadherin as a biological marker of metastatic development in gastric cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 38, 850-855 (2003).

270. Harigopal,M., Berger,A.J., Camp,R.L., Rimm,D.L. & Kluger,H.M. Automated quantitative analysis of E-cadherin expression in lymph node metastases is predictive of survival in invasive ductal breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 4083-4089 (2005).
271. Okegawa,T., Pong,R.C., Li,Y. & Hsieh,J.T. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim. Pol.* 51, 445-457 (2004).
272. Graff,J.R., Gabrielson,E., Fujii,H., Baylin,S.B. & Herman,J.G. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J. Biol. Chem.* 275, 2727-2732 (2000).
273. Hashimoto,M., Niwa,O., Nitta,Y., Takeichi,M. & Yokoro,K. Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 459-463 (1989).
274. Mareel,M. & Van Roy,F. [The human E-cadherin/catenin complex: a potent invasion and tumor suppressor]. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* 60, 567-598 (1998).
275. Mareel,M.M. *et al.* Down-regulation of E-cadherin expression in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int. J. Cancer* 47, 922-928 (1991).
276. Katayama,M. *et al.* Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br. J. Cancer* 69, 580-585 (1994).
277. Kadowaki,T. *et al.* E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res.* 54, 291-296 (1994).
278. Takayama,T. *et al.* Beta-catenin expression in human cancers. *Am. J. Pathol.* 148, 39-46 (1996).
279. Sahin,U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769-779 (2004).
280. Murakami,D. *et al.* Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* 22, 1511-1516 (2003).
281. Cao,X. & Sudhof,T.C. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120 (2001).
282. Kopan,R. & Ilagan,M.X. Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 499-504 (2004).
283. Kalus,I., Schnegelsberg,B., Seidah,N.G., Kleene,R. & Schachner,M. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 278, 10381-10388 (2003).
284. Naus,S. *et al.* Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 16083-16090 (2004).

285. Galko,M.J. & Tessier-Lavigne,M. Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* 289, 1365-1367 (2000).
286. Matsumoto-Miyai,K. *et al.* NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J. Neurosci.* 23, 7727-7736 (2003).
287. Linnemann,D., Edvardsen,K. & Bock,E. Developmental study of the cell adhesion molecule L1. *Dev. Neurosci.* 10, 34-42 (1988).
288. Patel,K., Kiely,F., Rathjen,F. & Kemshead,J. Monoclonal antibody UJ127.11 recognizes the human homologue of mouse L1 cell adhesion molecule. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 274 (1990).
289. Reid,R.A. & Hemperly,J.J. Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J. Mol. Neurosci.* 3, 127-135 (1992).
290. Katayama,M. *et al.* Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct. Funct.* 22, 511-516 (1997).
291. Fogel,M. *et al.* L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362, 869-875 (2003).
292. Fogel,M. *et al.* L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett.* 189, 237-247 (2003).
293. Gavert,N. *et al.* L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J. Cell Biol.* 168, 633-642 (2005).

## 8 Veröffentlichungen

### Veröffentlichung 1

Reiss K, Marezky T\*, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P.  
ADAM10 cleavage of N-Cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. EMBO J. 2005 Feb 23;24(4):742-52. (\* gleichberechtigter Erstautor)

### Veröffentlichung 2

Marezky T, Reiss K\*, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P.  
ADAM10 mediates E-Cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 28;102(26):9182-7.  
(\*gleichberechtigte Erstautorin)

### Veröffentlichung 3

Marezky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K.  
L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin/ $\gamma$ -Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion, Cell Migration, and Neurite Outgrowth. Mol Cell Biol. 2005 Oct;25(20):9040-53.

# ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell–cell adhesion and $\beta$ -catenin nuclear signalling

Karina Reiss<sup>1,3</sup>, Thorsten Maretzky<sup>1,3</sup>,  
Andreas Ludwig<sup>1</sup>, Thomas Tousseyn<sup>2</sup>,  
Bart de Strooper<sup>2</sup>, Dieter Hartmann<sup>2</sup>  
and Paul Saftig<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biochemical Institute, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany and <sup>2</sup>Department for Human Genetics, KU Leuven and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB-4), Leuven, Belgium

**Cadherins are critically involved in tissue development and tissue homeostasis. We demonstrate here that neuronal cadherin (N-cadherin) is cleaved specifically by the disintegrin and metalloproteinase ADAM10 in its ectodomain. ADAM10 is not only responsible for the constitutive, but also for the regulated, shedding of this adhesion molecule in fibroblasts and neuronal cells directly regulating the overall levels of N-cadherin expression at the cell surface. The ADAM10-induced N-cadherin cleavage resulted in changes in the adhesive behaviour of cells and also in a dramatic redistribution of  $\beta$ -catenin from the cell surface to the cytoplasmic pool, thereby influencing the expression of  $\beta$ -catenin target genes. Our data therefore demonstrate a crucial role of ADAM10 in the regulation of cell–cell adhesion and on  $\beta$ -catenin signalling, leading to the conclusion that this protease constitutes a central switch in the signalling pathway from N-cadherin at the cell surface to  $\beta$ -catenin/LEF-1-regulated gene expression in the nucleus.**

*The EMBO Journal* (2005) **24**, 742–752. doi:10.1038/sj.emboj.7600548; Published online 3 February 2005

**Subject Categories:** cell & tissue architecture; signal transduction

**Keywords:** ADAM10; cell adhesion; N-cadherin; nuclear signalling; shedding

## Introduction

Neuronal cadherin (N-cadherin A-CAM) belongs to a family of intercellular adhesion molecules that mediate calcium-dependent cell–cell adhesion through homophilic interaction. Cadherins are essential for cell recognition and tissue morphogenesis, as well as for the maintenance of solid tissue (Takeichi, 1991; Gumbiner, 1996). Like the other classical type I cadherins, E- and P-cadherin, N-cadherin contains a large N-terminal extracellular region which consists of five tandem

repeated domains (EC1–EC5). The conserved cytoplasmic domains of cadherins interact with  $\beta$ -catenin, which in turn is linked to the cytoskeleton.  $\beta$ -Catenin plays a key role in the transduction of the Wnt signals, acting as coactivator for the transcription factor lymphocyte enhancer binding factor-1 (LEF-1). N-cadherin is critically involved in heart tube formation, neurulation and somitogenesis (Radice *et al.*, 1997), and in connective tissue remodelling and wound healing (Gabbiani, 1981; Van Hoorde *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 2001).

The release of the extracellular domain, which contains the homophilic binding sites, is functionally of major importance for the regulation of cell adhesion, cell migration and neurite outgrowth (Paradies and Grunwald, 1993; Nakagawa and Takeichi, 1998). This ectodomain cleavage of N-cadherin can be inhibited with MMP inhibitors, including the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). TIMPs promote fibroblast adhesion through stabilisation of focal adhesion contacts, which is correlated with an increase in N-cadherin expression at the cell surface (Ho *et al.*, 2001). The extracellular domain released through metalloproteinase activity has been shown to retain biological function and to promote neuronal cell adhesion and neurite outgrowth (Bixby and Zhang, 1990; Paradies and Grunwald, 1993; Utton *et al.*, 2001). The nature of the N-cadherin ectodomain-generating protease is unknown. This is also of importance since the proteolytic ectodomain cleavage leads to a membrane-bound carboxy-terminal fragment which is a substrate for regulated intramembrane proteolysis (RIP) (Marambaud *et al.*, 2003).

In this process, the carboxy-terminal membrane-bound fragment becomes a substrate for a presenilin/ $\gamma$ -secretase-mediated intramembrane proteolysis, resulting in the release of the cytoplasmic carboxy-terminal fragment. In case of N-cadherin, this intracellular fragment is apparently involved in signal transduction, since it promotes in a not yet clarified way the degradation of the transcriptional coactivator CREB-binding protein (CBP) (Marambaud *et al.*, 2003). The regulation of RIP (e.g. Notch, APP, CD44) is thought to occur at the level of the first ectodomain-shedding processing step.

This observation, especially when combined with the fact that also other RIP substrates are cleaved by similar proteases, suggested to us that a member of the disintegrin and metalloprotease (ADAM) family is involved in the ectodomain cleavage of N-cadherin. The ADAMs are a family of type I transmembrane proteins and combine features of both cell adhesion molecules and proteinases. They play important roles in fertilisation, neurogenesis and angiogenesis (Blobel, 2000), and they are involved in the shedding of various membrane-bound proteins, including cytokines, growth factors and adhesion molecules (Schlondorff and Blobel, 1999; Seals and Courtneidge, 2003). ADAM10 and ADAM17 (TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE)) have been studied in particular in the context of ectodomain shedding. They are involved in the proteolysis of various substrates such as Notch, EGF ligands, APP and fractalkine (Lammich *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2002; Hundhausen *et al.*, 2003; Sahin *et al.*, 2004).

\*Corresponding author. Biochemical Institute, Christian-Albrechts-University Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel, Germany.  
Tel.: +49 431 880 2216; Fax: +49 431 880 2238;  
E-mail: psaftig@biochem.uni-kiel.de

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work

Received: 23 August 2004; accepted: 10 December 2004; published online: 3 February 2005

In the present study, we focused on the potential role of different ADAMs in N-cadherin shedding. We demonstrate that ADAM10 is the major proteinase responsible for N-cadherin ectodomain cleavage in fibroblasts and neuronal cells. We demonstrate further how ADAM10 activity regulates cell adhesion and importantly affects  $\beta$ -catenin signalling, resulting in the expression of cyclin D1, c-myc and c-jun. Our results link extracellular protein cleavage to the regulation of intracellular processes, thereby establishing the couple ADAM10/N-cadherin as a central switch in mediating signals from the extracellular matrix to the nucleus.

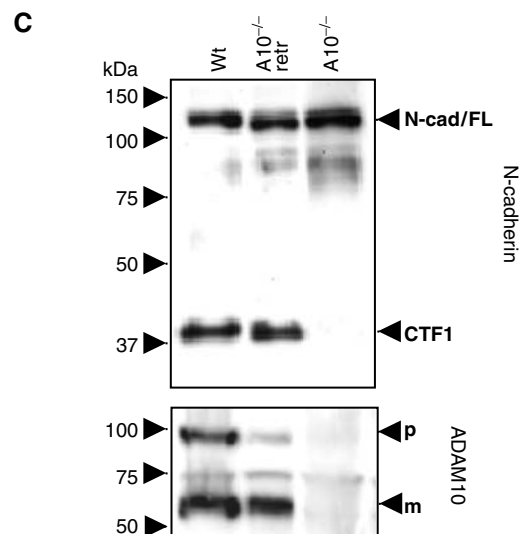
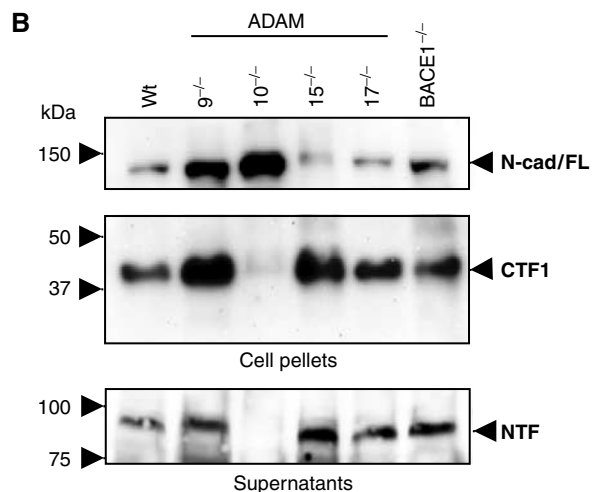
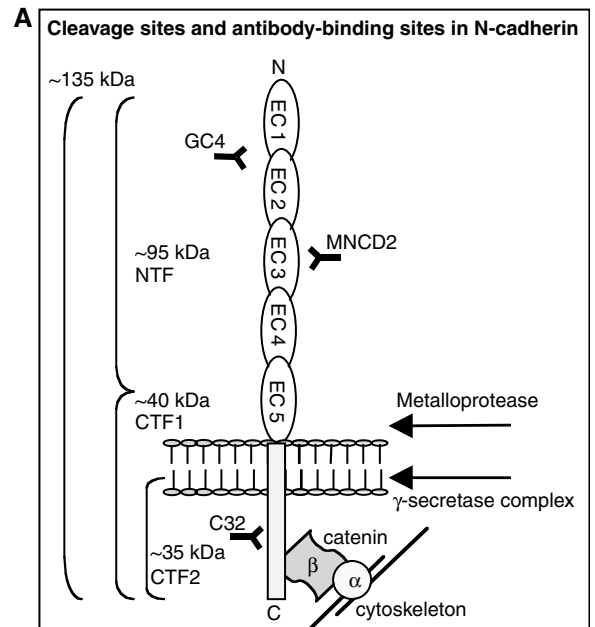
## Results

### ADAM10 is responsible for ectodomain shedding of N-cadherin

The full-length 135 kDa N-cadherin protein is cleaved in the extracellular domain by metalloproteinase activity, generating a 40 kDa C-terminal fragment termed CTF1, which can be further processed by a  $\gamma$ -secretase-like activity into a soluble 35 kDa CTF2 (Figure 1A). Recently, Marambaud *et al* (2003) showed that CTF2 is strongly diminished but not absent in fibroblasts deficient for presenilin 1 (PS1), a component of the  $\gamma$ -secretase complex. We confirmed these findings and additionally demonstrated that the remaining proteolytic activity was due to presenilin 2 (PS2) by comparing PS1 and PS1/2 double-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and analysing these cells by Western blot analysis using monoclonal antibodies against the C-terminal part of mouse N-cadherin (Supplementary Figure A).

In order to identify the protease responsible for the first, rate-limiting processing step in the RIP of N-cadherin, we compared a panel of ADAM-deficient fibroblasts (Hartmann *et al*, 2002; Weskamp *et al*, 2002; Horiuchi *et al*, 2003) in a similar assay. We also included fibroblasts from BACE1-deficient mice since BACE is a sheddase responsible for the cleavage of APP and PSGL-1 (Lichtenthaler *et al*, 2003). To avoid the rapid processing of the CTF1 by  $\gamma$ -secretase, we included the  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 in our assays. As shown in Figure 1B, only ADAM10-deficient fibroblasts showed a clear reduction in the generation of the N-cadherin CTF1 (Figure 1B, upper panel, lane 3). Accordingly, the

proteolytically released ectodomain was detectable in the supernatants of the analysed cell lines, but was absent in the supernatant of ADAM10-deficient cells (Figure 1B, lower

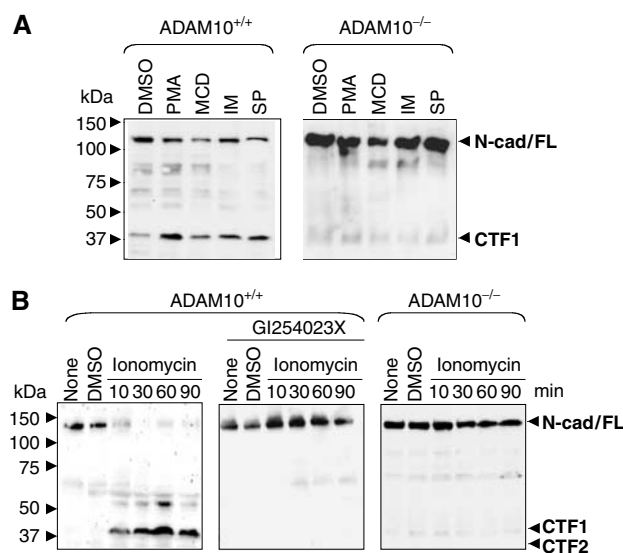


**Figure 1** Involvement of ADAM10 in N-cadherin processing. (A) Schematic representation of N-cadherin cleavage sites and antibody-binding regions. Full-length 135 kDa N-cadherin is cleaved by metalloproteinase activity in N-terminal 95 kDa fragments (NTF) and C-terminal 40 kDa fragments (CTF1), which can be further processed by  $\gamma$ -secretase-like activity in soluble 35 kDa fragments (CTF2). (B) Constitutive N-cadherin cleavage is reduced in ADAM10<sup>-/-</sup> fibroblasts. MEFs were preincubated with  $\gamma$ -secretase inhibitor (0.5  $\mu$ M) overnight and harvested. Immunoblot with total cell extracts from ADAM9<sup>-/-</sup>, ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup> and ADAM17<sup>-/-</sup> fibroblasts, BACE1<sup>-/-</sup> cells and wild-type MEFs stained with C-terminal anti-N-cadherin antibody. Supernatants of these cells were also subjected to Western blot analysis using N-terminal anti-N-cadherin antibodies (MNCD2). N-Cad/FL: full-length N-cadherin; CTF: carboxy-terminal fragment of N-cadherin; NTF: N-terminal fragment of N-cadherin; WT: wild-type MEFs. (C) ADAM10-deficient cells were stably retransfected with wild-type ADAM10 (A10<sup>-/-</sup> retr) and compared with wild-type and ADAM10-deficient MEFs for N-cadherin expression in the presence of  $\gamma$ -secretase inhibitor (0.5  $\mu$ M). N-cad/FL: full-length N-cadherin; CTF: C-terminal fragment of N-cadherin; NTF: N-terminal fragment of N-cadherin; p: precursor of ADAM10; m: mature form of ADAM10.

panel, lane 3). Considering the minor differences in N-cadherin expression in these different cell lines, we also quantified the amount of CTF1 as percentage of 'total' N-cadherin (full-length N-cadherin plus N-cadherin/CTF1) by densitometric analysis (Supplementary Figure B), making the reduced shedding in ADAM10-deficient cells even more apparent. We confirmed this observation in three independently derived ADAM10-deficient cell lines (Hartmann *et al*, 2002), (Supplementary Figure C). Additional strong corroborative evidence came from genetic reconstitution assays: N-cadherin shedding could be completely restored in these cells after transfection of wild-type ADAM10 (Figure 1C). Finally, we confirmed the findings also by pharmacological means using the hydroxamate-based inhibitors GW280623X (blocking ADAM10 and TACE) and GI254023X (preferentially blocking ADAM10) (Hundhausen *et al*, 2003). Both inhibitors reduced the ectodomain shedding of N-cadherin in wild-type fibroblasts in a dose-dependent manner, confirming the essential role of ADAM10 in this process (Supplementary Figure D). In the absence of  $\gamma$ -secretase inhibitor, ADAM10 inhibition did not only correlate with a decrease of CTF1 but also with a decrease of CTF2 (Supplementary Figure E), illustrating a sequence of proteolytic events.

#### ADAM10 is also crucial for induced shedding of N-cadherin

In general, shedding of proteins can occur in a constitutive and regulated fashion. ADAM17 has been implied in the regulated shedding of many membrane-bound proteins (Hundhausen *et al*, 2003; Sahin *et al*, 2004), and we therefore set out to analyse in more detail regulated shedding of N-cadherin. Stimulation of protein kinase C (PKC) using phorbol ester phorbol-12 myristate 13-acetate (PMA) (Hooper *et al*, 1997) as well as depletion of cholesterol using cyclo-dextrin (MCD) strongly induced N-cadherin shedding in wild-type fibroblasts (Figure 2A). Staurosporine (SP), which induces apoptosis and has been previously implicated in the activation of metalloproteinase-mediated cleavage of E-cadherin (Marambaud *et al*, 2002), also stimulated N-cadherin shedding. Also, ionomycin (IM), an agent that promotes shedding of cadherins through stimulation of calcium influx (Marambaud *et al*, 2002), increased CTF1 production in wild-type cells. This clearly established that N-cadherin cleavage is regulated by several signalling pathways, including PKC and  $Ca^{2+}$ -regulated ones. We next addressed to what extent this inducible cleavage was depending on ADAM10 or on other proteases by analysing the effects of these different compounds in ADAM10-deficient cells. If another protease (e.g. TACE) is responsible for the induction of N-cadherin shedding, we expected to observe a partial restoration of CTF1 generation. This was, however, not the case (Figure 2A), and we therefore conclude that ADAM10 is required for the induction of N-cadherin cleavage. Extracellular calcium influx, which can be induced by mechanical stimulation of cells (Ko *et al*, 2001), has important physiological relevance during wound healing and tissue remodelling after injury. Therefore, we investigated this aspect in more detail. In wild-type cells, IM induced a rapid accumulation of the CTF1 within minutes (Figure 2B, left panel). This effect was completely blocked with the ADAM10 inhibitor GI254023X (Figure 2B, middle panel) and in ADAM10-deficient cells (Figure 2B, right panel). Taken together, these results demonstrate that

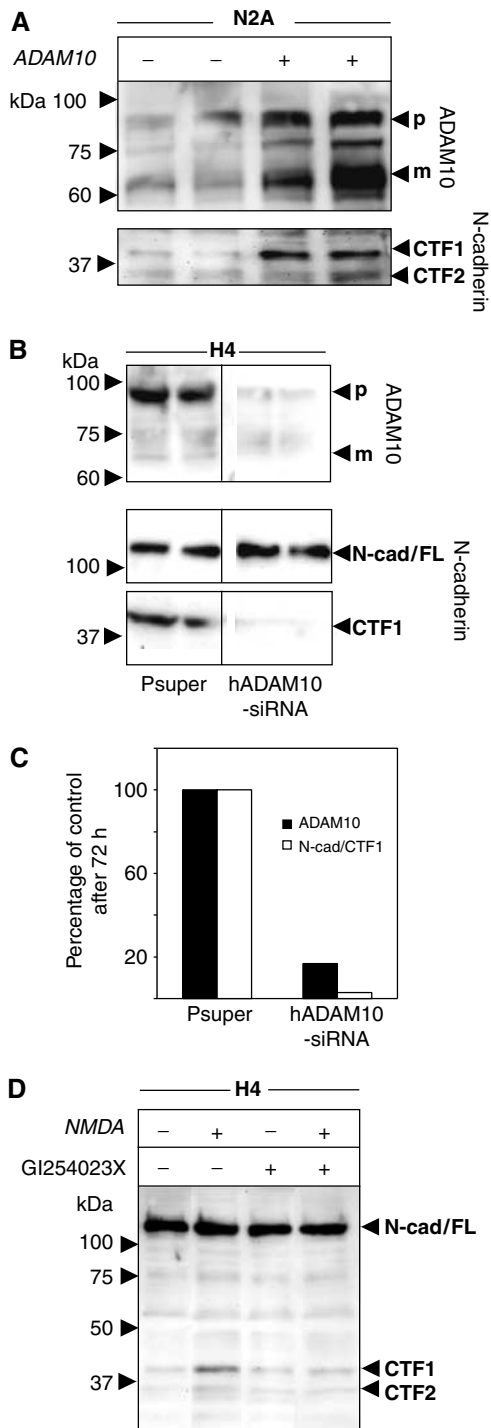


**Figure 2** ADAM10 involvement in stimulated N-cadherin shedding. (A) Effect of different stimuli on N-cadherin shedding. Cells were stimulated with PMA (100 ng/ml), MCD (10 mM) or vehicle control (DMSO) for 4 h, with IM (5  $\mu$ M) for 30 min or with SP (1  $\mu$ M) for 6 h in the presence of  $\gamma$ -secretase inhibitor (0.5  $\mu$ M). Subsequently, cell pellets were lysed and subjected to N-cadherin (C-terminal) Western blot analysis. (B) IM-induced N-cadherin shedding occurred in wild-type but not in ADAM10-deficient fibroblasts. Cells were stimulated with 5  $\mu$ M IM or vehicle control (DMSO) for different periods in the presence or absence of GI254023X. Cell pellets were harvested and analysed by Western blotting using C-terminal anti-N-cadherin antibodies. N-Cad/FL: full-length N-cadherin; CTF: C-terminal fragment of N-cadherin.

ADAM10 is the major proteinase responsible for constitutive, and also for, induced N-cadherin shedding.

#### ADAM10-dependent N-cadherin cleavage in neuronal cells

N-cadherin, like ADAM10, is predominantly expressed in neuronal cells (Radice *et al*, 1997; Karkkainen *et al*, 2000) and promotes possibly axonal outgrowth and regulation of synaptogenesis (Huntley, 2002). Like MEFs, mouse neuroblastoma N2a cells and human neuroglioma H4 cells express both the full-length N-cadherin form (not shown) and the 40 kDa CTF1 proteolytic fragment (Figure 3A). Upon ADAM10 overexpression (Figure 3A, upper panel), an increased level of N-cadherin CTF1 was observed (Figure 3A, lower panel). A similar increase of CTF1 after overexpression of ADAM10 could also be observed in human neuronal H4 cells (not shown). We finally confirmed the role of endogenously expressed ADAM10 in N-cadherin shedding in neuronal cells using vector-based RNA interference (RNAi) (Brummelkamp *et al*, 2002). After 72 h, ADAM10 levels dropped to 15% as compared to mock-transfected cells (Figure 3B and C). CTF1 was decreased to a similar extent (Figure 3B and C). N-cadherin is physically associated with N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors in large, multi-protein complexes (Husi *et al*, 2000). It has been speculated that NMDA receptor activation may provide a signal that regulates the molecular configuration of synaptic N-cadherin, and therefore the strength of adhesion across the synaptic cleft. Direct stimulation of the NMDA receptor after application of NMDA in H4 neuronal cells resulted in an increased



**Figure 3** ADAM10-mediated N-cadherin shedding in neuronal cells. (A) Overexpression of ADAM10 protein in mouse N2A cells. Cells were transiently transfected with ADAM10 or empty vector. Subsequently, cells were lysed and analysed by Western blotting using anti-ADAM10 antibodies. The same blot was reprobed with anti-N-cadherin antibodies. (B) H4 cells were transiently transfected with pSUPER-ADAM10 siRNA or empty vector. Cell pellets were harvested 72 h after transfection and analysed for ADAM10 expression. Membranes were reprobed with anti-N-cadherin antibodies. (C) Densitometric analysis of (B). (D) H4 cells were incubated in the presence or absence of NMDA (50  $\mu$ M) and the ADAM10 inhibitor GI254023X (5  $\mu$ M) for 30 min.

generation of CTF1 and CTF2 N-cadherin fragments. This stimulation was lost after simultaneous addition of the ADAM10 inhibitor GI254023X (Figure 3D), indicating that

the ADAM10-mediated N-cadherin ectodomain cleavage can be modulated by the presence of neurotransmitters and might influence synaptic plasticity.

