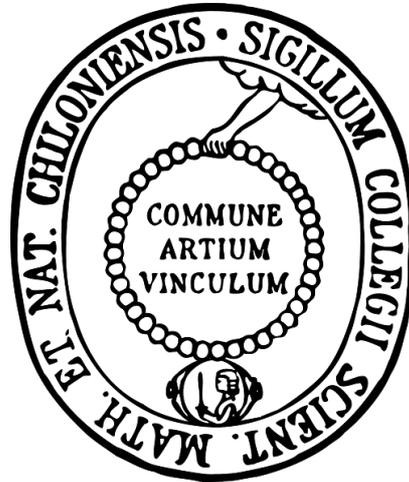


Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



# **Die Bedeutung von ADAM10 für die Proteolyse des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin und für die endotheliale Permeabilität**

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

vorgelegt von

**Beate Schulz**

Kiel, Juli 2010

Referent/in: Professor Dr. P. Saftig  
Koreferent/in: Professor Dr. M. Dittmar  
Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2010  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 27.09.2010

Professor Dr. L. Kipp  
(Der Dekan)



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs).....	1
1.1.1 <i>Shedding</i> - proteolytische Ektodomänenspaltung .....	5
1.1.2 ADAM10.....	7
1.2 Zelladhäsionsmoleküle .....	9
1.2.1 Cadherine .....	10
1.2.2 VE-Cadherin.....	12
1.3 Endothel: innerste Wandschicht der Gefäße .....	14
1.3.1 Regulation der endothelialen Barriere.....	16
1.3.2 Angiogenese .....	18
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Labormaterialien .....	22
2.1.3 Chemikalien .....	23
2.1.4 Kits .....	25
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	26
2.1.6 Antikörper .....	31
2.1.7 Plasmide .....	31
2.1.8 Inhibitoren und Stimulantien.....	32
2.1.9 Zelllinien .....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Zellkultur .....	34
2.2.1.2 Präparation von HUVECs .....	34
2.2.1.3 Präparation von Phytohämagglutinin-stimulierten T-Zellen (PHA-Blasten)..	35

2.2.1.4 Subkultivierung von Zellen .....	35
2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen.....	36
2.2.1.6 Auftauen von Zellen.....	36
2.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl .....	36
2.2.1.8 Transiente Transfektion.....	37
2.2.1.9 siRNA ( <i>small interfering RNA</i> ) Transfektion .....	37
2.2.1.10 T-Zellen Transfektion .....	38
2.2.1.11 Stimulation von Zellen und Inhibitionsversuche .....	38
2.2.1.12 Permeabilitätsversuch.....	39
2.2.1.13 Transmigrationsversuch .....	40
2.2.1.14 Angiogeneseversuch ( <i>tube forming assay</i> ) .....	41
2.2.1.15 Migrationsversuch ( <i>in vitro wound healing assay</i> ) .....	41
2.2.1.16 Co-Kultur Experiment.....	42
2.2.1.17 VE-Cadherin <i>in vitro</i> -Spaltungsversuch ( <i>in vitro cleavage assay</i> ).....	42
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	43
2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten .....	43
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	43
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
2.2.2.4 <i>Western Blotting</i> .....	44
2.2.2.5 Immunologische Detektion der transferierten Proteine .....	45
2.2.2.6 Strippen von PVDF-Membranen .....	45
2.2.3 Immunologische Methoden.....	46
2.2.3.1 Immunzytochemie.....	46
2.2.3.2 VE-Cadherin-ELISA.....	46
2.2.4 Statistische Analyse.....	47
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1 Analyse der Proteolyse von VE-Cadherin .....	48
3.1.1 Einfluss von $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren auf die Prozessierung von VE-Cadherin .....	48
3.1.2 Die VE-Cadherin Proteolyse wird durch Metalloproteinase-Inhibitoren reduziert ...	50
3.2 Bedeutung der Metalloproteinase ADAM10 bei der Spaltung von VE-Cadherin.....	52
3.2.1 Reduktion des konstitutiven VE-Cadherin <i>Sheddings</i> durch ADAM10 siRNA.....	52
3.2.2 Die VE-Cadherin Proteolyse ist ADAM10-abhängig.....	54

3.2.3 VE-Cadherin wird direkt durch ADAM10 proteolytisch gespalten.....	56
3.3 Regulation des VE-Cadherin <i>Sheddings</i> .....	57
3.3.1 Serumfreies Medium hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Spaltung von VE-Cadherin.....	57
3.3.2 Staurosporin stimuliert das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin.....	59
3.3.3 PMA beeinflusst die proteolytische Spaltung von VE-Cadherin nicht.....	60
3.3.4 Calcium-Einstrom durch Ionomycin induziert die ADAM10-vermittelte VE-Cadherin Proteolyse.....	61
3.3.5 TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ aktivieren die VE-Cadherin Proteolyse nicht .....	63
3.3.6 Der Einfluss von Thrombin auf die Spaltung von VE-Cadherin .....	64
3.4 Funktionelle Relevanz des VE-Cadherin <i>Sheddings</i> .....	69
3.4.1 Metalloproteinase-Inhibitoren und ADAM10-Transfektion beeinflussen die Permeabilität.....	69
3.4.2 Die Transmigration von T-Zellen wird durch die Inhibition der Metalloproteinasen und durch ADAM10 siRNA gehemmt.....	73
3.4.3 Die Co-Kultivierung von HUVECs mit T-Zellen verstärkt die ADAM10 Aktivität.....	75
3.4.4 Wirkung von rekombinantem ADAM10 auf die Angiogenese .....	76
3.4.5 Die Inhibition von ADAM10 beeinflusst die Migration von HUVECs nicht.....	77
3.4.6 Serumproben von KHK-Patienten zeigen im Vergleich zu gesunden Patienten eine verstärkte Freisetzung von löslichem VE-Cadherin.....	78
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>80</b>
4.1 Die Proteolyse von VE-Cadherin .....	80
4.2 Regulation der VE-Cadherin Proteolyse .....	84
4.3 Einfluss von ADAM10 auf die Permeabilität des Endothels .....	86
4.4 Einfluss von ADAM10 auf die Transmigration .....	89
4.5 Rolle der ADAMs bei der Angiogenese .....	91
4.6 Die Bedeutung von ADAM10 bei der Arteriosklerose .....	93
4.7 Ausblick .....	94
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>96</b>
<b>5 summary.....</b>	<b>97</b>

<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
Danksagung.....	118
Erklärung.....	119

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1: Metzinkinfamilie der Metalloproteinasen .....	1
Abb. 1.2: Aufbau der ADAMs und verwandter Metalloproteinasen .....	2
Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs) .....	4
Abb. 1.4: <i>Shedding</i> eines transmembranen Proteins .....	5
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der vier Hauptfamilien von Zelladhäsionsmolekülen.....	10
Abb. 1.6: Mitglieder der Cadherin-Superfamilie .....	11
Abb. 1.7: Schematischer Aufbau des vaskulären endothelialen (VE)-Cadherins.....	13
Abb. 1.8: Aufbau des Gefäßes .....	14
Abb. 1.9: Endotheliale Zelladhäsionsmoleküle.....	15
Abb. 1.10: Transendotheliale Migration .....	17
Abb. 1.11: Angiogenese .....	17
Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Permeabilitätsversuches .....	40
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Transmigrationsversuches.....	41
Abb. 2.3: Aufbau des rekombinanten VE-Cadherin und des rekombinanten ADAM10.....	42
Abb. 3.1: Einfluss von $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren auf die Prozessierung von VE-Cadherin .....	49
Abb. 3.2: Einfluss verschiedener Metalloproteinasen-Inhibitoren auf die Proteolyse von VE-Cadherin.....	50
Abb. 3.3: Konzentrationsreihe des ADAM10-Inhibitors GI254023X und Einfluss auf die Bildung des C-terminalen Fragments.....	50
Abb. 3.4: Einfluss der ADAM10 siRNA auf die Proteolyse von VE-Cadherin .....	53
Abb. 3.5: Einfluss des Metalloproteinasen-Aktivators APMA auf die Proteolyse von VE-Cadherin.....	54
Abb. 3.6: Einfluss von ADAM10 siRNA in Gegenwart von APMA auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin.....	55
Abb. 3.7: <i>In vitro</i> -Spaltungsversuch von rekombinantem VE-Cadherin und rekombinantem ADAM10 .....	56
Abb. 3.8: Übersicht der verwendeten Stimulantien zur Untersuchung des induzierten VE-Cadherin <i>Sheddings</i> .....	57
Abb. 3.9: Einfluss von serumfreiem Medium auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin .....	58
Abb. 3.10: Einfluss von Staurosporin auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin.....	59
Abb. 3.11: Einfluss von PKC-Inhibitoren auf die Spaltung von VE-Cadherin .....	60
Abb. 3.12: Einfluss von PMA auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin .....	61
Abb. 3.13: Einfluss von Ionomycin auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin.....	62

---

Abb. 3.14: Einfluss von Ionomycin auf die Lokalisation von VE-Cadherin .....	63
Abb. 3.15: Einfluss von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ auf die Spaltung von VE-Cadherin.....	64
Abb. 3.16: Einfluss von Thrombin auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin .....	65
Abb. 3.17: Einfluss von ADAM10 siRNA in Gegenwart von Thrombin auf die Proteolyse von VE-Cadherin.....	66
Abb. 3.18: Zeitkinetik von Thrombin auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin.....	67
Abb. 3.19: Zeitlicher Einfluss von Thrombin auf die Lokalisation von VE-Cadherin.....	67
Abb. 3.20: Übersicht der Stimulantien, die das induzierte VE-Cadherin <i>Shedding</i> vermitteln .....	68
Abb. 3.21: Übersicht zur Untersuchung der Funktionellen Relevanz des VE-Cadherin <i>Sheddings</i> .....	69
Abb. 3.22: Einfluss von Metalloproteinase-Inhibitoren auf die Permeabilität .....	70
Abb. 3.23: Einfluss von ADAM10-Transfektion auf die Permeabilität .....	71
Abb. 3.24: Einfluss von Thrombin in Gegenwart des ADAM10-Inhibitors auf die Permeabilität.....	72
Abb. 3.25: Einfluss von Metalloproteinase-Inhibitoren auf die Transmigration von T-Zellen.....	73
Abb. 3.26: Einfluss von ADAM10 siRNA auf die Transmigration von T-Zellen.....	74
Abb. 3.27: Co-Kultivierung von HUVECs mit T-Zellen.....	76
Abb. 3.28: Einfluss von rekombinantem ADAM10 auf die Angiogenese von HUVECs .....	77
Abb. 3.29: Einfluss des ADAM10-Inhibitors auf die Migration von HUVECs.....	77
Abb. 3.30: Bestimmung des löslichen VE-Cadherins von gesunden- und KHK-Patienten .....	79
Abb. 4.1: Schematisches Model der ADAM10-abhängigen VE-Cadherin Proteolyse.....	83
Abb. 4.2: Schematisches Model der ADAM10-abhängigen endothelialen Permeabilität.....	90

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1.1: ADAM10 Substrate .....	8
Tab. 2.1: Verwendete Primärantikörper .....	31
Tab. 2.2: Verwendete Sekundärantikörper.....	31
Tab. 2.3: Verwendete Plasmide.....	31
Tab. 2.4: Verwendete Inhibitoren .....	32
Tab. 2.5: Verwendete Stimulantien .....	32

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	$\beta$ -Amyloid-Peptid
ADAM	<i>a disintegrin and a metalloproteinase</i>
ADAM-TS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
Aph-1	<i>anterior-pharynx-defective protein-1</i>
APLP2	<i>amyloid precursor protein-like protein 2</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
BACE	$\beta$ -site APP cleavage enzyme
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Cadherin-5	VE-Cadherin
Cadherine	<i>calcium-dependent adhering proteins</i>
CAMs	<i>cellular adhesion molecules</i>
CAR	<i>cell adhesion recognition</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD30	Ki-1, <i>cluster of differentiation 30</i>
CD44	H-CAM, Pgp-1, <i>cluster of differentiation 44</i>
CD99	MIC-2, E2, <i>cluster of differentiation 99</i>
CD144	VE-Cadherin, <i>cluster of differentiation 144</i>
C-Terminal	Carboxyterminales Ende des Peptides
CTF	C-terminales Fragment
CX3CL1	Fraktalkin, membrangebundenes CX3C Chemokin
CXCL16	membrangebundenes CXC Chemokin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EC	Ektodomäne
E-Cadherin	epitheliales-Cadherin
EDTA	N, N, N', N'-Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
ESAM	<i>endothelial cell selective adhesion molecule</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	fötales Kälberserum
HAV	(His-Ala-Val)-Sequenzmotiv
HB-EGF	<i>heparin-binding - epidermal growth factor</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF/SF	<i>hepatocyte growth factor/scatter factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IZD	intrazelluläre Domäne
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IP3	Inositoltriphosphat
JAMs	<i>junctional adhesion molecules</i>
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KUZ	kuzbanian
L1	L1-CAM, L1 <i>cell adhesion molecule</i>
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid

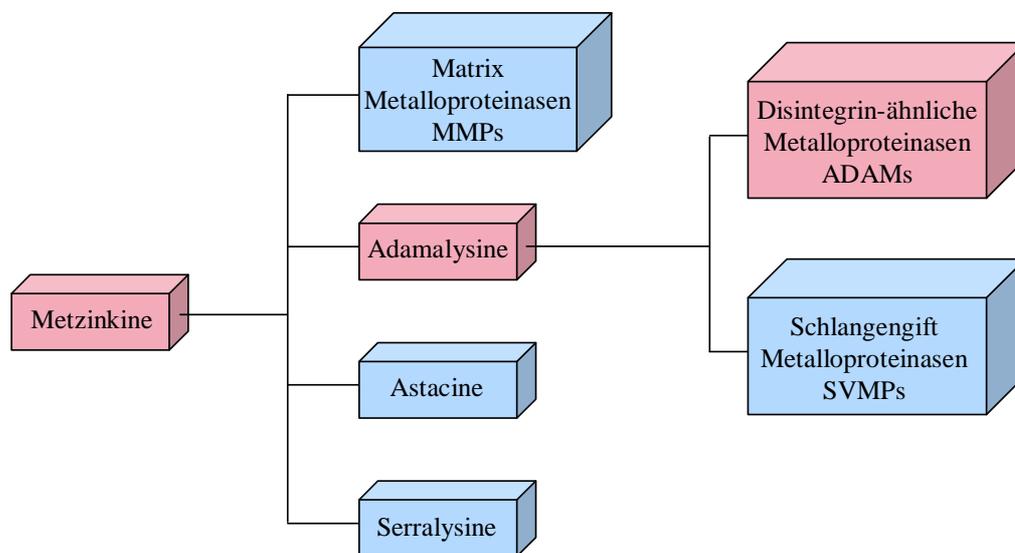
LRP1	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MADM	<i>mammalian disintegrin metalloproteinase</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
N-Cadherin	neuronales-Cadherin
N-Terminal	Aminoterminales Ende des Peptides
PAEC	<i>porcine aortic endothelial cells</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
pAVK	partielle arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P-Cadherin	plazentales-Cadherin
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
Pen-2	<i>presenilin enhancer protein 2</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
POD	Peroxidase
<i>post partum</i>	nach der Geburt
PrP	Prion Protein
PS	Presenilin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
R-Cadherin	retinales-Cadherin
RIP	regulierte intramembrane Proteolyse
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>rotation per minutes</i> )
RPTP	<i>receptor protein tyrosine phosphatase</i>
RPTPkappa	<i>receptor protein tyrosine phosphatase kappa</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3-Domäne	<i>Src homology domain 3</i>
SVMPs	<i>snake venom metalloproteinases</i>
TACE	<i>TNF-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TAPI	<i>TNF-<math>\alpha</math> protease inhibitor</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-alpha</i>
TIMPs	<i>tissue inhibitors of metalloproteases</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
U	Unit
VAP	<i>vascular apoptosis-inducing factor</i>
VCAM-1	<i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>
VE-Cadherin	vaskuläres endotheliales-Cadherin
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor-A</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
VE-PTP	<i>vascular endothelial protein tyrosine phosphatase</i>
$\gamma$ -Protocadherin	Protocadherin exprimiert im CNS
WT	Wildtyp

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs)

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen - kurz ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) - bilden eine Enzymfamilie, die eine Gruppe transmembraner Typ I Glykoproteine umfasst. Die Bezeichnung ADAM beruht zum einen auf der Eigenschaft der Enzyme bei der Zell-Zell-Interaktion mit Integrinen zu interagieren und zum anderen auf der Fähigkeit die Ektodomänen von membranassoziierten Proteinen proteolytisch zu spalten.

Aufgrund ihrer Funktion sind die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen in der Lage, die Zelloberfläche zu modifizieren und mit anderen Zellen zu interagieren, sie spielen daher eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse. Dazu zählen insbesondere Entwicklungs- und Regulationsprozesse im Organismus wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellmigration und Signaltransduktion. Neben ihren physiologischen Funktionen sind die ADAMs auch an pathologischen Vorgängen beteiligt, wie Entzündungsreaktionen, Tumorprogression und Metastasierung.



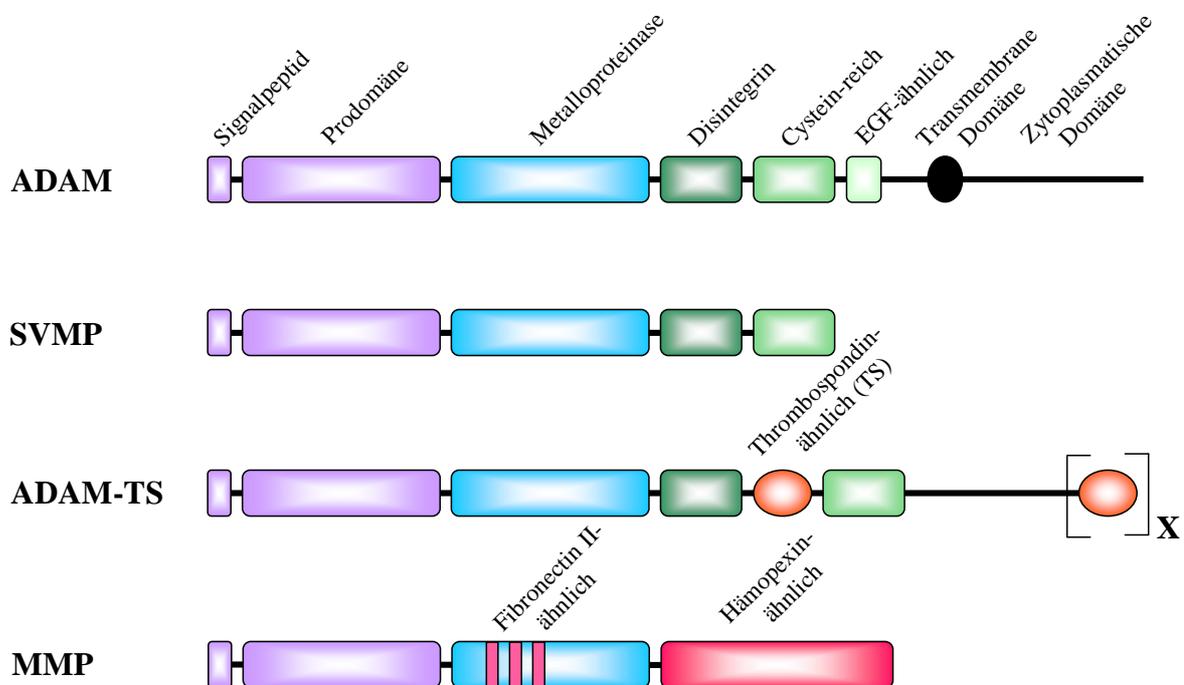
**Abb. 1.1: Metzinkinfamilie der Metalloproteinasen**

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs) leiten sich von den Adamalysinen ab, die wiederum eine Unterfamilie der Metzinkine darstellen. Zu der Metzinkinfamilie zählen ebenso die Matrix Metalloproteinasen (MMPs), die Astacine und Serralysine. Zur Gruppe der Adamalysine gehören neben den ADAMs auch die Schlangengift Metalloproteinasen (SVMPs).

Die ADAMs bilden eine Untergruppe der Zink-abhängigen Metalloproteinasen, der sogenannten Metzinkine (siehe Abb. 1.1). Zur Superfamilie der Metzinkine gehören die Familien der MMPs (*matrix metalloproteinases*), Astacine (zuerst in Flusskrebs *Astacus*

*astacus* beschrieben), Serralysine (bakterielle Proteinasen) und Adamalysine (Bode *et al.*, 1993). Die letzte Gruppe, die Adamalysine, wird gemeinsam von den ADAMs und den Schlangengiften SVMPs (*snake venom metalloproteinases*) gebildet, die eine enge Homologie zueinander aufweisen (Blobel *et al.*, 1992).

Eine Untergruppe der ADAMs bilden die ADAM-TS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe löslicher Proteasen. Bekannte Funktionen der ADAM-TS sind die Prozessierung von Kollagen, die Spaltung einiger Matrix-Proteoglykane und des von Willebrand Faktors, sowie die Inhibierung der Angiogenese (Porter *et al.*, 2005). Der strukturelle Aufbau der ADAMs und einiger verwandter Metalloproteinasen ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abb. 1.2: Aufbau der ADAMs und verwandter Metalloproteinasen**

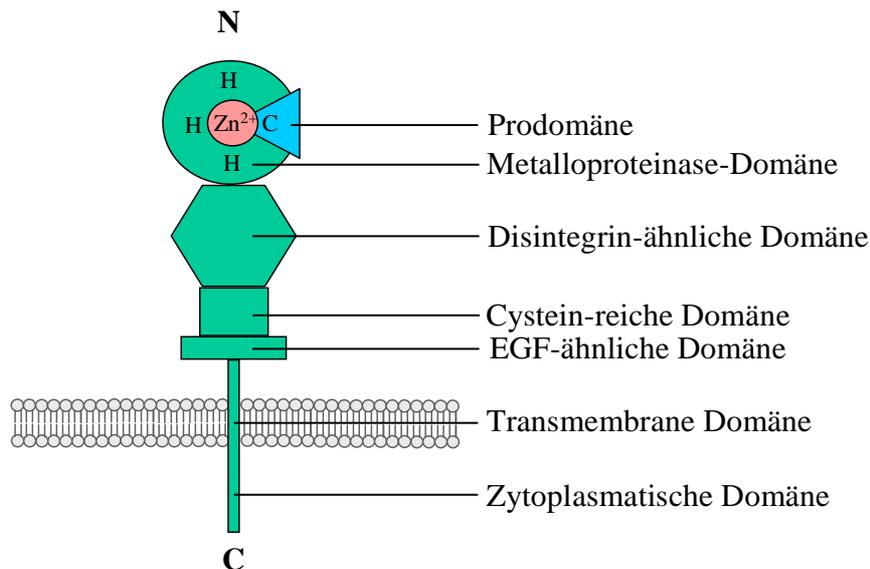
Domänenstruktur der ADAMs, SVMPs, ADAM-TSs und MMPs. Die ADAM-TS Familie hat eine variable Anzahl von Thrombospondin-ähnlichen Motiven. Eine Subklasse der MMPs die sogenannten MT-MMPs (Membran-Typ MMPs) besitzen zusätzlich eine transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Domäne. Modifiziert nach Seals und Courtneidge, 2008.

Die ersten ADAMs wurden 1987 bei der Analyse von Sperma-Oberflächenproteinen bei Meerschweinchen isoliert. Hierbei handelt es sich um ADAM1 und ADAM2, die auch als Fertilin- $\alpha$  und - $\beta$  bezeichnet werden (Primakoff *et al.*, 1987, Evans *et al.*, 1999). Fertilin- $\alpha$  und - $\beta$  bilden ein Heterodimer, welches mit Integrinen interagiert. Sie spielen eine Rolle bei der Sperma-Ei-Membranfusion und bei der Spermatogenese (Blobel *et al.*, 1992, Blobel, 2000).

ADAMs konnten bislang in einer Vielzahl von Spezies identifiziert werden, unter anderem in *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und in Vertebraten (Pan und Rubin, 1997, Huang *et al.*, 2003, Nakamura *et al.*, 2004). In Bakterien und Pflanzen wurden bisher keine ADAMs nachgewiesen (Stone *et al.*, 1999).

Die Synthese der ADAMs findet an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums statt, gefolgt von der Maturierung im Trans-Golgi-Netzwerk, wo die Glykosylierung und die Abspaltung der Prodomäne durch Proprotein Convertase 7 oder Furin von dem ADAM Vorläuferprotein erfolgt (Lum *et al.*, 1998, Endres *et al.*, 2003). Die Prodomäne der ADAMs hält die Funktion der Proteinase via eines Cystein-Schalters (*cystein-switch*) in einem latenten Zustand, in dem konservierte Cystein-Reste der Prodomäne das für die Funktion des Enzyms notwendige  $Zn^{2+}$  innerhalb der Metalloproteinase-Domäne koordinieren (Roghani *et al.*, 1999, Anders *et al.*, 2001). Darüber hinaus wirkt die isolierte Prodomäne der ADAMs als spezifischer Inhibitor der proteolytischen Aktivität und inhibiert so zelluläre *Shedding* Ereignisse (Moss *et al.*, 2007, Gonzales *et al.*, 2004). Im stationären Zustand befinden sich die ADAMs überwiegend im Trans-Golgi-Netzwerk (Schlondorff *et al.*, 2000) und sind nur zu einem geringen Umfang auf der Plasmamembran lokalisiert (Gutwein *et al.*, 2003).

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen zeigen in ihrem strukturellen Aufbau eine charakteristische Domänenstruktur. Die Erkenntnisse über die Topologie beruhen auf Röntgenkristallographiedaten einiger SVMPs, wie beispielsweise des Apoptose-induzierenden Proteins-1 VAP1 (*vascular apoptosis-inducing factor-1*) und VAP2B (Takeda *et al.*, 2006, Igarashi *et al.*, 2007). Der N-terminalen Prodomäne der ADAMs schließt sich die katalytisch aktive Metalloproteinase-Domäne an, welche über ein konserviertes charakteristisches Zinkbindendes Konsensusmotiv (**HEXXHXXGXXH**) einschließlich dreier Histidinreste verfügt, die  $Zn^{2+}$  im aktiven Zentrum binden. Die vierte Koordinationsstelle des  $Zn^{2+}$  wird durch einen Cysteinrest der Prodomäne abgeschirmt. Die globuläre Metalloproteinase-Domäne besitzt darüber hinaus ein Methionin-enhaltenen „Met-turn“. Dieser formt die hydrophobe Tasche für das Zinkion und die Histidinreste und ist somit für die Konformation und strukturelle Integrität des aktiven Zentrums von Bedeutung (Bode *et al.*, 1993). An die katalytische Domäne schließen sich eine Disintegrin-ähnliche Domäne, eine Cystein-reiche Domäne und eine EGF (*epidermal growth factor*)-ähnliche Domäne an, gefolgt von einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne (Blobel *et al.*, 1992). Die Bezeichnung „Disintegrin“ beruht auf die durch die Disintegrin-Domäne hervorgerufene Störung von Integrinbindungen (Gould *et al.*, 1990). In Abbildung 1.3 ist der schematische Aufbau der ADAMs mit dem katalytisch aktiven Zink-bindenden Konsensusmotiv dargestellt.



**Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs)**

Die katalytisch aktiven ADAMs besitzen eine Prodomäne (blau) die das aktive Zentrum verschließt. Das Zinkion (rosa) ist über drei Histidinreste des konservierten **HEXXHXXGXXH**-Motives in der katalytisch aktiven Metalloproteinase-Domäne koordiniert. Die vierte Koordinationsbindung geht das Zinkion mit einem Cysteinrest der Prodomäne ein. Durch Furin oder einer Proprotein Convertase kann die Prodomäne abgespalten werden. An die Metalloproteinase-Domäne schließt sich die Disintegrin-ähnliche Domäne an, gefolgt von einer Cysteinreichen Domäne, der EGF-ähnlichen Domäne, der transmembranen und schließlich der zytoplasmatischen Domäne. ADAMs, die nicht katalytisch aktiv sind, fehlt das Zink-bindende Konsensusmotiv. Die zytoplasmatische Domäne besitzt teilweise Phosphorylierungsstellen und SH3-bindende Domänen. Einigen ADAMs fehlt die EGF-ähnliche Domäne, unter anderem ADAM10 und ADAM17.

Das Zink-bindende Motiv ist nicht bei allen der bislang 40 bekannten ADAMs zu finden, so dass nur etwa die Hälfte der ADAMs proteolytisch aktiv sind. Eine Metalloproteinaseaktivität wurde für ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 und 33 beschrieben (Howard *et al.*, 2001, Moss *et al.*, 2002, Zheng *et al.*, 2004).

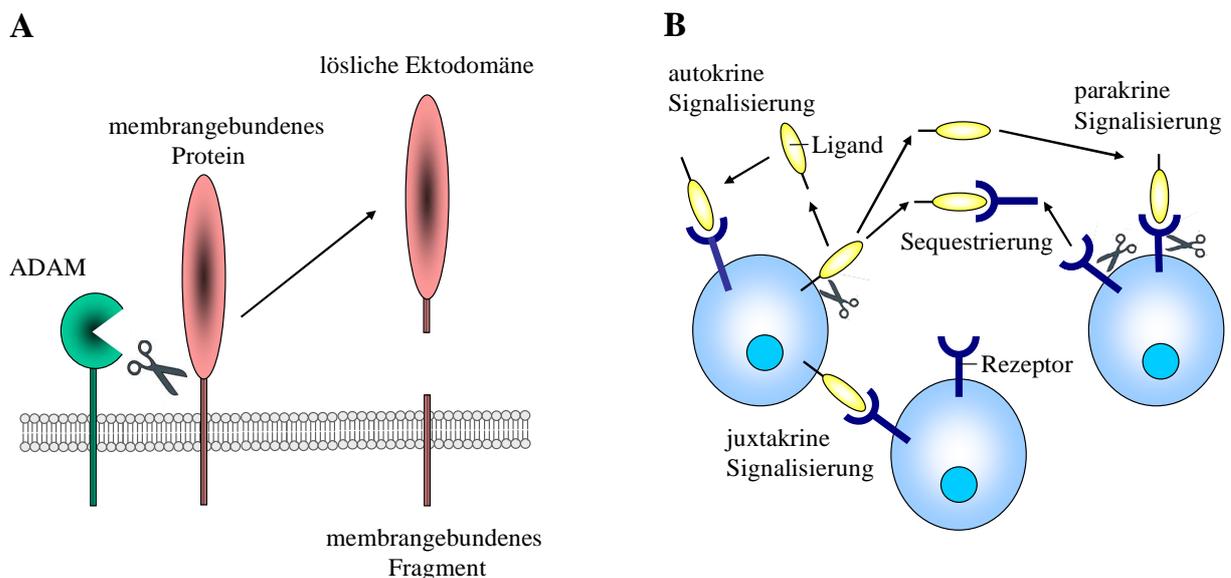
Die Aktivität der ADAMs kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden, u.a. durch transkriptionelle Kontrolle, alternatives Spleißen oder post-transkriptionelle Modifikation. Auch die Interaktion anderer Proteine mit der ADAM-Ektodomäne oder der zytoplasmatischen Domäne, die Lokalisation innerhalb der Plasmamembran, die Regulation durch das Substrat und die Stabilität der ADAM Proteinase können deren Aktivität beeinflussen (Huovila *et al.*, 2005).

Die ADAMs weisen ein sehr breites Substratspektrum auf. Einer der wichtigsten Vertreter aus der Proteasefamilie ist ADAM17, welches im Zusammenhang mit der Freisetzung von TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) entdeckt wurde und daher auch als TACE (**TNF- $\alpha$ -converting enzyme**) bekannt ist (Black *et al.*, 1997). Neben ADAM17 spielt auch ADAM10 eine wichtige Rolle bei der proteolytischen Spaltung vieler transmembraner Moleküle.

### 1.1.1 *Shedding* - proteolytische Ektodomänenspaltung

*Shedding* beschreibt die proteolytische Prozessierung eines membranständigen Moleküls, bei der ein lösliches Fragment in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (Abb. 1.4). Die an diesem Prozess beteiligten Enzyme werden als Sheddasen bezeichnet. Das *Shedding* wurde bereits bei vielen transmembranen Proteinen beobachtet, unter anderem bei Zytokinen (TNF- $\alpha$  (Black *et al.*, 1997)), Wachstumsfaktoren (EGF (Le Call *et al.*, 2003), TGF- $\alpha$  (Peschon *et al.*, 1998)), Adhäsionsmolekülen (L-Selektin (Peschon *et al.*, 1998), ICAM-1 (Tsakadze *et al.*, 2006), VCAM-1 (Garton *et al.*, 2003)), Rezeptoren (TNF-Rezeptor (Peschon *et al.*, 1998), IL-6-Rezeptor (Althoff *et al.*, 2000)) und weiteren transmembranen Molekülen (Fas Ligand (Mitsiades *et al.*, 2001), CD30 (Hansen *et al.*, 2000)).

Die proteolytische Ektodomänenspaltung stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation zellulärer Prozesse dar. Abhängig von der Expression und Lokalisation der Sheddase und deren Substrate ergeben sich durch das *Shedding* vielfältige Konsequenzen für die Zelle.



**Abb. 1.4: *Shedding* eines transmembranen Proteins**

(A) Die Proteolyse eines membranständigen Proteins setzt ein lösliches Peptid in den extrazellulären Raum frei. Nach dem *Shedding* verbleibt ein membranständiges Fragment in der Plasmamembran. (B) Anhand von Ligand-Rezeptor-Paaren sind die möglichen Funktionen des *Sheddings* dargestellt. In Abwesenheit der proteolytischen Ektodomänenspaltung vermag ein membran-verankerter Ligand nur die juxtakrine Signalisierung zu vermitteln. Das *Shedding* eines Liganden kann die eigene Zelle stimulieren (autokrine Signalisierung) oder Zellen in der unmittelbaren Umgebung (parakrine Signalisierung). Es kann auch ein löslicher Ligand-Rezeptor-Komplex entstehen, wenn Ligand und Rezeptor gespalten werden. Die membran-proximale Spaltung durch ADAMs leitet oft eine Presenilin-abhängige zweite Spaltung ein. Dieser Mechanismus wird auch als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) bezeichnet und ermöglicht, dass eine intrazelluläre Domäne (IZD) in den Zellkern transloziert und eine transkriptionelle Antwort induziert. Modifiziert nach Blobel, 2005.

Im Falle der Adhäsionsmoleküle führt die proteolytische Spaltung zu einem Aufheben ihrer adhäsiven Eigenschaft. Beispielhaft hierfür ist das *Shedding* des L-Selektins, welches die charakteristische Rollen der Leukozyten am Endothel zulässt. Die Inhibition des L-Selektin *Sheddings* äußert sich hingegen in einem veränderten Rollverhalten der Leukozyten und in einer erhöhten Leukozytenrekrutierung (Herren, 2002).

Freigesetzte Moleküle sind sowohl in der Lage, das Zellverhalten anderer Zellen (parakrin) als auch das der eigenen Zelle (autokrin) zu beeinflussen. So führt das Entfernen der Rezeptoren von der Zelloberfläche zu einem Verlust an Responsivität. Allerdings können auch lösliche Rezeptoren ihren Liganden binden und als lösliche Rezeptor-Ligand-Komplexe andere Zellen, denen der entsprechende Rezeptor fehlt, aktivieren. Dieses Phänomen des *Trans-signallings* wurde insbesondere für den IL-6-Rezeptor beschrieben (Rose-John *et al.*, 1994).

Grundsätzlich wird zwischen zwei Formen des *Sheddings* unterschieden, dem konstitutiven und dem induzierbaren *Shedding*. Letzteres kann durch Calcium-Mobilisierung, Signaltransduktionswege der MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen (Fan *et al.*, 1999; Gechtman *et al.*, 1999) oder der Proteinkinase C (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002) eingeleitet werden.

Für die Untersuchung des induzierbaren *Sheddings* wird daher oft der synthetisch hergestellte Proteinkinase C-Agonist PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) verwendet. Ein weiteres Stimulanz zur Aktivierung der Sheddasen ist das Calcium-Ionophor Ionomycin, welches einen Calcium-Einstrom in die Zelle bewirkt (Liu und Hermann, 1978). Für die Regulation des *Sheddings* gibt es jedoch auch physiologische Stimulantien, darunter das Acetylcholin im Falle des APP *Sheddings* (Buxbaum *et al.*, 1992, Nitsch *et al.*, 1992) und Lipopolysaccharide (LPS) im Falle des TNF- $\alpha$  *Sheddings* (McGeehan *et al.*, 1994).

Neben den Induktoren des *Sheddings* existieren auch physiologische Inhibitoren. So hemmen beispielsweise die TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*) endogen die Sekretaseaktivität von Matrix Metalloproteinasen und ADAMs (Murphy *et al.*, 2003). Bislang wurden vier verschiedene TIMPs identifiziert (Brew *et al.*, 2000). Sie besitzen 12 konservierte Cysteinreste, die sechs Disulfidbrückenbindungen ausbilden. Die hemmende Wirkung der TIMPs erfolgt durch die Bindung an das katalytische Zinkion der Metalloprotease.

TIMP-3 ist im Gegensatz zu TIMP-1, -2 und -4 in der Lage, die Metalloprotease-Domäne von ADAM17 zu hemmen (Amour *et al.*, 1998). ADAM10 kann durch TIMP-1 und TIMP-3, aber nicht durch TIMP-2 und TIMP-4 gehemmt werden (Amour *et al.*, 2000).

Um Aufschluss darüber zu erhalten, welche Sheddasen am *Shedding* beteiligt sind, bietet sich der Einsatz spezifischer Inhibitoren an. Zur Hemmung von Metalloproteinasen werden

Hydroxamat-basierte Inhibitoren eingesetzt, wie z. B. TAPI und GM6001. Diese besetzen spezifisch das aktive Zentrum der katalytischen Domäne und chelatieren das Zinkion, was zu einem Verlust der Sekretaseaktivität führt (Ludwig *et al.*, 2005).

Im Vergleich zu den ADAMs spaltet die  $\gamma$ -Sekretase ihre Substrate innerhalb der transmembranen Domäne. Die im intrazellulären Raum freigesetzten Fragmente können dann entweder degradiert werden oder beispielsweise als Transkriptionsfaktoren Einfluss auf das zelluläre Geschehen nehmen. Die  $\gamma$ -Sekretase ist als ein Komplex in der Membran vorzufinden der aus Presenilin, Nicastrin, Aph-1 (*anterior-pharynx-defective protein-1*) und Pen-2 (*presenilin enhancer protein-2*) besteht. Entscheidend für die katalytische Wirkung ist das Presenilin (PS), ein Protein mit acht Transmembran-Domänen. Das Presenilin wird zunächst als inaktives Holoprotein synthetisiert und erst durch endoproteolytische Spaltung zwischen der 6. und 7. transmembranen Domäne in die aktive Form überführt. Bekannte Substrate der  $\gamma$ -Sekretase sind neben APP (Selkoe, 1998) unter anderem der Notch-1 Rezeptor (Fortini, 2001), Syndecan-3 (Schulz *et al.*, 2003) und E-Cadherin (Marambaud *et al.*, 2002).

Man geht davon aus, dass die  $\gamma$ -Sekretase nur bereits proteolytisch verkürzte Moleküle als Substrat erkennt. Deshalb kommt den ADAMs eine Schlüsselrolle bei der proteolytischen Ektodomänenspaltung zu. Im nächsten Kapitel wird eingehender auf ADAM10 eingegangen. Für die verwandten Moleküle, des in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteins VE-Cadherin, wie E- und N-Cadherin wurde ADAM10 bereits als bedeutsame Metalloproteinase für das konstitutive *Shedding* ausgemacht.

### 1.1.2 ADAM10

ADAM10 - ebenfalls als Kuzbanian, KUZ und MADM (*mammalian disintegrin metalloproteinase*) bezeichnet - wurde erstmals 1989 aus Rinderhirn als ein MBP (*myelin basic protein*)-degradierendes Enzym isoliert (Chantry *et al.*, 1989) und nach seiner Klonierung als ADAM klassifiziert (Howard *et al.*, 1996).

Für ADAM10 konnte anhand der Ektodomänenspaltung von APP eine  $\alpha$ -Sekretaseaktivität nachgewiesen werden. Dabei verhindert die Spaltung von APP durch ADAM10 die Bildung eines  $\beta$ -Amyloid-Peptids (A $\beta$ ), welches in der Folge zur Entstehung der Alzheimer Erkrankung beiträgt. Das durch eine  $\alpha$ -Sekretase entstehende sezernierte APP (sAPP) wirkt neuroprotektiv (Lammich *et al.*, 1999).

ADAM10 wird in verschiedenen Geweben exprimiert, unter anderem im Gehirn, Skelettmuskel, Herz und Niere (Kärkkäinen *et al.*, 2000, Dehmel *et al.*, 2008, Albrecht *et al.*,

2006, Schramme *et al.*, 2008). Zudem ist ADAM10 in einer Vielzahl von Spezies (*Bos taurus*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Sus scrofa*, *Xenopus laevis*) vorzufinden ([http://people.virginia.edu/~jw7g/Table\\_of\\_the\\_ADAMs.html](http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html)).

Zahlreiche Substrate, die einer proteolytischen Prozessierung durch ADAM10 unterliegen, konnten bereits identifiziert werden (siehe Tab. 1.1).

**Tab. 1.1: ADAM10 Substrate**

Substratgruppe	Substrat	Referenzen
Zytokine	CX3CL1 CXCL16	(Hundhausen <i>et al.</i> , 2003) (Abel <i>et al.</i> , 2004), (Gough <i>et al.</i> , 2004)
Wachstumsfaktoren	Betacellulin EGF HB-EGF	(Sanderson <i>et al.</i> , 2005) (Sahin <i>et al.</i> , 2004) (Higashiyama <i>et al.</i> , 2005)
Rezeptoren	IL-6-Rezeptor Notch-1-Rezeptor RAGE LRP1 HER2	(Matthews <i>et al.</i> , 2003) (Hartmann <i>et al.</i> , 2002) (Raucci <i>et al.</i> , 2008) (Liu <i>et al.</i> , 2009) (Liu <i>et al.</i> , 2006)
Adhäsionsmoleküle	CD44 E-Cadherin N-Cadherin L1 $\gamma$ -Protocadherin	(Nagano <i>et al.</i> , 2004) (Maretzky <i>et al.</i> , 2005a) (Reiss <i>et al.</i> , 2005) (Maretzky <i>et al.</i> , 2005b) (Reiss <i>et al.</i> , 2006)
Proteinasen	BACE1	(Hussain <i>et al.</i> , 2003)
Andere Proteine	APP Kollagen IV Kollagen XVII Delta-1 Jagged Ephrin-A2 Ephrin-A5 PrP RPTPkappa APLP2 FasL Klotho	(Lammich <i>et al.</i> , 1999) (Millichip <i>et al.</i> , 1998) (Franzke <i>et al.</i> , 2002) (Six <i>et al.</i> , 2003) (La Voie <i>et al.</i> , 2003) (Hattori <i>et al.</i> , 2000) (Janes <i>et al.</i> , 2005) (Vincent <i>et al.</i> , 2001) (Anders <i>et al.</i> , 2006) (Endres <i>et al.</i> , 2005) (Schulte <i>et al.</i> , 2007) (Bloch <i>et al.</i> , 2009)

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass ADAM10 selbst durch Proteasen gespalten wird. So sind ADAM9 und ADAM15 in der Lage, die Ektodomäne von ADAM10 freizusetzen. Weiterhin kann die intrazelluläre Domäne von ADAM10 durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex proteolytisch prozessiert werden. Das Fragment transloziert nach der Spaltung in den Zellkern und ist in subnukleären Strukturen lokalisiert, welche in der Regulation von Genen involviert

sind. ADAM10 übt so eine doppelte Rolle aus, zum einem indem es als membrangebundenes Protein eine Metalloproteinase-Aktivität aufweist und zum anderen ein potentiell Signal-molekül darstellt nachdem es durch ADAM9/ADAM15 und der  $\gamma$ -Sekretase gespalten wird (Tousseyn *et al.*, 2009).

ADAM10 ist äußerst wichtig während der frühen Embryogenese, so sterben ADAM10-defiziente Mäuse bereits an Embryonaltag E9,5 und zeigen Entwicklungsstörungen, die eventuell durch Beeinträchtigung des Notch-Signalweges hervorgerufen sind. Die Mäuse weisen Defekte in der Herz- und ZNS-Entwicklung, in der Vaskulogenese und Somitogenese auf (Hartmann *et al.*, 2002).

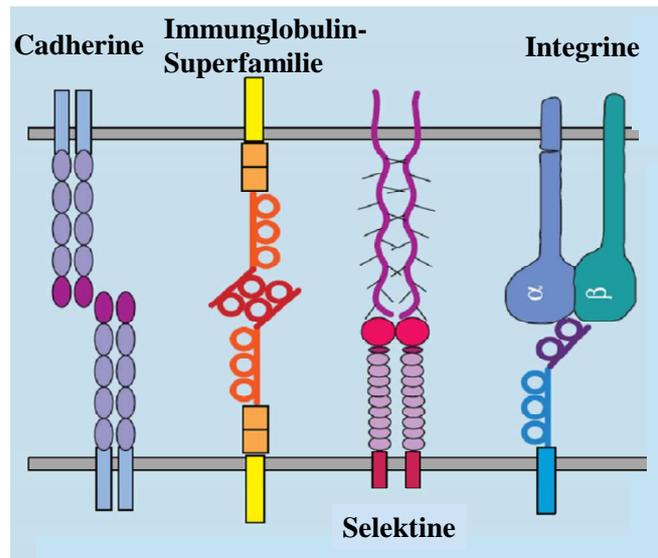
ADAM10 spielt auch bei pathologischen Prozessen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von ADAM10 mit verschiedenen Tumoren assoziiert ist. Dies konnte für Prostatakrebs, Darmkrebs und Plattenepithelkarzinom beobachtet werden (McCulloch *et al.*, 2004, Gavert *et al.*, 2007, Ko *et al.*, 2007).

Eine wichtige Substratgruppe von ADAM10 bilden die Zelladhäsionsmoleküle. Es konnten bereits eine Vielzahl von Substraten, wie N-Cadherin, E-Cadherin,  $\gamma$ -Protocadherin, L1 und CD44 aufgefunden werden. Für diese Proteine konnte gezeigt werden, dass sie zusätzlich einer Spaltung durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex unterliegen (Marambaud *et al.*, 2003, Marambaud *et al.*, 2002, Maretzky *et al.*, 2005b, Murakami *et al.*, 2003, Haas *et al.*, 2005). Da in dieser Arbeit die Untersuchung des VE-Cadherins im Vordergrund stand, soll im nächsten Abschnitt näher auf die Zelladhäsionsmoleküle und im Speziellen auf VE-Cadherin eingegangen werden.

## **1.2. Zelladhäsionsmoleküle**

Adhäsionsmoleküle vermitteln Zell-Zell-Verbindungen bzw. Zell-Matrix-Verbindungen und bilden damit die Grundlage, dass Zellen aneinander oder an der Extrazellulären Matrix haften. Die Zelladhäsionsmoleküle werden in vier Hauptfamilien unterteilt: die Cadherine, die Selektine, die Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie (Abb. 1.6, Hynes, 1999). Generell wird zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger (Takeichi, 1977), homophiler und heterophiler Interaktion unterschieden (Edelmann, 1985).

Eine der wichtigsten und weitverbreitetsten Arten adhäsiver Interaktion zwischen Zellen wird durch Cadherine vermittelt, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der vier Hauptfamilien von Zelladhäsionsmolekülen**

Zu den Hauptfamilien der Zelladhäsionsmoleküle zählen: die Cadherine, die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektine und die Integrine. Die Cadherine vermitteln die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige homophile Adhäsion zwischen den Zellen. Die Kristallstruktur der Domänen zeigt, dass die Moleküle während ihrer Bindung als Dimere auftreten. Die Immunglobulin-Superfamilie vermittelt die homophile Interaktion (beispielsweise PECAM-1) und die heterophile Interaktion mit Integrinen (z.B. VCAM-1 auf stimulierten Endothelzellen bindet  $\alpha 4\beta 1$  Integrin auf Leukozyten). Die Zelladhäsion ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Selektine besitzen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Lektindomäne, die mit Kohlehydratgruppen von hoch-glykosylierten Proteinen interagiert. P-Selektin auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen vermittelt die Adhäsion zu Mucinen, die auf einigen Leukozyten präsentiert sind. Integrine formen ein Heterodimer aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ . Die Bindung der Integrine ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Sie binden Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, lösliche Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Fibrinogen) und Proteine der Extrazellulären Matrix (Hynes, 1999).

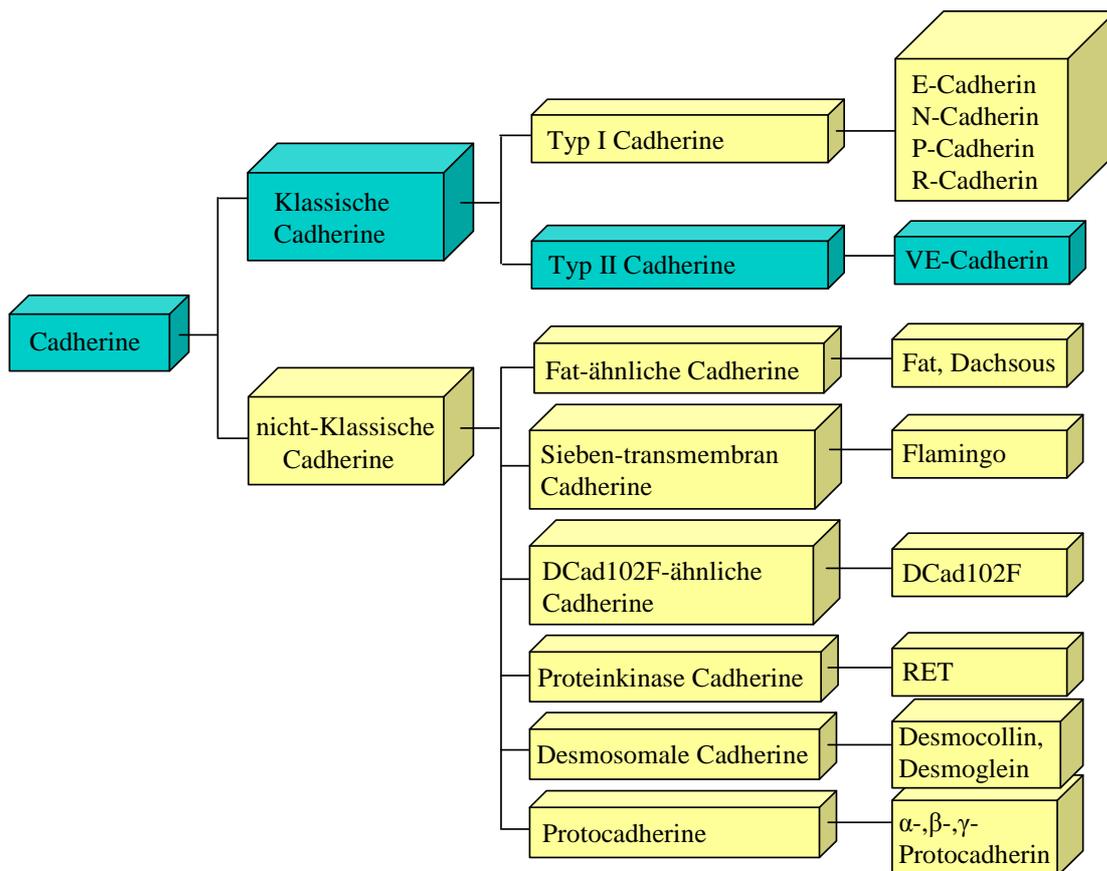
### 1.2.1 Cadherine

Die Cadherine (*Calcium-dependent adhering proteins*) sind Zelladhäsionsmoleküle, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige transmembrane Glykoproteine die homophile Adhäsion zwischen Zellen vermitteln und die Gewebestruktur und Morphogenese aufrechterhalten (Ranscht, 1994, Takeichi, 1995).

Zur Cadherin-Superfamilie gehören eine Vielzahl diverser Mitglieder. Im Menschen sind bislang mehr als 80 Mitglieder der Cadherin-Superfamilie bekannt. Insgesamt sind bisher über 300 verschiedene Cadherine gefunden worden (Tepass *et al.*, 2000). Eingeteilt werden die Cadherine in Klassische Cadherine und nicht-Klassische Cadherine (Angst *et al.*, 2001).

Basierend auf den Sequenzvergleichen, können die Klassischen Cadherine wiederum in zwei Subfamilien unterteilt werden: die Klassischen Typ I Cadherine, wie zum Beispiel das epitheliale (E)-, das neuronale (N)-, das plazentale (P)- und das retinale (R)-Cadherin und die Typ II Cadherine, zu denen das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin gehört (Abb. 1.6).