#### Cadherin-mediated cell-cell adhesion is upregulated in ADAM10-deficient fibroblasts

The adhesion between ADAM10-deficient cells was much stronger, as indicated by failures to mechanically disrupt cell aggregates, which was easily achieved in wild-type fibroblasts (Figure 4A). Since an increased N-cadherin cell surface expression enhances cell adhesion (Steinberg and Takeichi, 1994; Yap *et al*, 1997b), we next investigated to what extent ADAM10 could be involved in the regulation of cell surface expression of N-cadherin. For this purpose, cells were stained with antibodies against the extracellular region of N-cadherin (GC4, Figure 4B). In comparison to wild-type cells, ADAM10-deficient fibroblasts showed an increased expression of full-length N-cadherin at the cell surface as determined by flow-cytometric analysis (Figure 4B). To elucidate the relevance of this increase for cell-cell adhesion, calcein-stained wild-type and ADAM10-deficient cells were seeded on top of an unstained monolayer of corresponding cells in the presence or absence of EGTA, the inhibitory N-cadherin antibody GC4 or the corresponding isotype control. After 20 min incubation, nonadherent cells were washed away and the remaining fluorescent cells were quantified (Figure 4C). While the  $Ca^{2+}$ - and N-cadherin-independent adhesions were comparable, ADAM10-deficient cells showed an increased N-cadherin-dependent cell-cell adhesion. We confirmed this result in a cell-substrate adhesion assay (Figure 4D). For this assay, 96-well plates were coated with recombinant N-cadherin or buffer overnight, and afterwards the adhesion of wild-type and ADAM10-deficient cells was analysed after 20 min incubation. Likewise, this assay demonstrated an increased N-cadherin-mediated adhesion in ADAM10-deficient cells.

#### ADAM10 colocalises with N-cadherin and affects its distribution in fibroblasts

ADAM10 staining has already been described in different cell types to be localised in the Golgi apparatus and at the cell surface (Lammich *et al*, 1999; Gutwein *et al*, 2003). This holds also true for wild-type MEFs (Supplementary Figure F). ADAM10 as well as N-cadherin both localise in a region near the nucleus and at the plasma membrane. The analysis of N-cadherin expression in ADAM10-deficient cells showed that N-cadherin surface-bound immunoreactivity was much stronger in ADAM10-deficient cells as compared to the staining in control cells and was distributed in an almost continuous belt along the region of cell-cell contact (Figure 5A, upper panel). Similar results were obtained when wild-type cells were treated with the ADAM10 protease inhibitor GI254023X (Figure 5A, lower panel). In contrast, untreated wild-type cells only showed minimal expression at the cell surface restricted to short segments on cell borders at the cell boundary (Figure 5A, top left). Our finding that full-length N-cadherin co-precipitates with ADAM10 in wild-type fibroblasts in co-immunoprecipitation (IP) experiments (Figure 5B) and the observation that recombinant ADAM10 can cleave recombinant N-cadherin *in vitro* (data not shown) provides additional evidence for an interaction of these proteins.



In embryonic day (E) 9.5-old embryos, N-cadherin and ADAM10 were colocalised in different regions of the embryo, such as somites (upper panel of Figure 5C), heart (lower panel of Figure 5C) and neural tube (not shown), giving further support that both proteins are functionally linked. Within the heart anlage, both ADAM10 and N-cadherin were present on the membranes of cardiomyocytes, and N-cadherin also featured an intense expression in the surrounding pericardial sac. In somites, both proteins concentrate along the surfaces of the dermatomyotome cells at their interface with the ectoderm, and extend well into the intersomitic clefts.

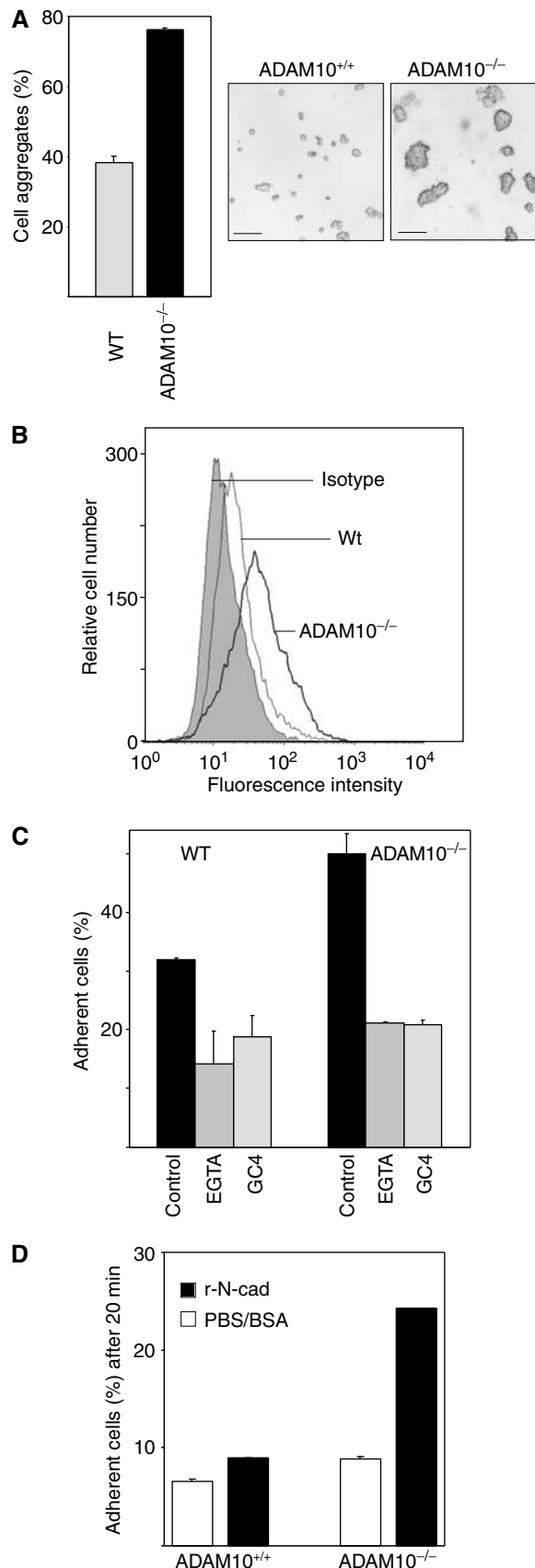
In order to analyse N-cadherin distribution in the ADAM10-deficient embryo, we performed whole-mount staining with a N-cadherin antibody at embryonic day 9 (Supplementary Figure G). In both embryos, N-cadherin was found to be expressed in the optic and otic pit, in the heart anlage and in the neural tube, like it has also been described by Radice *et al* (1997). The only difference was that the N-cadherin expression in the somites was apparently lower in the ADAM10 knockout mice, probably related to the developmental differences of the embryos. Since ADAM10 has also been described to cleave several other substrates like EGF or Notch, which are also critically involved in development, the combination of several protein-processing disturbances might be important to understand the altered N-cadherin distribution. These findings highlight the much more complex situation in the embryo and indicate that the ADAM10 knockout phenotype is probably a result of an impaired shedding of different substrates.

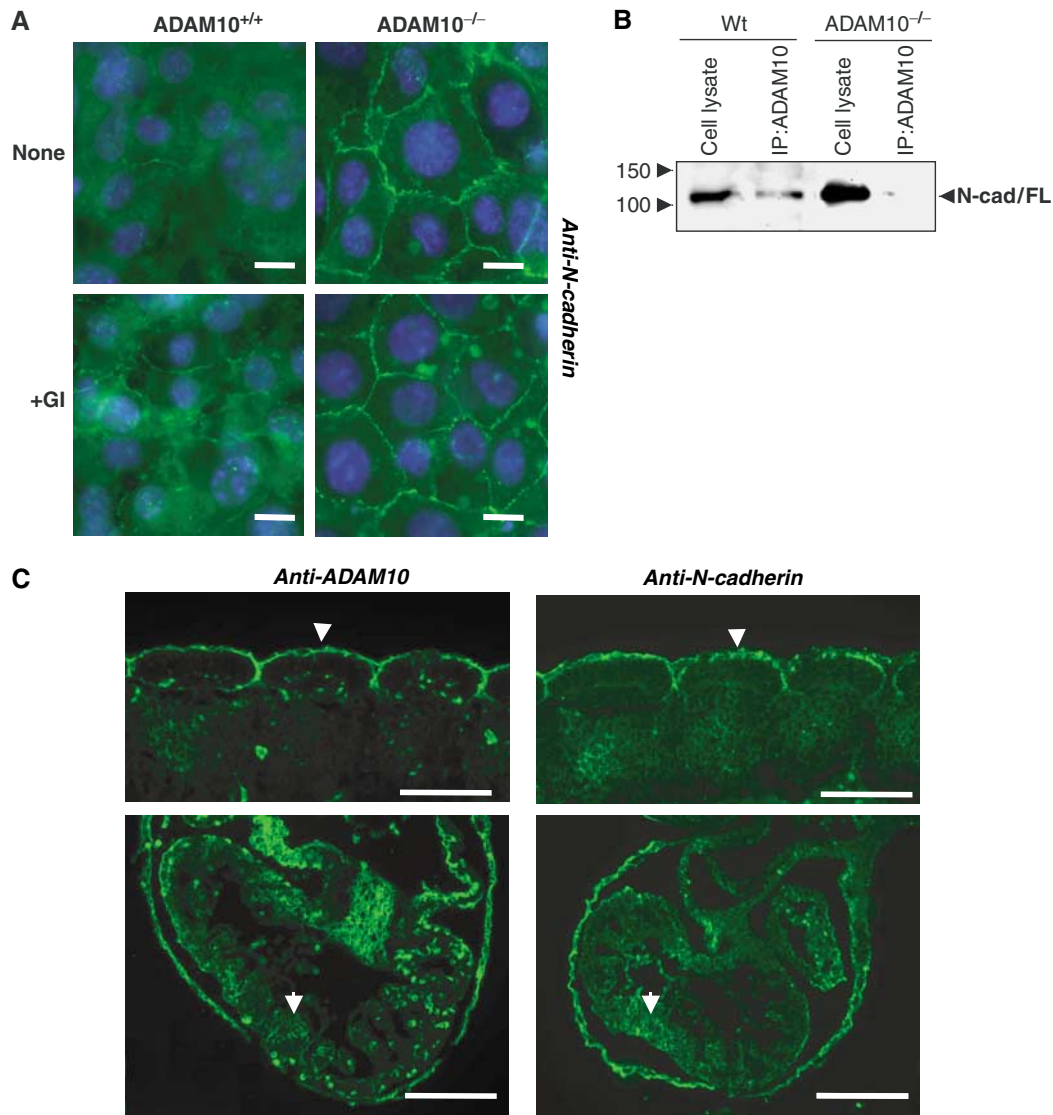
***β-Catenin recruitment to cell surface leads to impaired signal transduction in ADAM10-deficient cells***

β-Catenin and its homolog armadillo from *Drosophila* are components of the Wnt/wingless signal pathway that plays a key role in embryogenesis (Nelson and Nusse, 2004). β-Catenin exists in two pools in the cell. The levels of the

cytoplasmic, soluble pool are regulated by Wnt and adenomatous polyposis coli (APC). A cell membrane-bound pool is linked to cadherins, also affecting the overall β-catenin

**Figure 4** Increased N-cadherin-mediated adhesion of ADAM10-deficient cells. (A) Increased adhesion between ADAM10-deficient cells. Confluent monolayers of ADAM10-deficient and wild-type MEFs were mechanically dissociated through 30-times pipetting with a 5 ml pipette. Afterwards, the cells were photographed and the amount of aggregates was quantified with a Casy TT cell Counter system (Schärfe System, Reutlingen, Germany) (bars = 50 µm). (B) Surface expression of N-cadherin. Cells were harvested and investigated for N-cadherin surface expression by flow cytometry with an N-terminal antibody (GC4). Unspecific antibody binding was evaluated with IgG1 control. Since isotype control of wild-type and ADAM10-deficient cells looked identical, only the wild-type control is shown. Results are representative for two independent cell lines. (C) ADAM10 deficiency leads to increased cell-cell adhesion. Calcein-labelled wild-type and ADAM10-deficient fibroblasts were seeded on top of an unlabelled monolayer of the corresponding cells in the presence or absence of EGTA (5 mM), the inhibitory anti-N-cadherin antibody GC4 or the corresponding IgG1 isotype (control). After 20 min of incubation, cells were washed and the remaining fluorescence was calculated as percentage of total fluorescence before washing. The isotype control was also representative for the adhesion of untreated cells (not shown). (D) Cell adhesion on recombinant N-cadherin. Calcein-stained wild-type and ADAM10-deficient MEFs were seeded in N-cadherin- or PBS/BSA-coated wells of a 96-well plate in triplicates. After 20 min incubation, nonadherent cells were washed away with PBS and the fluorescence of the remaining cells was quantified as percentage of total fluorescence.



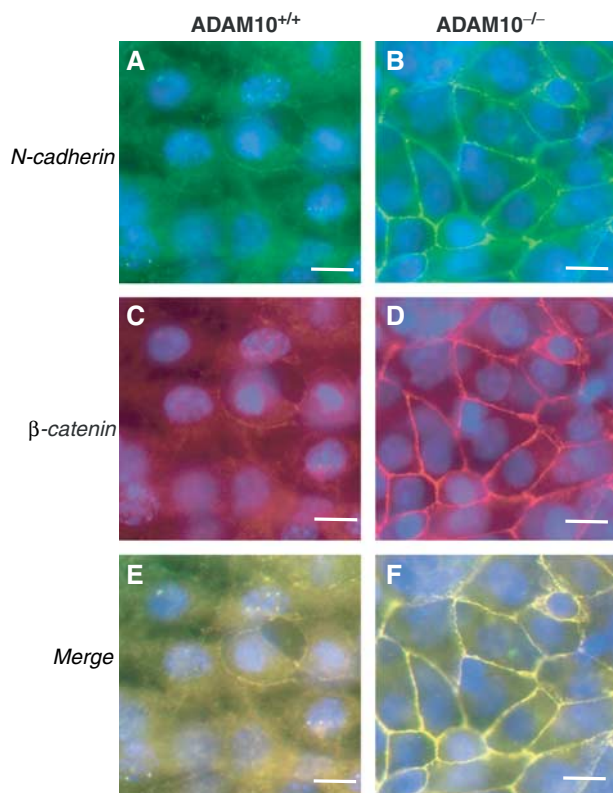


**Figure 5** N-cadherin expression in ADAM10-deficient cells and embryos. (A) Subcellular localisation of N-cadherin in ADAM10<sup>+/+</sup> and ADAM10<sup>-/-</sup> cells. Bar = 10  $\mu$ m. GI254023X induces N-cadherin surface expression. Cells were incubated with the inhibitor (3  $\mu$ M) for 4 h, fixed in methanol and immunostained with anti-N-cadherin antibodies. (B) N-cadherin co-precipitates with ADAM10. Identical amounts of wild-type or ADAM10-deficient cell lysates were immunoprecipitated with anti-ADAM10 antibodies (IP:ADAM10) and loaded onto SDS-PAGE. The immunoblot was stained with anti-N-cadherin antibodies. (C) Partial ADAM10 and N-cadherin colocalisation in E 9.5 wild-type embryos. Upper panel: somites; lower panel: heart. Note the immunostaining along the dermatomyotome surfaces (arrowheads in upper panel) and on cardiomyocyte surfaces (arrows in lower panel). Bars: 100  $\mu$ m.

distribution and  $\beta$ -catenin-dependent signalling. Indeed, in ADAM10-deficient cells,  $\beta$ -catenin immunostaining (Figure 6D) was closely associated with the increased N-cadherin staining (Figure 6B), while in wild-type cells much weaker signals, both for N-cadherin and  $\beta$ -catenin (Figure 6A and C), were observed.  $\beta$ -Catenin immunoreactivity was mainly located in the cytoplasm of these cells.

We confirmed biochemically the increased association of N-cadherin and  $\beta$ -catenin by co-IP experiments using anti-N-cadherin antibodies as well as anti- $\beta$ -catenin antibodies (Figure 7A). The suitable antibody concentration was determined by titration and the efficiency of IP was controlled by immunoblots comparing the amount of N-cadherin and  $\beta$ -catenin before and after the IP (Supplementary Figure H). In ADAM10-deficient cells, similar levels of N-cadherin

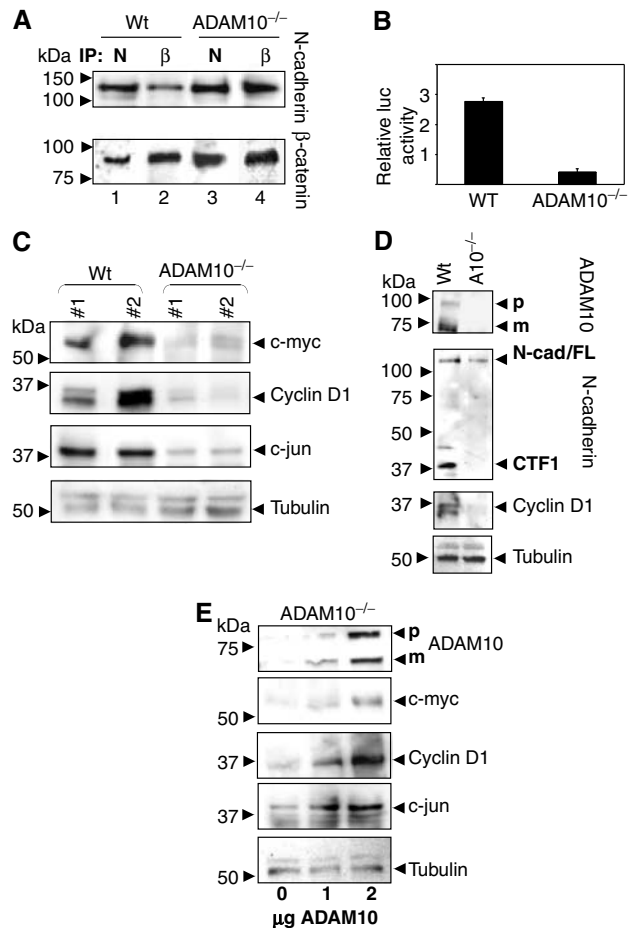
(Figure 7A, upper panel) and  $\beta$ -catenin (lower panel) were immunoprecipitated with N-cadherin, or in the reverse experiment with  $\beta$ -catenin (Figure 7A, lanes 3 and 4). In contrast, less  $\beta$ -catenin immunoreactivity was co-precipitated with N-cadherin antibodies (lane 1) and, *vice versa*, less N-cadherin was present in the  $\beta$ -catenin immunoprecipitates in wild-type cells compared to ADAM10-deficient cells (lower panel, lanes 1 and 3), even though the  $\beta$ -catenin overall content was comparable (lower panel, lanes 2 and 4), indicating an increased number of N-cadherin/ $\beta$ -catenin complexes in ADAM10-deficient fibroblasts.  $\beta$ -Catenin was shown to associate with transcription factors of the LEF/TCF family, forming a complex that can transactivate genes containing a LEF/TCF-binding sequence. To assess whether the observed alterations in  $\beta$ -catenin distribution in ADAM10-deficient



**Figure 6**  $\beta$ -Catenin and N-cadherin expression in ADAM10-deficient cells. Subcellular localisation of N-cadherin (green: **A**, **B**) and  $\beta$ -catenin (red: **C**, **D**) in ADAM10<sup>+/+</sup> and ADAM10<sup>-/-</sup> cells. Double-staining for N-cadherin (C-terminal) and  $\beta$ -catenin. Colocalisation is shown in the merged (**E**, **F**) image (yellow). The experiment was repeated three times with similar results. Bar: 10  $\mu$ m.

cells were also functionally significant, we transfected these cells and wild-type MEFs with the  $\beta$ -catenin/TCF transcriptional reporter TOP-FLASH or a control reporter with mutated TCF-binding sites (FOP-FLASH). In wild-type cells, we observed a six-fold higher basal expression of the  $\beta$ -catenin reporter as compared to ADAM10-deficient cells (Figure 7B). To further explore the consequences of this reduced  $\beta$ -catenin transcriptional activity, we monitored the transcription of  $\beta$ -catenin target genes such as c-myc and cyclin D1 and c-jun (He *et al*, 1998; Mann *et al*, 1999; Shtutman *et al*, 1999; Tetsu and McCormick, 1999).

Expressions of the proto-oncogene c-jun, a component of the AP-1 transcription factor complex, as well as c-myc were reduced in two independently derived ADAM10-deficient cell lines (Figure 7C). This was also the case for the expression level of cyclin D1, which plays a critical role in cellular proliferation and survival (Brown *et al*, 1998). In order to verify that cyclin D1 is indeed regulated through  $\beta$ -catenin/TCF signalling in the MEFs, we analysed cyclin D1 expression and activation in a luciferase reporter assay after transfection of  $\beta$ -catenin or a dominant-negative (DN)-TCF-4 construct (Supplementary Figure I). Indeed, DN-TCF-4 decreased cyclin D1 expression and activation. *Vice versa*,  $\beta$ -catenin overexpression correlated with an increase in the expression of the predicted downstream genes (Supplementary Figure J).



**Figure 7**  $\beta$ -Catenin signal transduction in ADAM10-deficient cells. **(A)** Co-IP of N-cadherin (N) and  $\beta$ -catenin ( $\beta$ ). Identical amounts of the same cell lysate were co-immunoprecipitated with either anti-N-cadherin or anti- $\beta$ -catenin antibodies and loaded onto SDS-PAGE. The immunoblot was first stained with anti-N-cadherin antibodies and afterwards re-probed with anti- $\beta$ -catenin antibodies. **(B)** Analysis of  $\beta$ -catenin/TCF activity. Wild-type and ADAM10-deficient MEFs were transfected with TOP-FLASH or the control plasmid FOP-FLASH and transfection control, renilla luciferase. After 48 h, the expression of TOP-FLASH was assayed. Data are expressed as relative light units normalised to the co-transfected Renilla luciferase and show TOP-FLASH activity with FOP-FLASH activity subtracted. The average activities and standard deviations were derived from three independent experiments, each based on duplicate transfected samples. Similar results were obtained from separate experiments with different cell lines. **(C)** Two wild-type and ADAM10-deficient MEF lines were analysed for the presence of c-myc, cyclin D1 and c-jun by immunoblot analysis. **(D)** Loss of N-cadherin ectodomain shedding and cyclin D1 expression in ADAM10-deficient E 9.0 embryos was demonstrated by immunoblot analysis of whole embryo extracts. **(E)** ADAM10-deficient MEFs were transiently transfected with different amounts of ADAM10 expression plasmid and analysed for the re-expression of ADAM10, c-myc, cyclin D1 and c-jun. Tubulin expression was used as loading control in (C), (D) and (E).

To further elucidate the *in vivo* relevance of ADAM10 in  $\beta$ -catenin signalling, we analysed lysates of wild-type and ADAM10-deficient embryos by Western blotting. Our immunoblot analysis (Figure 7D) showed that the CTF was also missing in the ADAM10-deficient embryo even though the full-length protein was expressed. Together with the colocalisation of N-cadherin and ADAM10 in wild-type embryos

(Figure 5C), this clearly indicates an *in vivo* relevance of the ADAM10/N-cadherin interaction. Moreover, ADAM10 deficiency was correlated with an absence of N-cadherin CTF1, but also with dramatically reduced cyclin D1 expression level (Figure 7D). We finally confirmed the essential role of ADAM10 in this signalling event by restoring its expression in the fibroblasts in a dose-dependent manner. The ADAM10 expression level correlated with the rescue of expression of c-myc, cyclin D1 and c-jun (Figure 7E). Noteworthy, stimulation of the ADAM10-mediated N-cadherin shedding (e.g. IM) correlated with an increase of cyclin D1 expression in wild-type cells, which could not be observed when these cells were stimulated in the presence of the ADAM10 inhibitor and remained nearly absent in ADAM10-deficient cells (Supplementary Figure K). Thus, our findings suggest that ADAM10 is not only regulating cell–cell adhesion but is also involved in the regulation of crucial intracellular signalling pathways.

## Discussion

Here, we have provided multiple lines of evidence that the metalloproteinase ADAM10 is responsible for the initial and crucial proteolytic processing of N-cadherin, leading to the generation of the CTF1 fragment and thereby modulating cell–cell adhesion as well as signal transduction through influencing the cytoplasmic  $\beta$ -catenin pool. Apart from the identification of ADAM10 as the major proteinase responsible for N-cadherin ectodomain cleavage in fibroblasts and neuronal cells, we demonstrate how this cleavage is involved in the regulation of cell adhesion on the one hand and gene transcription on the other hand.

While ADAM10 activity has been implicated in the constitutive shedding of several substrates, many authors attribute stimulated shedding to ADAM17 (Lammich *et al*, 1999; Sahin *et al*, 2004). In contrast, we demonstrate here that both constitutive and inducible ectodomain shedding of N-cadherin was lost in ADAM10-deficient cells. Cadherin-mediated adhesion is regulated by a variety of external stimuli mostly mediated by tyrosine phosphorylation or PKC activation (Winkel *et al*, 1990; Yap *et al*, 1997a). Our findings reveal in addition a time- and ADAM10-dependent stimulation of N-cadherin shedding after IM treatment. This is in accordance with the observations that calcium imbalance disrupted cadherin mediated cell–cell adhesion (Ito *et al*, 1999; Ko *et al*, 2001). Thus, activation of ADAM10 via calcium influx may provide an important mechanism for regulating dynamic processes during tissue remodelling and tissue repair after injury.

The strength of cell–cell interaction can be affected by changing the expression level of cadherins on the cell surface (Steinberg and Takeichi, 1994; Yap *et al*, 1997b). We demonstrate here that ADAM10 is critically involved in regulating N-cadherin-mediated cell–cell adhesion. While this interaction correlates with increased amounts of full-length N-cadherin on the cell surface of ADAM10-deficient fibroblasts, the *in vivo* situation turned out to be more complicated. Despite the partial similarity of ADAM10-deficient mice and N-cadherin-deficient mice (day of embryonic lethality and impaired development of the heart, neural tube and somites), N-cadherin distribution and expression in ADAM10 knockout embryos can apparently not be directly correlated with the

ADAM10 phenotype. Since ADAM10 seems to be involved in the processing of several important proteins, it is much more likely that the phenotype of the embryo as well as N-cadherin distribution is related to various endogenous substrates which are cleaved by ADAM10, and different signalling pathways which are affected by the missing initial ectodomain cleavage. Taking this complex situation into account, it is even more surprising that ADAM10-mediated N-cadherin shedding can apparently not be compensated in the embryo (Figure 7D).

Previous studies have shown that E-cadherin cleavage and the subsequent degradation of the cytoplasmic domain lead to translocation of  $\beta$ -catenin from the cell–cell contacts to the cytoplasm (Ito *et al*, 1999).  $\beta$ -Catenin is a central component of the Wnt signalling pathway, which is of key importance in development as well as implicated in a variety of human cancers (Nelson and Nusse, 2004). Overexpression of cadherins in the embryos of *Xenopus laevis* and *Drosophila* inhibited signal transduction via  $\beta$ -catenin/armadillo (Fagotto *et al*, 1996; Sanson *et al*, 1996). When  $\beta$ -catenin is removed from its cytoplasmic pool, it becomes inaccessible for participating in signalling. On the contrary, elevated cytosolic levels are associated with increased  $\beta$ -catenin nuclear accumulation and LEF-1-mediated transcription (Sadot *et al*, 1998; Simcha *et al*, 2001). The enhanced N-cadherin surface expression caused by ADAM10 deficiency was directly correlated with a high  $\beta$ -catenin level at the cell membrane.  $\beta$ -Catenin trans-activation has been shown to induce a set of genes critical for cell proliferation and cell survival, including cyclin D1 (Shtutman *et al*, 1999), c-myc (He *et al*, 1998) and c-jun (Mann *et al*, 1999), and we show here the decreased expression of these different genes in ADAM10-deficient cells. These findings phenotypically correlate with an extremely retarded proliferation of ADAM10-deficient primary mouse fibroblasts compared to the wild-type cells (data not shown).

The cytoplasmic  $\beta$ -catenin level can be downregulated either by binding to cadherins at the cell surface or through association with a complex containing the APC protein. Conversely, Wnt binding to its receptor results in accumulation of cytoplasmic  $\beta$ -catenin and activation of transcriptional events. Although we cannot formally exclude that ADAM10 also directly or indirectly influences proteins of the APC complex, we propose that the ADAM10-dependent regulation of  $\beta$ -catenin downstream genes is likely related to the cleavage of N-cadherin and possibly also other cadherins, which might also influence  $\beta$ -catenin-mediated target gene expression. Interestingly, the loss of E-cadherin and the gain of N-cadherin expression has been correlated with the transition from a benign tumour to an invasive, metastatic cancer. In this context, regulation of N-cadherin cell surface expression seems to be an important prerequisite for tumour cell migration (Hazan *et al*, 2000; Li *et al*, 2001), while  $\beta$ -catenin accumulation could contribute to neoplastic transformation by accumulation of c-myc, c-jun and cyclin D1, leading to uncontrolled progression into the cell cycle (Korinek *et al*, 1997; Morin *et al*, 1997). Therefore, inhibition of ADAM10 might not only limit cell migration due to decreased N-cadherin shedding but also control the proliferation of tumour cells due to downregulation of  $\beta$ -catenin signalling.

In conclusion, we have shown that the metalloproteinase ADAM10 is crucial for the constitutive as well as for the induced shedding of N-cadherin. This proteolysis influences

cell–cell adhesion as well as cell signalling in physiological, but probably also in pathological, conditions. The coordinated interaction of ADAM10 and N-cadherin may be significant for the coordinated interplay between cell–cell adhesion, cell detachment, cell proliferation and cell survival during embryonic development, in wound healing and during tumour invasion.

## Materials and methods

### Primary antibodies and reagents

Primary antibodies against mouse proteins included anti-N-cadherin antibody (BD Bioscience),  $\beta$ -catenin antibody, c-jun and c-myc antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Inc. and anti cyclin D1 (Labvision) antibody.  $\beta$ -Tubulin antibody (E7) and N-terminal anti-N-cadherin MNCD2 were from DSHB, Iowa. The monoclonal N-terminal anti-N-cadherin antibody (A-CAM, clone GC-4) was purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany) and the corresponding control monoclonal IgG1 clone was from R&D Systems (Wiesbaden, Germany). ADAM10 was detected using a polyclonal antiserum B42.1 described previously (Hartmann *et al*, 2002).  $\gamma$ -Secretase inhibitor L-685,458 was a kind gift of Wim Anneart, University Leuven. PMA, SP, IM and NMDA were purchased from Sigma. Methyl- $\beta$ -MCD was obtained from Research Biochemicals International. Hydroxamate-based inhibitors GW280264 and GI254023 were described elsewhere (Hundhausen *et al*, 2003). Protein G-sepharose beads were purchased from Pierce. Complete™ EDTA-free proteinase inhibitor mixture was obtained from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany).

### Cell culture, stimulation and transfection

Simian virus large T-antigen (SV-T)-immortalised and primary MEF cell lines from ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM9<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup>, ADAM17<sup>-/-</sup> mice, BACE1<sup>-/-</sup>, PS1<sup>-/-</sup>, PS1/2<sup>-/-</sup> and respective wild-type animals were generated and characterised as described elsewhere (Hartmann *et al*, 2002; Weskamp *et al*, 2002; Lichtenthaler *et al*, 2003; Sahin *et al*, 2004). All cells were grown in DMEM (high glucose) (PAA Laboratories) supplemented with 10% foetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. For FACS analysis and adhesion assays, cells were harvested under cadherin-saving conditions (Boterberg *et al*, 2001). The cloning of ADAM10 in pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was reported previously (Hundhausen *et al*, 2003). Human neuronal H4 cells, kindly provided by J Wilfang (Erlangen, Germany), and mouse neuroblastoma cells (N2a) were transfected in six-well tissue culture plates with FuGENE 6 (Roche) according to the manufacturer's instructions.

### siRNA transfection

The mammalian expression vector pSUPER, kindly provided by Dr Brummelkamp, was used for expression of siRNA in neuronal H4 cells. The sequence of the human ADAM10 siRNA was as follows: 5'-GACAUUUAACCUACGAAUTT-3'. The sequence was separated by a nine-nucleotide noncomplementary spacer (tctctgaa) from the corresponding reverse complement of the same 19-nucleotide sequence. These sequences were inserted into the pSUPER backbone after digestion with *Bgl*III and *Hind*III. H4 cells were transfected with pSuper-ADAM10-siRNA vector with the use of FuGENE 6 (Roche) according to the manufacturer's recommendations.

### Flow cytometry

Cells were labelled with anti-N-cadherin (GC4) antibody (1:60) for 1 h, followed by incubation with Cy3-conjugated sheep anti-mouse F(ab)2 antibody (Dianova). As a negative control, the cells were labelled with mouse IgG1. By excluding propidium iodide-permeable cells, only living cells were analysed by flow cytometry (FACSscan; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

### Immunoblotting and IP

Briefly, cells were lysed in RIPA buffer. Same amounts of protein were loaded on 10% SDS-PAGE gels and electrotransferred onto PVDF membranes (Hybond-P; Amersham). Primary antibodies were detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies.

For IP, sepharose-prepared cell lysates were incubated for 2 h at 4°C with the appropriate antibody and protein G sepharose (Pierce). The beads were resuspended in 2 × sample loading buffer and loaded on 10% SDS-PAGE. For Western blot analysis of supernatants, cells were incubated in DMEM overnight and supernatants were concentrated (30-fold) through centrifugation in Microcon Centrifugal Filter Devices (YM-10, Millipore). More detailed information is provided in the supplements.

### Immunocytochemistry/immunohistochemistry

Cells were fixed and permeabilised with methanol at -20°C for 10 min, blocked with 3% BSA in PBS for 15 min, and incubated with primary antibody ( $\beta$ -catenin (Santa Cruz); N-cadherin (BD Bioscience)) for 1 h at room temperature, washed three times with PBS containing 0.2% BSA, and incubated with goat anti-mouse Alexa Fluor<sup>®</sup>488 or donkey anti-goat Alexa Fluor<sup>®</sup>594 (Molecular Probes). For immunohistochemistry, embryos were fixed by immersion in 2% paraformaldehyde. Paraffin sections were incubated with N-cadherin antibody (BD Bioscience) and detected by the avidin-biotin complex technique (reagents from Vector, Burlingame, USA). Nonspecific control staining was performed using only the secondary antibody.

### Luciferase assay

Cells cultured as described previously were transfected 1 day after plating with 1  $\mu$ g of TOP-FLASH or FOP-FLASH plus 0.1  $\mu$ g phRG-TK (Renilla-Luciferase) as a cotransfection control. Cells were lysed 48 h after transfection and the luciferase activity was determined with a luminometer (TD-20/20 Luminometer Turner Designs, CA, USA) using the Dual-Luciferase system (Promega). Firefly luciferase activity, indicating TCF-dependent transcription, was normalised to the Renilla luciferase activity of each extract. The cyclin D1 reporter constructs were analysed similar to the TOP-FLASH plasmids.

### Whole-mount embryo staining

Embryos were stained according to Radice *et al* (1997). Briefly, after heating and incubation in cold methanol containing 3% hydrogen peroxide for 30 min, the embryos were rehydrated with PBS containing 0.1% Triton X-100 and incubated with anti-N-cadherin antibody (MNCD2) 1:100 in PBS with 3% BSA. The samples were washed three times in PBS and incubated with HRP-conjugated anti-mouse monoclonal antibody (1:1000 in PBS containing 3% BSA). After washing, the embryos were incubated with diaminobenzidine and 0.015% hydrogen peroxide.

### Adhesion assays

Detailed information for all adhesion assays is provided in the supplements.

Briefly, for analysing cell–cell adhesion, MEFs were suspended at 2 × 10<sup>6</sup>/ml in PBS/0.1% BSA and incubated with 2.5  $\mu$ M fluorescent dye (calcein AM; Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) at 37°C for 30 min. After washing, cells were preincubated with the inhibitory N-cadherin antibody GC4 (50  $\mu$ g/ml) or isotype control (50  $\mu$ g/ml) for 20 min, with EGTA (5 mM) for 10 min or left untreated. The labelled MEFs were added to a monolayer of unstained cells at 5 × 10<sup>4</sup> cells per well. The fluorescence signal from the adherent cells was measured after 20 min incubation before and after PBS washing (2 × 200  $\mu$ l) using a fluorescence plate reader (Lambda Fluoro 230; MWG Biotech, Munich, Germany).

To investigate cell substrate adhesion, 96-well plates (Sarstedt Inc., NC, USA) were coated with 10  $\mu$ g/ml recombinant human N-cadherin (R&D Systems, Minneapolis, MN) or 10  $\mu$ g/ml BSA in 100  $\mu$ l PBS at 4°C overnight. Calcein-labelled MEFs were seeded at a density of 5 × 10<sup>4</sup> cells/well and incubated for 20 min and analysed as described above.

For determining the adhesion capacity of ADAM10-deficient and wild-type MEFs, confluent monolayers were mechanically dissociated through 30-times pipetting with a 5 ml pipette (Sarstedt) in 5 ml medium, photographed, and the amount of aggregates was quantified with a Casy TT cell Counter system (Schärfe System, Reutlingen, Germany).

### Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

## Acknowledgements

We thank J Buchholz for his excellent technical assistance, R Kemler for the TOP/FOP-FLASH reporter constructs, and O Tetsu and F McCormick for the DN-TCF-4 plasmid. The cyclin D1 reporter plasmid was kindly provided by R Pestell. We are grateful to C Blobel for providing ADAM9 and 15-deficient MEFs. We thank

B Rudolph for providing us with the pHRTK construct and also S Rose-John for ADAM17-deficient MEFs. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft Sonderforschungsbereich 415 to PS and KR, DFG LU869/1-2 to AL, Interuniversity Attraction Poles Program P5/19 of the Belgian Federal Science Policy Office, the Alzheimer Forschungsinitiative to KR and the APOPIE EU-network.

## References

- Bixby JL, Zhang R (1990) Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* **110**: 1253–1260
- Blobel CP (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 606–612
- Boterberg T, Bracke M, Bruyneel E, Mareel M (2001) Cell aggregation assays. In *Methods in Molecular Medicine*, Brooks S, Schumacher U (eds), pp 33–45. Totowa, NJ, USA: Humana Press
- Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME (1998) Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol* **18**: 5609–5619
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550–553
- Fagotto F, Funayama N, Gluck U, Gumbiner BM (1996) Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* **132**: 1105–1114
- Gabbiani G (1981) The myofibroblast: a key cell for wound healing and fibrocontractive diseases. *Prog Clin Biol Res* **54**: 183–194
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**: 345–357
- Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S, Zentgraf H, Fogel M, Altevogt DP (2003) ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J* **17**: 292–294
- Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena IA, von Figura K, Saftig P (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* **11**: 2615–2624
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* **148**: 779–790
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**: 1509–1512
- Ho AT, Voura EB, Soloway PD, Watson KL, Khokha R (2001) MMP inhibitors augment fibroblast adhesion through stabilization of focal adhesion contacts and up-regulation of cadherin function. *J Biol Chem* **276**: 40215–40224
- Hooper NM, Karran EH, Turner AJ (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J* **321** (Part 2): 265–279
- Horiuchi K, Weskamp G, Lum L, Hammes HP, Cai H, Brodie TA, Ludwig T, Chiusaroli R, Baron R, Preissner KT, Manova K, Blobel CP (2003) Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol Cell Biol* **23**: 5614–5624
- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**: 1186–1195
- Huntley GW (2002) Dynamic aspects of cadherin-mediated adhesion in synapse development and plasticity. *Biol Cell* **94**: 335–344
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* **3**: 661–669
- Ito K, Okamoto I, Araki N, Kawano Y, Nakao M, Fujiyama S, Tomita K, Mimori T, Saya H (1999) Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* **18**: 7080–7090
- Karkkainen I, Rybnikova E, Peltto-Huikko M, Huovila AP (2000) Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* **15**: 547–560
- Ko KS, Arora PD, McCulloch CA (2001) Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. *J Biol Chem* **276**: 35967–35977
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* **275**: 1784–1787
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert 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 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3922–3927
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M (2001) N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**: 3819–3825
- Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, Saftig P, de Strooper B, Seed B (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* **278**: 48713–48719
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1603–1608
- Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* **21**: 1948–1956
- Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**: 635–645
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**: 1787–1790
- Nakagawa S, Takeichi M (1998) Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* **125**: 2963–2971
- Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**: 1483–1487
- Paradies NE, Grunwald GB (1993) Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J Neurosci Res* **36**: 33–45
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997) Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* **181**: 64–78
- Sadot E, Simcha I, Shtruman M, Ben Ze'ev A, Geiger B (1998) Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15339–15344
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* **164**: 769–779
- Sanson B, White P, Vincent JP (1996) Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**: 627–630
- Schlondorff J, Blobel CP (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and

- triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* **112** (Part 21): 3603–3617
- Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* **17**: 7–30
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben Ze'ev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5522–5527
- Simcha I, Kirkpatrick C, Sadot E, Shtutman M, Polevoy G, Geiger B, Peifer M, Ben Ze'ev A (2001) Cadherin sequences that inhibit beta-catenin signaling: a study in yeast and mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**: 1177–1188
- Steinberg MS, Takeichi M (1994) Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 206–209
- Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**: 1451–1455
- Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422–426
- Utton MA, Eickholt B, Howell FV, Wallis J, Doherty P (2001) Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. *J Neurochem* **76**: 1421–1430
- Van Hoorde L, Braet K, Mareel M (1999) The N-cadherin/catenin complex in colon fibroblasts and myofibroblasts. *Cell Adhes Commun* **7**: 139–150
- Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashiyama S, Manova K, Ludwig T, Blobel CP (2002) Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol* **22**: 1537–1544
- Winkel GK, Ferguson JE, Takeichi M, Nuccitelli R (1990) Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev Biol* **138**: 1–15
- Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM (1997a) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 119–146
- Yap AS, Brieher WM, Pruschy M, Gumbiner BM (1997b) Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* **7**: 308–315

# ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell–cell adhesion, migration, and $\beta$ -catenin translocation

Thorsten Maretzky<sup>\*†</sup>, Karina Reiss<sup>\*†</sup>, Andreas Ludwig<sup>\*</sup>, Julian Buchholz<sup>\*</sup>, Felix Scholz<sup>‡</sup>, Erhardt Proksch<sup>‡</sup>, Bart de Strooper<sup>§</sup>, Dieter Hartmann<sup>§</sup>, and Paul Saftig<sup>\*†1</sup>

<sup>\*</sup>Biochemical Institute and <sup>†</sup>Department of Dermatology, Christian-Albrechts-University Kiel, D-24098 Kiel, Germany; and <sup>§</sup>Department of Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB-4), 3000 Leuven, Belgium

Edited by Richard O. Hynes, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved May 14, 2005 (received for review February 4, 2005)

E-cadherin controls a wide array of cellular behaviors, including cell–cell adhesion, differentiation, and tissue development. We show here that E-cadherin is cleaved specifically by ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 10 in its ectodomain. Analysis of ADAM10-deficient fibroblasts, inhibitor studies, and RNA interference-mediated down-regulation of ADAM10 demonstrated that ADAM10 is responsible not only for the constitutive shedding but also for the regulated shedding of this adhesion molecule in fibroblasts and keratinocytes. ADAM10-mediated E-cadherin shedding affects epithelial cell–cell adhesion as well as cell migration. Furthermore, the shedding of E-cadherin by ADAM10 modulates the  $\beta$ -catenin subcellular localization and downstream signaling. ADAM10 overexpression in epithelial cells increased the expression of the  $\beta$ -catenin downstream gene cyclin D1 dose-dependently and enhanced cell proliferation. In ADAM10-deficient mouse embryos, the C-terminal E-cadherin fragment is not generated, and the full-length protein accumulates, highlighting the *in vivo* relevance for ADAM10 in E-cadherin shedding. Our data strongly suggest that this protease constitutes a major regulatory element for the multiple functions of E-cadherin under physiological as well as pathological conditions.

ADAM | cadherin | metalloproteinases | shedding

E-cadherin (epithelial cadherin, uvomorulin) is one of the most important molecules involved in tissue morphogenesis, wound healing, and the maintenance of tissue integrity (1, 2). The extracellular domain of this type I transmembrane glycoprotein interacts homotypically with cadherins on the surface of neighboring cells to form calcium-dependent adherens junctions. The stabilization of intercellular adhesion requires the conserved cytoplasmic domain of E-cadherin, which binds to  $\beta$ -catenin.  $\beta$ -Catenin, in turn, is linked to the cytoskeleton. Cadherin-mediated adhesion must be dynamic to accommodate epithelial growth and remodeling during development and to facilitate wound healing and turnover of epithelia in mature tissues (2, 3). Although proteolytic cleavage of E-cadherin has been suggested to cause rapid changes in cell adhesion, signaling, and apoptosis (3–5), the proteinase responsible for these processes has not been identified.

ADAMs (a disintegrin and metalloproteases), a family of zinc-dependent transmembrane proteins, have been implicated in the ectodomain shedding of various membrane-bound proteins (6, 7). ADAM17 (also known as TACE, TNF- $\alpha$ -converting enzyme) is required for proper epithelial tissue development in mice (8) and shares structural and functional homology with ADAM10. ADAM10 (*kuzbanian*) plays an essential role during neuronal development in vertebrates and *Drosophila* (9–11). In addition, the analysis of avian epithelial morphogenesis revealed that ADAM10 shows a very prominent expression in all epithelial tissues, especially in the epidermis, the somitic dermatome and myotome, and the epithelial tissues of the kidney, liver, and heart (12). This expression pattern suggests not only that

ADAM10 might be important for neuronal development but also that it may play a significant role in the morphogenesis of epithelial tissues and in tissue remodeling. In the present study, we analyzed the potential role of different ADAMs in E-cadherin shedding and the functional relevance for keratinocyte adhesion, migration, and proliferation.

## Materials and Methods

For more detailed information, see *Supporting Text*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

**Reagents.** Reagents were obtained as follows: phorbol-12 myristate 13-acetate (PMA), staurosporine, and ionomycin were from Sigma. Hydroxamate-based inhibitors GW280264X and GI254023X are described in ref. 13. Complete EDTA-free proteinase inhibitor mixture was obtained from Roche Molecular Biochemicals.  $\gamma$ -Secretase inhibitor L-685,458 was obtained from Calbiochem.

**Cell Culture and Transfection.** Simian virus large tumor-antigen-immortalized and primary mouse embryonic fibroblast (MEF) cell lines from PS1/2<sup>-/-</sup>, ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup>, ADAM17<sup>-/-</sup> mice and respective WT animals were generated and characterized as described in refs. 11 and 14–16. All cells were grown in DMEM (PAA, Linz, Austria) supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin. The human keratinocyte cell line HaCaT (17) was generously provided by N. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Cells were transfected with FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions.

**Small Interfering RNA (siRNA) Transfection.** The mammalian expression vector pSUPER, kindly provided by T. R. Brummelkamp (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), was used for expression of siRNA in HaCaT cells. The sequence of the human ADAM10 siRNA was as follows: 5'-GACAUUUCAACCUAC-GAAU-3'. The sequence was separated by a 9-nt noncomplementary spacer (tctcttgaa) from the corresponding reverse complement of the same 19-nt sequence. These sequences were inserted into the pSUPER backbone after digestion with BglII and HindIII.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: ADAM, a disintegrin and metalloprotease; MEF, mouse embryonic fibroblast; CTF, C-terminal fragment; PMA, phorbol-12 myristate 13-acetate; siRNA, small interfering RNA.

<sup>†</sup>T.M. and K.R. contributed equally to this work.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at: Biochemical Institute, Christian-Albrechts-University Kiel, Olshausenstrasse 40, D-24098 Kiel, Germany. E-mail: psaftig@biochem.uni-kiel.de.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA



**Preparation of Primary Mouse Keratinocytes.** Murine epidermal keratinocytes were isolated from WT mice as described in ref. 18, with the exception that 3-day-old mice were used instead of embryonic day-17.5 embryos. For each experiment, keratinocytes were freshly isolated, grown to confluence in defined keratinocyte serum-free medium (GIBCO/BRL) supplemented with epidermal growth factor (0.1 ng/ml), bovine pituitary extract (25  $\mu$ g/ml), 5% streptomycin/penicillin, and 0.07 mM  $\text{CaCl}_2$ .

**Adhesion Assays.** The adhesion assay was performed as described in refs. 13 and 19. Briefly, HaCaT cells were labeled at  $2 \times 10^6$  cells per ml in PBS/0.1% BSA with 2.5  $\mu$ M fluorescent dye (calcein AM, Molecular Probes) at 37°C for 30 min. After washing, cells were resuspended in growth medium and preincubated with the inhibitory E-cadherin antibody DECMA-1 (50  $\mu$ g/ml), isotype control (50  $\mu$ g/ml), EGTA (5 mM), PMA (200 ng/ml), and G1254023X (5  $\mu$ M) plus PMA or left untreated. The labeled HaCaT cells were added to a monolayer of unstained cells at  $5 \times 10^4$  cells per well in growth medium containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . The plate was incubated at 37°C for 20 min and then washed repeatedly. The fluorescence signal from the adherent cells was measured before and after washing by using a fluorescence plate reader (Lambda Fluoro 230, MWG Biotech, Ebersberg, Germany) at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 530 nm. The differences in fluorescence before and after washing were depicted as percentages of adherent cells. All analyses were performed in triplicate.