Die klassischen Typ I Cadherine verfügen über ein konserviertes HAV (His-Ala-Val)-Sequenzmotiv in der ersten Cadherin-Domäne, welches auch als CAR (*cell adhesion recognition*) bezeichnet wird und für die Zell-Zell Adhäsion notwendig ist (Blaschuk *et al.*, 1990, Blaschuk *et al.*, 2002). Die Typ II Cadherine haben ebenso eine postulierte CAR Stelle, die das zentrale Alanin enthält. Die beiden benachbarten Aminosäurereste können hierbei allerdings variieren. VE-Cadherin fehlt das zentrale Alanin in der CAR Region, stattdessen verfügt es über ein Tryptophan in Position 2 (Vincent *et al.*, 2004).



**Abb. 1.6: Mitglieder der Cadherin-Superfamilie**

Die Cadherine unterteilen sich in Klassische und nicht-Klassische Cadherine. Die Klassischen Cadherine wiederum teilen sich in Typ I und Typ II Cadherine. Zu den Typ I Cadherinen gehören unter anderem das epitheliale (E)-Cadherin, das neuronale (N)-Cadherin, das plazentale (P)-Cadherin und das retinale (R)-Cadherin. Zu den Typ II Cadherinen zählt das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin. Nicht-Klassische Cadherine sind unter anderem die Desmosomalen Cadherine (z.B. Desmogleine und Desmocolline) und die Protocadherine (z.B.  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Protocadherin).

Die Klassischen Cadherine besitzen eine große N-terminale extrazelluläre Domäne, welche durch eine Serie von fünf homologen Wiederholungen charakterisiert ist, die meist distal für die Bindungsspezifität verantwortlich sind (Hatta *et al.*, 1991, Takeichi, 1988). Der relativ kurze C-Terminus interagiert mit zytoplasmatischen Proteinen, welche zur Armadillo Familie gehören, darunter  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin und p120 (Hinck *et al.*, 1994).  $\beta$ -Catenin und

Plakoglobin können als Signalmoleküle agieren. Wenn diese von der Adhäsionsverbindung ins Zytosol freigesetzt werden, sind sie in der Lage, in den Zellkern zu translozieren, dort an Transkriptionsfaktoren zu binden und die Genexpression zu regulieren (Beherens *et al.*, 1996, Huber *et al.*, 1996).

$\beta$ -Catenin spielt eine zentrale Rolle im Wnt-Signaltransduktionsweg, der verschiedene Entwicklungsprozesse vermittelt.  $\beta$ -Catenin assoziiert dabei im Zellkern mit der LEF (*lymphoid enhancer factor*)/ TCF (*T-cell factor*) Familie von Transkriptionsfaktoren und reguliert eine Reihe von Genen, darunter *cyclin D1*, *c-myc* und *c-jun*, die vor allem für die Zellproliferation von Bedeutung sind (Willert *et al.*, 1998).

Viele Cadherine werden gewebespezifisch exprimiert. Eine gestörte Expression oder Funktion einiger Cadherine resultiert in einer abnormen Entwicklung einzelner Organe (Larue *et al.*, 1994, Radice *et al.*, 1997, Vittel *et al.*, 1997, Carmeliet *et al.*, 1999).

### 1.2.2 VE-Cadherin

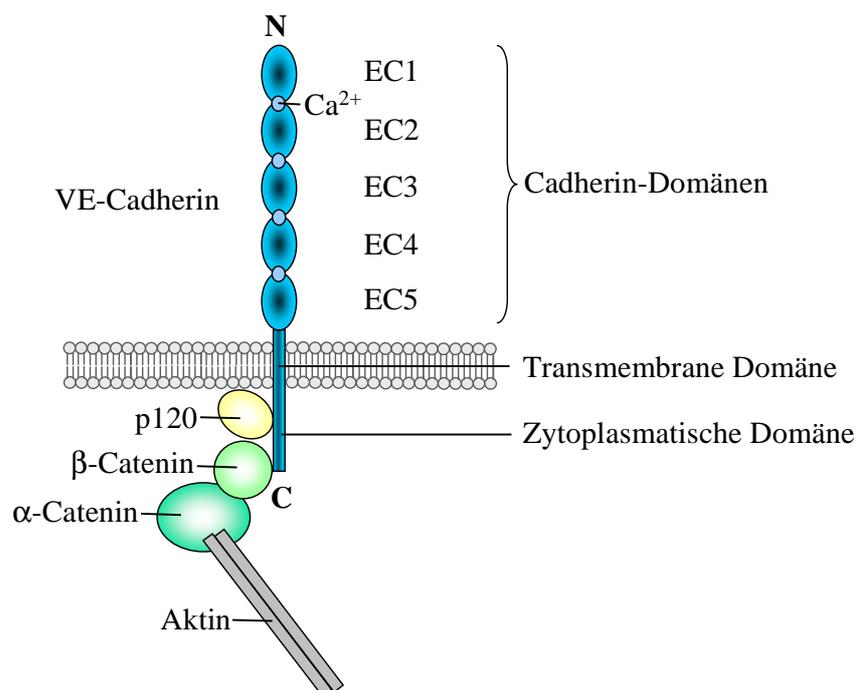
VE-Cadherin (vaskuläres endotheliales-Cadherin) - auch als Cadherin-5 oder CD144 bezeichnet - ist in intrazellulären Verbindungen von Endothelzellen lokalisiert, wo es für die Kohäsion und Organisation der Zell-Zell-Interaktion eine Rolle spielt (Brevario *et al.*, 1995).

VE-Cadherin wurde erstmals 1991 von Suzuki identifiziert und beschrieben (Suzuki *et al.*, 1991). Es handelt sich dabei um ein 130 kDa großes, transmembranes Glykoprotein, welches zur Cadherin-Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehört. Das VE-Cadherin gehört zum Typ I transmembraner Proteine und besitzt somit einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus.

Abbildung 1.7 zeigt den strukturellen Aufbau des VE-Cadherins. Der N-terminale Anteil besteht aus fünf repetitiven Cadherin-Domänen und dazwischenliegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen. Das Calcium wird dabei über saure Seitengruppen von Glutamin und Asparaginsäure gebunden. Den tandemartigen Ig-ähnlichen Cadherin-Domänen folgt eine transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Domäne. Letztere besitzt eine Bindestelle für Catenine, die indirekt die Bindung an das Zytoskelett vermitteln (Vincent *et al.*, 2004).

Das VE-Cadherin spielt eine zentrale Rolle in der Vaskulogenese, Angiogenese und in der Regulation der Permeabilität (Vincent *et al.*, 2004). VE-Cadherin ist wichtig für die Ausbildung der endothelialen Morphologie (Martin-Padura *et al.*, 1995) und ist essentiell für die Bildung eines stabilen Blutgefäßsystems während der Embryonalentwicklung (Vittel *et al.*, 1997). Es wird in Mausembryonen ab Tag E7,5 in mesodermalen Zellen der Eihülle exprimiert

(Breier *et al.*, 1996). Die funktionelle Bedeutung des VE-Cadherins konnte bei Mäusen durch gezieltes Ausschalten dieses Gens beobachtet werden. So sterben VE-Cadherin-defiziente Embryonen bereits am Tag E9,5, wobei ein nicht entwickeltes Gefäßsystem sowie starke Defekte in der Herzentwicklung beobachtet wurden (Carmeliet *et al.*, 1999). Zudem hebt die Defizienz von VE-Cadherin die Übermittlung des Überlebenssignals über den VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*) Signaltransduktionsweg auf und induziert somit Apoptose in Endothelzellen (Carmeliet *et al.*, 1999). Generell schützen Zell-Zell-Verbindungen bzw. Zell-Matrix-Verbindungen die Zellen vor Apoptose (Alahari *et al.*, 2002).



**Abb. 1.7: Schematischer Aufbau des vaskulären endothelialen (VE)-Cadherins**

Im Extrazellulären Raum ragt die N-terminale Cadherin-Domäne hervor, die insgesamt aus fünf einzelnen Ektodomänen (EC1-EC5) besteht, zwischen denen sich jeweils  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen befinden. Daran schließen sich die transmembrane und die zytoplasmatische Domäne an. Die zytoplasmatische Domäne ist über  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin an das Aktin-Zytoskelett gebunden.

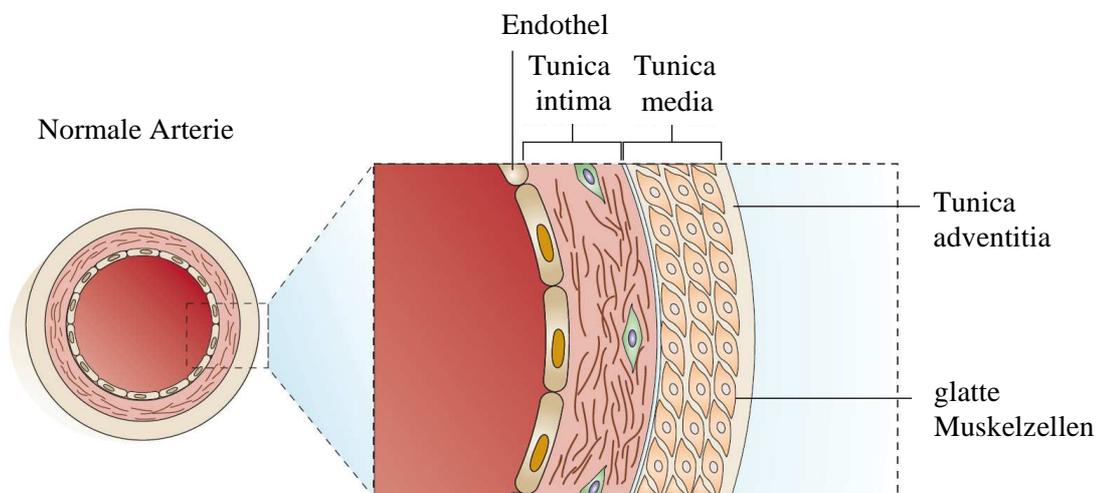
VE-Cadherin konnte auch im Zusammenhang mit Tumoren beobachtet werden. So wird VE-Cadherin in stark aggressiven Melanomzellen exprimiert, in schwach aggressiven Tumorzellen hingegen konnte VE-Cadherin nicht detektiert werden. Die Herunterregulierung der VE-Cadherin Expression in den aggressiven Melanomzellen, hebt die Fähigkeit auf, ein vaskuläres Netzwerk auszubilden (Hendrix *et al.*, 2001).

### 1.3 Das Endothel: die innerste Wandschicht der Gefäße

Das Endothel kleidet die Gefäße aus und bildet somit die innerste Wandschicht (Abb. 1.8). Es formt die Hauptbarriere für die Passage von Makromolekülen und zirkulierenden Blutzellen zum Gewebe und stellt damit einen wichtigen Bestandteil der Blut-Organ-Schranke dar (Dejana *et al.*, 1995).

Das Endothel weist spezialisierte Zellverbindungen auf, zum einen Verschlusskontakte (*Tight junctions*) und zum anderen Adhäsionskontakte (*Adherens junctions*). In diesen endothelialen Zellverbindungen sind eine Reihe verschiedener Zelladhäsionsmoleküle lokalisiert (Dejana, 2004). Die interzellulären Zelladhäsionsmoleküle sind in der Lage die endotheliale Permeabilität sowie die Leukozytentransmigration zu regulieren (Dejana *et al.*, 1995).

Die Verschlusskontakte bilden einen sehr engen Kontakt zwischen den Nachbarzellen aus, dadurch wird eine Diffusionsbarriere geschaffen, die den Fluss von Molekülen über das Endothel kontrolliert. Zu den bekanntesten Zelladhäsionsmolekülen, die den Verschlusskontakt bilden, zählen das Occludin, die Claudine und die JAMs (*junctional adhesion molecules*) (Fanning *et al.*, 1999).



**Abb. 1.8: Aufbau des Gefäßes**

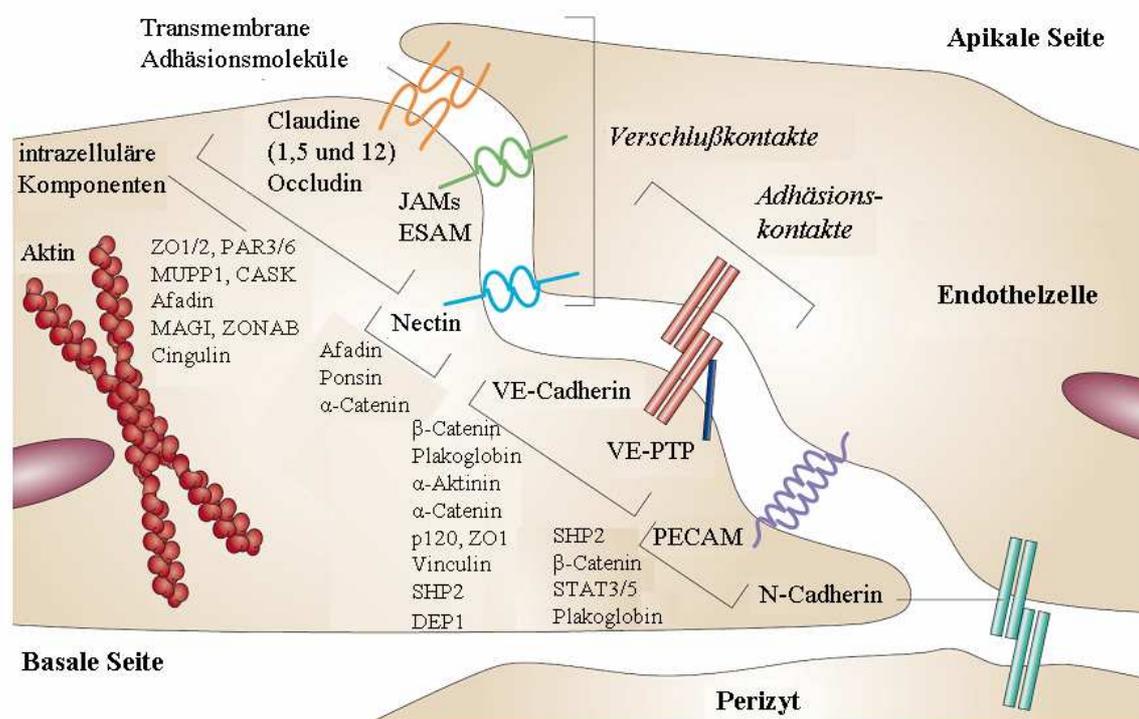
Der Wandaufbau von Gefäßen (Blutgefäße und Lymphgefäße) gliedert sich in drei Schichten: die innere *Tunica intima*, die sich aus dem Endothel und einer subendothelialen Schicht zusammensetzt, die mittlere *Tunica media*, die aus glatten Muskelzellen und einer äußeren elastischen Lamina besteht, und die äußere *Tunica adventitia*, die aus Bindegewebe aufgebaut ist. In der äußeren *Tunica adventitia* befinden sich zudem kleine Versorgungsgefäße (*Vasa vasorum*), die die äußeren Schichten des Gefäßes mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. (Watkins und Farrall, 2006)

Die Adhäsionskontakte werden durch Cadherine gebildet, die die physikalische Verbindung zwischen Zellmembranen und dem Zytoskelett ausbilden. Endothelzellen exprimieren neben dem spezifischen VE-Cadherin auch N-Cadherin. Im Gegensatz zum VE-Cadherin liegt das N-Cadherin nicht konzentriert in Adhäsionskontakten vor, sondern ist über die gesamte

Zellmembran verteilt. N-Cadherin vermittelt die Adhäsionsverbindungen zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen oder Perizyten (Navarro *et al.*, 1998).

In den Adhäsionskontakten findet sich weiterhin das VE-PTP (*vascular endothelial protein tyrosine phosphatase*) - ein transmembraner Bindepartner von VE-Cadherin -, welcher die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin reduziert, die Permeabilität verringert und damit die adhäsive Funktion von VE-Cadherin verstärkt. VE-PTP ist so in der Lage, die Integrität des Adhäsionskontaktes zu kontrollieren (Nawroth *et al.*, 2002).

Neben den Zelladhäsionsmolekülen, die in Verschlusskontakten oder Adhäsionskontakten zu finden sind, ist PECAM (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) ein weiteres wichtiges Molekül, welches die endotheliale Zelladhäsion vermittelt. PECAM gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist ein transmembranes Protein mit sechs Ig-ähnlichen homologen Domänen (Newman *et al.*, 1990). PECAM ist wichtig für verschiedene endotheliale Zellaktivitäten, wie Angiogenese, vaskuläre Wundheilung und Kontrolle der Leukozytenextravasation (Newman *et al.*, 1990, DeLisser *et al.*, 1994, Muller *et al.*, 1993). In Abbildung 1.9 sind die endothelialen Zelladhäsionsmoleküle dargestellt.



**Abb. 1.9: Endotheliale Zelladhäsionsmoleküle**

Endotheliale Zellverbindungen werden durch transmembrane Adhäsionsmoleküle und ihren intrazellulären Komponenten gebildet. Die Verschlusskontakte (*tight junctions*) werden von Proteinen wie Claudine, Occludin, JAMs (*junctional adhesion molecules*), ESAM (*endothelial cell selective adhesion molecule*) und Nectin vermittelt. Die Adhäsionskontakte (*adherens junctions*) werden überwiegend durch VE-Cadherin aufgebaut. Außerhalb dieser Kontakte findet man als Zelladhäsionsmoleküle PECAM und N-Cadherin. Modifiziert nach Dejana, 2004.

### 1.3.1 Regulation der endothelialen Barriere

Das Endothel formt ein wichtiges metabolisches Organ, welches in vielen physiologischen Prozessen involviert ist. Die endotheliale Homöostase und vaskuläre Integrität wird während der Angiogenese, der Wundheilung und bei thrombotischen und entzündlichen Reaktionen streng reguliert (Red-Horse *et al.*, 2007). Die Gefäßwand kontrolliert dabei den Austausch von Makromolekülen und Flüssigkeiten zwischen dem Blutstrom und dem intestinalen Gewebe (Weis *et al.*, 2005).

Verschiedene Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren, wie Thrombin, Histamin, Bradykinin, VEGF, TNF- $\alpha$ , LPS, Serotonin und Oxidantien können die vaskuläre Permeabilität erhöhen (Vestweber *et al.*, 2008). Für die Entzündungsmediatoren Histamin und Thrombin, dem Wachstumsfaktor VEGF sowie LPS und ROS wurde ein Einfluss auf die VE-Cadherin-vermittelten Zellkontakte beschrieben (Andriopoulou *et al.*, 1999, Rabiet *et al.*, 1996, Gavard *et al.*, 2006, Gong *et al.*, 2008, van Wetering *et al.*, 2002).

Histamin, ein biogenes Amin, welches in Mastzellen und basophilen Granulozyten synthetisiert wird, induziert die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin und führt damit zu einer erhöhten Permeabilität (Andriopoulou *et al.*, 1999).

Thrombin - eine Serinprotease, die an der Blutgerinnung, bei Entzündungen und Angiogenese beteiligt ist - repräsentiert einen Schlüsselregulator der endothelialen Barriere. Es aktiviert die Protease-aktivierte Rezeptor (PAR) Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch proteolytische Spaltung (Coughlin *et al.*, 2005). Daraufhin erhöht sich die intrazelluläre Calciumkonzentration, wodurch die Proteinkinase C (PKC) stimuliert wird (Sandoval *et al.*, 2001). Thrombin zerstört damit reversibel den VE-Cadherin/Catenin-Komplex und erhöht somit die endotheliale Permeabilität (Rabiet *et al.*, 1996).

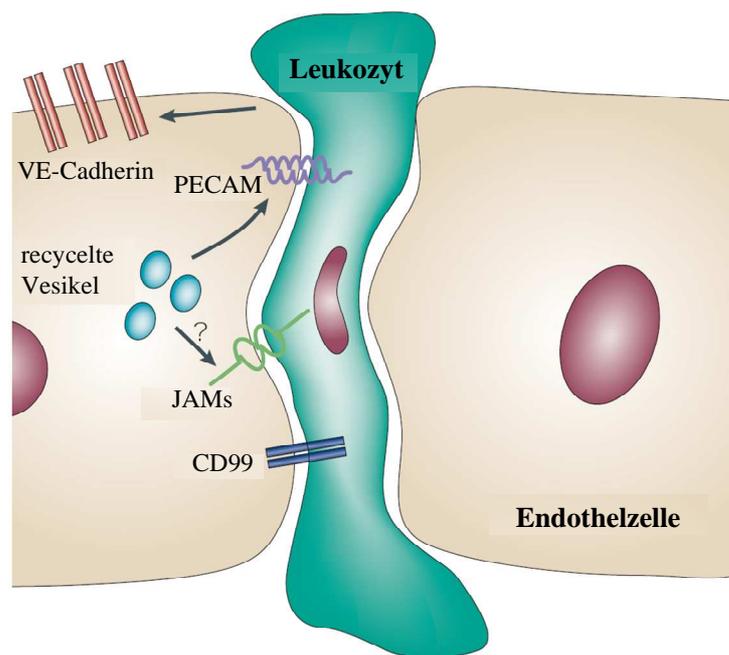
Der Wachstumsfaktor VEGF induziert die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin und p120 und erhöht auf diese Weise die Permeabilität (Esser *et al.*, 1998). Es wurde darüber hinaus publiziert, dass VEGF die Endozytose von VE-Cadherin über Clathrin-beschichtete Vesikel fördert und somit die endotheliale Permeabilität kontrolliert (Gavard *et al.*, 2006).

TNF- $\alpha$  ist ebenfalls in der Lage, die Permeabilität zu induzieren, so konnte beobachtet werden dass TNF- $\alpha$  die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin,  $\gamma$ -Catenin und p120 erhöht (Angelini *et al.*, 2006). Weiterhin hebt TNF- $\alpha$  selektiv die Integrität von Blutgefäßtumoren auf, indem es den VE-Cadherin-Komplex zerstört, was zur erhöhten Durchlässigkeit zwischen den Endothelzellen des Tumors führt (Menon *et al.*, 2006).

Für LPS und ROS wurde ebenfalls eine Erhöhung der Permeabilität durch eine Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin und p120 beschrieben (Gong *et al.*, 2008, van Wetering *et al.*, 2002).

Neben der Permeabilität spielt die Leukozytentransmigration (Abb. 1.10) eine weitere wichtige Rolle im metabolischen Prozess des Endothels. Es wurde gezeigt, dass die Transmigration von Neutrophilen durch das vaskuläre Endothel parallel mit der Spaltung von VE-Cadherin durch die Serinproteasen Elastase und Cathepsin G einhergeht, die auf der Oberfläche von Neutrophilen präsentiert sind (Hermant *et al.*, 2003).

Drei weitere wichtige Adhäsionsmoleküle, die im Zusammenhang mit der Transmigration von Leukozyten stehen, sind PECAM-1, JAMs und CD99 - auch bekannt als MIC2. Sie werden auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert und vermitteln die homophile Interaktion zwischen beiden Zelltypen (Muller *et al.*, 1993, Martin-Padura *et al.*, 1998, Lou *et al.*, 2007).



#### Abb. 1.10: Transendotheliale Migration

Während der Passage über den interendothelialen Spalt begegnen die Leukozyten verschiedenen Adhäsionsmolekülen. Während dieses Prozesses wird VE-Cadherin vorübergehend verlagert. Dabei tendiert VE-Cadherin zu einer Umverteilung auf die Endothelzelloberfläche (Allport *et al.*, 1997). PECAM und JAMs sind entlang der endothelialen Zellgrenze konzentriert. Möglicherweise werden beide Moleküle aus spezifischen Vesikeln recycelt. PECAM, JAMs und CD99 werden auch auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert, so dass entlang der Zellgrenzen homophile Verbindungen zwischen diesen Molekülen aufgebaut werden. Modifiziert nach Dejana, 2004.

Das Endothel spielt durch dessen regulatorische Funktion auf das Gefäß, wie Kontrolle des vasomotorischen Tonus, lokale Homöostase und proliferative Prozesse, eine entscheidende Rolle im Prozess der arteriosklerotischen Erkrankung (Schächinger *et al.*, 2000). Die Endotheliale Dysfunktion stellt eine Funktionsstörung des Endothels dar, aus der Arteriosklerose entsteht. Die Arteriosklerose (Arterienverkalkung) ist eine Erkrankung der Gefäße, bei der krankhafte Veränderung der Arterienwand zu einer Verdickung und Verhärtung und somit zu einem Elastizitätsverlust und einer Lumeneinlagerung führt. Infolgedessen kann eine Durchblutungsstörung und Minderdurchblutung des nachgeschalteten Gewebes beobachtet werden. Typische Folgeerkrankungen sind die Koronare Herzkrankheit (KHK) und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). In arteriosklerotischen Plaques von Carotiden konnte eine starke Expression von VE-Cadherin beobachtet werden, weshalb dieses Molekül ein Marker für die Progression von arteriosklerotischen Plaques zu sein scheint (Sigala *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Angiogenese

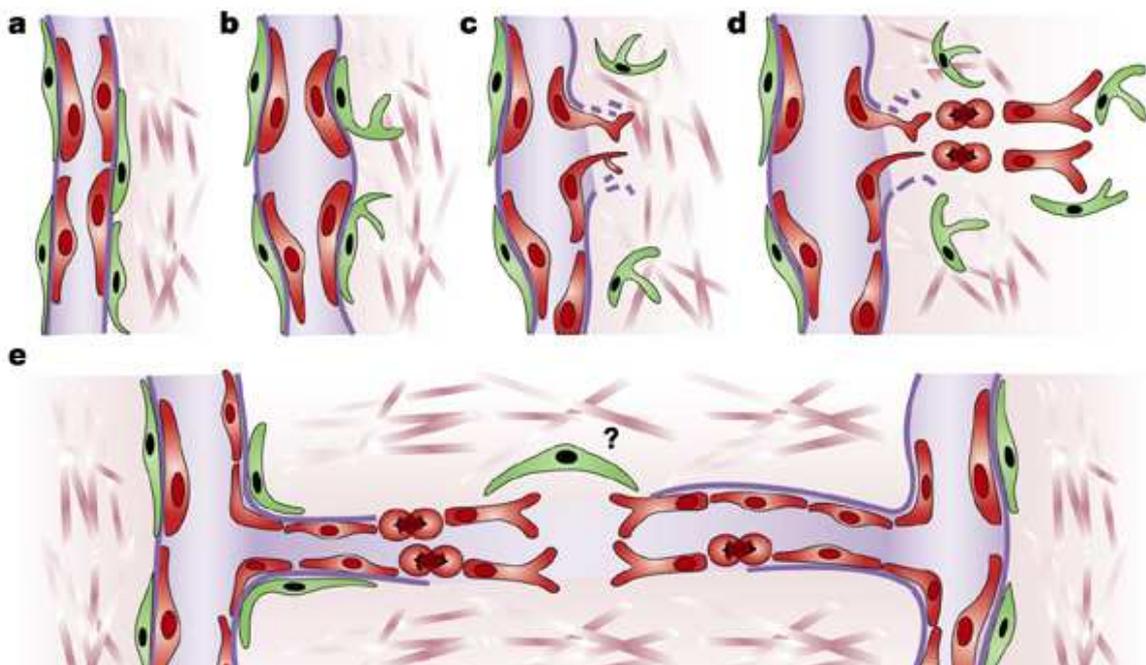
Angiogenese beschreibt den Prozess, bei dem ein neues Gefäßsystem durch Sprossung aus einem bereits bestehenden Gefäß gebildet wird (Folkman, 2003). Von der Angiogenese abzugrenzen ist die Vaskulogenese, die gekennzeichnet ist durch die Neubildung eines Blutgefäßes während der Embryogenese. Bei diesem Prozess migrieren angiogenetische Vorläuferzellen zur Stelle der Vaskularisierung, differenzieren in Endothelzellen und verbinden sich, um einen initialen Vaskularplexus zu bilden (Risau, 1995, Carmeliet, 2003). VE-Cadherin ist bei der Vaskulogenese ein frühzeitiger Marker in der Differenzierung von Endothelzellen (Vittet *et al.*, 1997).