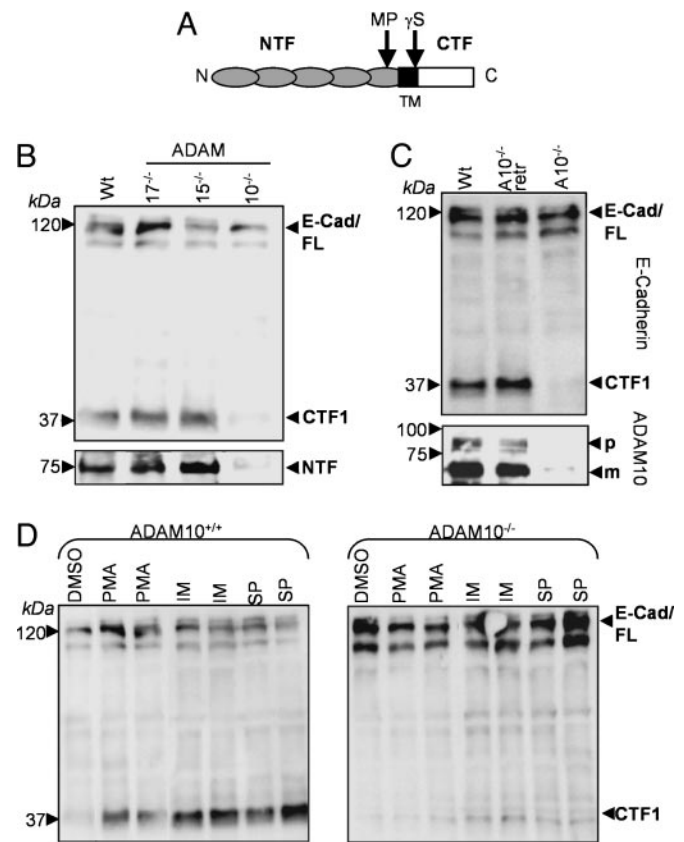
**Whole-Mount Embryo Staining.** Embryos were stained as described in ref. 20. Briefly, after heating and incubating in cold methanol containing 3% hydrogen peroxide for 30 min, the embryos were rehydrated with PBS containing 0.1% Triton X-100 and incubated with anti-N-terminal E-cadherin antibody (H108) 1:50 in PBS with 3% BSA. The samples were washed three times in PBS and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,000 in PBS containing 3% BSA). After washing, the embryos were incubated with diaminobenzidine (Sigma) and 0.015% hydrogen peroxide.

**In Vitro Wound Healing.** HaCaT cells were seeded in six-well plates (Sarstedt) and transfected with ADAM10 or empty vector and cultured until they reached confluence (48 h). To avoid a proliferative effect, cells were treated with 100 mM hydroxyurea for 24 h (Sigma-Aldrich). A cell-free area was introduced by scraping the monolayer with a pipette tip (10  $\mu$ l, Sarstedt). After different periods under standard culture conditions, cells were photographed by using an inverted phase-contrast microscope (Zeiss).

**Cell Proliferation Assay.** HaCaT cells were seeded at an initial number of 20,000 cells into wells of microtiter plates and transfected with ADAM10 or empty vector. After 24 h of incubation under standard culture conditions, cells were pulsed with 0.25  $\mu$ Ci (1 Ci = 37 GBq) per well of [ $^3\text{H}$ ]thymidine (Amersham Pharmacia) for 16 h. After the radioactive labeling, cells were briefly frozen to detach them from the plates and harvested by a cell harvester (Inotech, Wohlen, Switzerland). The incorporated radioactivity was quantitated on a liquid scintillation counter (Wallac, Gaithersburg, MD).

## Results

**ADAM10 Mediates Shedding of E-Cadherin in MEFs.** The full-length 120-kDa E-cadherin protein is cleaved in the extracellular domain by a metalloprotease, generating a 38-kDa C-terminal fragment (CTF) termed CTF1, which can be further processed by a  $\gamma$ -secretase-like activity into a soluble 33-kDa CTF2 (Fig. 1A) (21). To compare the influence of different ADAMs for the



**Fig. 1.** Involvement of ADAM10 in E-cadherin processing. (A) Schematic map of E-cadherin cleavage sites. Full-length E-cadherin is cleaved by a metalloprotease activity (MP) near the transmembrane domain (TM) in 80-kDa N-terminal fragments and 38-kDa CTFs (CTF1), which can be further processed by  $\gamma$ -secretase-like activity ( $\gamma$ S) in soluble 33-kDa fragments (CTF2). (B) Constitutive E-cadherin cleavage is strongly reduced in ADAM10<sup>-/-</sup> fibroblasts. MEFs were transfected with E-cadherin plasmid and harvested 48 h after transfection. Immunoblots with total cell extracts from ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup>, and ADAM17<sup>-/-</sup> fibroblasts and WT MEFs were stained with an C-terminal anti-E-cadherin antibody. Supernatants of these cells were also subjected to Western blot analysis using N-terminal anti-E-cadherin antibodies (Lower). (C) ADAM10<sup>-/-</sup> cells were retransfected with WT ADAM10 (A10<sup>-/-</sup> retr) and compared with WT and ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs for E-cadherin expression. (D) Effect of different stimuli on E-cadherin shedding. MEFs were stimulated with PMA (200 ng/ml) or vehicle control (DMSO) for 4 h, with ionomycin (IM, 5  $\mu$ M) for 30 min, or with staurosporine (SP, 1  $\mu$ M) for 6 h. Cell pellets were subjected to E-cadherin (C-terminal) Western blot analysis. E-Cad/FL, full-length E-cadherin; CTF, CTF of E-cadherin; NTF, N-terminal fragment of E-cadherin; WT, WT MEFs.

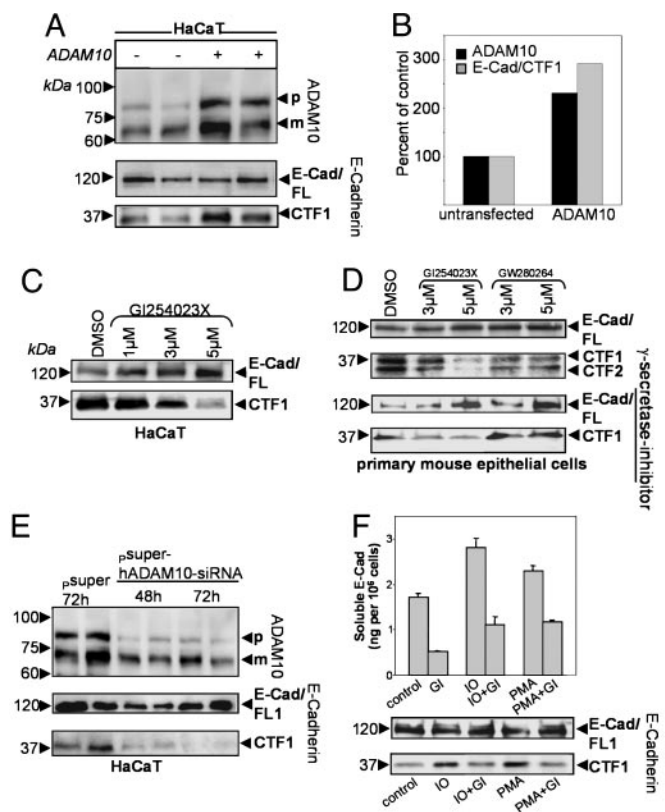
ectodomain cleavage of E-cadherin, we compared a panel of ADAM-deficient fibroblasts transfected with E-cadherin. Through Western blot analysis using monoclonal antibodies against the C terminus of E-cadherin, we observed a clear reduction in the generation of the E-cadherin CTF1 in ADAM10-deficient fibroblasts (Fig. 1B). Quantification considering transfection efficiencies indicated a CTF1 reduction of 90% in ADAM10-deficient cells compared with WT cells (see Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site). This reduced amount of CTF1 was independent of further processing through  $\gamma$ -secretase activity because the presence of the  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 did not change this result (see Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). Accordingly, the released ectodomain of E-cadherin was strongly reduced in the supernatant of ADAM10-deficient cells (Fig. 1B Lower). In addition,

E-cadherin shedding could be completely restored in ADAM10-deficient cells after cotransfection of WT ADAM10 (Fig. 1C). We also confirmed the ADAM10-mediated E-cadherin cleavage in a cell-free assay. Recombinant ADAM10 was able to cleave E-cadherin *in vitro* in a time-dependent manner, resulting in the generation of two fragments with apparent molecular masses of  $\approx 40$  and 75 kDa, as evidenced by silverstaining and immunoblotting (see Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site).

For further characterization of inducible E-cadherin proteolysis, the effects of different stimuli were analyzed. Stimulation of protein kinase C using phorbol ester PMA clearly enhanced E-cadherin shedding in WT fibroblasts (Fig. 1D Left). Ionomycin, which promotes shedding of cadherins through stimulation of  $Ca^{2+}$  influx (21), and staurosporine, which induces apoptosis (4), also strongly increased the generation of E-cadherin CTF1. We next addressed to what extent this inducible cleavage depended on ADAM10 by analyzing the effects of these compounds in ADAM10-deficient cells. In these cells, only a very moderate stimulation of E-cadherin shedding could be observed (Fig. 1D Right), suggesting that the majority of the stimulated E-cadherin sheddase activity is due to ADAM10. The densitometric analysis verified this observation (see Fig. 9, which is published as supporting information on the PNAS web site).

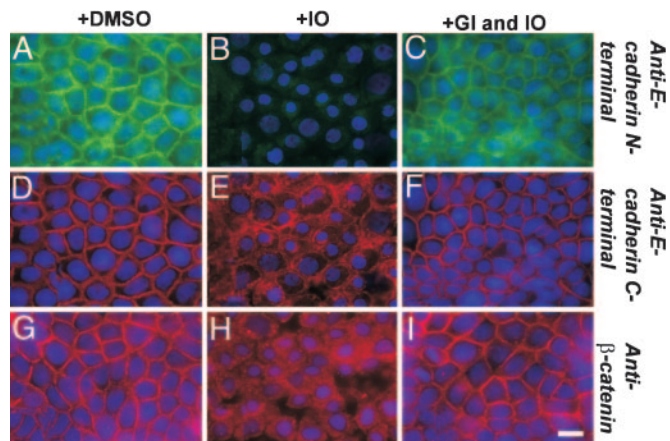
**E-Cadherin Cleavage in Epithelial Cells Is ADAM10-Dependent.** To analyze E-cadherin processing endogenously, we overexpressed ADAM10 in the human keratinocyte cell line HaCaT. ADAM10 transfection led to an increased level of E-cadherin CTF1 (Fig. 2A and B). In contrast, GI254023X, an hydroxamate-based inhibitor preferentially blocking ADAM10 (13), reduced E-cadherin shedding in a dose-dependent manner in HaCaT keratinocytes (Fig. 2C; for quantification, see Fig. 10, which is published as supporting information on the PNAS web site). The ADAM10 inhibitor also reduced CTF1 generation in primary epithelial cells compared with the inhibitor GW280623X (preferentially blocking TACE and, to a lesser extent, ADAM10) (Fig. 2D), confirming the essential role of ADAM10 in this process. Comparable with our findings in MEFs, this reduction was independent of the presence of  $\gamma$ -secretase inhibitors in HaCaT cells (see Fig. 8) as well as in primary epithelial cells (Fig. 2D Lower). To further analyze the role of endogenously expressed ADAM10 in E-cadherin shedding in HaCaT cells, we used RNA interference (22). ADAM10 siRNA decreased E-cadherin CTF1 generation to 5% of the mock-transfected level after 72 h (Fig. 2E; see also Fig. 11, which is published as supporting information on the PNAS web site). These results clearly implicate ADAM10 in the physiological E-cadherin shedding in keratinocytes. To investigate the inducible cleavage of E-cadherin in epithelial cells, HaCaT cells were incubated with PMA or ionomycin in the presence or absence of the ADAM10 inhibitor GI254023X. Serum-free supernatants were analyzed for soluble E-cadherin by an ELISA system. As shown in Fig. 2F, the ADAM10 inhibitor abolished not only the constitutive release but also the stimulated E-cadherin release, demonstrating that inducible E-cadherin shedding in epithelial cells is also ADAM10-dependent. The intensity of decrease depended on the concentration of the applied inhibitor (data not shown). We also confirmed the important role of ADAM10 for inducible E-cadherin shedding by immunoblot analysis (Fig. 2F), demonstrating that the increase of CTF1 generation after stimulation was abrogated in the presence of the ADAM10 inhibitor.

**ADAM10 Affects E-Cadherin and  $\beta$ -Catenin Subcellular Localization.** Ionomycin treatment is known to induce cleavage of E-cadherin and to disrupt cell-cell adhesion, leading to a dislocation of the C-terminal bound  $\beta$ -catenin (5, 21). To determine the effect of ADAM10 in this process, we analyzed the subcellular localiza-



**Fig. 2.** ADAM10-mediated E-cadherin shedding in epithelial cells. (A) Overexpression of ADAM10 protein in human HaCaT cells. Cells were transiently transfected with ADAM10 or empty vector. Subsequently, cells were lysed and analyzed by Western blotting using anti-ADAM10 antibodies. The same blot was reprobed with anti-E-cadherin antibodies. (B) Quantification of A. For densitometric analysis, ADAM10 and E-cadherin CTF1s were quantified after transfection and compared with the mock-treated cells (100%). (C and D) Effect of the inhibitor GI254023X (blocking preferentially ADAM10) and GW280623X (blocking preferentially TACE) on constitutive E-cadherin cleavage. HaCaT cells and primary mouse keratinocytes were incubated with various concentrations of GI254023X or vehicle control (DMSO) for 6 h and analyzed by Western blot. The ADAM10 inhibitor also reduced CTF1 generation in the presence of the  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 (1  $\mu$ M). (E) HaCaT cells were transiently transfected with pSUPER-ADAM10 siRNA or empty vector. Cell pellets were harvested 48 and 72 h after transfection and analyzed for ADAM10 expression. Membranes were reprobed with anti-E-cadherin antibodies. (F) Effect of the ADAM10 inhibitor on inducible E-cadherin shedding in HaCaT keratinocytes. Cells were mock-treated (control) or treated with PMA (200 ng/ml) or ionomycin (IO, 5  $\mu$ M) for 4 h or 30 min, respectively. In parallel, cells were pretreated with the ADAM10 inhibitor GI254023X (GI, 5  $\mu$ M) or incubated with the ADAM10 inhibitor alone. Supernatants were harvested, and soluble E-cadherin was determined by ELISA (Upper). GI254023X treatment abolished the increased release of soluble E-cadherin but also the increase in CTF1 generation, as evidenced by E-cadherin immunoblots of comparable treated cells (Lower) (independent experiment).

tion of E-cadherin by means of immunocytochemistry, using antibodies against the ectodomain and the cytoplasmic domain of E-cadherin in HaCaT cells (Fig. 3). Whereas E-cadherin and  $\beta$ -catenin immunoreactivity was very prominent at cell-cell junctions of mock-treated cells (Fig. 3A, D, and G), stimulation with ionomycin lead to loss of the E-cadherin ectodomain from the cell surface (Fig. 3B). Accordingly, cells lost cell-cell contacts and exhibited a slightly rounded appearance. The C-terminal E-cadherin immunoreactivity as well as the  $\beta$ -catenin staining became more diffuse and dislocated into the cytoplasm (Fig. 3E and H). In contrast, cotreatment with the ADAM10 inhibitor GI254023X retained E-cadherin as well as  $\beta$ -catenin at



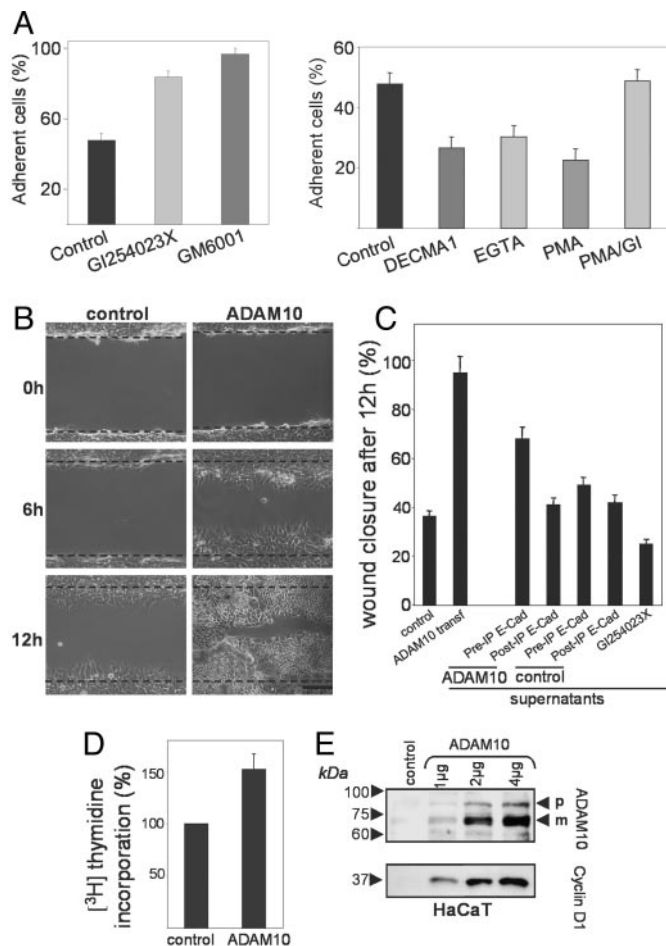
**Fig. 3.** The ADAM10 inhibitor GI254023X rescues E-cadherin cell surface expression and  $\beta$ -catenin translocation after ionomycin treatment. HaCaT cells were mock-treated (A, D, and G) or stimulated with ionomycin (5  $\mu$ M) for 30 min in the presence (C, F, and I) or absence (B, E, and H) of the ADAM10 inhibitor GI254023X (GI, 5  $\mu$ M). Afterward, cells were fixed with PFA and immunostained with N-terminal (green) and C-terminal (red) E-cadherin and  $\beta$ -catenin (red, Bottom) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. (Scale bar: 10  $\mu$ m.)

the cell surface, and the morphological integrity was unaffected (Fig. 3 C, F, and I). This observation confirms our biochemical data and strongly suggests that changes in E-cadherin localization, epithelial cell–cell adhesion, and  $\beta$ -catenin translocation are ADAM10-mediated.

**Influence of ADAM10 on Adhesion, Migration, and Proliferation of Epithelial Cells.** To elucidate the functional relevance of ADAM10-mediated E-cadherin shedding for cell–cell adhesion, calcein-stained HaCaT cells were seeded on top of an unstained monolayer of corresponding cells in the presence or absence of the general metalloprotease inhibitor GM6001 or the ADAM10 inhibitor GI254023X. After 20 min of incubation, nonadherent cells were washed away, and the remaining fluorescent cells were quantified. As shown in Fig. 4A, both inhibitors strongly increased cell–cell adhesion to a nearly equal level, confirming the importance of metalloproteases in the regulation of cell–cell adhesion and demonstrating that the majority of this activity can be attributed to ADAM10. In contrast, induction of E-cadherin shedding with PMA profoundly reduced cell–cell adhesion, and this effect could be reversed with the ADAM10 inhibitor GI254023X (Fig. 4A Right). The degree of PMA-reduced cell–cell adhesion was comparable with the E-cadherin-mediated and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adhesion as evidenced by the use of the inhibitory E-cadherin antibody DECMA-1 (23) and EGTA, respectively. This experiment demonstrates that ADAM10 is critically involved in the constitutive regulation, as well as the inducible regulation, of the adhesive properties of epithelial cells.

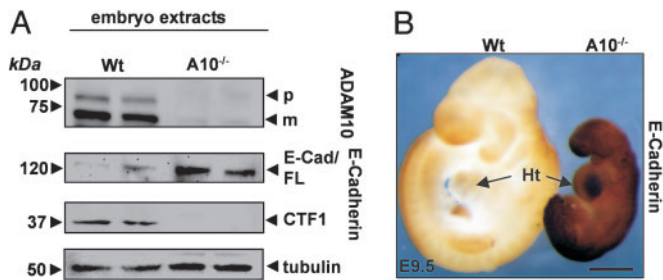
To address the role of ADAM10 in keratinocyte migration, we tested ADAM10-transfected HaCaT cells in an *in vitro* model for wound healing (24). In this assay, scrape wounds were generated in confluent HaCaT cultures, and cells were allowed to migrate into the denuded area for 12 h at 37°C. ADAM10-transfected HaCaT cells (40–50% transfection efficiency) started to recover the denuded area 6 h after scratching, and scratch closure was nearly completed after 12 h. In contrast, mock-transfected cells were less motile, as indicated by a lower number of cells in the denuded area after 6 and 12 h (Fig. 4B), demonstrating an ADAM10-dependent effect on epithelial cell migration.

Previously, it has been demonstrated that soluble E-cadherin can disrupt cell–cell adhesion and induce invasion into collagen



**Fig. 4.** ADAM10 regulates cell–cell adhesion and migration of epithelial cells. (A) Adhesion of calcein-labeled HaCaT cells on a monolayer of the corresponding cells after 20 min of incubation was analyzed in the presence or absence of the broad metalloprotease inhibitor GM6001 (5  $\mu$ M) or the ADAM10 inhibitor GI254023X (5  $\mu$ M). In a similar assay, cells were preincubated with the inhibitory anti-E-cadherin antibody DECMA-1, the corresponding IgG1 isotype (control), and EGTA (5 mM) for 30 min or with PMA (200 ng/ml) or PMA in the presence of GI254023X (GI) for 2 h. Means and SDs from three independent experiments are shown. (B) ADAM10 enhances epithelial migration. HaCaT cells were transfected with empty vector (control) or ADAM10 and grown to confluence. A cell-free area was introduced by scratching with a pipette tip, and migration was evaluated after different times. Micrographs of nonfixed cells at 0, 6, and 12 h are shown. One representative of three independent experiments is shown. (Scale bar: 100  $\mu$ m.) (C) ADAM10-released soluble E-cadherin increases the migration of keratinocytes. HaCaT cells were mock-transfected (control), ADAM10-transfected, or treated with GI254023X overnight, and the supernatants of these cells were harvested. Supernatants were left untreated (PreIP E-Cad) or E-cadherin-immunoprecipitated (PostIP E-Cad) and transferred to untreated HaCaT cells. All cells were analyzed for migration in a wound healing assay (see also Figs. 12 and 13). (D) Increased proliferation in keratinocytes overexpressing ADAM10. HaCaT cells were transfected with empty vector (control) or with ADAM10. After 24 h, cells were pulsed with 0.25  $\mu$ Ci per well of [ $^3\text{H}$ ]thymidine for an additional 16 h. Values obtained for mock-treated cells were considered 100% and compared with ADAM10-transfected cells (mean and SD;  $n = 6$ ). (E) Overexpression of ADAM10 leads to a dose-dependent increase of cyclin D1 in keratinocytes. HaCaT cells were transfected with empty vector or different amounts of ADAM10 and analyzed for expression of ADAM10 and cyclin D1.

type I (25, 26). To analyze the contribution of soluble E-cadherin to cell migration, we examined the influence of the supernatant of mock-transfected and ADAM10-transfected HaCaT cells on the migration of untransfected control cells. Indeed, the supernatant of ADAM10-transfected cells increased the cell migra-



**Fig. 5.** Loss of E-cadherin ectodomain shedding in ADAM10-deficient embryos. (A) The same amount of proteins from WT embryo and ADAM10<sup>-/-</sup> embryo extracts (embryonic day 9.5) were analyzed by immunoblot for ADAM10 and E-cadherin cleavage products. (B) Accumulation of full-length E-cadherin in an ADAM10<sup>-/-</sup> embryo. Whole-mount staining of WT and ADAM10<sup>-/-</sup> embryos (embryonic day 9.5) with N-terminal E-cadherin (H108) antibodies is shown. Ht, heart. (Scale bar: 500  $\mu$ m.)

tion, whereas the supernatant of mock-transfected cells showed only weak effects (Fig. 4C; see also Fig. 12, which is published as supporting information on the PNAS web site). Interestingly, immunoprecipitation of soluble E-cadherin abolished this stimulatory effect (Fig. 4C; see also Fig. 13, which is published as supporting information on the PNAS web site).

Because reepithelialization of the epidermis also requires keratinocyte proliferation, we assayed ADAM10 and mock-transfected HaCaT cells for proliferation by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. ADAM10 transfection stimulated the proliferation of HaCaT cells (Fig. 4D). To explore whether this effect could be due to a modified expression of the cell cycle regulator cyclin D1, we analyzed the expression of this  $\beta$ -catenin downstream gene. ADAM10 transfection led to a dose-dependent increase in cyclin D1 expression (Fig. 4E), indicating that ADAM10 might influence proliferation through its effect on  $\beta$ -catenin translocation and  $\beta$ -catenin signal transduction.

**ADAM10-Mediated E-Cadherin Shedding Cannot Be Compensated *in Vivo*.** To further elucidate the *in vivo* relevance of E-cadherin cleavage by ADAM10, we analyzed extracts of WT and ADAM10-deficient embryos at embryonic day 9.5 by Western blotting. The generation of the E-cadherin CTF1 was almost completely abolished in the ADAM10-deficient embryos, even though the full-length protein was expressed and equal protein was loaded (Fig. 5A). The full-length E-cadherin fragment was even increased  $\approx$ 4-fold, underlining the essential role of ADAM10 in the regulation of the adhesion-competent, full-length protein. Interestingly,  $\beta$ -catenin downstream genes such as cyclin D1, c-myc, and c-jun were decreased in the ADAM10-deficient embryo (data not shown), supporting an effect of ADAM10 on  $\beta$ -catenin signaling.