Der Prozess der Angiogenese beginnt mit der Aktivierung von Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren. Es folgt die Migration und Proliferation von Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus, was zur Bildung eines Sprosses aus Endothelzellen führt, der in das Bindegewebe hineinragt. Matrix Metalloproteinasen zersetzen währenddessen die Extrazelluläre Matrix. Anschließend bildet sich eine neue Basalmembran rund um das unreife Gefäß (Carmeliet, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass ADAMs in der Angiogenese involviert sind, indem mit einem ADAM-Inhibitor die Dosis-abhängige *Tube Formation* (Gefäßneubildung) reduziert wurde (Trochon *et al.*, 1998). Verschiedene potentielle Regulatoren in der Angiogenese sind beschrieben worden. Zu diesen Proangiogenetischen Faktoren gehören: VEGF, Angiopoietin,

FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ), TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , HGF/SF (*hepatocyte growth factor/scatter factor*), Angiogenin und Interleukin-8 (Risau, 1997, Folkman *et al.*, 1992).

Es wird zwischen der physiologischen Angiogenese und der pathologischen Angiogenese unterschieden. Die physiologische Angiogenese findet während der Embryonalentwicklung, bei der Wundheilung, bei der Bildung des Gelbkörpers und im Endometrium des Uterus statt (Reynolds *et al.*, 1992, Risau, 1997). Die pathologische Angiogenese hingegen ist die durch Tumore ausgelöste Neubildung von Gefäßen, die somit für das Wachstum und die Metastasierung des Tumors essentiell ist (Folkman, 1995). Angiogenese spielt weiterhin in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie z. B. proliferative Retinopathie, Altersverwandte Makulardegeneration, Krebs, rheumatoide Arthritis und Psoriasis eine Rolle (Folkman, 1995).



**Abb. 1.11: Angiogenese**

(a) Die Blutgefäße entstehen aus kleinen Gefäßen (Kapillaren). (b) Erste Perizyten (grün) lösen sich vom Gefäß und die Blutgefäße erweitern sich. (c) Die Basalmembran und die Extrazelluläre Matrix werden abgebaut. Dies ermöglicht Endothelzellen (rot) in den perivaskulären Raum, aufgrund angiogener Stimulie, zu migrieren. (d) Die Endothelzellen proliferieren und folgen lose aufeinander. (e) Die Endothelzellen adhären und bilden ein Lumen aus. Die Basalmembran bildet sich aus. Schließlich verschmilzt das Blutgefäß mit einem anderen Blutgefäß und bildet so ein neues Kreislauf-System aus (Bergers und Benjamin, 2003).

### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die proteolytische Prozessierung von VE-Cadherin sowie deren funktionelle Bedeutung näher untersucht werden. Basierend auf der Veröffentlichung von Herren *et al.*, bei der gezeigt wurde, dass die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin während der Apoptose freigesetzt wird, sollte nun die für das *Shedding* von VE-Cadherin verantwortliche Metalloproteinase identifiziert werden. Für die Untersuchungen wurden primäre endotheliale HUVEC-Zellen verwendet, die das VE-Cadherin konstitutiv exprimieren. Um die Frage zu klären, welche Metalloproteinase am VE-Cadherin *Shedding* beteiligt ist, standen eine Reihe von Metalloproteinase-Inhibitoren zur Verfügung. Zudem sollte der Einfluss der verantwortlichen ADAMs durch spezifische Hemmung mittels RNA-Interferenz Experimente analysiert werden. Überdies war zu Beginn der Arbeit völlig ungeklärt, ob auch der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex an der Proteolyse von VE-Cadherin beteiligt ist, dies sollte ebenfalls in Inhibitionsexperimenten geklärt werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, welche Faktoren die proteolytische Aktivität der verantwortlichen Metalloproteinase beeinflussen und in der Folge die VE-Cadherin Proteolyse regulieren. Hierbei sollten sowohl synthetische Stimulantien wie Ionomycin und PMA, als auch physiologische Faktoren wie proinflammatorische Zytokine und der Permeabilitätssteigernde-Faktor Thrombin zum Einsatz kommen. Die Bedeutung der verantwortlichen Metalloproteinase während der Stimulation sollte auch hinsichtlich der Stabilität der VE-Cadherin-Zellkontakte in immunzytochemischen Färbungen analysiert werden.

Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung des VE-Cadherin *Sheddings* sollte die Permeabilität, anhand der Durchlässigkeit einer HUVEC-Zellschicht für Makromoleküle untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss der für das *Shedding* von VE-Cadherin verantwortlichen Metalloproteinase auf die Transmigration von Leukozyten überprüft werden. Die Untersuchung dieser Ereignisse sollte unter Einsatz von Metalloproteinase-Inhibitoren, ADAM-Überexpression bzw. RNA-Interferenz näher analysiert werden. Ferner war die Frage zu klären, welche physiologische Bedeutung die Metalloproteinase bei der Angiogenese und Migration von Endothelzellen einnimmt. Dies sollte unter Zuhilfenahme von rekombinantem ADAM bzw. spezifischem ADAM-Inhibitor in Zellkulturversuchen geprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

96-Loch-Mikrotiterplattenleser Sunrise	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Analysenwaage	Kern & Sohn, Dürrwangen, Deutschland
Autoklav Tecnomara	Integra, Fernwald, Deutschland
Brutschrank Hera cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage A120S	Satorius, Göttingen, Deutschland
Kopfkanüle	Assmann, Kiel, Deutschland
Laborpunktionskanüle	Assmann, Kiel, Deutschland
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroplatten Fluoreszenzleser	
Lambda Fluoro-320	MWG Biotech, München, Deutschland
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop Axiovision	Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzkamera Axiovert 200M	Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzfilter A488/A594	Zeiss, Jena, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Japan
Mischer Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Neubauerzählkammer	Assistent, Sondheim, Deutschland
Nukleofektionsgerät Nucleofektor <sup>TM</sup>	Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland
pH-Meter	Krick, Langenselbold, Deutschland
<i>Phosphoimager</i> LAS-3000	Fujifilm, Kanagawa, Japan
Pinzette	FST, Heidelberg, Deutschland
Polyacrylamidgelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini Protean <sup>®</sup> 3	
Präparierschere	FST, Heidelberg, Deutschland
Rollenmischgerät RM5	Assistent, Sondheim, Deutschland
Schüttelheizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator KL-2	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Semi-Dry-Blot Apparatur Trans-Blot <sup>®</sup> SD	Bio-Rad, München, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 200/300	Bio-Rad, München, Deutschland

Sterilarbeitsbank danLAF VFR 1806	Claus Damm A/S, Humlebæk, Dänemark
Sterilarbeitsbank Hera safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus	Millipore, Billerica, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen:	
Zentrifuge Centrifuge GS-6KR	Beckman, Krefeld, Deutschland
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.2 Labormaterialien

6-, 24-Loch-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15 ml-, 50 ml-Sarstedtröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-well Millicell <sup>®</sup>	
<i>Hanging Cell Culture Insert</i> 0,4 µm	Millipore, Billerica, USA
Deckgläschen (13 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einmal-Skalpelle	B Braun, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Latex-Handschuhe	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatte ELISA Microlon	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatte Proteinbestimmung	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M	American National Can, Greenwich, Großbritannien
Pasteurpipetten RM5	Assistent, Sondheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pursept-A	Merz, Pharma, Frankfurt a. M., Deutschland
PVDF-Membran	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Box	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Transwell tissue culture insert</i> 0,4 µm	Costar, Cambridge, USA
<i>Transwell tissue culture insert</i> 3,0 µm	Costar, Cambridge, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Whatman Papier	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>2.1.3 Chemikalien</b>	
Acrylamid Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
ADAM10 Stealth <sup>™</sup> Select RNAi	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HSS100165, HSS100166, HSS100167	
Ammoniumchlorid	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat, p.a. (APS)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
BM blue POD Substrat	Roche, Mannheim, Deutschland
Bovines Fibronectin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Calcein	Molecular Probes, Oregon, USA
Complete <sup>™</sup> EDTA-free Proteaseinhibitor	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Diazobicyclooctan (DABCO)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
ECM-Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Großbritannien
FITC-Dextran 40.000 Da	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

Fötales Kälberserum (FKS)	BIOCHROM KG, Berlin, Deutschland
Gentamycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerin	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol, p.a.	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
jetPEI <sup>TM</sup> -HUVEC <i>transfection reagent</i>	Polyplus <i>transfection</i> , Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen ( <i>from Calf skin</i> )	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Kollagenase IV	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
2-Mercaptoethanol, p.a.	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol <sup>®</sup> 4-88	Calbiochem, La Jolla, USA
N, N, N', N'-Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
p.a. 99% f. d. Elektrophorese (TEMED)	
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
NEAA ( <i>non essential amino acids</i> )	GIBCO, Invitrogen, Großbritannien
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA, Linz, Schweiz
Phytohämagglutinin (PHA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Protein-Molekulargewichtsmarker ( <i>Page Ruler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder</i> )	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Rekombinantes humanes ADAM10	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes IL-2	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes VE-Cadherin	R&D Systems, Minneapolis, USA
RPMI 1640 Kulturmedium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Salzsäure	Merck, Allied Signal Riedel de Haën, Seelze, Deutschland

---

Saponin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Stealth <sup>TM</sup> RNAi Negative Control	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Low GC Duplex 12935-200	
Sucrose	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinhusen, Deutschland
Trypanblau	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Linz, Schweiz
Tween <sup>®</sup> 20	ROTH, Karlsruhe, Deutschland

#### **2.1.4 Kits**

Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
ECL Plus <i>Western Blotting Detection System</i>	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Großbritannien
<i>Human T cell Nucleofector Kit</i>	Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland
VE-Cadherin-ELISA	Bender MedSystems <sup>®</sup> , Wien, Österreich

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

ADAM10-Lysepuffer	5 mM Tris 1 mM EGTA 250 mM Sucrose 1 % Triton X-100 in bidest. Wasser → Aufbewahrung bei 4°C Complete (Proteaseinhibitorcocktail, frisch 1:40 verdünnt eingesetzt), 1 Tablette in 1 ml PBS gelöst, Aliquots bei -20°C aufbewahrt
ADAM10-Reaktionspuffer	25 mM Tris 0,005 % Brij-35 2,5 µM ZnCl <sub>2</sub> in bidest. Wasser pH 8,8
Amphotericin B	50 mg Amphotericin B in 200 ml DMSO → Aliquots gelagert bei -20°C
Blockierungspuffer 1	0,12 % Glycin 0,2 % Saponin in PBS
Blockierungspuffer 2	3 % BSA 0,2 % Saponin in PBS
bovines Fibronektin	1 mg bovines Fibronektin in 1 ml bidest. Wasser → Aliquots gelagert bei -20°C

DABCO-Stammlösung	200 mg Diazobicyclooctan in 1 ml PBS → Lagerung bei -20 °C
DAPI-Stammlösung	1 µg DAPI in 1 ml PBS → Lagerung bei -20 °C
Eindeckmedium	1 ml Mowiol 100 µl DABCO 1 µl DAPI
ELISA-Blockierungspuffer	0,5 % BSA 0,05 % Tween 20 in PBS
ELISA-Stopplösung	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
ELISA-Waschpuffer	0,05 % Tween <sup>®</sup> 20 in PBS
Erythrozyten-Lyse-Lösung	155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA in bidest. Wasser pH 7,2
Kollagenaselösung (0,1%)	100 mg Kollagenase in 100 ml PBS → Aliquots bei -20 °C gelagert
Kollagenlösung	50 mg Kollagen ( <i>from Calf skin</i> ) in 50 ml PBS, 1h bei RT gelöst → Aliquots bei -20°C gelagert

Mowiol	10 g Mowiol in 40 ml PBS 24 h bei RT rühren, 20 ml 100 %iges Glycerol zugeben, 24 h bei RT rühren, pH-Kontrolle (pH 6-7), 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren; Lagerung bei -20°C, nur 1-2 x auftauen
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat in bidest. Wasser pH 7,2-7,4
Permeabilisierungspuffer	0,2 % Saponin in PBS
Sammelgel (4,5 %)	5,79 ml bidest. Wasser 2,60 ml Sammelgelpuffer 1,67 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %/0,8 % w/v) 60 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfatlösung (w/v) 30 µl TEMED
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/ HCL, 0,4 % SDS (w/v) in bidest. Wasser pH 6,8
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 3,5 mM SDS in bidest. Wasser

2x SDS-Probenpuffer (reduzierend)	3,5 mM Natriumdodecylsulfat (SDS) 250 mM Tris/ HCl, pH 6,8 5 % 2-Mercaptoethanol 0,07 mM Bromphenolblau 10 % Glycerin in bidest. Wasser
<i>Stripping</i> -Puffer	63 mM Tris 70 mM SDS 0,7 % 2-Mercaptoethanol in bidest. Wasser pH 6,7
Trenngel (10 %)	4,03 ml bidest. Wasser 2,60 ml Trenngelpuffer 3,33 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %/0,8 % w/v) 60 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfatlösung (w/v) 30 µl TEMED
Trenngel (12,5 %)	3,29 ml bidest. Wasser 2,50 ml Trenngelpuffer 4,17 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %/0,8 % w/v) 60 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfatlösung (w/v) 30 µl (TEMED)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/ HCL, 0,4 % SDS (w/v) in bidest. Wasser pH 8,8

---

Trypsin-EDTA	400 µl 0,25 % Trypsin in 0,03 % EDTA in PBS
T-Zell-Medium	36 ml RPMI 1640 400 µl Pen/Strep 400 µl Glutamin 400 µl NEAA ( <i>non essential amino acid</i> ) 4 ml FKS 40 µl Gentamycin (50 mg/ml) 40 µl 2-Mercaptoethanol (50 mM)
<i>Western Blot</i> -Blockierungspuffer	5 % Milchpulver in <i>Western Blot</i> -Waschpuffer (TBST)
<i>Western Blot</i> -Transferpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin in bidest. Wasser 10 % Methanol pH 8,2-8,4 (pH-Wert nicht einstellen)
<i>Western Blot</i> -Waschpuffer (TBST-Puffer)	20 mM Tris 1 mM EDTA 140 mM NaCl 0,001 % Tween 20 in bidest. Wasser pH 7,5

### 2.1.6 Antikörper

**Tab. 2.1: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Herkunft	Immunisierte Spezies	Verd. WB	Verd. ICC
VE-Cadherin (F-8) C-terminal	Santa Cruz	Maus	1:500	1:100
ADAM10	Calbiochem	Kaninchen	1:2000	
$\beta$ -Tubulin	DSHB	Maus	1:1000	
PECAM-1 (M-20) C-terminal	Santa Cruz	Ziege	1:600	
His	Dianova	Maus	1:1000	

**Tab. 2.2: Verwendete Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Herkunft	Kopplung	Verd. WB	Verd. ICC
Schaf $\alpha$ -Maus	Dianova	HRP	1:10000	
Esel $\alpha$ -Kaninchen	Santa Cruz	HRP	1:5000	
Esel $\alpha$ -Ziege	Dianova	HRP	1:10000	
Ziege $\alpha$ -Maus	Molecular Probes	Alexa Fluor 594		1:300

### 2.1.7 Plasmide

**Tab. 2.3: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Protein	Markierung	Vektor	Herkunft
pcDNA3.1	-	-	pcDNA3.1	Maus
ADAM10	ADAM10	-	pcDNA3.1	Maus

### 2.1.8 Inhibitoren und Stimulantien

Tab. 2.4: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Inhibitorklasse	Hersteller	eingesetzte Konzentration
GI254023X	ADAM10-Inhibitor <sup>1</sup> IC <sub>50</sub> (ADAM17) = 541 nM IC <sub>50</sub> (ADAM10) = 5,3 nM	GlaxoSmithKline	10 µM
GW280264X	ADAM10- und ADAM17-Inhibitor IC <sub>50</sub> (ADAM17) = 8,0 nM IC <sub>50</sub> (ADAM10) = 11,5 nM	GlaxoSmithKline	10 µM
GM6001	Metalloproteinase-inhibitor	Calbiochem	10 µM
TAPI	Metalloproteinase-inhibitor	Calbiochem	20 µM
Inhibitor X	γ-Sekretaseinhibitor	Calbiochem	1 µM
DAPT	γ-Sekretaseinhibitor	Calbiochem	10 µM
Staurosporin	Proteinkinase-inhibitor	Calbiochem	1 µM
GF109203X	nicht-selektiver PKC-Inhibitor; primäre Spezifität: PKCα/β1/β2/γ/δ/ε	Sigma-Aldrich	5 µM
Gö6976	selektiver PKC α/β- Inhibitor; primäre Spezifität: PKC α/β1	Sigma-Aldrich	1 µM

Tab. 2.5: Verwendete Stimulantien

Stimulanz	Funktion	Hersteller	eingesetzte Konzentration
APMA	Metalloproteinase-Aktivator	Sigma-Aldrich	100 µM
PMA	Proteinkinase C-Agonist	Sigma-Aldrich	200 ng/ml
TNF-α	proinflammatorisches Zytokin	Sigma-Aldrich	20 ng/ml
IFN-γ	proinflammatorisches Zytokin	Sigma-Aldrich	20 ng/ml
Ionomycin	Calcium-Ionophor	Calbiochem	10 µM
Thrombin	Serinprotease	Sigma-Aldrich	1 U/ml

<sup>1</sup> IC<sub>50</sub> ist die Inhibitor-Konzentration bei der 50% der Enzyme inhibiert werden

### **2.1.9 Zelllinien**

#### **HUVEC**

HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) sind primäre Endothelzellen, die aus der Vene humaner Nabelschnüre isoliert wurden. Die Zellen wachsen adhärent mit Ausläufern. Dieses Zellsystem wird für physiologische und pharmakologische Untersuchungen eingesetzt wie makromolekularen Transport, Blutkoagulation und Fibrinolyse.

#### **T-Zellen (PHA-Blasten)**

Die T-Zellen wurden mittels Ficoll-Gradienten aus Blut gewonnen und aufgereinigt. Die T-Zellen wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) aktiviert und mit IL-2 stimuliert. Bei den PHA-stimulierten T-Zellen handelt es sich um Suspensionszellen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur erfolgten an einer Sterilwerkbank unter sterilen Bedingungen. Die Arbeitsfläche und Hände wurden vor jedem Arbeitsgang mit Pursept-A desinfiziert. Die verwendeten Zellkulturmaterialien waren steril. Labormaterial bzw. Präparierbesteck wurden autoklaviert bzw. im Sterilisator für 8 h bei 180°C sterilisiert. Die verwendeten Medien, das fötale Kälberserum (FKS) sowie ein Gemisch aus Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) und Trypsin-EDTA wurden von PAA (Linz, Schweiz) bezogen. Die Zellkulturmedien und Trypsin-EDTA wurden bei 4°C gelagert und vor dem Einsatz im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das in der Zellkultur verwendete PBS wurde bei 120°C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Die Kultivierung der HUVECs und der PHA-stimulierten T-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, Sarstedt, Nümbrecht). Die verwendeten HUVECs wurden in ECM (*Endothel Cell Growth Medium*) mit SupplementMix und 1 % Pen/Strep und die PHA-stimulierten T-Zellen in T-Zell-Medium unter gleichen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Stimulations- und Inhibitionsversuche wurden in 6-Loch-Platten (Sarstedt) und die Permeabilitätsversuche sowie Transmigrationsversuche in 24-Loch-Platten (Sarstedt) durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Präparation von HUVECs

Die primären humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVECs) wurden nach der Methode nach Jaffe *et al.* isoliert (Jaffe *et al.*, 1973). Hierzu wurden Nabelschnüre innerhalb von 3 h *post partum* bearbeitet und zur Aufbewahrung in PBS bei 4°C gelagert. Zu Beginn wurde die Nabelschnurvene mittels Kopfkanüle (Assmann, Kiel) mit PBS mehrfach gespült, um Blutzellen zu entfernen. Die Nabelschnur wurde an einem Ende mit einer Klemme abgeklemmt. Eine 0,1 %ige Kollagenaselösung (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) wurde mittels Kopfkanüle (Assmann) eingefüllt und das andere Ende der Nabelschnur ebenfalls abgeklemmt. Die Nabelschnur wurde 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei die Kollagenase die Endothelzellen aus der Vene enzymatisch ablöst. Durch Öffnen der Klemmen wurde die Kollagenaselösung mit den Endothelzellen in ein 50 ml-Sarstedtröhrchen (Sarstedt) überführt.

Um restliche Endothelzellen aus der Vene zu gewinnen, wurde diese mehrfach mittels Kopfkanüle und PBS durchgespült. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (Centrifuge GS-6KR, Beckman, Krefeld) bei 2500 rpm und 15 min isoliert. Das Zellpellet wurde in *Endothel Cell Growth Medium* (Promocell, Heidelberg) resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt. Diese wurde zuvor mit 1 ml einer 20 µg/ml bovinem Fibronektinlösung (Sigma-Aldrich) in PBS für 1 h beschichtet und anschließend dreimal mit je 3 ml PBS gewaschen. Bis zur ersten Passage wurde dem Medium 500 ng/ml Amphotericin B (Sigma-Aldrich) zugesetzt, um Kontaminationen mit Hefen zu unterbinden. Die HUVECs wurden von Passage 2-6 verwendet.

### **2.2.1.3 Präparation von Phytohämagglutinin-stimulierten T-Zellen (PHA-Blasten)**

Für die Präparation von PHA-Blasten wurden 25 ml heparinisertes Blut auf 25 ml Ficoll (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) vorsichtig aufgeschichtet und 30 min bei 1200 rpm mit deaktivierter Bremse (Centrifuge GS-6KR, Beckman) zentrifugiert. Das oben befindliche Serum und die in der Mitte befindliche Interphase wurden abgenommen und in ein neues 50 mL-Sarstedtröhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und 15 min bei 1200 rpm mit deaktivierter Bremse zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 4 ml Erythrozyten-Lyse-Lösung resuspendiert und 4 min inkubiert, anschließend mit PBS aufgefüllt und 15 min bei 1200 rpm mit deaktivierter Bremse zentrifugiert. Die Zellen wurden in T-Zell-Medium resuspendiert und zur Aktivierung mit 0,5 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) versetzt und in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät. Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen mit 10 U/ml rIL-2 (R&D Systems, Minneapolis, USA) stimuliert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen für die Transmigrationsversuche bzw. Co-Kultur Experimente eingesetzt.

### **2.2.1.4 Subkultivierung von Zellen**

Die adhärennten Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz von 80-90 % subkuliviert. Dazu wurde das alte Kulturmedium entfernt. Die Zellen wurden mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden durch die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA und 5 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurden die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Universal 320, Hettich, Tuttlingen).

Das entstandene Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und entsprechend ihrer Proliferationsgeschwindigkeit in Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 auf neuen Zellkulturschalen bzw. Zellkulturflaschen oder für Experimente in 6-Loch-Platten ausgesät.

Die PHA-stimulierten T-Zellen wurden zur Subkultivierung 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Universal 320, Hettich). Das Zellpellet wurde in frischem T-Zell-Medium resuspendiert und die Zellen auf neue Zellkulturflaschen (Sarstedt) aufgeteilt.

#### **2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen**

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Zelllinien diene flüssiger Stickstoff (-196°C). Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz von 90-100 % von der Zellkulturschale bzw. Zellkulturflasche trypsinisiert, zentrifugiert und danach in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 40 % FKS und 10 % DMSO) aufgenommen, kurz resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort auf Eis gelagert, anschließend ein bis zwei Tage bei -80°C aufbewahrt und danach in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben.

#### **2.2.1.6 Auftauen von Zellen**

Das Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurde nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter kurz im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sofort in 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium aufgenommen, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde überprüft, ob die Zellen adhärent geworden waren und nicht angewachsene oder tote Zellen wurden durch einen Mediumwechsel entfernt.

#### **2.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl**

Für das Zählen der Zellen wurden diese mit Trypanblau angefärbt. Tote Zellen werden bei dieser Färbung blau, indem der Farbstoff durch die Zellmembran dringt und mit zytosolischen Proteinen interagiert. Die zu zählenden Zellen wurden im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau versetzt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauerzählkammer gegeben.

Die Zahl der lebenden Zellen wurde durch das Auszählen der vier großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer und der folgenden Berechnung ermittelt:

$$[\text{Summe der Zellzahl}/4] \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

$$\text{Zellen/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$$

### 2.2.1.8 Transiente Transfektion

HUVECs wurden transient mit den Transfektionsreagenz jetPEI<sup>TM</sup>-HUVEC (Polyplus *transfection*, Hamburg) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 30.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 6-Loch-Platten ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen mit 1 µg Plasmid-DNA je Loch transfiziert, indem getrennt voneinander 1 µg DNA und 7 µl jetPEI<sup>TM</sup>-HUVEC Transfektionsreagenz in je 50 µl sterilfiltrierter 150 mM Natriumchloridlösung pipettiert wurden. Die Ansätze wurden vereinigt und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 600 µl RPMI/2 % FKS ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde hinzugefügt. Nach 4 h wurde der Transfektionsansatz durch einen Mediumwechsel mit *Endothel Cell Growth Medium* von den Zellen entfernt. 48 h nach der Transfektion erfolgten Permeabilitätsversuche bzw. die Ernte der Zellen.