In accordance with the E-cadherin immunoblot analysis, ADAM10-deficient embryos showed dramatically increased amounts of full-length E-cadherin on their surface, as evidenced by whole-mount staining with an N-terminal E-cadherin antibody (Fig. 5B). The specificity of the whole-mount staining was confirmed by analysis of tubulin immunoreactivity, which was comparable in both embryos (see Fig. 14, which is published as supporting information on the PNAS web site). These results demonstrate that ADAM10 is essentially involved in E-cadherin processing *in vivo*.

## Discussion

E-cadherin plays a central role in many aspects of epithelial biogenesis and is essential for epithelial integrity during development (27–29). Regulating E-cadherin function is a dynamic process associated with cellular rearrangements,

movements, and pathologic processes such as wound healing. Morphogenetic movements during development but also in postnatal life involve the continual breaking and reforming of cell–cell adhesive contacts (30). Although it has been suggested that proteolytic cleavage of E-cadherin ectodomains influences cadherin-mediated adhesion, the proteinase responsible for this process has not been identified. In this report, we have provided multiple lines of evidence that ADAM10 is critically involved in the proteolytic processing of E-cadherin *in vitro* and *in vivo*. Our experiments indicate that ADAM10-mediated cleavage of E-cadherin represents a potent mechanism for regulating cell–cell adhesion, motility, and proliferation of epithelial cells.

Recently, the cleavage of E-cadherin has been attributed to an unidentified membrane-bound metalloprotease (5). Our experiments using different ADAM-deficient fibroblasts and our retransfection studies clearly demonstrate that ADAM10 is critically involved in the constitutive cleavage of E-cadherin. To exclude that the relevance of this finding is restricted to fibroblasts, we examined the role of ADAM10 in epithelial cells. ADAM10 overexpression, inhibitor studies, and RNA interference-mediated down-regulation of endogenous ADAM10 demonstrated that in established and primary epithelial cell lines, ADAM10 represents the major E-cadherin sheddase.

Previous studies have shown that cadherin-mediated adhesion is regulated by a variety of external stimuli (4, 5). In particular, Ca<sup>2+</sup> influx is recognized as a critical event in the stimulation of wound healing, leading to increased migration and proliferation (31, 32). Our results, which demonstrate that Ca<sup>2+</sup> influx induces the cleavage of E-cadherin depending on ADAM10 activity, offer valuable clues to understanding these processes. Accordingly, the adhesiveness of epithelial cells was increased after inhibition of ADAM10. The important role of ADAM10 is further supported by the *in vitro* reepithelization assay of this study, which showed that transient transfection of ADAM10 led to increased motility of epithelial cells. In accordance with previous reports that demonstrated that soluble E-cadherin causes scattering of epithelial cells and induction of invasion (25, 26, 33), our data demonstrate that ADAM10-released soluble E-cadherin also contributes to this effect. Therefore, the increased cell migration seems to be a result of ADAM10-mediated abrogation of cell–cell contacts on the one hand and additional effects of increased amounts of soluble E-cadherin on the other hand. However, we cannot exclude that the shedding of other ADAM10 substrates like CD44 that are also important for cell migration (34, 35) might directly or indirectly contribute to the observed increase of migration. ADAM10-mediated E-cadherin shedding also affected  $\beta$ -catenin translocation.  $\beta$ -Catenin is known to bind to transcription factors of the lymphocyte enhancer-binding factor 1/T cell factor pathway to regulate expression of downstream target genes such as c-myc (36) and cyclin D1 (37), which are involved in controlling proliferation. Our data show that ADAM10 modulates  $\beta$ -catenin signaling through regulation of E-cadherin cell surface expression and affects the expression of  $\beta$ -catenin downstream genes *in vitro* and *in vivo*. Even though we cannot completely exclude that these effects are also influenced by other ADAM10 substrates, it seems reasonable that the increased cyclin D1 level due to ADAM10 overexpression contributes to the enhanced proliferation of the keratinocytes. Because transcriptional down-regulation, but also posttranscriptional down-regulation, of E-cadherin expression has been discussed as a key mechanism for the increased proliferation and migration of epithelial cancer cells, further studies will have to show whether ADAM10-mediated E-cadherin cleavage might also contribute to tumor progression.

Our data reveal that the interaction of ADAM10 and E-cadherin is also of high relevance for embryonic development *in vivo*. Our immunoblot analysis, as well as immunostaining of embryos, demonstrated that ADAM10-mediated E-cadherin shedding can apparently not be compensated in the knockout embryo. Because E-cadherin overexpression is known to lead to cell growth arrest and apoptosis (38), it is tempting to speculate that this E-cadherin increase might also contribute to the developmental defects of the ADAM10-deficient mice.

In conclusion, our findings demonstrate that ADAM10 is critically involved in the physiological processing of E-cadherin *in vitro* and *in vivo*. The coordinated interaction of ADAM10 and E-cadherin may be significant for an effective interplay

among cell–cell adhesion, cell detachment, cell proliferation, and cell survival during development but also under pathological conditions.

We thank S. Jessen for excellent technical assistance, S. Rose-John (Biochemical Institute, Kiel, Germany) for the ADAM17-deficient MEFs, C. Blobel (Weill Medical College of Cornell University, New York) for the ADAM15-deficient MEFs, N. Fusenig for the HaCaT keratinocytes, and D. Vestweber (Max-Planck-Institut of Molecular Biomedicine, Münster, Germany) for the E-cadherin construct. This work was supported by Hensel Stiftung, Kiel, Deutsche Forschungsgemeinschaft Sonderforschungsbereich 415 (to P.S. and K.R.), Deutsche Forschungsgemeinschaft LU869/1-2 (to A.L.), Interuniversity Attraction Poles Program P5/19 of the Belgian Federal Science Policy Office, and European Union contract LSHM-CT-2003-503330 (APOPIS).

- Gumbiner, B. M. (1996) *Cell* **84**, 345–357.
- Takeichi, M. (1991) *Science* **251**, 1451–1455.
- Gumbiner, B. M. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 399–404.
- Steinhilber, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K. & Huber, O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4972–4980.
- Ito, K., Okamoto, I., Araki, N., Kawano, Y., Nakao, M., Fujiyama, S., Tomita, K., Mimori, T. & Saya, H. (1999) *Oncogene* **18**, 7080–7090.
- Schlondorff, J. & Blobel, C. P. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, Part 21, 3603–3617.
- Seals, D. F. & Courtneidge, S. A. (2003) *Genes Dev.* **17**, 7–30.
- 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., *et al.* (1998) *Science* **282**, 1281–1284.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T. & Rubin, G. M. (1996) *Science* **273**, 1227–1231.
- Pan, D. & Rubin, G. M. (1997) *Cell* **90**, 271–280.
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herremans, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena, I. A., von Figura, K., *et al.* (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615–2624.
- Hall, R. J. & Erickson, C. A. (2003) *Dev. Biol.* **256**, 146–159.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., *et al.* (2003) *Blood* **102**, 1186–1195.
- Herremans, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11872–11877.
- Horiuchi, K., Weskamp, G., Lum, L., Hammes, H. P., Cai, H., Brodie, T. A., Ludwig, T., Chiusaroli, R., Baron, R., Preissner, K. T., *et al.* (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 5614–5624.
- 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., *et al.* (1997) *Nature* **385**, 729–733.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N. E. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 761–771.
- Caldelari, R., Suter, M. M., Baumann, D., De Bruin, A. & Muller, E. (2000) *J. Invest. Dermatol.* **114**, 1064–1065.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., De Strooper, B., Hartmann, D. & Saftig, P. (2005) *EMBO J.* **24**, 742–752.
- Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M. & Hynes, R. O. (1997) *Dev. Biol.* **181**, 64–78.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., *et al.* (2002) *EMBO J.* **21**, 1948–1956.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002) *Science* **296**, 550–553.
- Pece, S. & Gutkind, J. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 41227–41233.
- Cha, D., O'Brien, P., O'Toole, E. A., Woodley, D. T. & Hudson, L. G. (1996) *J. Invest. Dermatol.* **106**, 590–597.
- Wheelock, M. J., Buck, C. A., Bechtol, K. B. & Damsky, C. H. (1987) *J. Cell. Biochem.* **34**, 187–202.
- Ryniers, F., Stove, C., Goethals, M., Brackenier, L., Noe, V., Bracke, M., Vandekerckhove, J., Mareel, M. & Bruyneel, E. (2002) *Biol. Chem.* **383**, 159–165.
- Levine, E., Lee, C. H., Kintner, C. & Gumbiner, B. M. (1994) *Development (Cambridge, U.K.)* **120**, 901–909.
- Hermiston, M. L. & Gordon, J. I. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 489–506.
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y. & Takeichi, M. (1996) *Genes Dev.* **10**, 659–671.
- Gumbiner, B. M. (1992) *Cell* **69**, 385–387.
- Tran, P. O., Hinman, L. E., Unger, G. M. & Sammak, P. J. (1999) *Exp. Cell Res.* **246**, 319–326.
- Coomer, B. L. & Gotlieb, A. I. (1990) *Arteriosclerosis* **10**, 215–222.
- Noe, V., Willems, J., Vandekerckhove, J., Roy, F. V., Bruyneel, E. & Mareel, M. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, Part 1, 127–135.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M. & Saya, H. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 893–902.
- Murai, T., Miyazaki, Y., Nishinakamura, H., Sugahara, K. N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T. & Miyasaka, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 4541–4550.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1998) *Science* **281**, 1509–1512.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. & Ben Ze'ev, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5522–5527.
- Stockinger, A., Eger, A., Wolf, J., Beug, H. & Foisner, R. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 1185–1196.
- Boterberg, T., Bracke, M., Bruyneel, E. & Mareel, M. (2001) in *Methods in Molecular Medicine*, eds Brooks, S. & Schumacher, U. (Humana, Totowa, NJ), pp. 33–45.
- Gottardi, C. J., Wong, E. & Gumbiner, B. M. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 1049–1060.

# L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin/ $\gamma$ -Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion, Cell Migration, and Neurite Outgrowth

Thorsten Maretzky,<sup>1</sup> Marc Schulte,<sup>1</sup> Andreas Ludwig,<sup>1</sup> Stefan Rose-John,<sup>1</sup> Carl Blobel,<sup>2</sup> Dieter Hartmann,<sup>3</sup> Peter Altevogt,<sup>4</sup>† Paul Saftig,<sup>1</sup>†\* and Karina Reiss<sup>1</sup>†

*Biochemical Institute, Christian Albrechts University Kiel, D-24098 Kiel, Germany<sup>1</sup>; Arthritis and Tissue Degeneration Program, Hospital for Special Surgery at Weill Medical College of Cornell University, New York, New York 10021<sup>2</sup>; Department for Human Genetics, K. U. Leuven and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB-4), 3000 Leuven, Belgium<sup>3</sup>; and German Cancer Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany<sup>4</sup>*

Received 10 June 2005/Accepted 14 June 2005

**The immunoglobulin superfamily recognition molecule L1 plays important functional roles in the developing and adult nervous system. Metalloprotease-mediated cleavage of this adhesion molecule has been shown to stimulate cellular migration and neurite outgrowth. We demonstrate here that L1 cleavage is mediated by two distinct members of the disintegrin and metalloprotease family, ADAM10 and ADAM17. This cleavage is differently regulated and leads to the generation of a membrane bound C-terminal fragment, which is further processed through  $\gamma$ -secretase activity. Pharmacological approaches with two hydroxamate-based inhibitors with different preferences in blocking ADAM10 and ADAM17, as well as loss of function and gain of function studies in murine embryonic fibroblasts, showed that constitutive shedding of L1 is mediated by ADAM10 while phorbol ester stimulation or cholesterol depletion led to ADAM17-mediated L1 cleavage. In contrast, *N*-methyl-D-aspartate treatment of primary neurons stimulated ADAM10-mediated L1 shedding. Both proteases were able to affect L1-mediated adhesion and haptotactic migration of neuronal cells. In particular, both proteases were involved in L1-dependent neurite outgrowth of cerebellar neurons. Thus, our data identify ADAM10 and ADAM17 as differentially regulated L1 membrane sheddases, both critically affecting the physiological functions of this adhesion protein.**

The neural cell adhesion molecule L1 (NCAM-L1) is a 200- to 220-kDa type I membrane glycoprotein, which consists of six immunoglobulin-like domains, followed by five fibronectin-like repeats (type III), a transmembrane domain, and a small conserved cytoplasmic tail (16, 49). L1 is critically involved in the development of the nervous system promoting neuronal migration, neuronal survival, neurite outgrowth, and myelination, as well as axon guidance, fasciculation, and regeneration (8, 25, 30, 60). The importance of L1 function is also illustrated by mutations in the human L1 gene, resulting in CRASH syndrome (corpus callosum agenesis, retardation, adducted thumbs, shuffling gait, and hydrocephalus) (19).

L1 mediates homophilic cell-cell interaction but also binds heterophilic ligands like axonin-1 (39), CD24 (36), and several integrins (35). It has been shown previously that L1 can undergo membrane-proximal cleavage, leading to the release of the soluble extracellular domain and the generation of a membrane-bound stub (2, 22, 23, 37, 48). The soluble extracellular domain remains intact and has been suggested to serve as a substrate for integrin-mediated cell adhesion, thereby stimu-

lating cellular motility and cell migration (48). In the nervous system, soluble L1 released from cultured neurons promotes neurite outgrowth and influences neuronal differentiation (12, 37, 68).

Recently, ADAM10, a family member of the disintegrin and metalloprotease family (ADAM) has been implicated in the release of soluble L1 in human tumor cell lines (22, 23, 48). ADAMs are involved in the constitutive and stimulated ectodomain shedding of various membrane-bound proteins (6, 63, 65). ADAM10 has been shown to play important roles in development and in the central nervous system by influencing Notch/Delta activation and N-cadherin-dependent  $\beta$ -catenin signaling (24, 51, 54, 55, 58). ADAM10 has high sequence similarity with the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme (TACE/ADAM17), which has been implicated in the ectodomain shedding of several substrates like TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  receptors I and II, transforming growth factor- $\alpha$ , interleukin 6 receptor, and fractalkine (4, 31, 59).

Recently, it has been shown that the proteolytic release of the extracellular domain of transmembrane proteins can be followed by intramembrane  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage, leading to the release of the cytoplasmic domain into the cytosol. This process, named regulated intramembrane proteolysis (RIP) (7), is discussed as a novel mechanism for signal transduction (71) and has been implicated in the processing of

\* Corresponding author. Mailing address: Biochemical Institute, Christian Albrechts University Kiel, D-24098 Kiel, Germany. Phone: 49/431-8802216. Fax: 49/431-8802238. E-mail: psaftig@biochem.uni-kiel.de.

† Contributed equally to this work.

an increasing number of proteins like Notch (66), the amyloid precursor protein (APP) (20), and N-cadherin (44, 55).

In this study, we have analyzed the proteolytic processing of the L1 adhesion molecule in detail. We provide multiple lines of evidence that two independent and differentially regulated members of the ADAM family, ADAM10 and ADAM17, are critically involved in the release of the extracellular domain of L1. We demonstrate that the remaining C-terminal fragment is further processed through  $\gamma$ -secretase activity, suggesting the possibility that L1 may also contribute to intracellular signal transduction pathways. Finally, we show that ADAM10 and ADAM17 play an important functional role by regulating L1-dependent neuronal cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth.

## MATERIALS AND METHODS

**Primary antibodies, reagents, and vectors.** The monoclonal antibody (MAbs) against the cytoplasmic domain of L1 (NCAM-L1) was purchased from Covance Research Products, Inc. (HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg, Germany). The antibodies MAb 324 and MAb 555 against the ectodomain of the mouse L1 adhesion molecule were described before (2, 14, 34). ADAM10 was detected by using a polyclonal antiserum B42.1, described previously (24). ADAM17 antibody was from Chemicon International, Inc. (Temecula, CA). Microtubule-associated protein-2 antibodies were from Sigma (Deisenhofen, Germany). The recombinant human NCAM L1/Fc chimera and the recombinant mouse ADAM10 were obtained from R&D Systems (Wiesbaden, Germany). Reagents were obtained as follows: phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), EDTA, and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) were from Sigma; methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) was from Research Biochemicals International (Natick, MA); and  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Hydroxamate-based inhibitors GW280264X and GI254023X were described previously (31). Complete EDTA-free protease inhibitor mixture was obtained from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany).

**Cell culture and transfection.** Simian virus large T-antigen-immortalized ADAM10<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and cell lines derived from presenilin 1/2<sup>-/-</sup> (PS1/2<sup>-/-</sup>), ADAM9<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup>, and respective wild-type (WT) animals were generated and characterized as described previously (24, 28, 29, 53, 59, 73). TACE<sup>-/-</sup> EC2 cells and TACE<sup>-/-</sup> EC2 cells stably retransfected with full-length TACE were described previously (5, 47). Human neuronal H4 cells were kindly provided by J. Wilfang (Erlangen, Germany). All cells were grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM; PAA Laboratories, Cölbe, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-1% streptomycin.

cDNA-encoding mouse ADAM10 was cloned into the XhoI/BamHI site of the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and confirmed by DNA sequencing. Cells were transfected in six-well tissue culture plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with FuGENE 6 (Roche) according to the manufacturers' instructions and analyzed 48 h after transfection.

**L1 cleavage assays.** For analysis of constitutive L1 shedding, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in DMEM with GI254023X (5  $\mu$ M), GW280264X (5  $\mu$ M), EDTA (5 mM), or dimethylsulfoxide (DMSO; Roth, Karlsruhe, Germany) for 3 h. For stimulation, FCS-free medium containing metalloprotease inhibitors or DMSO was added. After 30 min, the cells were stimulated with PMA (200 ng/ml) for 3 h or with MCD (10 mM) for 60 min. Afterward, the conditioned media were harvested, and a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche) was added. Supernatants were concentrated (30 fold) through centrifugation in Microcon Centrifugal filter devices (YM-10; Millipore, Bedford, MA). Cells were washed with 2 ml PBS and harvested in 1 ml PBS. Cell pellets were lysed in 100  $\mu$ l radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate) containing a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche).

**siRNA transfection.** The mammalian expression vector pSUPER, kindly provided by T. R. Brummelkamp, was used for expression of short hairpin RNA in H4 cells. Since short hairpin RNAs are processed into small interfering RNA (siRNA)-like molecules in the cell, this method is referred to as ADAM10 siRNA in the following text. The sequence of the human ADAM10 siRNA was 5'-GACAUUUAACCUACGAU-3'. The sequence of the human ADAM17 siRNA was 5'-CACAUUGAAGAAACACUACU-3'. Both sequences were sepa-

rated by a 9-nucleotide noncomplementary spacer (TCTCTTGAA) from the corresponding reverse complement of the same 19-nucleotide sequence. These sequences were inserted into the pSUPER backbone after digestion with BglII and HindIII.

**L1-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** A 96-well plate (Microton; Greiner, Frickenhausen, Germany) was coated overnight with 4  $\mu$ g/ml mouse anti-L1 (MAb 324) in 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.3), subsequently washed three times with PBS with 0.05% Tween (PBS-T), and blocked with PBS-T containing 2% bovine serum albumin (BSA) for 2 h. Samples (50  $\mu$ l per well) were added, and the plate was incubated at room temperature (RT) for 2 h. Following washing, 100-ng/ml biotinylated anti-L1 MAb 555 in PBS-T containing 1% BSA was added to each well, and the plate was incubated at RT for 1 h. After being washed, 100-mU/ml streptavidin-peroxidase (POD) conjugate (Roche) in PBS-T containing 1% BSA was added, followed by 1 h of incubation at RT. After being washed, chromogenic POD substrate (BM Blue; Roche) was added. The reaction was stopped after 20 min of incubation at RT by the addition of 1.8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> before the optical density was determined at 450 nm.

**Immunoblotting.** Same amounts of protein were loaded on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels. The samples were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P; Amersham), which were blocked overnight with 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS). After incubation with the indicated antibody in blocking buffer, membranes were washed three times in TBS containing 0.1% Tween. Primary antibodies were detected using affinity purified POD-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Detection was carried out using the ECL detection system (Amersham, Freiburg, Germany). Signals were recorded by a luminescent image analyzer (image reader LAS1000; Fujifilm, Tokyo, Japan) and analyzed with image analyzer software (Gel-ProAnalyser; Media Cybernetics). For reprobing blots, polyvinylidene difluoride membranes were incubated in stripping buffer (100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 1 h at 60°C with occasional shaking. After three washes in large volumes of TBS containing 0.1% Tween, membranes were blocked in blocking buffer for 1 h at room temperature, and immunodetection was repeated.

**In vitro assay of ADAM10-mediated L1 processing in mouse brain.** Brains from adult wild-type mice were homogenized in 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM spermidine (pH 7.9) and centrifuged at 600  $\times$  g for 15 min at 4°C. After recentrifugation of the supernatant at 25,000  $\times$  g for 45 min at 4°C, the crude membrane fraction of one mouse brain was resuspended in DMEM (PAA Laboratories) and subdivided into four 20- $\mu$ l aliquots. These aliquots were incubated at 37°C for different times with recombinant mouse ADAM10 (600 ng/aliquot; R&D). As a control, aliquots were incubated without recombinant mouse ADAM10 for 60 min. Samples were resuspended in sample buffer and loaded on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels.

**Microexplant cultures.** Microexplant cultures from mouse cerebella were prepared basically as described previously (18). Briefly, cerebella were taken from 6-day-old wild-type mice and transferred to ice-cold PBS. The tissue was freed from meninges, choroid plexus, and blood vessels and forced through a Nitrex net with a pore width of 100  $\mu$ m. The small tissue pieces were washed twice with Hanks' balanced salt solution, followed by a washing step with culture medium (minimum Eagle's medium containing 10% horse serum, 10% FCS, 6 mM glucose, 200  $\mu$ M L-glutamine, 50 units/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 10  $\mu$ g/ml human transferrin, 10  $\mu$ g/ml insulin, and 10 ng/ml selenium [Sigma]). The tissue pieces were collected by sedimentation. A total of 30 to 40 explants were plated onto poly-L-lysine (PLL; Sigma-Aldrich)-coated glass coverslips (15-mm diameter) or coverslips additionally coated with 2  $\mu$ g/ml recombinant human NCAM L1/Fc chimera (R&D). Coverslips were rinsed three times with distilled water before the explants were plated. At 16 h after plating, 1 ml of culture medium lacking FCS was added to the explants containing the metalloprotease inhibitor GW280264X or GI254023X at 5  $\mu$ M. As control, explants were incubated with DMSO only in parallel. After an incubation time of 24 h, the explants were fixed with 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde and stained with Coomassie brilliant blue G-250 solution (Serva, Heidelberg, Germany). The effect of the different protease inhibitors on neurite outgrowth was analyzed and quantitated by measuring the length of the 10 longest neurites of 10 aggregates in three independent experiments (37) with Axio Vision Release 4.2 software (Kontron, Zeiss, Germany).

**Preparation of external granular layer (EGL) cells.** Cerebella were taken from 6-day-old wild-type mice and transferred to ice-cold PBS. The tissue was freed from meninges, choroid plexus, and blood vessels. Sagittal sections of the cerebella were cut on a high-frequency vibratome (Bio-Rad, München, Germany) at 400  $\mu$ m and collected in a petri dish with fresh buffer. The EGL was selectively dissected from the slices with fine spatulas under a stereomicroscope and collected in separate vials before dissociation (56). Tissues were dissociated me-

chanically with Pasteur pipettes and enzymatically by limited trypsin digestion. Cells were seeded on PLL-coated six-well dishes (Sarstedt). For proper identification of neurons, cells were stained with anti-microtubule-associated protein-2 in parallel assays (data not shown).

**Adhesion assay.** For analyzing cell substrate adhesion, 96-well plates (Sarstedt) were coated with 2  $\mu\text{g/ml}$  recombinant human NCAM L1/Fc chimera (R&D) or 2  $\mu\text{g/ml}$  BSA in 100  $\mu\text{l}$  PBS at 4°C overnight. Fluorescently labeled cells were seeded at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well and incubated for 20 min. For fluorescent labeling, cells were suspended at  $2 \times 10^6/\text{ml}$  in PBS–0.1% BSA and incubated with 2.5  $\mu\text{M}$  fluorescent dye (calcein AM; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) at 37°C for 30 min. Excess dye was removed by washing cells twice with 15 ml PBS. Afterwards the cells were resuspended in growth medium and preincubated for 30 min with or without metalloprotease inhibitor GW280264X or GI254023X (5  $\mu\text{M}$ ) or vehicle control (DMSO). After incubation for 60 min with or without PMA (200 ng/ml), the cells were rapidly seeded onto the plates by centrifugation for 1 min at  $100 \times g$ . The plate was incubated at 37°C for 20 min and then repeatedly washed with 200  $\mu\text{l}$  PBS per well. The fluorescence signal from the adherent cells was measured before and after washing with a fluorescence plate reader (Lambda Fluoro 230; MWG Biotech, München, Germany) at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 530 nm. The differences in fluorescence before and after washing are depicted as percentages of adherent cells.

**Transmigration assay.** For the haptotactic cell migration assay, recombinant human NCAM L1/Fc chimera (2  $\mu\text{g/ml}$ ) or BSA (2  $\mu\text{g/ml}$ ) for a control was coated for 90 min to the back sides of transwell chambers (6.5-mm diameter, 5- $\mu\text{m}$  pore size; Costar). A total of  $3 \times 10^5$  dissociated EGL cells from 6-day-old mice were seeded in growth medium into the upper chamber and were allowed to transmigrate to the lower compartment for 48 h at 37°C. To quantitate transmigrated cells, the inner chamber was removed and cleaned with a cotton swab to remove the nonmigrated cells. Migrated cells adherent to the back side of the membrane were stained with crystal violet solution. The membranes were extensively washed in distilled water, and the remaining stain was eluted with 10% acidic acid. The eluted dye was measured at 595 nm with an ELISA reader (Sunrise; Tecan, Crailsheim, Germany).

**Statistical analysis.** All values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The standard error values indicate the variation between mean values obtained from at least three independent experiments. The assumptions for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and equal variance (Levene median test) were verified with SigmaStat 3.1 software (Erkrath, SYSSTAT, Germany). The analysis of variance was performed with one- or two-way analysis of variance. Multiple parametric statistical comparisons between experimental groups versus a control group were accomplished by Dunnett's method. All pairwise multiple comparison procedures were performed with Tukey's test. Nonparametric statistics were made using the Mann-Whitney rank sum test.  $P$  values of  $<0.05$  were classified as statistically significant.

## RESULTS

**Metalloprotease inhibitors that discriminate between ADAM10 and ADAM17 differentially block L1 cleavage in mouse embryonic fibroblasts.** The extracellular domain of the full-length 220-kDa type I protein L1 can be released through membrane-proximal cleavage, leading to the generation of a 32-kDa C-terminal fragment 1 (CTF1) and a soluble N-terminal fragment of 200 kDa (NTF) (Fig. 1A). To assess the involvement of the most likely candidate sheddase ADAM10 and its close homologue ADAM17, we performed inhibitor studies with two hydroxamate-based compounds which differ in their capacity to block the activities of these two proteases (1, 31). The inhibitor GW280264X has been shown to preferentially block ADAM17 and, to a lesser extent, ADAM10, while the compound GI254023X blocked ADAM10 with  $>100$ -fold-more potency than ADAM17. Western blot analysis of supernatants of inhibitor-treated WT MEFs demonstrated that the release of L1-NTF could be strongly diminished by the ADAM10 inhibitor GI254023X. In contrast, treatment with the inhibitor GW280264X affected L1 release only slightly (Fig. 1B). The reduction with GI254023X was comparable to

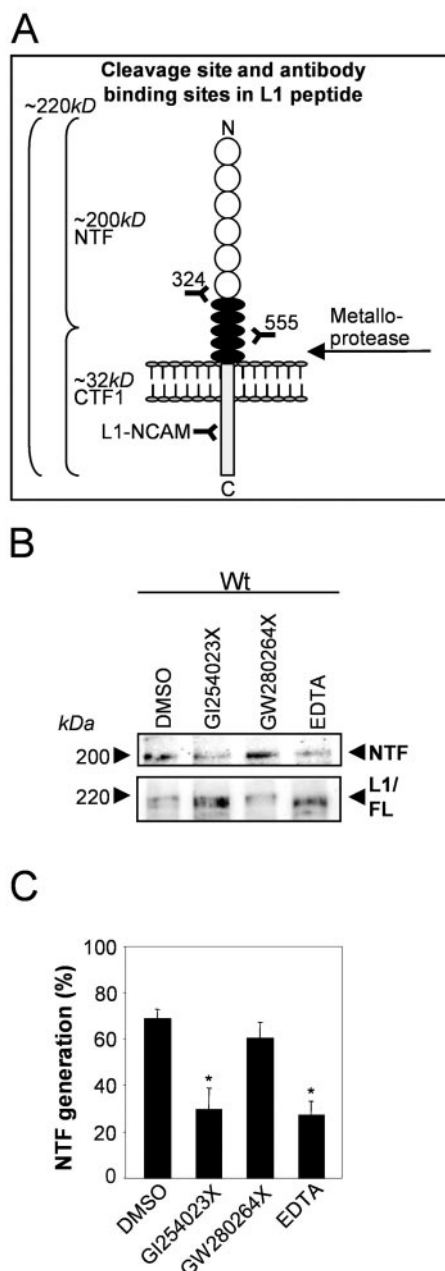


FIG. 1. Different effects of ADAM10 and ADAM17 inhibitors on L1 proteolysis. (A) Schematic map of L1, the metalloprotease cleavage site and antibody binding regions. Full-length 220-kDa L1 is cleaved near the transmembrane domain in N-terminal 200-kDa fragments (NTF) and C-terminal 32-kDa fragments (CTF1). (B) Representative immunoblot of supernatants (top) and cell lysates (bottom) of wild-type MEFs with N-terminal L1 antibodies. MEFs were transfected with an L1 expression vector; 48 h afterwards, cells were incubated with the hydroxamate-based ADAM10 inhibitor GI254023X (5  $\mu\text{M}$ ), the ADAM17/ADAM10 inhibitor GW280264X (5  $\mu\text{M}$ ), the broad-spectrum metalloprotease inhibitor EDTA (5 mM), or DMSO as control. EDTA, as well as the ADAM10 inhibitor, reduced constitutive L1 cleavage. L1/FL, full-length L1; WT, wild-type-MEFs. (C) Densitometric analysis of L1-NTF generation. To normalize variations in transfection efficiency, NTF generation was calculated as a percentage of total L1 (full-length L1 plus NTF). Results are obtained from three independent experiments and expressed as means  $\pm$  SEM. The release of soluble L1 was significantly decreased when cells were treated with GI254023X or EDTA compared to vehicle-treated cells (\*).



the effect of the broad-spectrum metalloprotease inhibitor EDTA, indicating that the majority of metalloprotease released L1 in MEFs can be attributed to ADAM10. To normalize variations in transfection efficiency, the cell pellet was also analyzed for L1 expression (Fig. 1B, bottom), and shedding was calculated as the percentage of soluble L1 in relation to total L1 (full-length protein and L1 fragment). The densitometric analysis of three independent experiments confirmed that ADAM10 contributes to the constitutive shedding of L1 (Fig. 1C).

**Constitutive shedding of L1 is severely diminished in ADAM10-deficient fibroblasts and embryos.** To further characterize the role of different ADAMs, we examined L1 shedding in a genetically defined system. We compared L1 release in a panel of different L1-transfected MEFs deficient for either ADAM9, ADAM10, ADAM15, or ADAM17 with wild-type cells. Western blot analysis with a C-terminal L1 antibody revealed that the generation of L1-CTF1 was unaffected in ADAM9<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup>, and ADAM17<sup>-/-</sup> fibroblasts and comparable with WT MEFs. In contrast, ADAM10<sup>-/-</sup> cells showed a strikingly reduced generation of this C-terminal fragment (Fig. 2A). This was also confirmed by densitometric analysis of several independent experiments, also taking into account the different transfection efficiencies (Fig. 2A, right). Notably, the generation of the CTF1 correlated well with the release of the soluble NTF in the cell culture medium in all analyzed cell lines (Fig. 2A, bottom).

To exclude heterogeneity in cell culture (24), we also confirmed the essential role of ADAM10 for constitutive L1 shedding in different independently derived ADAM10<sup>-/-</sup> cell lines (Fig. 2B). Moreover, we compared the release of soluble L1 in wild-type and ADAM10-deficient cells by ELISA (Fig. 2C). Corresponding to the data obtained by Western blot analysis, the release of the extracellular domain of L1 in ADAM10-deficient cells was severely reduced compared to that of wild-type cells. L1 release could also be inhibited with the broad-spectrum metalloprotease inhibitor GM6001 in wild-type cells but not in ADAM10-deficient cells (Fig. 2C). Finally, we confirmed by gain-of-function experiments that the defect in shedding in ADAM10<sup>-/-</sup> cells was indeed due to the lack of ADAM10. Transient retransfection of wild-type mouse ADAM10 rescued the constitutive L1 shedding in ADAM10-deficient fibroblasts (Fig. 2D).

To evaluate the *in vivo* relevance of ADAM10-mediated L1 shedding, we analyzed protein extracts from embryonic day 9 wild-type and ADAM10-deficient embryos. The absence of ADAM10 in the embryos was confirmed by Western blotting with an antiserum raised against murine ADAM10 (Fig. 2E, bottom). When the same Western blot was reprobed with C-terminal L1 antibodies, we found that the L1-CTFs were diminished but not absent in the ADAM10 knockout embryos. These data indicate that even though ADAM10 is critically involved in constitutive shedding of L1 it is not the exclusive sheddase *in vivo*. Since the embryo represents a very complex system of different cell types and complex interactions, it is not surprising that L1 can also be cleaved by one or even more distinct proteases. Of note, we also found a C-terminal fragment of about 28 kDa, which we called L1-CTF2. Comparable to CTF1, this fragment was prominent in the WT embryos but reduced in the knockout embryos, indicating that CTF1 pro-

duction is the rate-limiting step for further processing through another protease. In particular, this obvious sequence of proteolytic events suggested to us that L1 may also be processed by  $\gamma$ -secretase cleavage.

**L1 is a substrate for  $\gamma$ -secretase cleavage.** To identify the nature of the L1-CTF2-generating protease, we analyzed L1 shedding in the presence of the  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 in WT MEFs, ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs, and fibroblasts deficient for the  $\gamma$ -secretase complex components presenilin 1 and 2 (PS1/2) (Fig. 3). The CTF2 fragment of L1 was less abundant in MEFs than in embryo extracts. After overexposure of the immunoblot, a faint band of the CTF2 could be visualized in WT MEFs, which was missing in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 3, bottom). The application of  $\gamma$ -secretase inhibitor increased the amount CTF1 and diminished CTF2 production in WT cells, indicating a role of  $\gamma$ -secretase in L1 processing. The absence of CTF2 and the accumulation of CTF1 in PS1/2<sup>-/-</sup> MEFs confirmed this assumption. Thus, these data provide evidence that L1 is a substrate for RIP and suggest the possibility that L1 cleavage might also influence intracellular signal transduction pathways.

**PMA- and MCD-stimulated L1 cleavage in MEFs is mediated by ADAM17.** L1 shedding has been shown to be a regulated process which could be stimulated by treatment with different stimuli like protein kinase C agonist PMA (23). To clarify whether this stimulation could also be attributed to ADAM10, we analyzed the effect of GI254023X and GW280264X on PMA-treated wild-type fibroblasts. PMA treatment increased the release of L1 into the supernatant (Fig. 4A). Time-dependent analysis of PMA stimulation revealed that 2 h of incubation were sufficient to detect a considerable increase in L1 shedding, while a maximum was reached after 6 h (data not shown). The L1 release could be strongly diminished when cells were preincubated with the broad-spectrum metalloprotease inhibitor EDTA before stimulation. Since the inhibitor was applied before PMA stimulation and present during the time of PMA treatment, additional influence on the constitutive L1 shedding decreased the amount of soluble fragments even below the level of DMSO-treated control cells. In contrast to the constitutive conditions (Fig. 1B), the ADAM17/ADAM10 inhibitor GW280264X had an effect similar to that of the broad-spectrum inhibitor, while the ADAM10 inhibitor GI254023X affected L1 release to a lesser extent. This also became apparent after densitometric quantification of three independent experiments (Fig. 4A, right), suggesting that ADAM17 is involved in the PMA-stimulated cleavage of L1.

To clarify whether this effect was indeed due to ADAM17 activity, we analyzed PMA-stimulated shedding in the panel of different ADAM-deficient cells and ADAM17-deficient cells, which were stably retransfected with wild-type ADAM17. As shown in Fig. 4B, PMA increased the generation of the L1-NTF not only in wild-type cells but also in ADAM9<sup>-/-</sup>, ADAM10<sup>-/-</sup>, and ADAM15<sup>-/-</sup> fibroblasts. In contrast, PMA was not able to stimulate L1 release in ADAM17-deficient cells. Moreover, this effect was rescued in retransfected cells, clearly identifying ADAM17 as a major protease responsible for PMA-stimulated shedding in MEFs. The quantification of constitutively released soluble L1 (Fig. 4B, lower left) and the increase of soluble L1 after PMA stimulation (Fig. 4B, lower

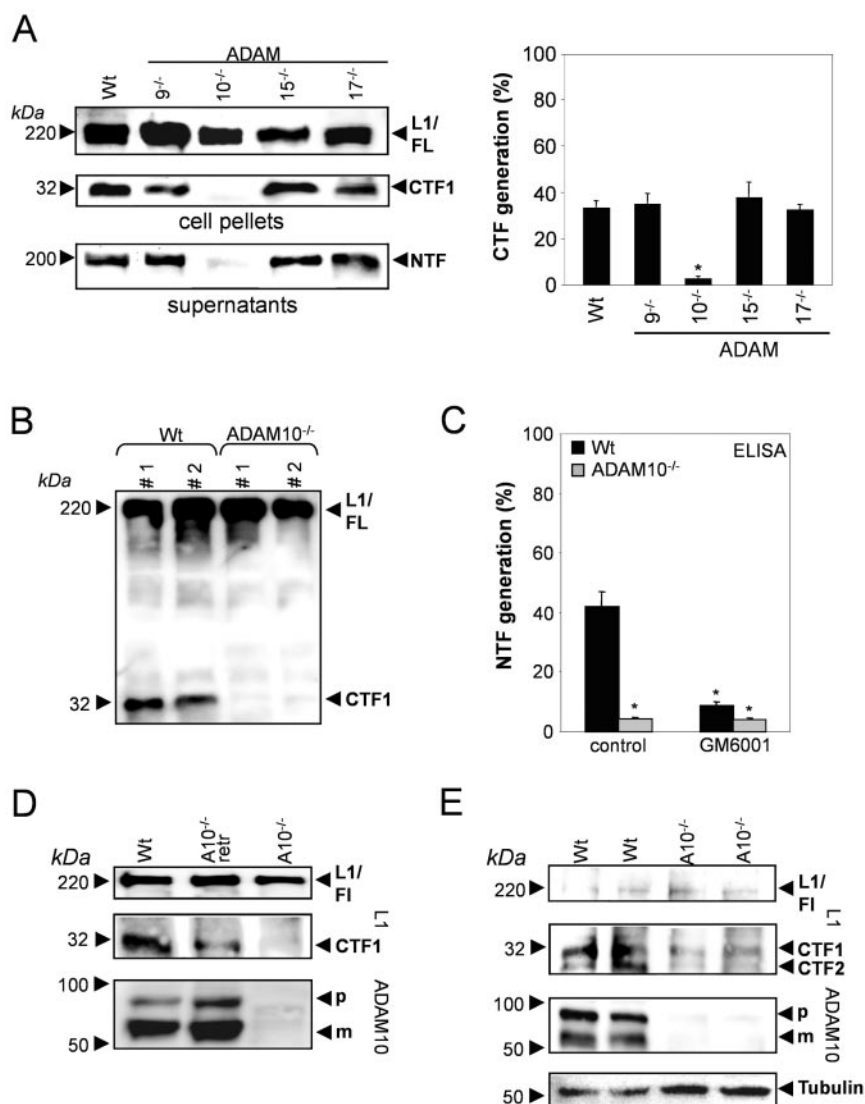


FIG. 2. Involvement of ADAM10 in constitutive L1 shedding. (A) Constitutive L1 cleavage is reduced in ADAM10<sup>-/-</sup> fibroblasts. (Left) A representative immunoblot with total cell extracts from ADAM9<sup>-/-</sup>, ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM15<sup>-/-</sup>, and ADAM17<sup>-/-</sup> fibroblasts and wild-type MEFs stained with C-terminal anti-L1 antibodies is shown. Supernatants of these cells were also subjected to Western blot analysis with N-terminal anti-L1 antibodies (bottom). L1/FL, full-length L1. (Right) CTF generation was calculated as a percentage of total L1 (full-length L1 plus CTF1) by densitometric analysis. Results were obtained from five independent experiments and expressed as means  $\pm$  SEM. L1-CTF1 generation was significantly decreased only in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs compared to WT cells (\*). (B) Anti-L1 (C-terminal) immunoblot of proteins from two independent ADAM10<sup>-/-</sup> and wild-type MEF cell lines. L1/FL, full-length L1; WT: wild-type-MEFs. (C) ELISA of constitutive L1 shedding. L1 was transiently transfected into ADAM10<sup>-/-</sup> or wild-type MEFs. Cells were incubated with or without the metalloprotease inhibitor GM6001 (5  $\mu$ M) for 3 h, and subsequently conditioned media and cell lysates were analyzed for the presence of soluble and cell-associated L1, respectively. To consider possible variations in transfection efficiency, the data for each single transfection were calculated as the percentage of soluble L1 released in the medium in relation to the total amount of soluble and cell-bound L1 determined in the medium and the lysate. Results were obtained from four independent experiments, each performed in triplicate and are expressed as means  $\pm$  SEM. L1-NTF generation was significantly lower in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs, WT cells, and ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs treated with GM6001 than in untreated WT cells (\*). (D) ADAM10-deficient cells were cotransfected with wild-type mouse ADAM10 (A10<sup>-/-</sup> retr) and L1 and compared with L1-transfected wild-type and ADAM10-deficient MEFs for ADAM10 and L1 expression. The immunoblot shows one representative of three independent experiments. L1/FL, full-length L1; WT, wild-type-MEFs; p, precursor of ADAM10; m, mature form of ADAM10. (E) Reduced L1 ectodomain shedding in ADAM10-deficient embryos (embryonic day 9) was demonstrated by immunoblot analysis of whole-embryo extracts of ADAM10<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Tubulin was used as a loading control.

right) underlined the distinct roles of ADAM10 and ADAM17 for constitutive and PMA-stimulated shedding, respectively.

Cholesterol depletion has been shown to induce cleavage of L1 in breast tumor cells (22, 48). To examine if this stimulus

would also induce ADAM17-mediated L1 shedding, ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM17<sup>-/-</sup>, and wild-type cells were treated with MCD or PMA. The release of soluble L1 into the cell culture medium was analyzed by ELISA. Both PMA and MCD

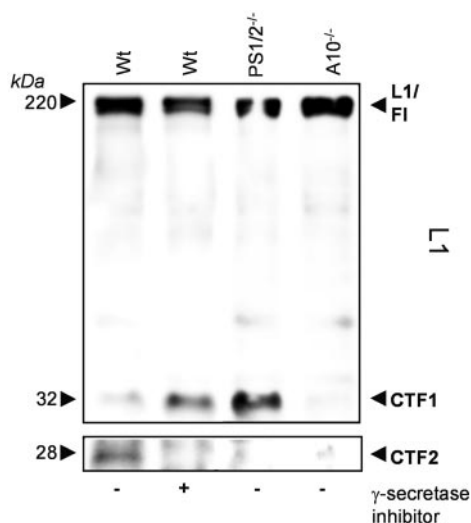


FIG. 3. L1-CTF1 is further processed through  $\gamma$ -secretase activity. L1 shedding was analyzed with WT MEFs in the absence or presence of the  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 (1  $\mu$ M, overnight) with ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs and fibroblasts deficient for the  $\gamma$ -secretase complex components PS1/2. The application of the  $\gamma$ -secretase inhibitor increased the amount of CTF1 and diminished CTF2 production in wild-type fibroblasts, visible after overexposure of the immunoblot. CTF2 was not detectable in the PS1/2-deficient cells or in ADAM10-deficient fibroblasts. One representative out of three immunoblots is shown.

induced L1 shedding in wild-type cells and also in ADAM10-deficient cells. In contrast, neither PMA nor MCD was able to increase the constitutive L1 release in ADAM17-deficient cells (Fig. 4C), indicating that MCD stimulation also leads to ADAM17-mediated L1 shedding in fibroblasts.

**ADAM10 and ADAM17 are differently involved in regulating L1-dependent cell adhesion.** Due to the early embryonic lethality of ADAM10-deficient mice (24), analysis of L1 processing was restricted to fibroblast cell lines. To further explore the role of ADAM10 in cells which express L1 endogenously, we used human neuroglioma H4 cells. To examine whether ADAM10 or ADAM17 is involved in L1 shedding, we knocked down the expression of these proteases by transfection of vector-based siRNA. By Western blot analysis, we found decreased expression of ADAM10 and ADAM17 after 48 h and almost undetectable levels after 72 h, compared with expression of mock-transfected control cells (Fig. 5A, top). While ADAM17 suppression did not affect L1 processing, the reduced expression of ADAM10 correlated with strongly decreased L1-CTF1 generation (Fig. 5A, bottom) in a densitometric analysis of three independent experiments. These data indicate that ADAM10 also represents the major sheddase responsible for constitutive processing of L1 in these cells.

To further explore the influence of ADAM10-mediated L1 shedding on the functional properties of neuroglioma cells, we performed a substrate adhesion assay. The adhesion of mock-treated H4 cells was significantly increased on L1 substrate compared to the BSA control (Fig. 5B, left). While there was no effect from using BSA as a substrate (not shown), preincubation with GI254023X or GW280264X further increased cell adhesion on recombinant L1-Fc protein (Fig. 5B, left). In par-

ticular, the ADAM10 inhibitor had the strongest effect and increased cell adhesion twofold in comparison to DMSO. Moreover, overexpression of ADAM10 resulted in decreased L1-dependent adhesion, while siRNA-mediated suppression of ADAM10 increased substrate adhesion (Fig. 5B, middle). The respective effect on ADAM10 expression was additionally controlled by immunoblot analysis (Fig. 5B, middle, insert). Thus, these data indicate that ADAM10-mediated constitutive cleavage of L1 is an important mechanism for regulating L1-dependent cell adhesion.

To examine whether ADAM17 would also play a role under nonconstitutive conditions, we analyzed cell adhesion with additional PMA stimulation before seeding. PMA-decreased cell adhesion by 50% compared to DMSO-treated cells (Fig. 5B, right). This decrease could be abolished when cells were preincubated with GI254023X or GW280264X before stimulation. In contrast to the constitutive conditions, the ADAM17/ADAM10 inhibitor showed a stronger ability to enhance cell-substrate adhesion under PMA-stimulated conditions than the ADAM10 inhibitor. This finding indicates an influence of ADAM17 on L1-dependent adhesion after protein kinase C activation. Since both inhibitors were applied before PMA stimulation and during PMA treatment, parts of the increased cell adhesion needed to be attributed to an effect on constitutive ADAM10-mediated L1 shedding (Fig. 4A). Taken together, these findings demonstrate that ADAM10- and ADAM17-mediated shedding of L1 is involved in regulating L1-dependent cell adhesion.

**ADAM10 is able to cleave L1 in the mouse brain.** The neuronal cell adhesion molecule L1 is well known to exert important functions during development of the central nervous system (CNS) but also in the adult brain. To analyze the role of the predominantly neuronal expressed ADAM10 in more detail, we used an *in vitro* cleavage assay. For this assay, crude membrane fractions prepared from adult mouse brain were incubated with recombinant ADAM10 for different time periods at 37°C. Western blot analysis showed that incubation with ADAM10 led to a time-dependent increase in the generation of L1-CTF1 (Fig. 6A). In the developing cerebellum, L1 is expressed only by postmitotic neurons (52). Therefore, we also analyzed the influence of ADAM10 on primary neurons of early postnatal mouse cerebellum. We found that expression of ADAM10 led to an increase in the generation of L1-CTF1, indicating that this protease is indeed capable of cleaving L1 in primary cells of the mouse cerebellum (Fig. 6B).