### 2.2.1.9 siRNA (*small interfering RNA*) Transfektion

Für die siRNA Transfektion wurden HUVECs mit Hilfe des jetPEI<sup>TM</sup>-HUVEC Transfektionsreagenz transfiziert. Die Zellen wurden mit einem Gemisch aus drei verschiedenen ADAM10 siRNAs (HSS100165, HSS100166, HSS100167, ADAM10 Stealth<sup>TM</sup> Select RNAi, Invitrogen, Karlsruhe) und einer Kontroll siRNA (12935-200, Stealth<sup>TM</sup> RNAi Negative Control Low GC Duplex, Invitrogen) transfiziert. Dazu wurden die Zellen in einer Zelldichte von 30.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium entfernt und durch 600 µl RPMI 1640/2 % FKS ersetzt. Pro Transfektionsansatz wurden je 20 pM siRNA und 7 µl jetPEI<sup>TM</sup>-HUVEC getrennt voneinander in je 50 µl sterilfiltrierter 150 mM Natriumchloridlösung resuspendiert. Beide Ansätze wurden vereinigt und anschließend 30 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurde der Transfektionsansatz durch einen Mediumwechsel mit *Endothel Cell Growth Medium* von den Zellen entfernt. 48 h nach der Transfektion erfolgten die funktionellen Versuche und die Zellernte.

### 2.2.1.10 T-Zellen Transfektion

Die PHA-stimulierten T-Zellen (PHA-Blasten) wurden mittels *Human T cell Nucleofector Kit* (Amaxa Biosystems, Köln) transfiziert. Die PHA-Blasten (stimuliert mit rIL-2) wurden in ein 15 ml-Sarstedtröhrchen überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Universal 320, Hettich). Das Pellet wurde in 2 ml T-Zell-Medium resuspendiert. Pro Transfektionsansatz wurden  $1-5 \times 10^6$  Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Das mediumfreie Zellpellet wurde mit 100  $\mu$ l Transfektionslösung (*Human T cell Nucleofector Solution 5: 1 Supplement*) und 5  $\mu$ l ADAM10 siRNA bzw. Kontroll siRNA (mock) versetzt. Dieser Transfektionsmix wurde in eine Amaxa-Küvette (Einmalküvette) überführt und in das Nucleofektionsgerät (Amaxa Biosystems, Köln) gesetzt. Die Transfektion erfolgte mit dem Programm X-01. Die Küvette wurde mit T-Zell-Medium gespült und der Transfektionsansatz in eine 24-Loch-Platte überführt. Die Zellen wurden bei 37°C für 4-12 h kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, dem zusätzlich 10 U/ml rIL-2 und 0,5  $\mu$ g/ml PHA hinzugesetzt wurden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen im Transmigrationsversuch eingesetzt.

### 2.2.1.11 Stimulation von Zellen und Inhibitionsversuche

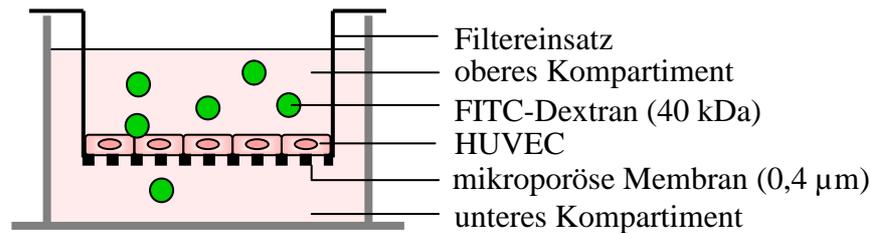
Zur Analyse des *Sheddings* wurden HUVECs unter Einsatz verschiedener Inhibitoren bzw. Stimulantien untersucht. Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten bei 80 % Konfluenz getestet. Die Inkubationszeit der Zellen mit den Inhibitoren bzw. Stimulantien betrug je nach Versuch 5 min bis 24 h. Die Metalloproteinase-Inhibitoren GI254023X, GW280264X und GM6001 wurden in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M und TAPI in einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M eingesetzt. In Kombination mit anderen Inhibitoren bzw. Stimulantien wurden die Zellen 30 min mit den Metalloproteinase-Inhibitoren vorinkubiert. Die  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren DAPT und Inhibitor X wurden jeweils in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M verwendet. Das Calcium-Ionophor Ionomycin wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. Die Behandlung mit Ionomycin wurde auf 30 min begrenzt, da das Stimulanz auf Dauer Apoptose induziert. Der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ M für 6 h und der Proteinkinase C-Agonist PMA in einer Konzentration von 200 ng/ml für 2 h eingesetzt. Der nicht-selektive PKC-Inhibitor GF109203X wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ M und der selektive PKC  $\alpha/\beta$ -Inhibitor Gö6976 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M verwendet. Die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wurden in einer Konzentration von 20 ng/ml für 18 h benutzt.

Thrombin wurde in einer Konzentration von 1 U/ml für verschiedene Zeitintervalle eingesetzt. Der Metalloproteinase-Aktivator APMA wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ M für 30 min verwendet. Die Wirkung von Inhibitoren und Stimulantien wurde nachfolgend mit Hilfe von *Western Blot*, ELISA und Immun-zytochemie analysiert.

#### 2.2.1.12 Permeabilitätsversuch

Die Durchlässigkeit einer einlagigen Zellschicht wurde mittels Permeabilitätsversuches bestimmt. Hierzu wurden Filtereinsätze in eine 24-Loch-Platte mit einer Porengröße von 0,4  $\mu$ m (Costar, Cambridge, USA) verwendet, die mit je 50  $\mu$ l einer 50  $\mu$ g/ml Kollagenlösung (Sigma-Aldrich) in PBS je Filtereinsatz für 1-2 h bei RT beschichtet wurden. Die Filtereinsätze wurden anschließend dreimal mit 100  $\mu$ l PBS gewaschen. Es folgte die Aussaat der HUVECs, wobei diese trypsinisiert und in *Endothel Cell Growth Medium* resuspendiert wurden. Es wurden  $3 \times 10^5$  Zellen/100  $\mu$ l je Filtereinsatz ausgesät und bei 37°C kultiviert. 2-3 h nach der Aussaat wurde 600  $\mu$ l *Endothel Cell Growth Medium* in das untere Loch der 24-Loch-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 2-3 Tage bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Zur Beurteilung der Konfluenz wurde eine 1  $\mu$ g/ml Calceinlösung (Molecular Probes, Oregon, USA) auf einen Filtereinsatz pipettiert und nach 5 min die Zelldichte unter dem Fluoreszenzmikroskop (FITC) kontrolliert. Waren die Zellen konfluent, wurden diese mit GI254023X bzw. DMSO in serumfreiem RPMI 1640 für 30 min in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M vorinkubiert oder unbehandelt belassen. Danach wurde 5  $\mu$ l FITC-Dextran ( $M_r$  40.000, Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml in jeden Filtereinsatz pipettiert. Die Probenentnahme erfolgte, indem nach definierten Zeitintervallen eine 50  $\mu$ l Probe aus dem unteren Loch entnommen wurde und in eine 96-Loch-Platte (Sarstedt) überführt wurde. Die 96-Loch-Platte wurde mit Alufolie lichtgeschützt abgedeckt und die Fluoreszenz (FITC,  $\lambda_{EX}$  485 nm,  $\lambda_{EM}$  525 nm) am Lambda Fluoro-320 (MWG Biotech, München) bei einer Sensitivität von 60 gemessen. In das untere Loch wurden zum Ausgleich der Mediummenge erneut 50  $\mu$ l *Endothel Cell Growth Medium* hinzugesetzt. In Abbildung 2.1 ist eine schematische Darstellung des Permeabilitätsversuches aufgeführt.



**Abb. 2.1 : Schematische Darstellung des Permeabilitätsversuches**

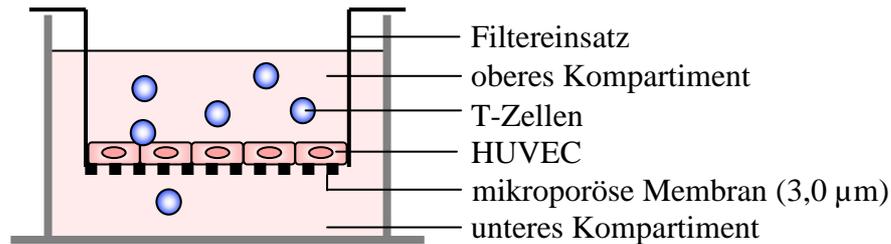
HUVECs werden auf der Kollagen-beschichteten mikroporösen Membran (Porengröße 0,4 µm) eines Filtereinsatzes ausgesät und kultiviert. Sind die HUVECs konfluent, wird in das obere Kompartiment fluoreszierendes FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 40 kDa pipettiert. Durch Zugabe von Inhibitoren bzw. Stimulantien kann sich die Permeabilität der HUVEC Zellschicht verändern. Nimmt die Durchlässigkeit der Zellschicht zu, gelangen FITC-Dextran markierte Moleküle in das untere Kompartiment. Nach festgelegten Inkubationszeiten wird die Fluoreszenzintensität des unteren Mediums gemessen.

### 2.2.1.13 Transmigrationsversuch

Zur Untersuchung der Migration von PHA-stimulierten T-Zellen (PHA-Blasten) durch eine HUVEC Zellschicht wurde ein Transmigrationsversuch durchgeführt. Dabei wurden Filtereinsätze in eine 24-Loch-Platte mit einer Porengröße von 3,0 µm (Costar) mit Kollagen beschichtet, wobei je 50 µl einer 50 µg/ml Kollagenlösung (Sigma-Aldrich) in PBS in jeden Filtereinsatz pipettiert und für 1-2 h bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurden die Filtereinsätze dreimal mit 100 µl PBS gewaschen. HUVECs wurden in einer Zellzahl von  $3 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  je Filtereinsatz ausgesät. Dazu wurden HUVECs zunächst trypsinisiert, in *Endothel Cell Growth Medium* resuspendiert und nachfolgend die Zellzahl eingestellt.

Die ausgesäten HUVECs wurden bei 37°C kultiviert. 2-3 h nach der Aussaat wurde 600 µl *Endothel Cell Growth Medium* in das untere Loch der 24-Loch-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 2-3 Tage bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Die Konfluenz der HUVEC-Zellschicht wurde durch Calcein kontrolliert, indem 1 µg/ml Calceinlösung (Molecular Probes) auf ein Filtereinsatz pipettiert und nach 5 min die Zelldichte unter dem Fluoreszenzmikroskop (FITC) beurteilt wurde. Die Zellen wurden mit GI254023X, GW280264X, GM6001 oder DMSO in einer Endkonzentration von 10 µM für 30 min vorinkubiert oder unbehandelt belassen. Die PHA-stimulierten T-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min (Universal 320) pelletiert und in *Endothel Cell Growth Medium* resuspendiert.  $5 \times 10^5$  Zellen/20 µl wurden je Filtereinsatz pipettiert. Nach 24 h wurde die Zellzahl in der unteren Kammer mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellzahl gibt ein direktes Maß der transmigrierten Zellen an. In Abbildung 2.2 ist eine schematische Darstellung des Transmigrationsversuches gezeigt.



**Abb. 2.2 : Schematische Darstellung des Transmigrationsversuches**

HUVECs werden auf der mikroporösen Membran (Porengröße 3,0 µm) eines Filtereinsatzes ausgesät, welche zuvor mit Kollagen beschichtet wurde. Die Zellen werden bei 37°C bis zur Konfluenz kultiviert. Sind die HUVECs konfluent, werden in das obere Kompartiment T-Zellen (PHA-Blasten) pipettiert. Nach 24 h werden die T-Zellen im unteren Kompartiment mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt und somit die Anzahl der transmigrierten Zellen bestimmt.

**2.2.1.14 Angiogeneseversuch (*tube forming assay*)**

Die Fähigkeit der HUVECs, in Anwesenheit von rekombinantem ADAM10 neue Gefäße auszubilden, wurde in einem Angiogeneseversuch untersucht. Hierbei wurde ECM-Gel (*from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma*, Sigma-Aldrich) bei 4°C aufgetaut und 1:2 in serumfreiem RPMI 1640 auf Eis verdünnt. 50 µl dieses Ansatzes wurden je Loch in eine 96-Loch-Platte luftblasenfrei pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden 50 µl des rekombinanten ADAM10 verdünnt in ADAM10-Reaktionspuffer je Loch pipettiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Nach 24 h wurde überschüssige ADAM10-Lösung abpipettiert und  $5 \times 10^4$  HUVEC Zellen/150 µl *Endothel Cell Growth Medium* je Loch ausgesät. Nach weiteren 24 h erfolgten die mikroskopischen Aufnahmen.

**2.2.1.15 Migrationsversuch (*in vitro wound healing assay*)**

Um die Bedeutung von ADAM10 auf die Migration von HUVECs zu klären, wurde ein Migrationsversuch durchgeführt. Dazu wurde in einer 6-Loch-Platte eine konfluente HUVEC Zellschicht zerstört, indem ein Querstrich mittels gelber Pipettenspitze über den Zellrasen gezogen wurde. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit 1 ml RPMI 1640/2 % FKS in Anwesenheit oder Abwesenheit eines Metalloproteinase-Inhibitors. Zur Lokalisation eines Bereiches für die spätere mikroskopische Aufnahme, wurde an der Unterseite der Platte eine Markierung eingezeichnet. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach 0, 3, 6 und 9 h.

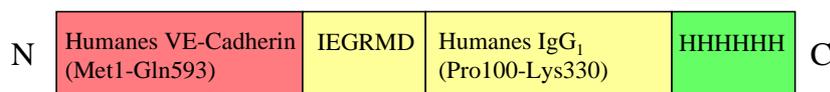
### 2.2.1.16 Co-Kultur Experiment

In einem Co-Kultur Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob PHA-stimulierte T-Zellen das VE-Cadherin *Shedding* in HUVECs induzieren können. Hierzu wurden HUVECs in 6-Loch-Platten mit PHA-Blasten co-kultiviert. Dabei wurden je  $14 \times 10^6$  PHA-Blasten (rIL-2 stimuliert) je Loch in *Endothel Cell Growth Medium* direkt auf die HUVECs oder indirekt in einem Filtereinsatz mit einer Porengröße von  $0,4 \mu\text{m}$  (6-well Millicell® *Hanging Cell Culture Insert*, Millipore, Billerica, USA) auf die HUVECs gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen für die Analyse im *Western Blot* geerntet.

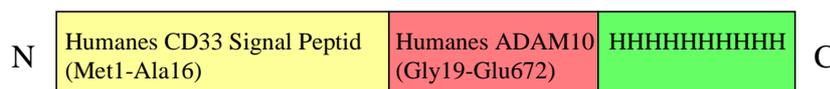
### 2.2.1.17 VE-Cadherin *in vitro*-Spaltungsversuch (*in vitro cleavage assay*)

Um einen direkten Nachweis der VE-Cadherin Spaltung durch ADAM10 zu untersuchen, wurde *in vitro* humanes rekombinantes VE-Cadherin mit humanem rekombinantes ADAM10 für 18 h inkubiert. In einem Versuchsansatz wurden 500 ng rekombinantes VE-Cadherin (R&D Systems, Minneapolis, USA) mit 500 ng rekombinantes ADAM10 (R&D Systems) in einen  $10 \mu\text{l}$  Reaktionsansatz in ADAM10-Reaktionspuffer verdünnt angesetzt und für 1, 4 und 18 h bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle für die unspezifische Degradation wurden 500 ng rekombinantes VE-Cadherin bzw. 500 ng rekombinantes ADAM10 alleine in ADAM10-Reaktionspuffer für die Zeit von 18 h inkubiert. Die rekombinanten Proteine sind schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt.

#### Humanes VE-Cadherin



#### Humanes ADAM10



**Abb. 2.3 : Aufbau des rekombinanten VE-Cadherin und des rekombinanten ADAM10**

Das humane rekombinante VE-Cadherin besitzt einen VE-Cadherin Anteil (Met1-Gln593), IEGRMD, humanes IgG<sub>1</sub> und einen fusionierten HIS-Tag. Das humane rekombinante ADAM10 besitzt ein humanes CD33 Signalpeptid, einen humanen ADAM10 Teil (Gly19-Glu672) und einen fusionierten HIS-Tag.

Die Proben wurden nachfolgend sofort mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt und bis zur Analyse im *Western Blot* bei –20°C aufbewahrt. VE-Cadherin und ADAM10 wurden mit einem Anti-His-Antikörper im *Western Blot* detektiert.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten**

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte zur Herstellung der Zelllysate erfolgten auf Eis. Zunächst wurde das Medium entfernt bzw. für die Analyse im ELISA abgenommen, zur Abtrennung von Zellen und Zelltrümmer zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4°C, Tischzentrifuge 5415R) und bei –20°C aufbewahrt.

Die Zellen wurden mit 1 ml PBS/6-Loch mechanisch von den Kulturschalen mittels Zellkulturschaber abgeschabt, in 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt und 10 min bei 13.000 rpm und 4°C (Tischzentrifuge 5415R) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Analyse im *Western Blot* bei –20°C aufbewahrt.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Zellpellet in 20 µl ADAM10-Lysepuffer, dem zusätzlich ein Proteaseinhibitor (Complete, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) zugesetzt wurde, resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Danach wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 13.000 rpm, 4°C für 10 min (Tischzentrifuge 5415R) abgetrennt. Dieser Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration (2.2.2.2) bestimmt. Für die SDS-PAGE wurden die Proben mit reduzierendem SDS-Probenpuffer gemischt und 10 min bei 95°C denaturiert.

### **2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit dem Bradfordreagenz nach Angaben des Herstellers in 96-Loch-Platten (Sardstedt) durchgeführt. 1 µl der Proben wurden mit 200 µl Bradfordreagenz versetzt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA), das in einer Verdünnungsreihe von 3000 µg/ml bis 23,44 µg/ml eingesetzt wurde. Die Messung wurde bei einer Absorption von 595 nm in einem 96-Loch-Mikrotiterplattenleser (SCT Rainbow, Tecan, Crailsheim) vorgenommen.

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Zellysate erfolgte im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine werden aufgrund des Molekularsiebeffekts der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) verleiht den Proteinen eine negative Ladung und überlagert somit die Eigenladung der Aminosäuren. Im grobporigen Sammelgel werden die aufgetragenen Proteine fokussiert und anschließend im feinporigen Trenngel in die einzelnen Bestandteile nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Trenngel (10 % bzw. 12,5 %) wurde zwischen 2 Glasplatten (Mini-Protean-3-System, Bio-Rad) mit einer Geldicke von 1,5 mm gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel (4,5 %) gegossen. Das Trenngel und das Sammelgel wurde aus bidest. Wasser, Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid zusammenpipettiert und zuerst das Trenngel mit den Radikalstartern Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) versetzt, in den Zwischenraum der beiden Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, mit bidest. Wasser gewaschen und das Sammelgel nach der Zugabe von APS und TEMED darüber gegossen. Für die Ausformung der Taschen zur späteren Probenauftragung wurde zügig in das noch flüssige Sammelgel ein Kamm gesteckt und nach dem Auspolymerisieren wieder entfernt. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt. Es wurde je Tasche 20 µg Protein und getrennt 4 µl Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Die Zellysate wurden mit reduzierendem 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene 2-Mercaptoethanol sorgt für die Reduktion der Cysteinreste und führt damit zum Aufbrechen von Tertiärstrukturen. Das negativ geladene Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) lagert sich an die Proteine, so dass alle SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern und ausschließlich aufgrund ihrer Größe im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt.

Das Gel wurde mit den Proben und dem Protein-Molekulargewichtsmarker beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V bis kurz vor dem Auslaufen der Bromphenolblaubande.

### 2.2.2.4 Western Blotting

Nach dem Auftrennen der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese aus dem Gel in einer Semi-Dry-Blot Apparatur (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe) transferiert.

Für den Transfer wurde die PVDF-Membran in Methanol für 2 min aktiviert. Die Membran und das Gel sowie vier Whatman-Papiere wurden in Transferpuffer äquilibriert.

Beginnend bei der Anode wurden zwei Lagen Whatman-Papier, die hydrophilisierte PVDF-Membran, das SDS-PAGE Gel und erneut zwei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinandergelegt. Der Transfer erfolgte bei 20 V für 90 min.

#### **2.2.2.5 Immunologische Detektion der transferierten Proteine**

Die Membran wurde für mindestens 2 h in *Western Blot*-Blockierungspuffer bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um freiliegende Bereiche der Membran abzusättigen. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf dem Rollenmischer (RM5, Assistent, Sondheim) und alle Waschschritte erfolgten auf dem Schüttelinkubator (KL-2, Edmund Bühler, Hechingen).

Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte bei RT für 1 h, dazu wurde der Antikörper in 3 ml *Western Blot*-Blockierungspuffer verdünnt, gemeinsam mit der Membran in ein 50 ml-Sarstedtröhrchen überführt und auf dem Rollenmischer gedreht. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in 20 ml *Western Blot*-Waschpuffer (TBST-Puffer) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in *Western Blot*-Waschpuffer verdünnt eingesetzt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die immunologisch markierten Proteine mit Hilfe des ECL Plus *Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die freigesetzte Chemilumineszenz wurde mit dem *Phosphoimager* LAS-3000 (Fujifilm, Kanagawa, Japan) aufgenommen.

#### **2.2.2.6 Strippen von PVDF-Membranen**

Wurde die PVDF-Membran mehrfach mit Antikörpern angefärbt, so wurde die Membran zuvor mit *Stripping*-Puffer für 30 min bei 60°C inkubiert. Der detergenzhaltige, reduzierende *Stripping*-Puffer entfernt gebundene Antikörper. Nachfolgend wurde die Membran dreimal 10 min mit 20 ml *Western Blot*-Waschpuffer gewaschen und danach erneut 2 h bei RT mit *Western Blot*-Blockierungspuffer blockiert und, wie beschrieben, mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

## 2.2.3 Immunologische Methoden

### 2.2.3.1 Immunzytochemie

In eine 24-Loch-Platte wurden Deckgläschen mit je 50 µl einer 50 µg/ml Kollagenlösung (Sigma-Aldrich) in PBS für 1-2 h bei RT beschichtet. Nachfolgend wurde überschüssiges Kollagen durch dreimaliges Waschen mit 300 µl PBS entfernt. Auf die Deckgläschen wurden HUVECs ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden mit Stimulantien bzw. Inhibitoren behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol 20 min fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur immunzytochemischen Färbung bei 4°C gelagert.

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst 5 min in Permeabilisierungspuffer permeabilisiert, anschließend 10 min in Blockierungspuffer 1 und danach 45 min in Blockierungspuffer 2 blockiert. Die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper erfolgte auf Parafilm in einer mit Alupapier umwickelten, lichtgeschützten Kammer. Als Primärantikörper wurde der VE-Cadherin Antikörper (Santa Cruz) 1:100 in Blockierungspuffer 2 verdünnt und 1 h inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus A594 (Molecular Probes, Oregon, USA) wurde 1:300 in Blockierungspuffer 2 verdünnt und 1 h inkubiert. Die Zellen wurden dreimal in PBS und einmal in bidest. Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit Eindeckmedium eingedeckt.

### 2.2.3.2 VE-Cadherin-ELISA

Zur Bestimmung des löslichen VE-Cadherins aus Zellkulturüberständen kam ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der Firma Bender MedSystems® (Wien, Österreich) zum Einsatz. Dazu wurde eine 96-Loch-Platte (Microlon, Greiner, Frickenhausen) mit 50 µl je Loch mit 2,5 µg/ml Beschichtungsantikörper in PBS über Nacht bei RT beschichtet.

Am folgenden Tag wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 200 µl ELISA-Waschpuffer pro Loch entfernt. Mit 200 µl ELISA-Blockierungspuffer je Loch wurden freie Bindungsstellen abgesättigt, um spätere unspezifische Bindungen zu vermeiden. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT auf einem Schüttelinkubator (KL-2). Nach 2 h Blockierung wurde der ELISA mit je 50 µl Standard bzw. Probe je Loch beladen. Der Standard wurde in einer absteigenden Verdünnungsreihe 1:2 von 10 ng/ml bis 0,16 ng/ml VE-Cadherin

eingesetzt. Als Verdünnungspuffer für Standard und Proben wurde dem Testsatz beigefügtes *Sample diluent* verwendet.

Neben dem Standard bzw. Proben wurde 50 µl Biotin-Konjugat je Loch hinzugefügt, welches wie angegeben 1:1000 in ELISA-Blockierungspuffer verdünnt wurde. Nach weiteren 2 h folgten drei Waschschrte mit je 200 µL ELISA-Waschpuffer je Loch. Anschließend wurden 100 µl je Loch mit einer Streptavidin POD Lösung beladen, welche zuvor 1:5000 in ELISA-Blockierungspuffer verdünnt wurde. Nach 1 h folgten wie oben beschrieben drei Waschschrte und anschließend wurden 80 µl Substratlösung (BM Blue POD Substrat, Roche) je Loch hinzugesetzt. Das Streptavidin-gekoppelte POD katalysiert die Umsetzung des Substrates zu einem blauen Farbstoff. Die Reaktion wurde nach 15 min mit 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Extinktion im 96-Loch-Mikrotiterplattenleser (SCT Rainbow, Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Referenzfilter von 690 nm gemessen.

#### 2.2.4 Statistische Analyse

Die Werte wurden ausgedrückt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert (SEM, *standard error of the mean*). Der Standardfehler der Werte zeigt die Varianzen zwischen den Mittelwerten der erhaltenen letzten 3 unabhängigen Experimente an.