**ADAM10 regulates L1-dependent haptotactic migration of cerebellar neurons and mediates NMDA-induced L1 shedding.** To further explore the functional significance of ADAM10- and ADAM17-mediated L1 shedding, we analyzed haptotactic migration of cerebellar granule neurons. For this study, we used a modified Boyden chamber assay in which cells migrate from top to bottom chambers through filters coated on the bottom side with BSA as a control or with L1-Fc protein. To determine the different effects of the proteases, cells were seeded in the absence or presence of GI254023X and GW280264X in transwell inserts. As shown in Fig. 6C, neurons displayed greater migration towards L1 substrate in 48 h than in their random migration towards BSA. This haptotactic migration was strongly inhibited by the ADAM10 inhibitor

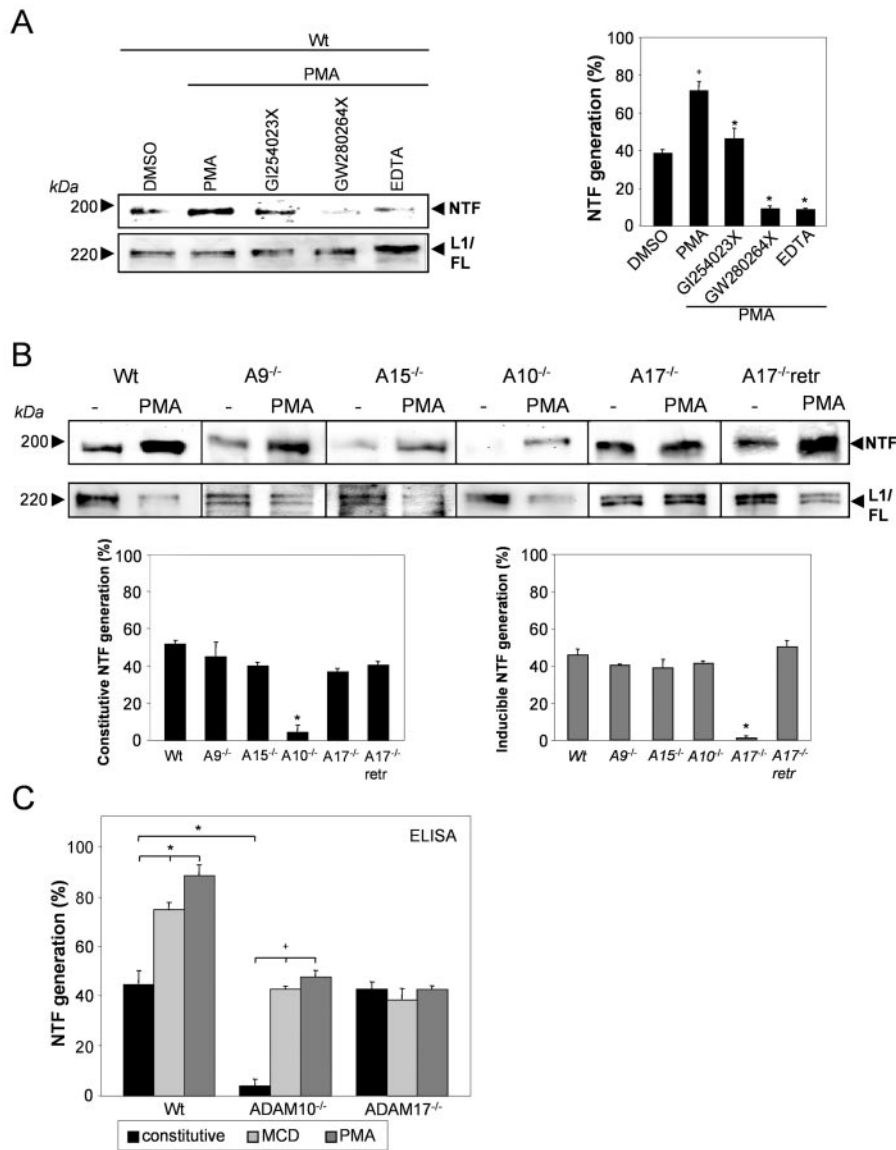


FIG. 4. ADAM17 mediates L1 shedding after PMA stimulation and cholesterol depletion. (A) Effect of different metalloprotease inhibitors on PMA-stimulated L1 shedding. (Left) Wild-type MEFs were stimulated with PMA (200 ng/ml) or vehicle control (DMSO) for 3 h. Subsequently, cell pellets and supernatants were subjected to L1 (N-terminal) Western blot analysis. (Right) NTF generation was calculated as the percentage of total L1 (full-length L1 plus NTF) by densitometric analysis. Results were obtained from three independent experiments and are expressed as means  $\pm$  SEM. Compared to the vehicle control, PMA treatment significantly increased L1-NTF generation (+). All inhibitors significantly decreased NTF generation in the presence of PMA compared to the only-PMA-treated cells (\*). (B) PMA-induced L1 shedding is abolished in ADAM17-deficient cells. (Top) Different ADAM-deficient fibroblasts and ADAM17<sup>-/-</sup> cells stably retransfected with full-length ADAM17 (A17<sup>-/-</sup> retr) were stimulated with PMA (200 ng/ml) or vehicle control (DMSO) for 3 h. Cell pellets and supernatants were harvested and analyzed by Western blotting using N-terminal anti-L1 antibodies. L1/FL, full-length L1. (Bottom) The constitutive NTF generation (lower left) and the increase in NTF generation after PMA treatment compared to the constitutive conditions (defined as inducible shedding) were also depicted as densitometric analysis (lower right). Results were obtained from five independent experiments and are expressed as means  $\pm$  SEM. Constitutive NTF generation and inducible NTF generation were significantly reduced in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs and ADAM17<sup>-/-</sup> cells, respectively (\*). (C) Effect of different stimuli on L1 shedding. L1 was transiently transfected into ADAM10<sup>-/-</sup>, ADAM17<sup>-/-</sup>, or wild-type MEFs. Cells were stimulated with MCD (10 mM) for 60 min, PMA (200 ng/ml) for 3 h, or vehicle control (DMSO) for 3 h; subsequently, conditioned media and cell lysates were analyzed for the presence of soluble and cell-associated L1, respectively, by ELISA. The generation of soluble L1 was calculated as the percentage of total L1 (L1 in cell lysates and supernatants) by densitometric analysis. Results are shown as means  $\pm$  SEM of triplicate transfections of four independent experiments. Compared to untreated WT cells, constitutive NTF generation was significantly decreased in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs, while MCD and PMA stimulation significantly increased NTF production in WT MEFs (\*). Compared to the vehicle-treated control, PMA and MCD treatment significantly increased L1-NTF generation in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs (\*). This was not the case in ADAM17<sup>-/-</sup> cells.

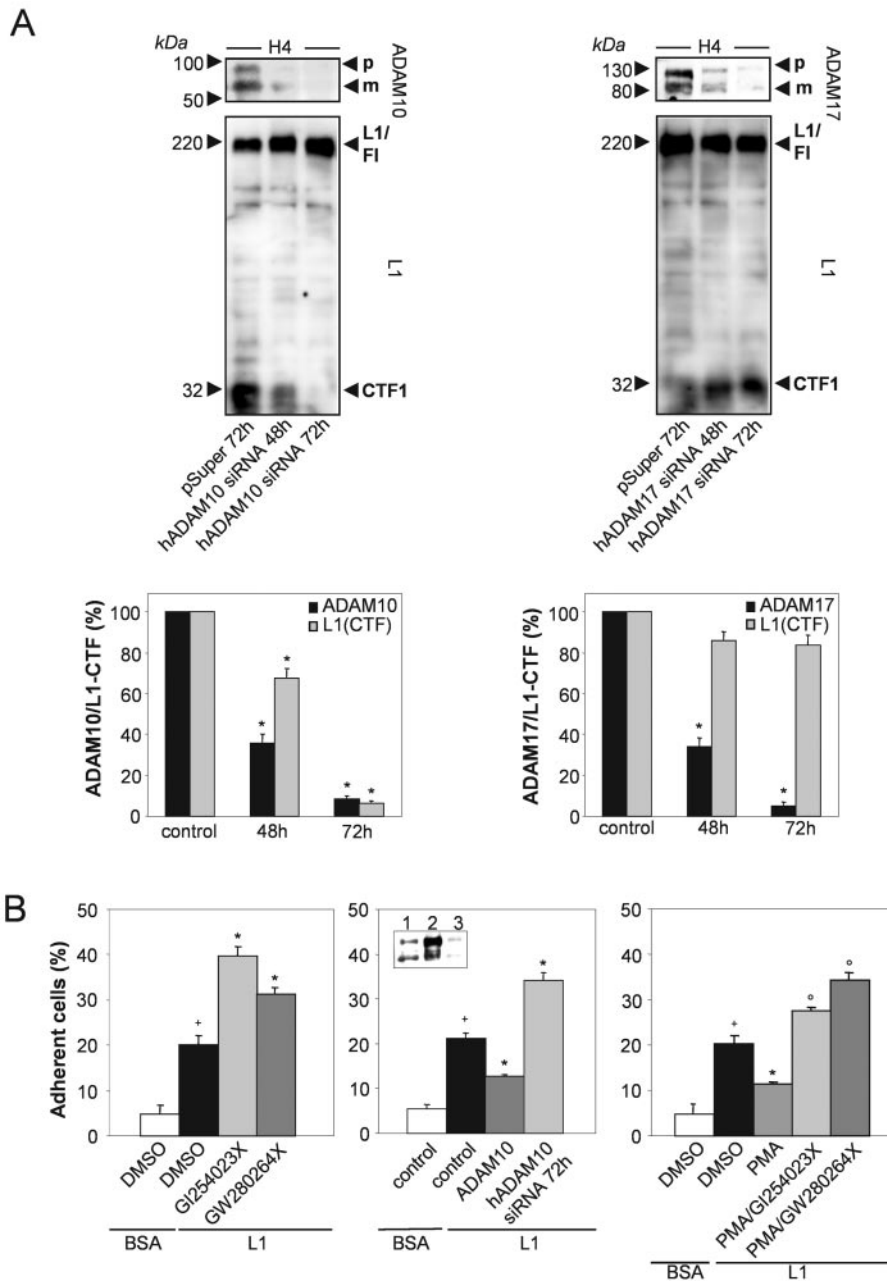


FIG. 5. ADAM10-mediated L1 shedding in neuronal cells. (A) (Top) Human neuroglioma H4 cells were transiently transfected with pSUPER-hADAM10 siRNA, pSUPER-hADAM17 siRNA, or empty vector. Cell pellets were harvested 48 h and 72 h after transfection and analyzed for ADAM10 and ADAM17 expression by immunoblotting, respectively. Membranes were reprobbed with anti-L1 antibodies. For densitometric quantification, ADAM10–L1-CTF values obtained from mock-treated cells after 72 h were considered 100% and compared with the values of ADAM10 siRNA- or ADAM17 siRNA-treated cells after 48 h and 72 h. (Bottom) Results from three independent experiments are shown and expressed as means  $\pm$  SEM. Compared to mock-transfected control cells, both siRNA treatments led to a significant suppression of the respective gene after 48 h and even more after 72 h. In contrast, L1-CTF1 generation was only significantly decreased after ADAM10 siRNA treatment, compared to mock-treated cells (\*). (B) Cell adhesion on recombinant human L1/Fc chimera. H4 cells were preincubated with ADAM10 inhibitor GI254023X (5  $\mu$ M), the mixed ADAM17/ADAM10 inhibitor GW280264X (5  $\mu$ M), or DMSO control with (right) or without (left) additional PMA (200 ng/ml) treatment. In another assay, cells were transfected with ADAM10 or ADAM10 siRNA and harvested after 48 h or 72 h, respectively (middle). ADAM10 expression of mock-transfected cells (middle, lane 1), ADAM10-transfected cells (lane 2), and siRNA-transfected cells (lane 3) was controlled by immunoblotting. Results are shown as means  $\pm$  SEM of three independent experiments, all performed in triplicate. In all assays, the adhesion on L1 substrate was significantly higher than on BSA (+). L1-dependent cell adhesion was significantly increased in the presence of inhibitors (left, \*), while PMA treatment (right, \*) decreased cell adhesion compared with the respective control on L1 substrate. The PMA effect could be significantly abolished after pretreatment with the inhibitors (right, °). While ADAM10 overexpression significantly decreased cell adhesion, ADAM10 siRNA transfection significantly increased adhesion on L1 compared to the control (middle, \*).

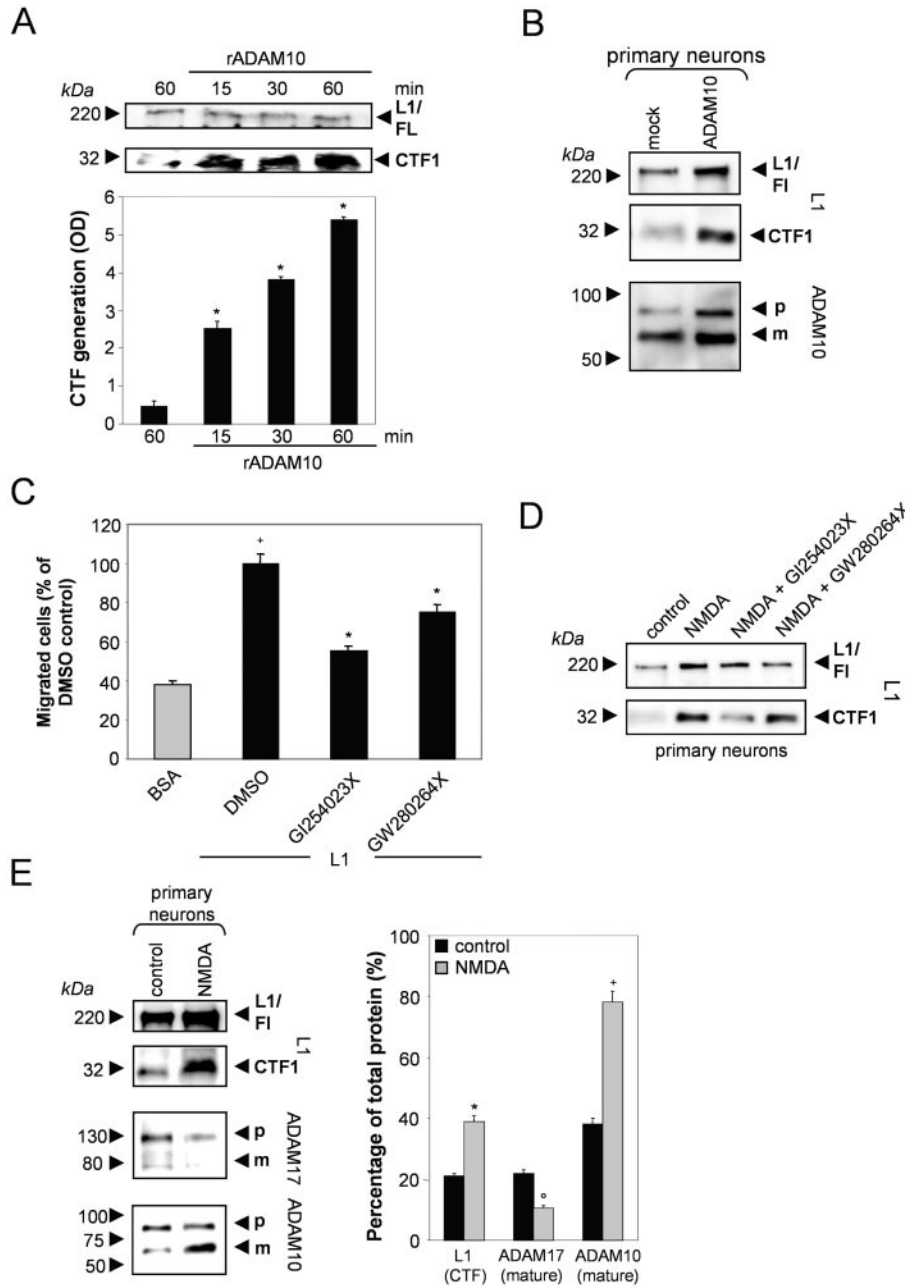


FIG. 6. ADAM10 mediates L1 shedding in the mouse brain and affects haptotactic migration of cerebellar neurons. (A) (Top) Crude membrane fractions prepared from adult wild-type mouse brain were incubated at 37°C for different times with recombinant mouse ADAM10 (rADAM10). As a control, aliquots were incubated without rADAM10 for 60 min. Samples were analyzed by immunoblotting with C-terminal L1 antibodies. (Bottom) CTF generation was also calculated by densitometric analysis of three independent experiments and expressed as means ± SEM. Addition of rADAM10 led to a significant time-dependent increase in CTF generation (\*). (B) Overexpression of ADAM10 in primary neurons of mouse cerebellum increases L1 shedding. Cells were prepared by mechanical and enzymatic dissociation of mouse cerebellum. Cells were transiently transfected with ADAM10 or empty vector. Subsequently, cells were lysed and analyzed by Western blotting with anti-ADAM10 antibodies. The same blot was reprobbed with anti-L1 antibodies (C terminal). L1/FL, full-length L1; WT, wild-type-MEFs; p, precursor of ADAM10; m, mature form of ADAM10. (C) Metalloprotease inhibitors reduce haptotactic migration of cerebellar neurons on L1 substrate. NCAM L1/Fc chimera at a concentration of 2 μg/ml or BSA for control were coated on the back sides of transwell chambers. Cerebellar neurons were seeded into the top chamber in the presence of GI254023X (5 μM), GW280264X (5 μM), or DMSO as a control and allowed to transmigrate for 48 h at 37°C. Cells on top of the filter were removed, and transmigrated cells were stained with crystal violet solution. The dye was eluted from the filter and measured at 595 nm. The amount of dye was proportional to the number of transmigrated cells. Values for the migration of mock-treated cells on L1 substrate were set at 100% and compared to the values of inhibitor treated cells. Results were obtained from three independent experiments, each performed in triplicate, and are expressed as means ± SEM. The haptotactic migration on L1 substrate was significantly higher than on BSA (+). L1-dependent cell migration was significantly decreased in the presence of inhibitors (\*). (D) NMDA stimulation induces ADAM10-mediated L1 shedding in primary cerebellar neurons. Cells were incubated in the presence or absence of NMDA (50 μM) and the inhibitor GI254023X (5 μM) or GW280264X (5 μM) for 30 min. Cell pellets were subjected to Western blot analysis with

GI254023X, while the effect of the mixed ADAM17-ADAM10 inhibitor GW280264X was less strong. These findings indicate that ADAM10 is involved in regulating L1-dependent haptotactic migration of cerebellar neurons.

It has been suggested previously that the presynaptic protein L1 might play important roles in synaptic plasticity (42, 46). Cell adhesion molecules thought to be involved in regulating synaptic functions by modulating synaptic contacts in response to neural activity (3, 69). To evaluate if stimulation of neural activity would induce ADAM10- or ADAM17-mediated processing of L1, we incubated primary neurons of early postnatal mouse cerebellum with the glutamate receptor agonist NMDA in the absence or presence of GI254023X and GW280264X. As shown in Fig. 6D, NMDA stimulation increased the generation of L1-CTFs. The increase of L1 proteolysis was strongly diminished by the ADAM10 inhibitor GI254023X, while GW280264X only showed weak effects. These results suggest that ADAM10 is involved in the cleavage of L1 after stimulation with NMDA in cerebellar neurons. Of note, NMDA stimulation led to a decrease in the mature form of ADAM17, while there was an increase in the mature form of ADAM10, further supporting that NMDA stimulation leads to activation of ADAM10-mediated L1 shedding (Fig. 6E).

**ADAM10 and ADAM17 influence L1-dependent neurite outgrowth.** L1-induced neurite outgrowth is known to be mainly mediated by homophilic interaction dependent on the processing of L1 via metalloproteases (37). Therefore, we investigated the influence of ADAM10 and ADAM17 in mediating neurite outgrowth of cerebellar neurons. We cultured microexplants of early postnatal mouse cerebellum in the presence of GI254023X or GW280264X either on PLL or on L1-Fc/PLL protein-coated coverslips, respectively. As demonstrated in Fig. 7, both inhibitors affected neurite length on PLL substrate only slightly, compared to the DMSO control which was set to 100% for quantification (Fig. 7A and B). In contrast, when microexplants were seeded on L1-coated surfaces, both inhibitors significantly inhibited neurite outgrowth. Additionally, the movement of small neuronal cell bodies from the explants was obviously decreased by both inhibitors applied (Fig. 7A). After GW280264X treatment, the extension of neuronal processes from the explant core was almost absent in the vast majority of explants. These data indicate that ADAM10 (and even more, ADAM17) is involved in L1-dependent neurite outgrowth. Microexplants seeded on PLL and treated with the inhibitors in parallel were harvested and analyzed by Western blotting with C-terminal anti-L1 antibodies (Fig. 7C). According to the neurite outgrowth assay, GW280264X had the strongest effect in reducing the generation of L1-CTF in the microexplants.

## DISCUSSION

The neural cell adhesion molecule L1 is involved in the regulation of cell adhesion and cell migration. Therefore, post-translational cleavage of L1 is important for regulating its function, but little is known about the proteolytic system responsible. Our present study demonstrates that two distinct metalloproteases, ADAM10 and ADAM17, are critically involved in controlling the release of soluble L1 by membrane-proximal cleavage, thereby regulating L1 function.

Initial evidence that ADAM10 is a candidate for constitutive L1 cleavage was obtained in inhibition studies with two hydroxamate-based compounds with different preferences in blocking ADAM10 and ADAM17. In accordance with other reports implicating the role of ADAM10 in shedding of L1 in tumor cells (21, 48), the ADAM10 inhibitor reduced constitutive L1 shedding in wild-type fibroblasts. We confirmed these findings by demonstrating that L1 shedding was nearly completely abolished in ADAM10-deficient fibroblasts. Thus, our data represent the first evidence in a genetically defined system that ADAM10 is responsible for the constitutive proteolysis of L1.

Analyzing the *in vivo* relevance of ADAM10 for L1 shedding, we found that L1 C-terminal fragments were clearly diminished in extracts from ADAM10-deficient embryos compared to the wild-type mice. This finding confirmed that ADAM10 is also of relevance for L1 proteolysis *in vivo*. However, in contrast to the almost-complete block of constitutive L1 shedding in ADAM10-deficient fibroblasts, which could not be compensated by other metalloproteases, L1-CTFs were still generated in the knockout embryos, demonstrating that ADAM10 is not the exclusive metalloprotease cleaving L1 *in vivo*. This is further supported by several findings indicating that L1 release seems to be a regulated process triggered by different extracellular signals (23, 27, 57). In particular, stimulation by phorbol esters or pervanadate, which activates cellular protein kinases, may regulate L1 cleavage (23). In agreement with these findings, our data demonstrate that L1 proteolysis can be induced through PMA stimulation in fibroblasts. Moreover, we identified ADAM17 as the protease responsible for this stimulated L1 proteolysis. Of note, PMA-stimulated L1 cleavage could not be compensated in ADAM17-deficient fibroblast by other proteases. The stimulation of ADAM17 activity by PMA is in agreement with numerous reports describing phorbol ester activation of ADAM17-mediated ectodomain shedding (13, 50). Interestingly, ADAM10 and ADAM17 have been reported to share other substrates as well. Fractalkine, the cellular prion protein, and APP are shed constitutively by ADAM10 and in a PMA-stimulated manner predominantly by ADAM17 (9, 31, 40, 72).

MCD treatment leading to the membrane extraction of cholesterol, has also been shown to activate L1 proteolysis (22).

C-terminal L1 antibodies. (E) NMDA-stimulated increase of L1 shedding was associated with an increase of the mature form of ADAM10. (Left) Western blots of NMDA-stimulated primary neurons were analyzed for L1 expression and afterwards reprobated with ADAM17 and ADAM10 antibodies. (Right) Results were obtained from three independent experiments and are expressed as means  $\pm$  SEM. L1-CTF1 generation was significantly increased after NMDA treatment compared with the vehicle-treated cells (\*). The ratio of the mature form of ADAM10/ADAM17 was calculated as the percentage of mature form to total ADAM10/ADAM17 (precursor form plus mature form). NMDA stimulation significantly decreased the mature form of ADAM17 ( $^{\circ}$ ), while the mature form of ADAM10 was significantly increased compared to control cells (+).

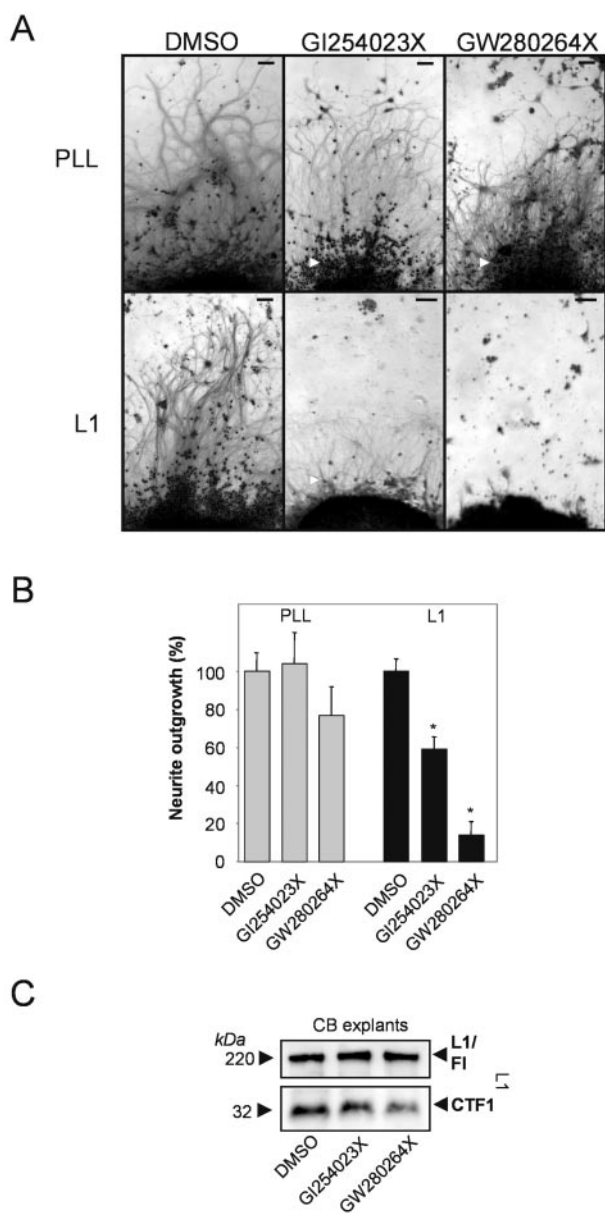


FIG. 7. Effect of different metalloprotease inhibitors on neurite outgrowth of cerebellar neurons. (A) Cerebellar microexplant cultures were plated onto glass coverslips coated with PLL or a combination of PLL and L1. After incubation for 24 h in the presence or absence of different metalloprotease inhibitors (5  $\mu$ M), the explants were fixed and stained. Neurite outgrowth and also movement of small neuronal cell bodies (arrowheads) from the explants grown on L1 substrate were decreased by the inhibitors applied. Representative images of three independent experiments are shown. Bar, 50  $\mu$ m. (B) The effect of the metalloprotease inhibitors GI254023X and GW280264X on neurite outgrowth from the explants was quantified by measuring the 10 longest neurites of 10 aggregates in three experiments. Results are shown as means  $\pm$  SEM of these independent experiments. The values obtained from DMSO-treated explants were set at 100% and compared with the values of inhibitor-treated cells. Neurite outgrowth from the explants grown on L1 substrate was significantly decreased after inhibitor treatment compared to vehicle-treated explants (\*). (C) Representative immunoblot with cerebellar (CB) explants stained with C-terminal L1 antibody. Cerebellar explants seeded on PLL were incubated for 24 h in the absence or presence of the metalloprotease inhibitor GI254023X (5  $\mu$ M) or GW280264X (5  $\mu$ M) or with DMSO as a control. L1/FL, full-length L1; WT, wild-type-MEFs.