Die Annahme für die Normalität (Kolmogorov-Smirnov Test) und gleiche Varianzen (Levene median Test) wurden verifiziert mit Sigma Stat 3.1 Software (SYSSTAT, Erkrath). Die Analyse der Varianzen wurde mit *one-way analysis of variance* (ANOVA) durchgeführt. Mehrfache Parameter statistischer Vergleiche zwischen experimentellen Gruppen gegen eine Kontrollgruppe wurden erreicht mit der Dunnett's Methode. Alle paarweisen mehrfachen Vergleichsprozeden wurden mit dem Tukey's Test durchgeführt. P Werte < 0,05 wurden klassifiziert als statistisch signifikant.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Analyse der Proteolyse von VE-Cadherin

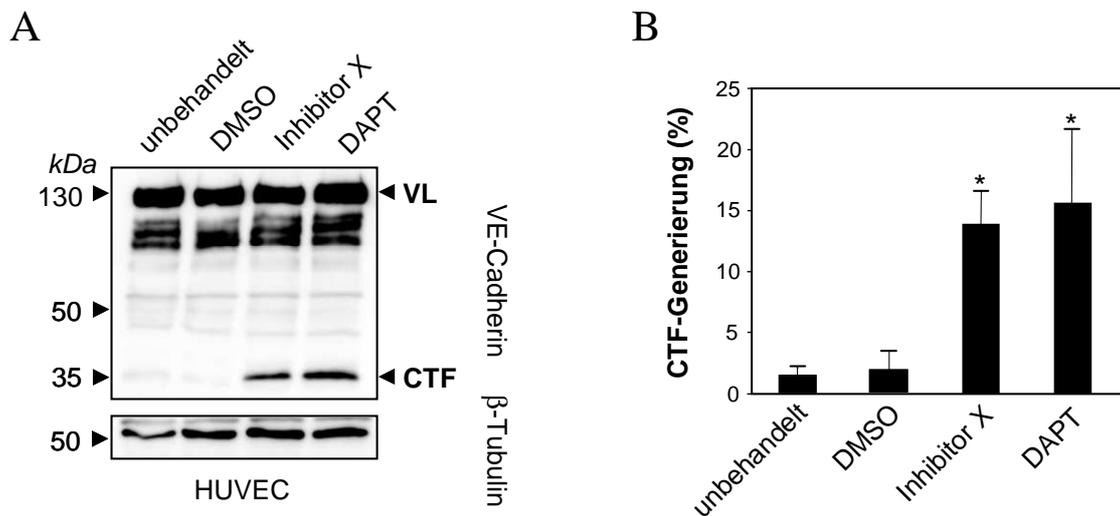
In dieser Arbeit sollte die Regulation und die funktionelle Bedeutung der Proteolyse von VE-Cadherin näher untersucht werden. Dabei stellte sich zu Beginn die Frage, welche Proteasen VE-Cadherin proteolytisch spalten. Herren *et al.*, konnten 1998 bereits zeigen, dass in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin durch eine noch unbekannte Metalloproteinase während der Apoptose freigesetzt wird (Herren *et al.*, 1998). So konnte in Zelllysaten apoptotischer Zellen mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne kein VE-Cadherin detektiert werden. In den Zellkulturüberständen von serumfrei-gehaltenen Zellen hingegen war eine Bande bei 90 kDa nachweisbar. Dies ist ein Indiz dafür, dass ein Teil der extrazellulären Domäne von VE-Cadherin während der Apoptose von der Zelloberfläche freigesetzt wird. In Anwesenheit des Metalloproteinase-Inhibitors TAPI konnte in den Zellkulturüberständen das 90 kDa große Fragment wiederum nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das VE-Cadherin *Shedding* während der Apoptose von HUVECs durch eine Metalloproteinase, ohne dass diese identifiziert worden ist, vermittelt wird.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit stellte die Identifizierung dieser unbekannt Protease dar. Da bei vielen Typ I transmembranen Proteinen eine weitere Proteolyse durch die  $\gamma$ -Sekretase die Analyse erschwert, sollte zunächst überprüft werden, ob auch VE-Cadherin Substrat für die  $\gamma$ -Sekretase ist.

#### 3.1.1 Einfluss von $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren auf die Prozessierung von VE-Cadherin

Für eine Reihe von Zelladhäsionsmolekülen konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex gespalten werden. Dies wurde unter anderem für E-Cadherin, N-Cadherin und L1 beschrieben (Maretzky *et al.*, 2005a, Reiss *et al.*, 2005, Maretzky *et al.*, 2005b). Um zu untersuchen, ob die  $\gamma$ -Sekretase VE-Cadherin proteolytisch spaltet, wurden HUVECs in Inhibitionsversuchen mit  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren behandelt. Als  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren wurden Inhibitor X [1  $\mu$ M] und DAPT [10  $\mu$ M] verwendet. Da sämtliche Inhibitoren in DMSO gelöst waren, dienten als Kontrollen HUVECs die mit DMSO behandelt oder unbehandelt belassen wurden. Nach einer 18 h-stündigen Inkubation mit Inhibitor X, DAPT oder DMSO wurden Zelllysate hergestellt, diese unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch im Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des VE-Cadherins erfolgte im *Western Blot* mit einem

C-terminalen Antikörper gegen VE-Cadherin. Damit ließen sich sowohl das 130 kDa große Volllängenprotein als auch ein C-terminales Fragment darstellen. Um zu zeigen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde die Membran nach der Detektion von VE-Cadherin, mit  $\beta$ -Tubulin inkubiert. Dazu wurde die PVDF-Membran zuvor gestrippt, wobei Primer- und Sekundärantikörper von der Membran gewaschen werden.



**Abb. 3.1: Einfluss von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren auf die Prozessierung von VE-Cadherin**

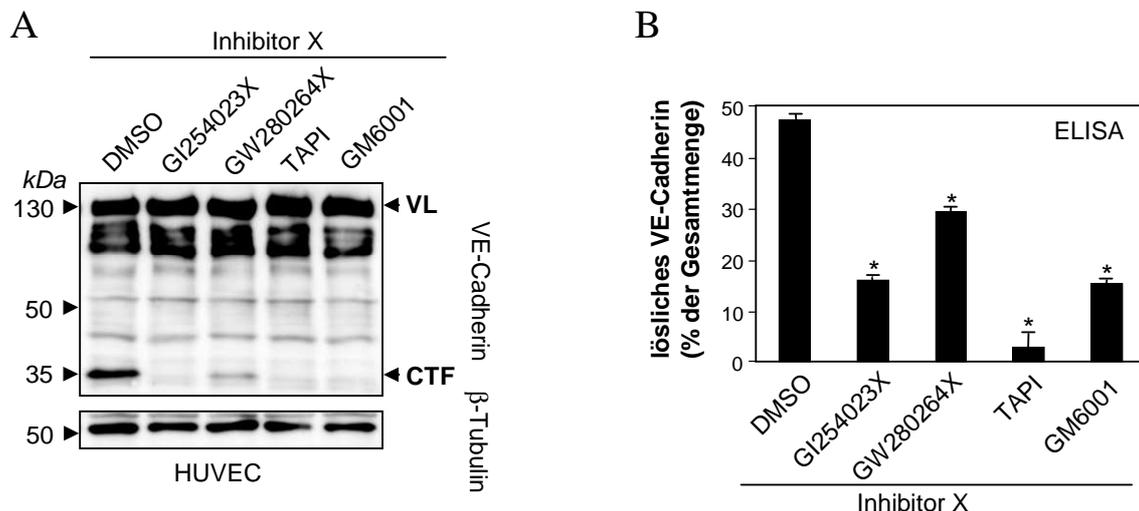
(A) HUVECs wurden mit DMSO,  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor Inhibitor X [1  $\mu$ M] und DAPT [10  $\mu$ M] für 18 h behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der Ernte wurden die Zelllysate elektrophoretisch im 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper auf der Membran erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Detektion der gebundenen Antikörper wurde mit dem *Phosphoimager* LAS-3000 durchgeführt. Die Membran wurde anschließend gestrippt und mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert, um Varianzen in der Proteinkonzentration der Proben auszuschließen. (B) Die CTF (C-terminales Fragment)-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von CTF und der Summe aus Volllängenprotein (VL) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $P < 0,05$  vs DMSO behandelte Zellen. (n=3)

Der in Abbildung 3.1 A dargestellte *Western Blot* zeigt, dass in den Zelllysaten bei denen die Zellen mit den  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren Inhibitor X und DAPT behandelt wurden, neben dem 130 kDa großen Volllängenprotein eine weitere Proteinbande bei 35 kDa auftritt. Hierbei handelt es sich um ein durch *Shedding* entstandenes C-terminales Fragment (CTF). Die densitometrische Auswertung (Abb. 3.1 B) des *Western Blots* zeigt die CTF-Generierung. Neben dem 130 kDa großen Volllängenprotein sind zusätzlich Banden bei 100 kDa sichtbar. Hierbei handelt es sich möglicherweise um unterschiedliche Glykosylierungsformen von VE-Cadherin. Die Zunahme der Menge an C-terminalen Fragment durch Verwendung der  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren zeigt, dass das Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex gespalten wird. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, welche Metalloproteinase das *Shedding* von VE-Cadherin vermittelt.

### 3.1.2 Die VE-Cadherin Proteolyse wird durch Metalloproteinase-Inhibitoren reduziert

ADAM10 und ADAM17 stellen bedeutsame Metalloproteinasen dar, die in der proteolytischen Ektodomänenspaltung verschiedener Substrate, unter anderem des Amyloiden Vorläuferproteins (APP) und des Prion Proteins (PrP), involviert sind (Hartmann *et al.*, 2002, Vincent *et al.*, 2001). Für die Untersuchung des Einflusses von Metalloproteinasen auf die Proteolyse von Substraten werden Hydroxamat-basierte Inhibitoren verwendet. Diese Inhibitoren binden direkt an das Zinkion im aktiven Zentrum der Metalloproteinasen und setzen dadurch deren Aktivität herab.

Der Hydroxamat-basierte Inhibitor GI254023X inhibiert ADAM10 mit einer 100-fach höheren Präferenz gegenüber ADAM10 als gegenüber ADAM17 (Ludwig *et al.*, 2005). GW280264X ist ein ADAM17-Inhibitor, der in einem geringeren Maße auch ADAM10 hemmt. Um Anhaltspunkte zu gewinnen, welche Metalloproteinase an der Proteolyse von VE-Cadherin beteiligt ist, wurden HUVECs mit GI254023X [10  $\mu$ M], GW280264X [10  $\mu$ M] und den Breitbandmetalloproteinase-Inhibitoren TAPI [20  $\mu$ M] und GM6001 [10  $\mu$ M] für 18 h behandelt. Da die Metalloproteinase-Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurden als Kontrolle HUVECs mit DMSO behandelt. Um die weitere Prozessierung des C-terminalen Fragments zu unterbinden, wurde der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor Inhibitor X [1  $\mu$ M] simultan während der Inkubation mit den Metalloproteinase-Inhibitoren eingesetzt.



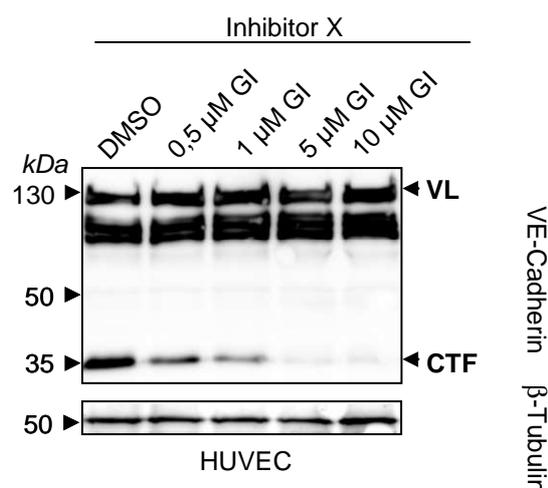
**Abb. 3.2: Einfluss verschiedener Metalloproteinase-Inhibitoren auf die Proteolyse von VE-Cadherin**

(A) HUVECs wurden mit DMSO, GI254023X [10  $\mu$ M], GW280264X [10  $\mu$ M], TAPI [20  $\mu$ M] bzw. GM6001 [10  $\mu$ M] für 18 h behandelt. Zusätzlich wurden alle Proben mit Inhibitor X [1  $\mu$ M] zeitgleich behandelt. Die Zellysate wurden elektrophoretisch im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit einem  $\beta$ -Tubulin Antikörper inkubiert. (B) Zusätzlich wurden die Zellkulturüberstände des Inhibitionsversuches nach 18 h abgenommen und die Konzentration des löslichen VE-Cadherins im ELISA quantifiziert. Die ELISA-Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $P < 0,05$  vs DMSO behandelte Zellen. (n=3)

Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und hinsichtlich ihrer Spaltfragmente durch Inkubation mit dem VE-Cadherin-Antikörper untersucht. Zusätzlich wurde die Konzentration von löslichem VE-Cadherin in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen.

Der *Western Blot* in Abbildung 3.2 A zeigt, dass mit allen Metalloproteinase-Inhibitoren eine verminderte Generierung des 35 kDa großen C-terminalen Fragments erreichbar war. Das Spaltfragment konnte mit dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X im Vergleich zu den anderen Metalloproteinase-Inhibitoren nicht vollständig in seiner Entstehung reduziert werden. TAPI und GM6001 erreichten hingegen eine ähnliche Reduktion des CTFs, wie der ADAM10-Inhibitor GI254023X. Ähnliche Ergebnisse konnten im ELISA gemessen werden (Abb. 3.2 B). Hierbei war eine Abnahme des löslichen VE-Cadherins in Anwesenheit aller Metalloproteinase-Inhibitoren zu beobachten. In den Zellkulturüberständen konnte mit TAPI die stärkste Reduktion des VE-Cadherin *Sheddings* im Vergleich zur DMSO Kontrolle mit 45 % erzielt werden, GI254023X und GM6001 zeigen hingegen eine Abnahme des *Sheddings* um 30 %, GW280264X eine Abnahme der Proteolyse um 20 %. Der unterschiedliche Wirkungsgrad des ADAM10- und des ADAM10/ADAM17-Inhibitors zeigt sowohl im *Western Blot* als auch im ELISA, dass ADAM10 vermutlich die Protease darstellt, die die VE-Cadherin Proteolyse vermittelt.

Da der ADAM10-Inhibitor GI254023X als entscheidender Inhibitor für die VE-Cadherin Proteolyse ausgemacht werden konnte, wurde im nachfolgenden Experiment eine Konzentrationsreihe dieses Inhibitors durchgeführt.



**Abb. 3.3: Konzentrationsreihe des ADAM10-Inhibitors GI254023X und Einfluss auf die Bildung des C-terminalen Fragments**

HUVECs wurden für die Dauer von 18 h mit DMSO und vier verschiedenen Konzentrationen des ADAM10-Inhibitors GI254023X [0,5; 1; 5; 10 μM] unter Zusatz des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1 μM] behandelt. Die Zellysate wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und diese mit Antikörper gegen den VE-Cadherin C-Terminus analysiert. Der *Western Blot* wurde nachfolgend mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert.

HUVECs wurden hierbei mit vier verschiedenen Konzentrationen des ADAM10-Inhibitors GI254023X in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1  $\mu$ M] für 18 h behandelt. Als Kontrolle wurden HUVECs mit DMSO unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zelllysate wurden im *Western Blot* analysiert.

Der in Abbildung 3.3 dargestellte *Western Blot* zeigt mit zunehmender Konzentration des ADAM10-Inhibitors GI254023X eine Abnahme des 35 kDa C-terminalen Fragments. Mit 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M GI254023X ist eine vollständige Reduktion des Fragments sichtbar. Der  $\beta$ -Tubulin Blot zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden.

### **3.2 Bedeutung der Metalloproteinase ADAM10 bei der Spaltung von VE-Cadherin**

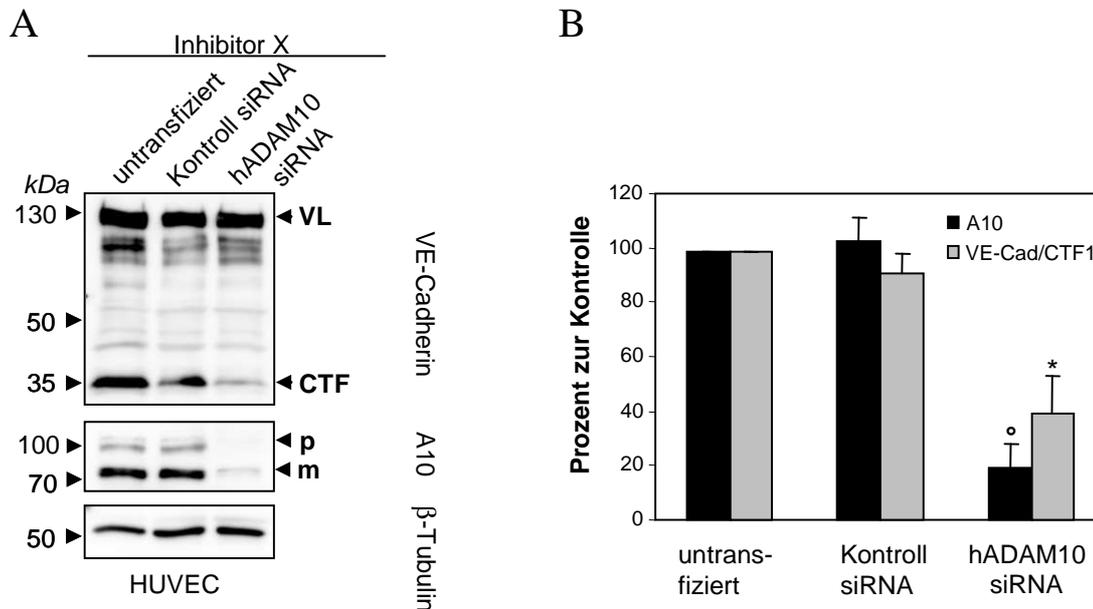
In den vorherigen Versuchen konnte eine vollständige Reduktion der VE-Cadherin Proteolyse mit dem spezifischen ADAM10-Inhibitor erreicht werden. Daher galt es nun, eingehender zu prüfen, ob ADAM10 die entscheidene Metalloproteinase bei der Spaltung von VE-Cadherin darstellt. Dies sollte sowohl mittels RNA-Interferenz Experimenten als auch mittels VE-Cadherin *in vitro*-Spaltversuchen näher untersucht werden. Für die Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und E-Cadherin konnte ADAM10 bereits als entscheidende Metalloproteinase ausgemacht werden (Reiss *et al.*, 2005, Maretzky *et al.*, 2005a).

#### **3.2.1 Reduktion des konstitutiven VE-Cadherin *Sheddings* durch ADAM10 siRNA**

Um den Hinweis auf einen Einfluss von ADAM10 abzusichern, wurden im Folgenden RNA-Interferenz Experimente durchgeführt. Hierbei wurden HUVECs transient mit humaner ADAM10 siRNA und als Kontrolle mit unspezifischer siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. 18 h vor der Ernte der Zellen, wurden diese mit Inhibitor X [1  $\mu$ M] behandelt, um eine weitere Prozessierung von VE-Cadherin durch die  $\gamma$ -Sekretase zu verhindern. Die Analyse der Zelllysate erfolgte mittels eines *Western Blots*. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen VE-Cadherin zur Analyse der VE-Cadherin Proteolyse und nachfolgend mit einem Antikörper gegen ADAM10 zur Überprüfung der Transfektionseffizienz gefärbt. Zusätzlich wurde die Membran mit einem  $\beta$ -Tubulin Antikörper, zur Darstellung der aufgetragenen Proteinmenge, inkubiert.

Der *Western Blot* wurde densitometrisch ausgewertet. Dabei wurde die ADAM10 Expression sowie die VE-Cadherin Proteolyse prozentual dargestellt. Die ADAM10 Expression wurde aus der Summe von Proform (p) und maturer Form (m) berechnet. Die Menge aus der Proform und

maturen Form untransfizierter HUVECs wurde dabei 100 % gesetzt. Die VE-Cadherin Proteolyse wurde aus dem Quotienten von C-terminalen Fragment (CTF) und der Summe aus dem Volllängenprotein (VL) und CTF bestimmt. Die so ermittelte CTF-Generierung wurde für die untransfizierten HUVECs 100 % gesetzt.



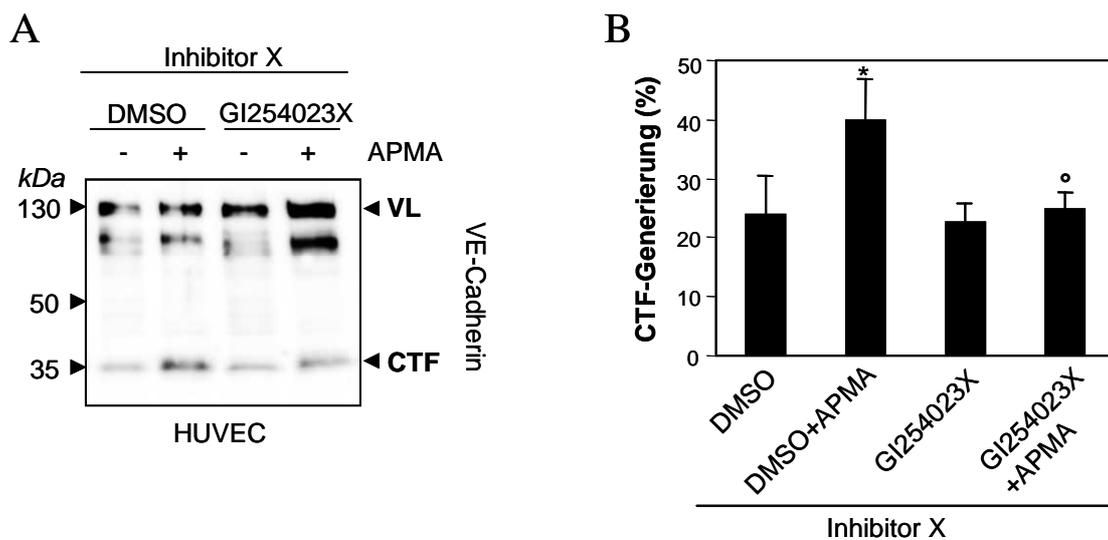
**Abb. 3.4: Einfluss der ADAM10 siRNA auf die Proteolyse von VE-Cadherin**

(A) HUVECs wurden transient mit Kontroll siRNA bzw. ADAM10 siRNA transfiziert. Die Zellen wurden für 48 h transfiziert und anschließend geerntet. 18 h vor der Zellernte wurden die Zellen mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor Inhibitor X [1  $\mu$ M] behandelt. Die Zellysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem VE-Cadherin Antikörper analysiert. Zur Überprüfung der ADAM10 Expression und des Proteingehaltes in den Zellysaten wurde die Membran anschließend mit einem gegen ADAM10 bzw.  $\beta$ -Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert. (B) Die ADAM10 Expression und die VE-Cadherin Proteolyse wurden densitometrisch bestimmt und graphisch dargestellt.  $^{*}P < 0,05$  ADAM10 siRNA vs Kontroll siRNA behandelte Zellen. (p: Proform von ADAM10, m: mature Form von ADAM10, A10: ADAM10)

Im *Western Blot* (Abb. 3.4 A) zeigt das RNA-Interferenz Experiment, dass die Herunterregulierung von ADAM10 mittels spezifischer ADAM10 siRNA gleichzeitig mit einer Abnahme des C-terminalen Fragments von VE-Cadherin einhergeht. Die mit  $\beta$ -Tubulin Antikörper inkubierte Membran zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die densitometrische Auswertung (Abb. 3.4 B) zeigt, dass die Transfektion der HUVECs mit ADAM10 siRNA zu einer Reduktion der ADAM10 Expression um 80 % führt. Parallel nimmt die VE-Cadherin Proteolyse um 60 % ab. Die Expression von ADAM10 korreliert gleichzeitig mit der Proteolyse von VE-Cadherin.

### 3.2.2 Die VE-Cadherin Proteolyse ist ADAM10-abhängig

Metalloproteinasen können in ihrer Aktivität durch verschiedene Faktoren reguliert werden. Einer dieser Faktoren ist das APMA (4-Aminophenyl-Quecksilberacetat), eine organische Quecksilberverbindung, die Sulfhydrylgruppen oxidiert und in der Lage ist, sowohl MMPs als auch ADAMs in ihrer Funktion zu aktivieren (Merlos-Suarez *et al.*, 2001). Dabei wandelt APMA das latente Zymogen, unter Freilegung des aktiven Zentrums, in das aktive Enzym um. Im folgenden Versuch galt es zu klären, ob eine Aktivierung der Metalloproteinasen unter gleichzeitiger Hemmung von ADAM10 eine Spaltung von VE-Cadherin zur Folge hat. Hierzu wurden HUVECs zunächst 30 min mit DMSO und dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] vorinkubiert und nachfolgend mit dem Metalloproteinase-Aktivator APMA [100  $\mu$ M] für 30 min behandelt. Die HUVECs wurden in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1  $\mu$ M] inkubiert. Die Zelllysate wurden im *Western Blot* mit einem Antikörper gegen VE-Cadherin inkubiert.



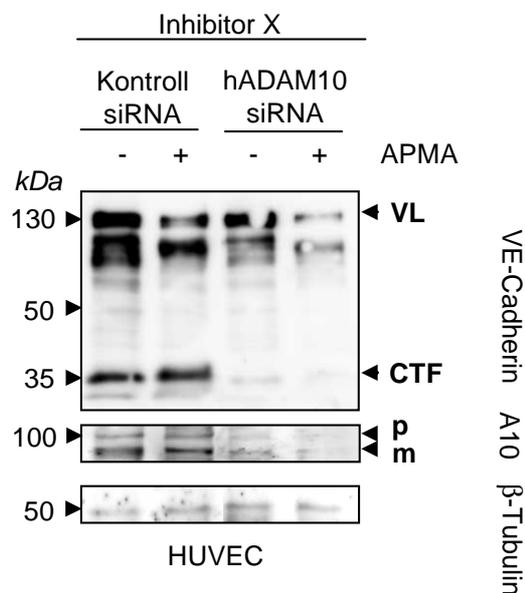
**Abb. 3.5: Einfluss des Metalloproteinase-Aktivators APMA auf die Proteolyse von VE-Cadherin**

(A) HUVECs wurden mit DMSO und GI254023X [10  $\mu$ M] 30 min vorinkubiert und mit APMA [100  $\mu$ M] für weitere 30 min behandelt. Die Zellen wurden in Gegenwart des Inhibitors X [1  $\mu$ M] inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im *Western Blot* mit einem VE-Cadherin Antikörper untersucht. (B) Die CTF (C-terminales Fragment)-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von CTF und der Summe aus Volllängenprotein (VL) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $P < 0,05$  DMSO + APMA vs DMSO, <sup>o</sup> $P < 0,05$  GI + APMA vs DMSO + APMA behandelte Zellen. (n=3)

Die Behandlung der Zellen mit APMA verstärkt signifikant die VE-Cadherin Proteolyse. Dies ist im Vergleich von DMSO behandelten Zellen mit den DMSO und APMA behandelten Zellen zu beobachten. In Anwesenheit des ADAM10-Inhibitors GI254023X hat APMA keinen Einfluss auf die CTF-Generierung von VE-Cadherin (Abb. 3.5 A). Die densitometrische

Auswertung ergab, dass DMSO und APMA stimulierte Zellen das VE-Cadherin *Shedding* im Vergleich zu ausschließlich DMSO behandelten Zellen um 15 % steigern. Dieser Effekt wird durch Zugabe von GI254023X vollständig aufgehoben (Abb. 3.5 B). Das Ergebnis, dass die Behandlung mit APMA die VE-Cadherin Proteolyse erhöht, allerdings nur in Gegenwart eines funktionell aktiven ADAM10, läßt die Schlussfolgerung zu, dass ADAM10 direkt für das VE-Cadherin *Shedding* zuständig ist.

In einem weiteren Experiment sollte dieses Ergebnis verifiziert werden. Dazu wurden HUVECs transient für 48 h mit ADAM10 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 30 min mit APMA [100 µM] oder ohne APMA in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1 µM]. Die Zelllysate wurden im *Western Blot* mit Antikörpern gegen VE-Cadherin, ADAM10 und  $\beta$ -Tubulin untersucht.



**Abb. 3.6: Einfluss von ADAM10 siRNA in Gegenwart von APMA auf das *Shedding* von VE-Cadherin**

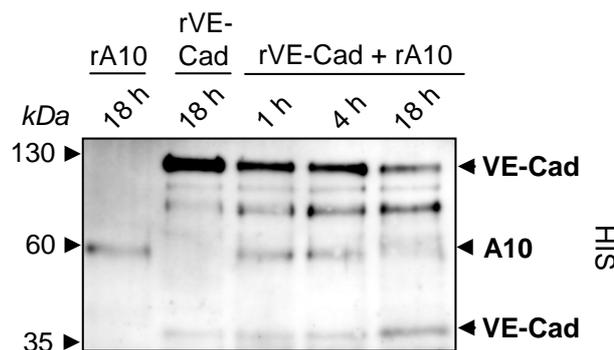
HUVECs wurden transient mit Kontroll siRNA bzw. ADAM10 siRNA in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1 µM] transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit APMA [100 µM] für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und gelelektrophoretisch in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der *Western Blot* wurde mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper inkubiert. Um sicherzustellen, dass die ADAM10 siRNA Transfektion erfolgreich war bzw. dass gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden, wurde die Membran nachfolgend mit einem gegen ADAM10 bzw. gegen  $\beta$ -Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert (p: Proform von ADAM10, m: mature Form von ADAM10).

Die Transfektion mit ADAM10 siRNA ohne als auch in Gegenwart von APMA inhibiert die CTF-Bildung und damit die VE-Cadherin Proteolyse (Abb. 3.6). Der ADAM10 gefärbte *Western Blot*, zeigt dass die Transfektion mit ADAM10 siRNA effektiv die ADAM10 Expression herunterregulierte. Die mit Kontroll siRNA behandelten HUVECs zeigen, dass

APMA zu einer Zunahme des CTFs führt und somit in der Lage ist, das *Shedding* von VE-Cadherin ADAM10-abhängig zu stimulieren.

### 3.2.3 VE-Cadherin wird direkt durch ADAM10 proteolytisch gespalten

In einem *in vitro*-Spaltungsversuch sollte nun der Nachweis geführt werden, ob VE-Cadherin direkt durch ADAM10 gespalten wird. Diese Aussage sollte in einem zellfreien System untersucht werden. Dazu wurde humanes rekombinantes VE-Cadherin [500 ng] mit humanem rekombinanten ADAM10 [500 ng] für verschiedene Zeitintervalle (1, 4 und 18 h) bei 37°C inkubiert und nachfolgend sofort mit SDS-Probenpuffer versetzt. Als Kontrolle wurden rekombinantes ADAM10 und rekombinantes VE-Cadherin einzeln für 18 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden bei 95°C für 10 min erhitzt und im *Western Blot* analysiert. Da sowohl das rekombinante VE-Cadherin als auch das rekombinante ADAM10 mit einem His-Tag versehen sind, wurden beide Proteine mit einem Anti-His Antikörper im *Western Blot* nachgewiesen.



**Abb. 3.7: *In vitro*-Spaltungsversuch von rekombinantischem VE-Cadherin und rekombinantischem ADAM10**

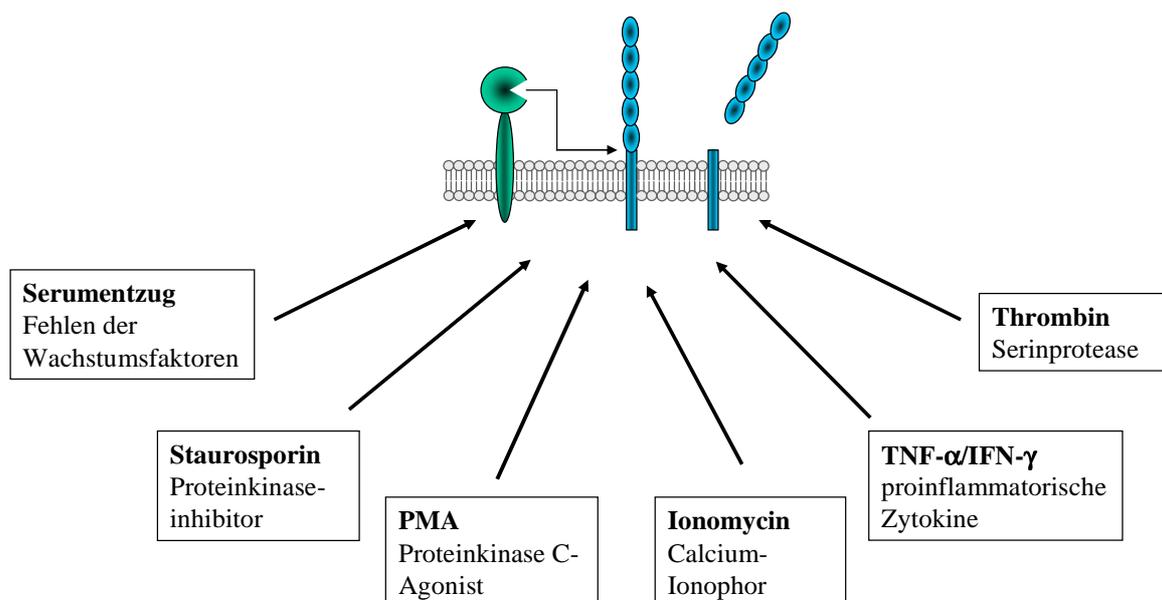
Rekombinantisches VE-Cadherin [500 ng] wurde mit rekombinantischem ADAM10 [500 ng] in ADAM10-Reaktionspuffer für 1, 4 und 18 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Reaktionsansätze separat mit rekombinantischem VE-Cadherin [500 ng] und rekombinantischem ADAM10 [500 ng] angesetzt, die ebenfalls 18 h bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktionsansätze wurden mit Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C erhitzt, elektrophoretisch im 12,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die *Western Blot* Analyse erfolgte mit einem anti-His Antikörper, mit dem sowohl das rekombinante VE-Cadherin als auch das rekombinante ADAM10 nachgewiesen werden konnte. (A10: ADAM10, VE-Cad: VE-Cadherin)

Die Analyse des *in vitro*-Spaltungsversuches in Abbildung 3.7 zeigt, dass mit zunehmender Reaktionszeit eine Abnahme des 130 kDa großen VE-Cadherin Protein sichtbar ist. Gleichzeitig nimmt mit der Reaktionszeit die Bildung des Spaltfragments von VE-Cadherin zu. Der Nachweis von ADAM10 im *Western Blot* zeigt den Einsatz des rekombinanten ADAM10. Rekombinantisches VE-Cadherin wird *in vitro* durch rekombinantisches ADAM10 gespalten.

### 3.3 Regulation des VE-Cadherin *Sheddings*

Im weiteren Verlauf der Arbeit galt es zu klären, durch welche Faktoren das *Shedding* von VE-Cadherin induziert werden kann. Um das induzierte *Shedding* zu untersuchen, wurden eine Reihe verschiedener Stimulantien getestet, die in Abbildung 3.8 aufgeführt sind.

Um den Einfluss von Apoptose auf das *Shedding* von VE-Cadherin zu prüfen, wurde den Zellen entweder Serum entzogen oder es wurde der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin eingesetzt (Tamaoki *et al.*, 1986). Weiterhin sollten die Stimulantien PMA und Ionomycin eingesetzt und auf deren Einfluss auf das VE-Cadherin *Shedding* hin untersucht werden (Whitefield *et al.*, 1973, Liu und Hermann, 1978). Zudem sollte TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  und Thrombin getestet werden, da sie einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin nehmen und damit einen Effekt auf die Permeabilität des Endothels ausüben (Angelini *et al.*, 2006, Rabiet *et al.*, 1996).



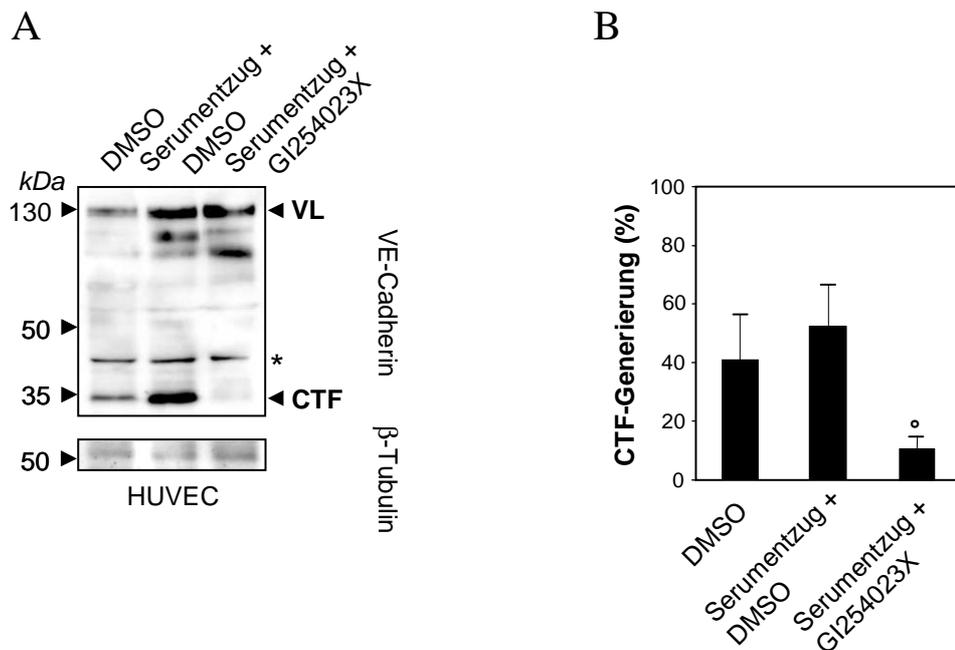
**Abb. 3.8:** Übersicht der verwendeten Stimulantien zur Untersuchung des induzierten VE-Cadherin *Sheddings*

Für die Untersuchung des induzierten VE-Cadherin *Sheddings* wurde Serum entzogen und die Stimulantien Staurosporin, PMA, Ionomycin, TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  und Thrombin eingesetzt.

#### 3.3.1 Serumfreies Medium hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Spaltung von VE-Cadherin

Zunächst sollte der Einfluss von serumfreiem Medium auf die Prozessierung von VE-Cadherin untersucht werden. Herren *et al.* beschrieben bereits, dass der Entzug von Wachstumsfaktoren bei HUVECs zum *Shedding* von VE-Cadherin führt. Zudem zeigten sie, dass dieser Vorgang Metalloproteinase-abhängig ist (Herren *et al.*, 1998).

In diesem Versuch wurden daher HUVECs für 16 h in serumfreiem Medium aufbewahrt. Die Zellen wurden zusätzlich in Gegenwart von DMSO bzw. dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] inkubiert, um zu überprüfen, ob durch Inhibition der Metalloproteinase ADAM10 der Effekt von serumfreiem Medium auf die Zellen wieder aufgehoben werden kann. Die Zellen wurden nach der Inkubation lysiert und die CTF-Generierung von VE-Cadherin im *Western Blot* analysiert.



**Abb. 3.9: Einfluss von serumfreiem Medium auf das *Shedding* von VE-Cadherin**

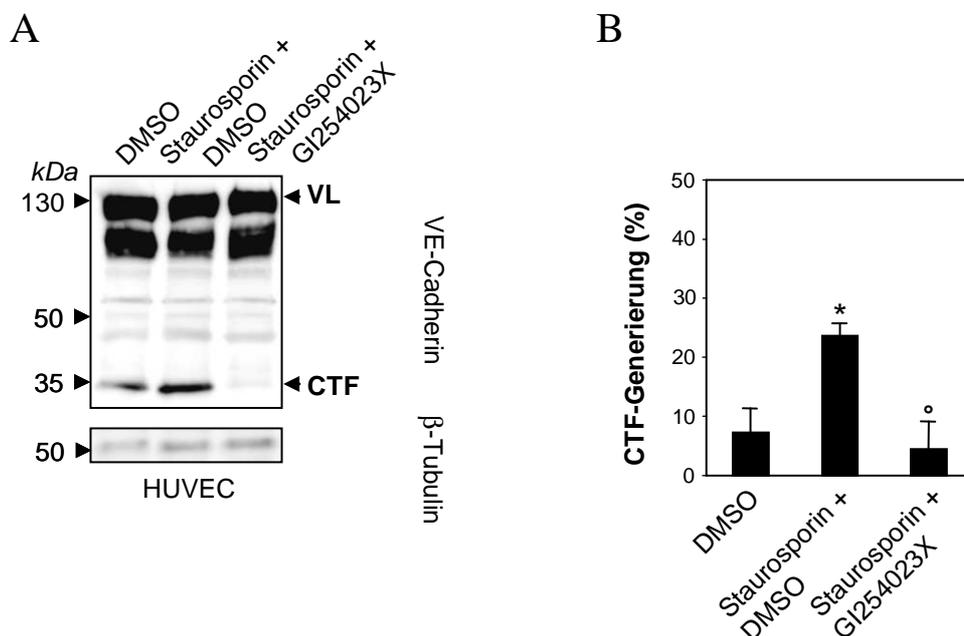
(A) HUVECs wurden 16 h in serumfreiem Medium mit DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] behandelt. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt und diese im *Western Blot* mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper analysiert. Die Membran wurde anschließend mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert, um Varianzen in der Proteinkonzentration der Proben auszuschließen. (B) Die CTF-Generierung wurde anhand der densitometrischen Bestimmung aus Volllängenprotein (VL) und CTF aus drei verschiedenen *Western Blots* ermittelt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $^{\circ}P < 0,05$  vs Serumentzug + DMSO behandelte Zellen. (n=3) (\* unspezifische Bande)

Im Versuch konnte gezeigt werden, dass Serumentzug zu einer verstärkten VE-Cadherin Expression führt. Das Volllängenprotein (VL) von VE-Cadherin und das CTF nehmen in ihrer Entstehung im Vergleich zur Kontrolle (DMSO behandelte Zellen) deutlich zu. In Gegenwart des ADAM10-Inhibitors GI254023X konnte eine vollständige Reduktion des C-terminalen Fragments erreicht werden (Abb. 3.9 A). Die densitometrische Auswertung belegt, dass der Entzug von Serum nicht zu einer signifikant gesteigerten Proteolyse von VE-Cadherin führt. Die gleichzeitige Inhibition der Metalloproteinase ADAM10 führt zu einer 40 %igen Reduktion der VE-Cadherin Proteolyse, die auf das konstitutive *Shedding* von VE-Cadherin zurückzuführen ist (Abb. 3.9 B).

### 3.3.2 Staurosporin stimuliert das *Shedding* von VE-Cadherin

Da im vorherigen Versuch kein signifikanter Einfluss des Serumentzugs auf die Prozessierung von VE-Cadherin gezeigt werden konnte, galt es die Frage nach dem Einfluss der Apoptose von einer zweiten Seite her zu beleuchten. Dazu wurde Staurosporin, ein effektiver Proteinkinase-Inhibitor der zur Apoptose der Zellen führt, eingesetzt.

Im folgenden Versuch wurden HUVECs mit Staurosporin [1  $\mu$ M] 6 h in Gegenwart von DMSO bzw. dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] behandelt. Die Zellysate wurden im *Western Blot* hinsichtlich der CTF-Generierung von VE-Cadherin untersucht. Der *Western Blot* wurde densitometrisch ausgewertet.

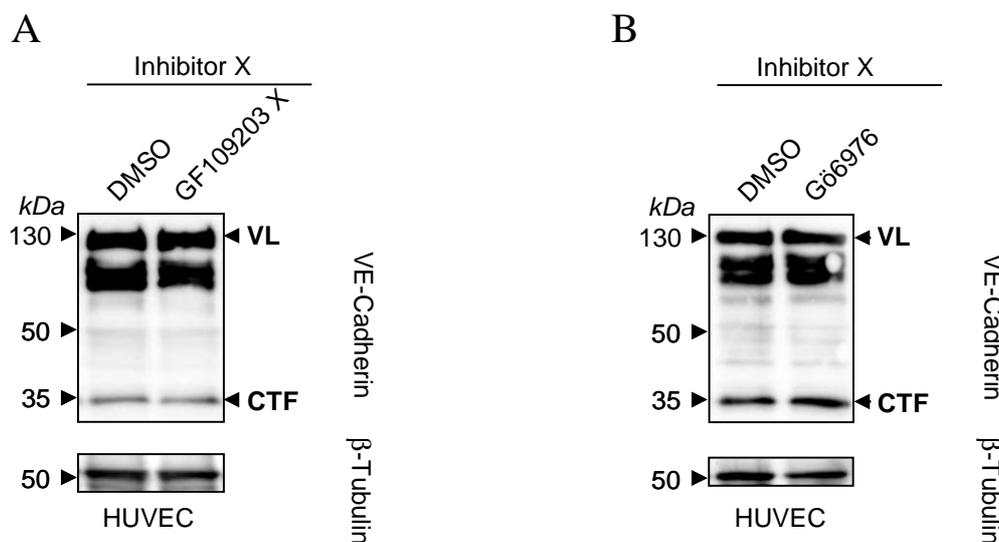


#### Abb. 3.10: Einfluss von Staurosporin auf das *Shedding* von VE-Cadherin

(A) HUVECs wurden mit Staurosporin [1  $\mu$ M] in Gegenwart von DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] für 6 h inkubiert. Die Zellysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und der *Western Blot* mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper inkubiert. Die Membran wurde nachfolgend mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin analysiert. (B) Die CTF-Generierung wurde densitometrisch durch Bildung des Quotienten aus CTF (C-terminalen Fragment) und der Summe aus Volllängenprotein (VL) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  vs DMSO behandelte Zellen, °  $P < 0,05$  vs Staurosporin + DMSO behandelte Zellen. (n=3)

Abbildung 3.10 zeigt, dass der Einsatz von Staurosporin zu einer signifikanten Zunahme des C-terminalen Fragments von VE-Cadherin führt. Staurosporin ist somit in der Lage das *Shedding* von VE-Cadherin zu induzieren. Die durch Staurosporin ausgelöste VE-Cadherin Proteolyse konnte in Anwesenheit des ADAM10-Inhibitors GI254023X vollständig reduziert werden. Die densitometrische Auswertung zeigt, dass unter Staurosporin-Einfluss eine 20 %ige Zunahme des CTFs erfolgt ist.

Um festzustellen, ob der Effekt von Staurosporin auf die VE-Cadherin Proteolyse auf der Wirkung von Staurosporin als Proteinkinase-Inhibitor oder Induktor der Apoptose beruht, wurden nachfolgend zwei verschiedenen Proteinkinase C (PKC)-Inhibitoren auf die CTF-Bildung hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die PKC-Inhibitoren GF109203X und Gö6976 eingesetzt (Toullec *et al.*, 1991, Martiny-Baron *et al.*, 1993). Hierzu wurden HUVECs mit GF109203X [5  $\mu$ M] und Gö6976 [1  $\mu$ M] für jeweils 18 h in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1  $\mu$ M] behandelt. Die Zellen wurden lysiert und nachfolgend im *Western Blot* untersucht.



#### Abb. 3.11: Einfluss von PKC-Inhibitoren auf die Spaltung von VE-Cadherin

HUVECs wurden mit den PKC-Inhibitoren GF109203X [5 $\mu$ M] (A) und Gö6976 [1  $\mu$ M] (B) in Anwesenheit des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1  $\mu$ M] für 18 h behandelt. Als Kontrollen dienten DMSO behandelte Zellen. Nach der Inkubationszeit wurden Zelllysate hergestellt, diese elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* analysiert. Zur Überprüfung des Proteingehaltes wurde die Membran anschließend mit einem gegen  $\beta$ -Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert.

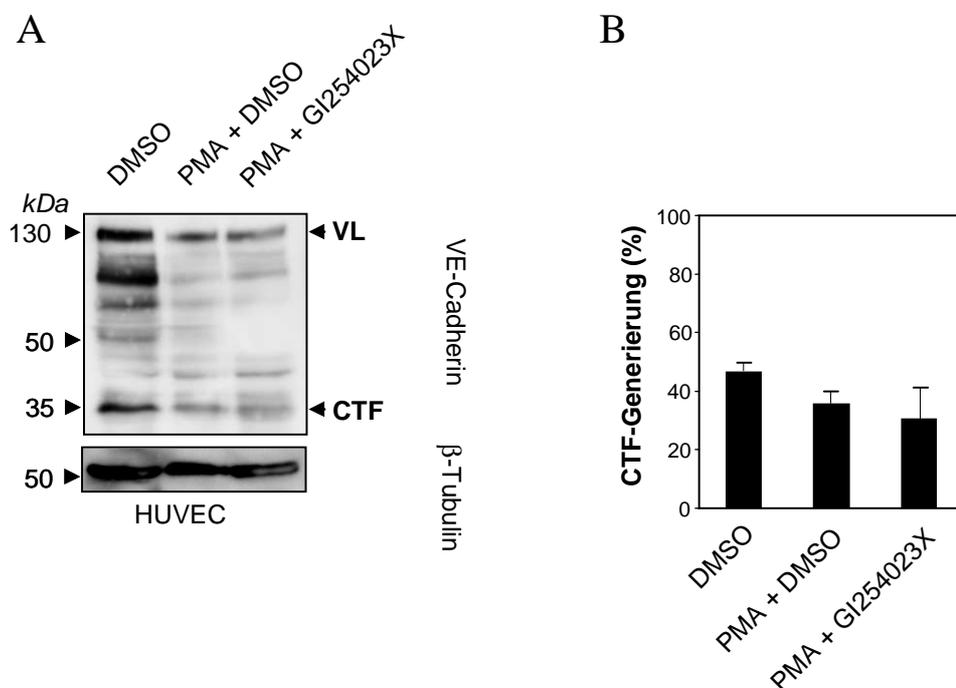
Wie in Abbildung 3.11 ersichtlich, konnte mit beiden PKC-Inhibitoren GF109203X und Gö6976 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kein Effekt auf die Bildung des C-terminalen Fragments beobachtet werden. Demnach ist der Einfluss, der mit Staurosporin erhalten wurde, eher der Apoptose als der Proteinkinase C-Inhibition zuzuschreiben.

#### 3.3.3 PMA beeinflusst die proteolytische Spaltung von VE-Cadherin nicht

Im nachfolgenden Versuch sollte der Proteinkinase C-Agonist Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) auf die Stimulierbarkeit des VE-Cadherin *Sheddings* hin untersucht werden. PMA ist in der Lage das *Shedding* einer ganzen Reihe transmembranener Proteinen zu induzieren,

darunter auch E-Cadherin und N-Cadherin (Maretzky *et al.* 2005a, Reiss *et al.* 2005). Dies galt es, auch für das Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin aufzuklären.

HUVECs wurden dazu mit PMA [200 ng/ml] für 2 h in Gegenwart von DMSO oder des ADAM10-Inhibitors GI254023X behandelt und anschließend im *Western Blot* untersucht.



**Abb. 3.12: Einfluss von PMA auf das *Shedding* von VE-Cadherin**

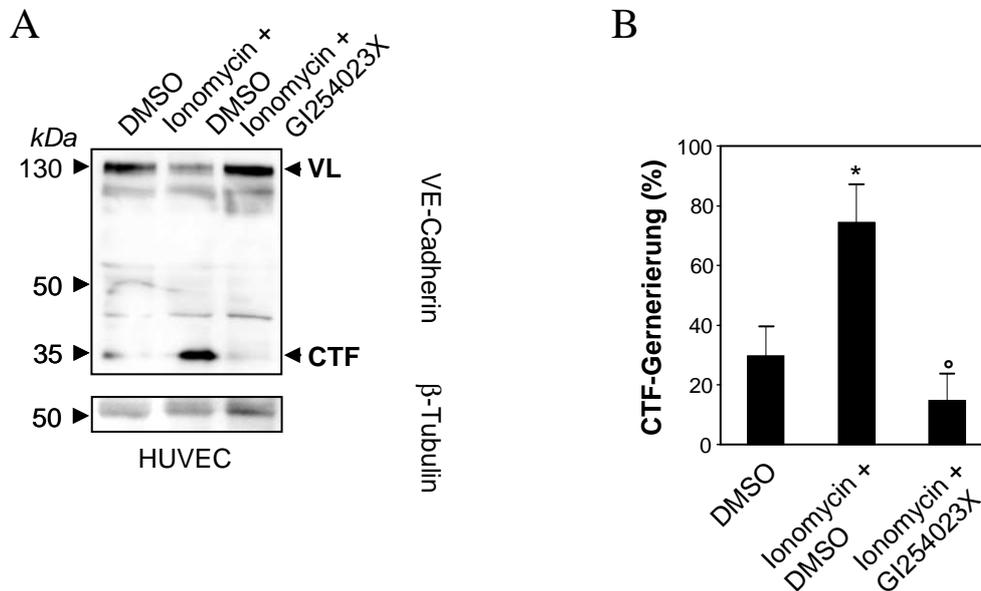
(A) HUVECs wurden mit PMA [200 ng/ml] in Gegenwart von DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] behandelt. Nach 2 h wurden die Zellen lysiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Der *Western Blot* wurde mit dem VE-Cadherin Antikörper analysiert. Um sicherzustellen, dass die Zelllysate gleiche Proteinkonzentrationen aufweisen, wurde die Membran nachfolgend mit einem gegen  $\beta$ -Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert. (B) Die CTF-Generierung wurde densitometrisch durch Bildung des Quotienten aus CTF (C-terminalen Fragment) und der Summe aus VL (Volllängenprotein) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. (n=3)

Der *Western Blot* in Abbildung 3.12 zeigt, dass die Stimulation mit PMA keine Zunahme des C-terminalen Fragments von VE-Cadherin zur Folge hat. So ist auch in der densitometrischen Auswertung eine gleichbleibende CTF-Generierung bei DMSO, PMA und DMSO sowie PMA und GI254023X behandelten Zellen zu beobachten.

### 3.3.4 Calcium-Einstrom durch Ionomycin induziert die ADAM10-vermittelte VE-Cadherin Proteolyse

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss von Ionomycin auf die proteolytische Prozessierung von VE-Cadherin untersucht werden. Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor und bewirkt den Einstrom von Calciumionen in die Zelle, was zu einer erhöhten intrazellulären Calcium-

konzentration führt (Kauffman *et al.*,1980). Für den Versuch wurden die HUVECs unter Einwirkung von Ionomycin [10  $\mu$ M] für 30 min in Gegenwart von DMSO und dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] behandelt und anschließend im *Western Blot* untersucht.