Cholesterol depletion has been implicated in the ADAM17-mediated shedding of the interleukin 6 receptor (47) but also in the ADAM10-mediated cleavage of N-cadherin (55). Our data suggest that the release of soluble L1 through cholesterol depletion is indeed ADAM17 dependent in fibroblasts. Taken together, our findings demonstrate that constitutive L1 shedding is mediated by ADAM10, while ADAM17 is responsible for PMA- but also MCD-stimulated shedding.

Interestingly, our data demonstrate for the first time that the metalloprotease-generated C-terminal fragment is a substrate for RIP. It is further processed through  $\gamma$ -secretase activity leading to the intracellular release of another L1 fragment (CTF2). This proteolytic sequence has been implicated in the processing of an increasing number of proteins like Notch (66) or APP (20), which are able to directly regulate signal transduction via translocation to the nucleus. For other proteins, like N-cadherin, intramembrane cleavage has been shown to indirectly influence cell signaling by enhancing the degradation of transcription factors (44). Therefore, our data suggest the interesting possibility that L1-CTF2 might also contribute to cellular signaling. It should be noted that L1-dependent gene regulation involving sustained extracellular signal-regulated kinase activation was recently reported (67). Further studies will have to clarify whether a link exists between L1-CTF2 cleavage and gene regulation.

Release of soluble L1 was observed in several cell lines of mouse and human origin (2), suggesting a conserved mechanism of metalloprotease-mediated L1 cleavage among different cell types and species. Accordingly, we were also able to demonstrate that ADAM10 is involved in the constitutive release of soluble L1 in the human neuroglioma cell line H4, which expresses L1 endogenously. In agreement with the presented biochemical data, our functional analysis demonstrated that inhibition or suppression of ADAM10 increased L1-dependent cell adhesion. In contrast, reduced cell adhesion after PMA stimulation could be reversed by the ADAM17 inhibitor. Thus, our data imply a role of ADAM10, as well as ADAM17, in the down-regulation of L1-mediated cell adhesion.

Both ADAM10 and ADAM17 are widely and differentially expressed in the CNS. ADAM10 is mainly expressed in neuronal cells (38, 45), while ADAM17 can be predominantly found in glia (32). During early postnatal development of the cerebellar cortex, granule cells migrate from their germinating zone, forming the external granular layer and ending at their final location in the internal granular layer. In the postnatal cerebellum, L1 is expressed by postmitotic, premigratory, and migrating granule cells at sites of neuron-neuron contact but not by stellate and basket cells or on glia (52). L1 antibodies have been shown to modify cell migration of granule cell neurons in early postnatal mouse cerebellum (41). In this study, we found that the ADAM10-specific inhibitor was able to strongly decrease the L1-dependent haptotactic migration of cerebellar granule cells. This finding suggests that ADAM10-mediated disruption of L1-dependent contacts might be an important mechanism for the regulation of the adhesion of migrating neurons.

Cell adhesion molecules play important roles in regulating synaptic plasticity (3, 69). Increased neural activity is discussed to induce the rapid changes in synaptic morphology that are required for controlling synaptic functions (15, 43, 70). Previ-



ously, L1 was thought to be involved in this process (42). Since NMDA stimulation led to increased L1 shedding in primary neurons, it is tempting to speculate that the ADAM10-mediated proteolysis may also be involved in regulating synaptic plasticity. NMDA-stimulated neural activity triggered a rapid increase in the mature form of ADAM10, while we found an opposite effect on ADAM17 expression. In agreement with these observations, the increase of L1 proteolysis due to NMDA treatment could be inhibited with the ADAM10 inhibitor. Interestingly, the NMDA subtype of glutamate receptor is responsible for a substantial fraction of  $Ca^{2+}$  influx in response to synaptic activity, especially early in development (75). This  $Ca^{2+}$  influx is known to affect activity-dependent synaptic plasticity (10). Recently, it was reported that  $Ca^{2+}$  influx activates ADAM10 by triggering the dissociation of calmodulin from pro-ADAM10 (50). Therefore, NMDA-stimulated  $Ca^{2+}$  influx might be the cause of enhanced ADAM10 activity, leading to increased L1 shedding. This hypothesis is also in accordance with a previous report demonstrating that calmodulin inhibitors enhance membrane proximal cleavage of L1 (37). NMDA stimulation has also been shown to induce ADAM10-mediated shedding of the neural adhesion molecule N-cadherin (55), which is also involved in synaptogenesis, thereby influencing synaptic plasticity.

It is well documented that L1 promotes neurite growth in vitro and in vivo and that a number of second-messenger systems are involved. ADAM10 has been implicated in multiple functions in axon extension and guidance (17). Moreover, regulated cleavage of the contact-mediated axon repellent ephrin-A2 (26) and the regulation of midline crossing of CNS axons (62) have been attributed to ADAM10. Therefore, we hypothesized that this protease might also influence L1-dependent neurite outgrowth. Indeed, the ADAM10-specific inhibitor strongly decreased the outgrowth of cerebellar neurons grown on L1 substrate. Even more severe effects on neurite outgrowth, as well as on L1-CTF generation, were caused by the ADAM17-specific inhibitor. On the one hand, this is not surprising, since microexplants do not present a single culture system but rather a complex interaction system. Moreover, L1 homophilic or heterophilic binding has been shown to induce the clustering of the molecule at the plasma membrane, which activates a mitogen-activated protein kinase signaling cascade through the intermediates Src, phosphoinositide-3 kinase, Rac1, and p21-activated kinase, leading to neurite growth (33, 61, 64). Thus, this signaling cascade might contribute to the activation of ADAM17 instead of ADAM10. The ADAM17 inhibitor also slightly affected neurite outgrowth on PLL substrate. Since ADAM17 has been shown to play a critical role in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (74), which is also important for neuronal survival, and in the proteolysis of the neurotrophin receptor TrkA (11), it seems plausible that the processing of additional substrates by ADAM17 might contribute to the severe effect.

Taken together, our data highlight the crucial role of ADAM10 and ADAM17 in the physiological processing of L1. These results have implications for brain development and for the function of the adult brain, since L1 has key roles in neuronal cell adhesion, cell migration, synaptic plasticity, and neurite outgrowth.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Jessen for her excellent technical assistance and J. Hedderich for help in performing statistical analysis.

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Sonderforschungsbereich 415 to P.S. and K.R., DFG LU869/1-2 to A.L., Interuniversity Attraction Poles Program P5/19 of the Belgian Federal Science Policy Office, and the APOPIE EU Network. K.R. was supported by the Stiftung zur Förderung der medizinischen Forschung, CAU Kiel. P.A. was supported by a grant from the Deutsche Krebshilfe (10-1307-3A1).

## REFERENCES

- Abel, S., C. Hundhausen, R. Mentlein, A. Schulte, T. A. Berkhout, N. Broadway, D. Hartmann, R. Sedlacek, S. Dietrich, B. Muetze, B. Schuster, K. J. Kallen, P. Saftig, S. Rose-John, and A. Ludwig. 2004. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* **172**:6362–6372.
- Beer, S., M. Oleszewski, P. Gutwein, C. Geiger, and P. Altevogt. 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.* **112**:2667–2675.
- Benson, D. L., L. M. Schnapp, L. Shapiro, and G. W. Huntley. 2000. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.* **10**:473–482.
- Black, R. A. 2002. Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**:1–5.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Bojani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* **385**:729–733.
- Blobel, C. P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:32–43.
- Brown, M. S., J. Ye, R. B. Rawson, and J. L. Goldstein. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**:391–398.
- Brummendorf, T., S. Kenwright, and F. G. Rathjen. 1998. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**:87–97.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti, and R. A. Black. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**:27765–27767.
- Castellani, G. C., E. M. Quinlan, L. N. Cooper, and H. Z. Shouval. 2001. A biophysical model of bidirectional synaptic plasticity: dependence on AMPA and NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12772–12777.
- Diaz-Rodriguez, E., J. C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste, and A. Pandiella. 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol. Biol. Cell* **13**:2031–2044.
- Dihne, M., C. Bernreuther, M. Sibbe, W. Paulus, and M. Schachner. 2003. A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J. Neurosci.* **23**:6638–6650.
- Doedens, J. R., R. M. Mahimkar, and R. A. Black. 2003. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**:331–338.
- Ebeling, O., A. Duczmal, S. Aigner, C. Geiger, S. Schollhammer, J. T. Kemshead, P. Moller, R. Schwartz-Albiez, and P. Altevogt. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur. J. Immunol.* **26**:2508–2516.
- Engert, F., and T. Bonhoeffer. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**:66–70.
- Faissner, A., D. B. Teplow, D. Kubler, G. Keilhauer, V. Kinzel, and M. Schachner. 1985. Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO J.* **4**:3105–3113.
- Fambrough, D., D. Pan, G. M. Rubin, and C. S. Goodman. 1996. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:13233–13238.
- Fischer, G., V. Kunemund, and M. Schachner. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* **6**:605–612.
- Fransen, E., V. Lemmon, G. van Camp, L. Vits, P. Coucke, and P. J. Willems. 1995. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur. J. Hum. Genet.* **3**:273–284.
- Gao, Y., and S. W. Pimplikar. 2001. The  $\gamma$ -secretase-cleaved C-terminal

- fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14979–14984.
21. Gavert, N., M. Conacci-Sorrell, D. Gast, A. Schneider, P. Altevogt, T. Brabletz, and A. Ben Ze'ev. 2005. L1, a novel target of  $\beta$ -catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J. Cell Biol.* **168**:633–642.
  22. Gutwein, P., S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel, and D. P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* **17**:292–294.
  23. Gutwein, P., M. Oleszewski, S. Mechtersheimer, N. Agmon-Levin, K. Krauss, and P. Altevogt. 2000. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* **275**:15490–15497.
  24. Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, I. A. Lena, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**:2615–2624.
  25. Haspel, J., and M. Grumet. 2003. The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front. Biosci.* **8**:s1210–s1225.
  26. Hattori, M., M. Osterfield, and J. G. Flanagan. 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* **289**:1360–1365.
  27. Heiz, M., J. Grunberg, P. A. Schubiger, and I. Novak-Hofer. 2004. Hepatocyte growth factor-induced ectodomain shedding of cell adhesion molecule L1: role of the L1 cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **279**:31149–31156.
  28. Herreman, A., D. Hartmann, W. Annaert, P. Saftig, K. Craessaerts, L. Serneels, L. Umans, V. Schrijvers, F. Checler, H. Vanderstichele, V. Baekelandt, R. Dressel, P. Cupers, D. Huylebrouck, A. Zwijsen, F. Van Leuven, and B. de Strooper. 1999. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11872–11877.
  29. Horiuchi, K., G. Weskamp, L. Lum, H. P. Hammes, H. Cai, T. A. Brodie, T. Ludwig, R. Chiusaroli, R. Baron, K. T. Preissner, K. Manova, and C. P. Blobel. 2003. Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol. Cell. Biol.* **23**:5614–5624.
  30. Hortsch, M. 1996. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* **17**:587–593.
  31. Hundhausen, C., D. Misztela, T. A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K. J. Kallen, S. Rose-John, and A. Ludwig. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**:1186–1195.
  32. Hurtado, O., A. Cardenas, I. Lizasoain, L. Bosca, J. C. Leza, P. Lorenzo, and M. A. Moro. 2001. Up-regulation of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* **40**:1094–1102.
  33. Ignelzi, M. A., Jr., D. R. Miller, P. Soriano, and P. F. Maness. 1994. Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* **12**:873–884.
  34. Itoh, K., L. Cheng, Y. Kamei, S. Fushiki, H. Kamiguchi, P. Gutwein, A. Stoeck, B. Arnold, P. Altevogt, and V. Lemmon. 2004. Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J. Cell Biol.* **165**:145–154.
  35. Kadmon, G., and P. Altevogt. 1997. The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* **61**:143–150.
  36. Kadmon, G., H. F. Bohlen und, R. Horstkorte, M. Eckert, P. Altevogt, and M. Schachner. 1995. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* **7**:993–1004.
  37. Kalus, I., B. Schnegelsberg, N. G. Seidah, R. Kleene, and M. Schachner. 2003. The proprotein convertase PCSA and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* **278**:10381–10388.
  38. Karkkainen, I., E. Rybnikova, M. Peltto-Huikko, and A. P. Huovila. 2000. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**:547–560.
  39. Kuhn, T. B., E. T. Stoekli, M. A. Condrau, F. G. Rathjen, and P. Sonderegger. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-I is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* **115**:1113–1126.
  40. Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3922–3927.
  41. Lindner, J., F. G. Rathjen, and M. Schachner. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* **305**:427–430.
  42. Luthi, A., H. Mohajeri, M. Schachner, and J. P. Laurent. 1996. Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **46**:1–6.
  43. Maletic-Savatic, M., R. Malinow, and K. Svoboda. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* **283**:1923–1927.
  44. Marambaud, P., P. H. Wen, A. Dutt, J. Shioi, A. Takashima, R. Siman, and N. K. Robakis. 2003. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**:635–645.
  45. Marcinkiewicz, M., and N. G. Seidah. 2000. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.* **75**:2133–2143.
  46. Matsumoto-Miyai, K., A. Ninomiya, H. Yamasaki, H. Tamura, Y. Nakamura, and S. Shiosaka. 2003. NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neurotrophin. *J. Neurosci.* **23**:7727–7736.
  47. Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen, and S. Rose-John. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* **278**:38829–38839.
  48. Mechtersheimer, S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, M. Oleszewski, S. Riedle, R. Postina, F. Fahrenholz, M. Fogel, V. Lemmon, and P. Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* **155**:661–673.
  49. Moos, M., R. Tacke, H. Scherer, D. Teplow, K. Fruh, and M. Schachner. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* **334**:701–703.
  50. Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. de Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara, and H. Saya. 2004. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular  $Ca^{2+}$  influx and PKC activation. *J. Cell Biol.* **165**:893–902.
  51. Pan, D., and G. M. Rubin. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**:271–280.
  52. Persohn, E., and M. Schachner. 1987. Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *J. Cell Biol.* **105**:569–576.
  53. Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March, and R. A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**:1281–1284.
  54. Qi, H., M. D. Rand, X. Wu, N. Sestan, W. Wang, P. Rakic, T. Xu, and S. Artavanis-Tsakonas. 1999. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* **283**:91–94.
  55. Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* **24**:742–752.
  56. Reiss, K., R. Mentlein, J. Sievers, and D. Hartmann. 2002. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* **115**:295–305.
  57. Richter-Landsberg, C., V. M. Lee, S. R. Salton, M. L. Shelanski, and L. A. Greene. 1984. Release of the NILE and other glycoproteins from cultured PC12 rat pheochromocytoma cells and sympathetic neurons. *J. Neurochem.* **43**:841–848.
  58. Rooke, J., D. Pan, T. Xu, and G. M. Rubin. 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science* **273**:1227–1231.
  59. Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig, and C. P. Blobel. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* **164**:769–779.
  60. Schachner, M. 1997. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:627–634.
  61. Schaefer, A. W., H. Kamiguchi, E. V. Wong, C. M. Beach, G. Landreth, and V. Lemmon. 1999. Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* **274**:37965–37973.
  62. Schimmelpfeng, K., S. Gogel, and C. Klambt. 2001. The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech. Dev.* **106**:25–36.
  63. Schlondorff, J., and C. P. Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* **112**:3603–3617.
  64. Schmid, R. S., W. M. Pruitt, and P. F. Maness. 2000. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J. Neurosci.* **20**:4177–4188.

65. **Seals, D. F., and S. A. Courtneidge.** 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **17**:7–30.
66. **Selkoe, D., and R. Kopan.** 2003. Notch and presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**:565–597.
67. **Silletti, S., M. Yebra, B. Perez, V. Cirulli, M. McMahon, and A. M. Montgomery.** 2004. Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J. Biol. Chem.* **279**:28880–28888.
68. **Sugawa, M., K. Ono, Y. Yasui, T. Kishi, and T. Tsumori.** 1997. Enhancement of neurite outgrowth by the soluble form of human L1 (neural cell adhesion molecule). *Neuroreport* **8**:3157–3162.
69. **Takeichi, M., and K. Abe.** 2005. Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol.* **15**:216–221.
70. **Tanaka, H., W. Shan, G. R. Phillips, K. Arndt, O. Bozdagi, L. Shapiro, G. W. Huntley, D. L. Benson, and D. R. Colman.** 2000. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* **25**:93–107.
71. **Urban, S., and M. Freeman.** 2002. Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**:512–518.
72. **Vincent, B., E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. de Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez, and F. Checler.** 2001. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **276**:37743–37746.
73. **Weskamp, G., H. Cai, T. A. Brodie, S. Higashiyama, K. Manova, T. Ludwig, and C. P. Blobel.** 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol. Cell. Biol.* **22**:1537–1544.
74. **Weskamp, G., J. Schlondorff, L. Lum, J. D. Becherer, T. W. Kim, P. Saftig, D. Hartmann, G. Murphy, and C. P. Blobel.** 2004. Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J. Biol. Chem.* **279**:4241–4249.
75. **Yuste, R., and L. C. Katz.** 1991. Control of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* **6**:333–344.

## Abkürzungen

<b>[<sup>3</sup>H]Thymidine</b>	Tritium-markiertes Thymidin	<b>CNR</b>	Cadherin-related-Neuronal-Receptor
<b>μM</b>	Micromol/l	<b>CNTF</b>	Ciliary Neurotrophic Factor
<b>7-D-Cadherine</b>	7-Domänen-Cadherine	<b>CREB</b>	cAMP Response Element Binding Protein
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>CTF</b>	C-terminales Fragment
<b>ADAM</b>	A Disintegrin And Metalloprotease	<b>DCC</b>	Deleted in Colorectal Carcinoma
<b>AFM</b>	Atomic Force Microscopy	<b>DM</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>AK</b>	Antikörper	<b>DSHB</b>	Developmental Studies Hybridoma Bank
<b>AP-β</b>	Amyloidprotein-β	<b>E</b>	Embryonaltag
<b>APP</b>	β-Amyloidvorläuferprotein	<b>EC</b>	Extracellular Cadherin-Domain
<b>BACE</b>	β-Site -APP Cleaving Enzyme	<b>E-Cadherin</b>	Epitheliales-Cadherin
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>EDTA</b>	N,N'-1,2-ethanediylbis(N-(carboxymethyl)glycine)edetic acid
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin	<b>EGF</b>	Epidermal Growth Faktor,
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium	<b>EGTA</b>	(Ethylenebis(oxyethylenitrilo)) tetra-; ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N'-tetraacetic acid
<b>CAM</b>	Cellular Adhesion Molecule	<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked-Immunsorbent -Assay
<b>cAMP</b>	Adenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate	<b>EMT</b>	epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
<b>CBP</b>	CREB-Binding Protein	<b>erbB4</b>	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation	<b>E-Selektin</b>	Endothel-Selektin
<b>Cdc42</b>	Cdc42 GTPase-Activating Protein	<b>FITC</b>	Fluoreszeinthiocyanat
<b>CHL1</b>	Close Homolog of L1	<b>Fn</b>	Fibronektin
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary	<b>GPI</b>	Glykosylphosphatidylinositol
<b>CHO</b>	chinesische Hamster-Ovarien	<b>GRASP</b>	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-Associated Scaffold Protein
<b>c-jun</b>	Für das nukleäre Protein p39 kodierende Onkogen		

<b>GSK</b>	GlaxoSmithKline	<b>MAC-1</b>	Macrophage Antigen-1
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat	<b>MBP</b>	myelin basic protein
<b>HAV</b>	Histidin-Alanin-Valin	<b>mg</b>	Milligramm
<b>HER4</b>	Hairy-Related 4	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium <sup>2+</sup>
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor	<b>min</b>	Minute
<b>HMG</b>	High Mobility Group	<b>mM</b>	Millimol/l
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibitorkonzentration für halbmaximalen Hemmeffekt	<b>MMP</b>	Matrixmetalloprotease
<b>ICAM</b>	Inter Cellular Adhesion Molecule	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Mangan <sup>2+</sup>
<b>iCLiP</b>	intramembrane-cleaving proteases	<b>myc</b>	<i>Myelocytomatose</i>
<b>Ig</b>	Immunoglobulin	<b>N-Cadherin</b>	Neuronales-Cadherin
<b>IgSF</b>	Immunoglobulin Superfamily	<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule
<b>IL-6</b>	Interleukin-6	<b>NgCAM</b>	Neurogliäres Zell-Adhäsionsmolekül
<b>IL-6R</b>	IL-6 Rezeptor	<b>NrCAM</b>	NgCAM-related Cell Adhesion Molecule
<b>JNK</b>	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase	<b>NTF</b>	N-terminales Fragment
<b>kb</b>	Kilobasen	<b>NZK</b>	Nierenzellkarzinomen
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ksp</b>	Kidney specific	<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>L</b>	Liter	<b>P-Cadherin</b>	Plazentales-Cadherin
<b>L1-NCAM</b>	L1-Neural Cell Adhesion Molecule	<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>LEF</b>	Lymphoid Enhancer binding Factor	<b>PLL</b>	Poly-L-Lysin
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1	<b>PMA</b>	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
<b>LI</b>	Liver Intestine	<b>PrP</b>	Prion-Protein
<b>L-Selektin</b>	Leukocyten-Selektin	<b>PS</b>	Presenilin
<b>M</b>	Mol/l	<b>P-Selektin</b>	Platelet-Selektin

<b>PSGL-1</b>	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1	<b>T-Cadherin</b>	Truncated-Cadherin
<b>RBPjk</b>	Recombination signal Binding Protein J-KAPPA	<b>TCF</b>	T-Cell-Factor
<b>R-Cadherin</b>	Retinal-Cadherin	<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming Growth Factor-alpha
<b>RGD-Motiv</b>	Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor-beta
<b>RhoA</b>	Ras homolog gene family, member A	<b>TIMP</b>	Tissue Inhibitor of Metalloprotease
<b>RIP</b>	Regulated Intramembrane Proteolysis	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor Alpha
<b>siRNA</b>	small interfering RNA/ short interfering RNA	<b>VE-Cadherin</b>	Vascular/Endotheliales-Cadherin
<b>SPR</b>	Surface Plasmon Resonance	<b>VL</b>	Voll-Längen
<b>Su(H)</b>	Suppressor of Hairless	<b>v-src</b>	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
<b>SVMP</b>	Snake Venom Metalloprotease	<b>Wnt</b>	Wingless-type
<b>TACE</b>	Tumor Necrosis Factor Alpha-Converting Enzyme	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zink <sup>2+</sup>
<b>TAG-1</b>	Transiently Expressed Axonal Glycoprotein-1		

**Symbole für Aminosäuren:**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## Lebenslauf

- 13.2.1976** geboren in Kiel; Staatsangehörigkeit: deutsch
- 1995** Abitur am Gymnasium in Preetz
- 1995-2002** Student im Diplom-Studiengang Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 2001** Diplomabschlussprüfung im Studiengang Biologie; Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Botanik und Biochemie
- 2001-2002** Diplomarbeit im Studiengang Biologie, durchgeführt am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Thema: *Expression und Charakterisierung von Komponenten eines im Kaliummangel induzierten Transportsystems in dem methanogenen Archaeon Methanothermobacter thermoautotrophicus: Identifizierung eines Phosphat-spezifischen ABC-Transporters*
- Seit August 2002** Doktorand am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Saftig

## **Danksagung**

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Saftig für die freundliche Aufnahme in dem Institut, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, für viele Anregungen und Ratschläge in den Seminaren und die Übernahme des Referats.

Ich möchte Herrn Prof. Leippe recht herzlich danken für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Karina Reiß für die vielen praktische Ratschläge im Labor und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Bei Bente Rudolph bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit während der Doktorarbeit und auch für die „lernintensive Zeit“.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe aussprechen. Ich danke Dr. Michael Schwake, Marc Schulte, Cathrin Claussen, Marion Willenborg, Alexander Schneede, Christina Wehling, Andrea Rittger, Christian Beimgraben, Jenny Schröder, Katrin Diercks und Annette Pachnow für viele hilfreiche und interessante Gespräche. Vielen Dank auch an Marlies Rusch, Nadine Karschuk, Stefanie Jessen, Björn Ahrens und Julian Buchholz für die große Unterstützung im Labor.

Dr. Andreas Ludwig und Dr. Christian Hundhausen bin ich sehr dankbar für den lebhaften Gedankenaustausch und die gute Zusammenarbeit. Für das aufmerksame Durchsehen des englischen Textes danke ich Katherina Petersen.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Paul Saftig und Prof. Dr. Stefan Rose-John sowie allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Abschließend bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mich während meines Studiums in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.



# Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass die Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.
- dass die Abhandlung noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.
- dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden.
- dass es keine Promotionsversuche in der gleichen Fakultät oder vergleichbaren Fachbereichen gab.
- dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

Kiel, den .....

-----  
Thorsten Maretzky