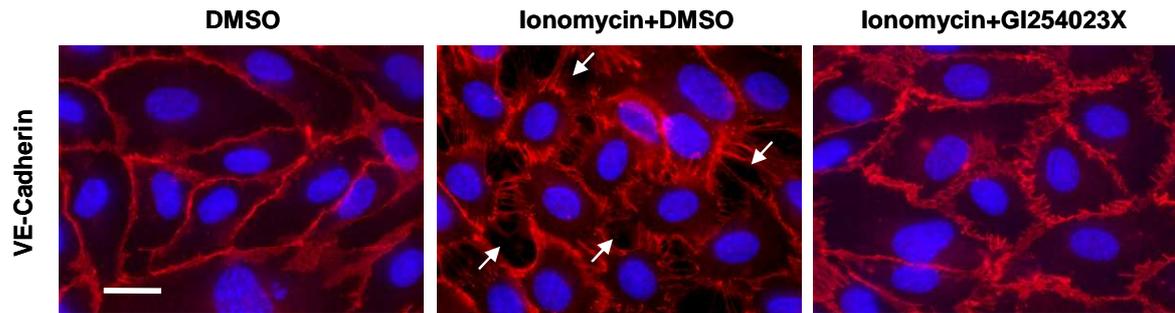


**Abb. 3.13: Einfluss von Ionomycin auf das Shedding von VE-Cadherin**

(A) HUVECs wurden mit Ionomycin [10  $\mu$ M] in Gegenwart von DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] für 30 min behandelt. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und die elektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel. Der *Western Blot* wurde mit Antikörper gegen den VE-Cadherin C-Terminus inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert. (B) Die CTF-Generierung wurde densitometrisch durch Bildung des Quotienten aus CTF und der Summe aus VL (Volllängenprotein) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P$ <0,05 vs DMSO behandelte Zellen,  $^{\circ}$  $P$ <0,05 vs Ionomycin + DMSO behandelte Zellen. (n=3)

Der *Western Blot* in Abbildung 3.13 A zeigt, dass die Stimulation mit Ionomycin zu einem verstärkten VE-Cadherin *Shedding* führt. Gleichzeitig ist sichtbar, dass der ADAM10-Inhibitor eine vollständige Reduktion des C-terminalen Fragments und damit des *Sheddings* bewirkt. Die densitometrische Auswertung zeigt, dass Ionomycin eine 40 %ige Zunahme des CTFs bewirkt. Unter gleichzeitiger Einwirkung des ADAM10-Inhibitors GI254023X konnte eine deutliche Reduktion des CTFs um 60 % beobachtet werden (Abb. 3.13 B).

In Immunfluoreszenzfärbungen sollte geklärt werden, ob Ionomycin auch einen Einfluss auf die Lokalisation von VE-Cadherin hat und welche Bedeutung ADAM10 dabei einnimmt. Dazu wurden HUVECs auf Kollagen-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Ionomycin [10 $\mu$ M] in Gegenwart von DMSO oder dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] für 30 min inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen die ausschließlich mit DMSO behandelt wurden. Die HUVECs wurden immunzytochemisch gefärbt. Dabei wurde VE-Cadherin rot und die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt.



**Abb. 3.14: Einfluss von Ionomycin auf die Lokalisation von VE-Cadherin**

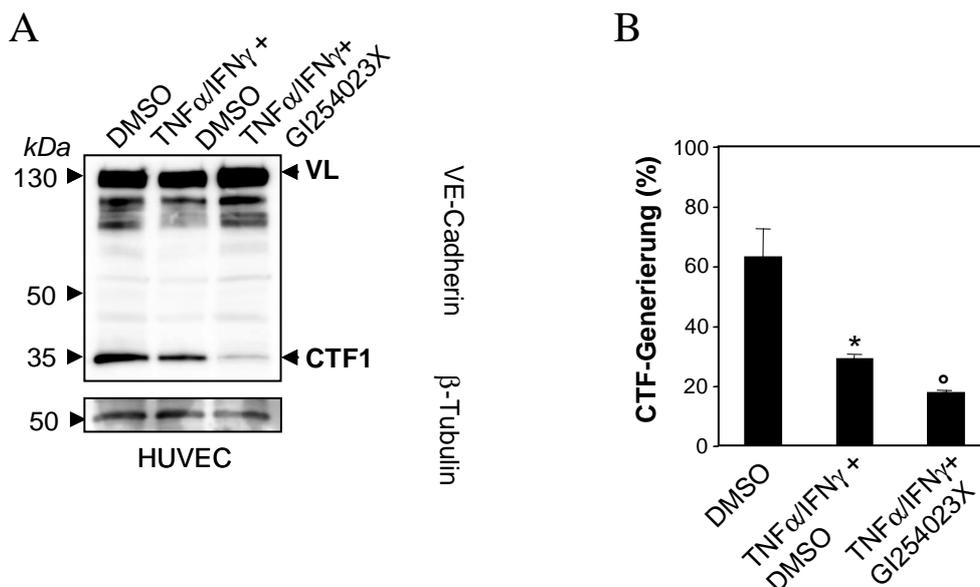
HUVECs wurden auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden 30 min mit DMSO bzw. GI254023X [10 $\mu$ M] vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von Ionomycin [10  $\mu$ M] für weitere 30 min inkubiert. Zur Kontrolle wurden HUVECs 30 min mit DMSO behandelt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert und immunzytochemisch mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper (rot) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu$ m. Die Pfeile zeigen offene Zellzwischenräume.

Die immunzytochemische Färbung in Abbildung 3.14 zeigt, dass DMSO behandelte Zellen enge Zellkontakte aufweisen. Das VE-Cadherin ist in den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und die Zellen bilden einen geschlossenen Zellrasen aus. Ionomycin behandelte Zellen zeigen hingegen einen Verlust der Zellkontakte (durch Pfeile gekennzeichnet). Zudem sind diese Zellen leicht rundlich. Ionomycin behandelte Zellen, die gleichzeitig mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X behandelt wurden, zeigen wiederum vermehrt geschlossene Zellkontakte. Die Stimulation mit Ionomycin scheint zu einem Verlust der VE-Cadherin Zellkontakte zu führen. Die parallele Behandlung der Zellen mit dem ADAM10-Inhibitor schützt vermutlich davor, dass Lücken im Zellrasen entstehen.

### 3.3.5 TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ aktivieren die VE-Cadherin Proteolyse nicht

Die inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sollten auf ihren Einfluss auf das VE-Cadherin *Shedding* untersucht werden. Es ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin induziert und somit in der Lage ist, die Permeabilität des Endothels zu erhöhen (Hofmann *et al.*, 2002, Angelini *et al.*, 2006).

Im folgenden Experiment galt es zu prüfen, ob TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zur Proteolyse von VE-Cadherin beitragen. Daher wurden HUVECs mit TNF- $\alpha$  [20 ng/ml]/IFN- $\gamma$  [20 ng/ml] in Gegenwart von DMSO bzw. dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] für 18 h behandelt und die Zellysate im *Western Blot* auf die Bildung C-terminaler Fragmente hin analysiert.



**Abb. 3.15: Einfluss von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die Spaltung von VE-Cadherin**

(A) HUVECs wurden mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  [20 ng/ml] und IFN- $\gamma$  [20 ng/ml] 18 h in Gegenwart von DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im *Western Blot* mit einem VE-Cadherin Antikörper untersucht. Nachfolgend wurde die Membran mit einem gegen  $\beta$ -Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert, um mögliche Varianzen in der Proteinkonzentration der Zellysate auszuschließen. (B) Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  vs DMSO behandelte Zellen, °  $P < 0,05$  vs TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  + DMSO behandelte Zellen. (n=3)

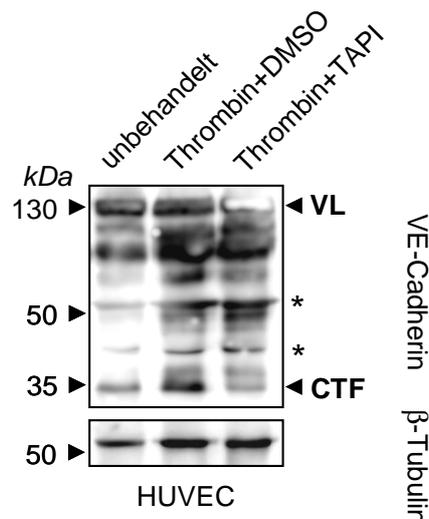
Der *Western Blot* in Abbildung 3.15 A zeigt, dass die Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  zu einer Abnahme des C-terminalen Fragments im Vergleich zur DMSO Kontrolle um 30 % führt. Unter gleichzeitiger Verwendung des ADAM10-Inhibitors GI254023X kann eine Reduktion des CTFs im *Western Blot* als auch in der Densitometrie um 10 % im Vergleich zu TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  behandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.15 B). In diesem Versuch konnte keine Aktivierung des VE-Cadherin *Sheddings* durch TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  Stimulation gezeigt werden.

### 3.3.6 Der Einfluss von Thrombin auf die Spaltung von VE-Cadherin

Die Serinprotease Thrombin sollte in nachfolgenden Experimenten näher auf deren Einfluss auf das VE-Cadherin *Shedding* untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Rolle von ADAM10 auf die durch Thrombin erhöhte endotheliale Permeabilität untersucht werden. Thrombin übt spezifische Effekte auf das Endothel aus: es stört die Barrierefunktion und stimuliert die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, vasoregulatorische Agenzien und Wachstumsfaktoren (Bogatcheva *et al.*, 2002). Thrombin stellt damit einen Schlüsselregulator der endothelialen Barriere dar. Durch Aktivierung seines Rezeptors erhöht Thrombin die

intrazelluläre Calciumkonzentration und stimuliert die Proteinkinase C (Sandoval *et al.*, 2001). Thrombin zerstört den VE-Cadherin/Catenin-Komplex und erhöht somit die endotheliale Permeabilität (Rabiet *et al.*, 1996).

Zunächst sollte in Stimulationsversuchen untersucht werden, ob Thrombin das *Shedding* von VE-Cadherin zu stimulieren vermag. HUVECs wurden zu diesem Zweck mit Thrombin [1 U/ml] für 30 min in Gegenwart von DMSO oder dem Breitbandmetalloproteinase-Inhibitor TAPI [20  $\mu$ M] inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im *Western Blot* mit einem VE-Cadherin Antikörper analysiert.

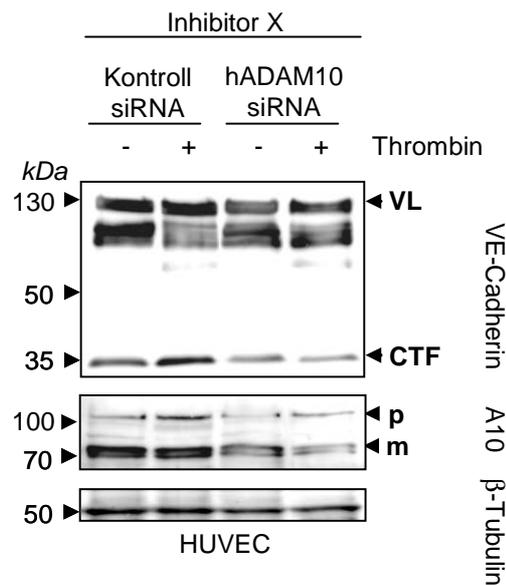


**Abb. 3.16: Einfluss von Thrombin auf das *Shedding* von VE-Cadherin**

HUVECs wurden mit DMSO bzw. TAPI [20  $\mu$ M] 30 min vorinkubiert und in Gegenwart von Thrombin [1 U/ml] für weitere 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und die elektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel. Der *Western Blot* wurde mit einem Antikörper gegen den VE-Cadherin C-Terminus und nachfolgend mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert, um Varianzen in der Proteinkonzentration der Zelllysate auszuschließen. (\* unspezifische Banden)

Die Behandlung der HUVECs mit Thrombin führt zu einer deutlichen Zunahme des C-terminalen Fragments von VE-Cadherin (Abb. 3.16). Der Einsatz des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors TAPI kann die Bildung des CTFs nahezu vollständig hemmen. Die Thrombin-stimulierte Erhöhung der VE-Cadherin Proteolyse ist somit Metalloproteinase-abhängig.

Als nächstes wurde der Einfluss von ADAM10 auf das Thrombin vermittelte VE-Cadherin-*Shedding* untersucht. Dies wurde in einem RNA-Interferenz Experiment analysiert. Hierzu wurden HUVECs transient mit ADAM10 siRNA und zur Kontrolle mit Kontroll siRNA in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Inhibitor X [1  $\mu$ M] transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit Thrombin [1 U/ml] behandelt und die Zelllysate im *Western Blot* analysiert.

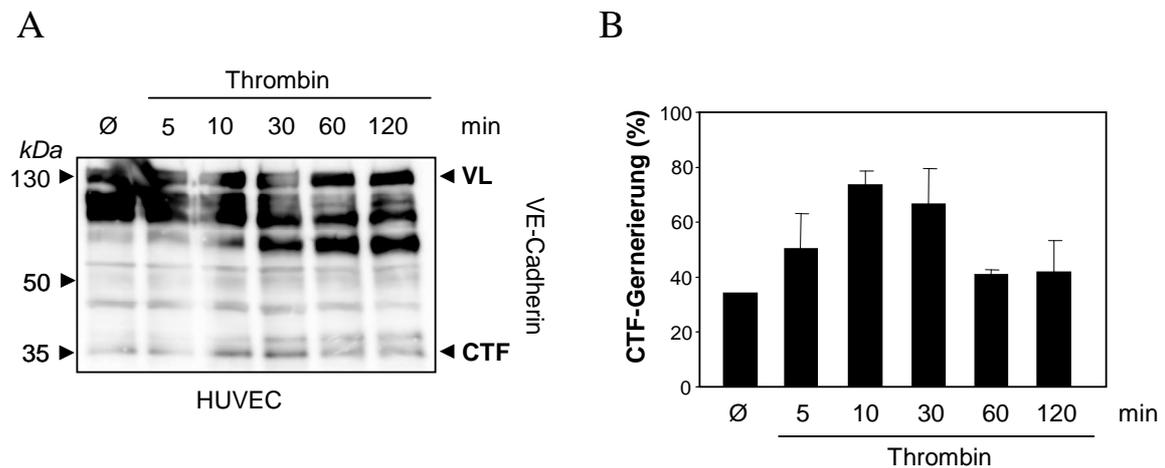


**Abb. 3.17: Einfluss von ADAM10 siRNA in Gegenwart von Thrombin auf die Proteolyse von VE-Cadherin**  
 HUVECs wurden transient mit Kontroll siRNA bzw. ADAM10 siRNA in Gegenwart des  $\gamma$ -Sekretase Inhibitors X [1  $\mu$ M] transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Thrombin [1 U/ mL] für 30 min inkubiert. Die Zellysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper im *Western Blot* analysiert. Zur Beurteilung der ADAM10 siRNA Transfektionseffizienz, wurde die Membran nachfolgend mit einem Antikörper gegen ADAM10 inkubiert. Zur Prüfung des Proteingehaltes in den Zellysaten wurde die Membran mit einem gegen  $\beta$ -Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert.

Die Herunterregulierung der Expression von ADAM10 mittels ADAM10 siRNA inhibiert in Gegenwart von Thrombin die VE-Cadherin Proteolyse (Abb. 3.17). Die mit Kontroll siRNA behandelten Zellen zeigen die Zunahme des VE-Cadherin *Sheddings* mit Thrombin. Der mit ADAM10 Antikörper inkubierte *Western Blot* zeigt, dass ADAM10 erfolgreich mit der ADAM10 siRNA herunterreguliert wurde. Die mit  $\beta$ -Tubulin gefärbte Membran bestätigt, dass gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

Im Folgenden sollte der zeitliche Einfluss von Thrombin auf das VE-Cadherin *Shedding* untersucht werden. Dazu wurden HUVECs in Gegenwart von Thrombin [1 U/ml] für verschiedene Zeitintervalle von 5, 10, 30, 60 und 120 min inkubiert. Die Zellysate wurden im *Western Blot* analysiert und der *Western Blot* nachfolgend densitometrisch ausgewertet.

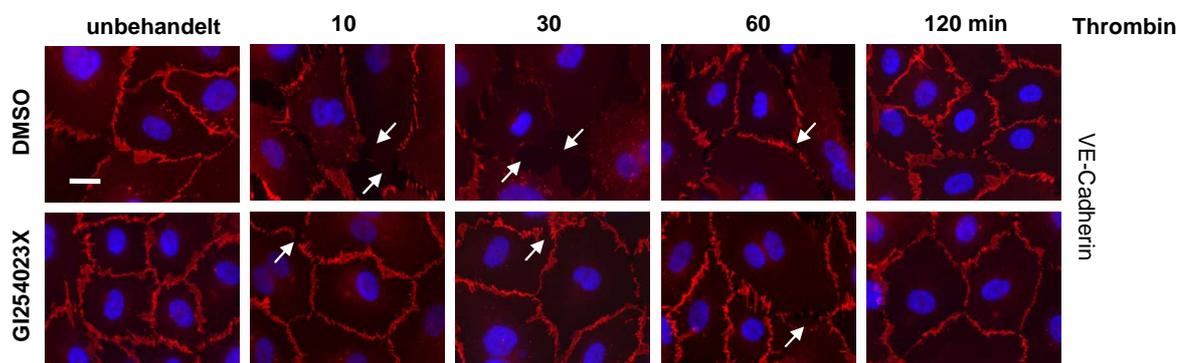
Wie in Abbildung 3.18 B gezeigt, führt die Behandlung mit Thrombin bereits nach 5 min zu einer Zunahme des 35 kDa großen C-terminalen Fragments. Dieser Effekt hat nach 10 bis 30 min sein Maximum erreicht. 60 min nach der Thrombin-Stimulation nimmt die Bildung des CTFs wieder ab. Der Effekt von Thrombin auf die VE-Cadherin Proteolyse ist demnach zeitabhängig.



**Abb. 3.18: Zeitkinetik von Thrombin auf das Shedding von VE-Cadherin**

(A) HUVECs wurden für die Dauer von 5 bis 120 min in verschiedenen Zeitintervallen mit Thrombin [1 U/ml] behandelt. Die Zellysate wurden im *Western Blot* mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper analysiert. (B) Die CTF-Generierung wurde densitometrisch durch Bildung des Quotienten aus CTF (C-terminalen Fragment) und der Summe aus Vollängenprotein (VL) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. (n=3)

Um den Einfluss von Thrombin auf die Lokalisation von VE-Cadherin zu untersuchen, wurden Thrombin-stimulierte Zellen immunzytochemisch gefärbt. HUVECs wurden auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausgesät. Die bis zur Konfluenz kultivierten Zellen, wurden mit Thrombin für verschiedene Zeitintervalle für 10, 30, 60 und 120 min behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen nicht mit Thrombin stimuliert. Die Zellen wurden in Gegenwart von DMSO bzw. dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10 µM] 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden immunzytochemisch mit dem VE-Cadherin Antikörper rot gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

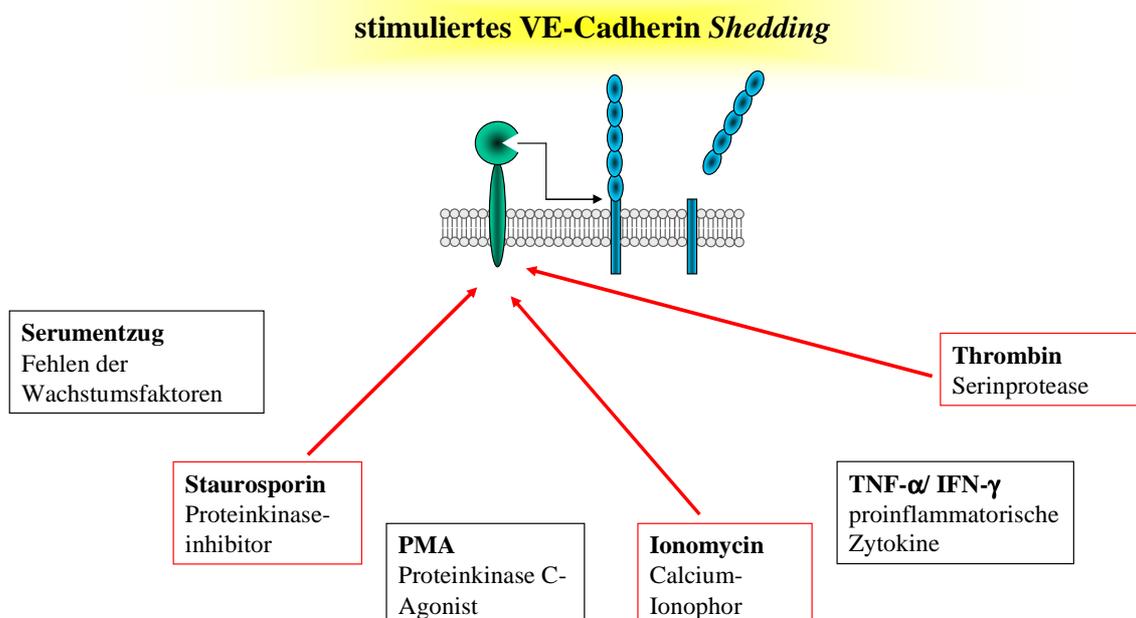


**Abb. 3.19: Zeitlicher Einfluss von Thrombin auf die Lokalisation von VE-Cadherin**

HUVECs wurden auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden in Gegenwart von Thrombin [1 U/ml] für 10, 30, 60 und 120 min stimuliert. Zuvor wurden die Zellen mit DMSO bzw. GI254023X [10µM] 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 20 min mit eiskaltem Methanol fixiert und immunzytochemisch mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper rot angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 20 µm. Die Pfeile kennzeichnen die Delokalisation des VE-Cadherins.

Die immunzytochemische Färbung (Abb. 3.19) zeigt, dass in den unbehandelten Zellen VE-Cadherin stark in den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist. Die Inkubation der HUVECs mit Thrombin in Gegenwart von DMSO zeigt, dass nach 10 min die Zellen ihre Zellkontakte zunehmend verlieren (Pfeile). Nach 30 min ist beinahe ein kompletter Verlust von VE-Cadherin auf der Zelloberfläche in den Zellzwischenräumen zu sehen. Im Vergleich dazu zeigen Zellen die in Gegenwart des ADAM10-Inhibitors GI254023X mit Thrombin behandelt wurden, einen weit geringeren Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Nach 120 min Stimulation mit Thrombin sind die VE-Cadherin Zellkontakte fast vollständig wiederhergestellt.

Zusammenfassend konnten für das induzierbare *Shedding* von VE-Cadherin folgende Ergebnisse gezeigt werden: Staurosporin, Ionomycin und Thrombin stimulieren die VE-Cadherin Proteolyse. Dieser Effekt konnte durch Inhibition von ADAM10 aufgehoben werden. Die Stimulation des VE-Cadherin *Sheddings* wird demnach durch ADAM10 vermittelt. Die immunzytochemischen Färbungen zeigen zudem, dass Ionomycin und Thrombin eine Abnahme der VE-Cadherin Zellkontakte bewirken. Die Inhibition von ADAM10 verhindert die Abnahme der VE-Cadherin Zellkontakte. Keinen Einfluss auf das induzierbare *Shedding* zeigen Serumentzug, PMA und TNF- $\alpha$ /INF- $\gamma$  (Abb. 3.20).

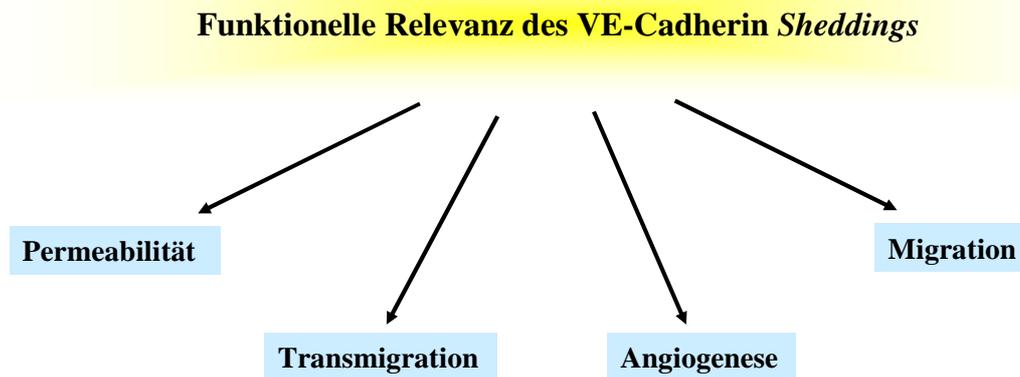


**Abb. 3.20: Übersicht der Stimulanzien, die das induzierte VE-Cadherin *Shedding* vermitteln**

Das stimulierte VE-Cadherin *Shedding* wird durch den Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin, das Calcium-Ionophor Ionomycin und der Serinprotease Thrombin vermittelt. Kein Effekt auf das *Shedding* konnte unter Serumentzug, PMA- und TNF- $\alpha$ /INF- $\gamma$ -Stimulation beobachtet werden.

### 3.4 Funktionelle Relevanz des VE-Cadherin *Sheddings*

Um die Relevanz der VE-Cadherin Proteolyse näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche funktionelle Experimente durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob das VE-Cadherin *Shedding* einen Einfluss auf die Permeabilität, Transmigration von Leukozyten, Angiogenese und Migration von Endothelzellen hat.



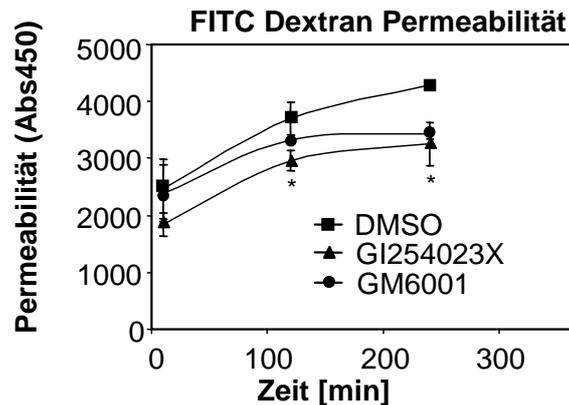
**Abb. 3.21: Übersicht zur Untersuchung der Funktionellen Relevanz des VE-Cadherin *Sheddings***  
Dargestellt sind zellphysiologische Vorgänge, auf die das *Shedding* von VE-Cadherin einen Einfluss haben könnte.

#### 3.4.1 Metalloproteinase-Inhibitoren und ADAM10-Transfektion beeinflussen die Permeabilität

Es wurde mehrfach beschrieben, dass die endotheliale VE-Cadherin Barriere durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden kann. So konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität durch VEGF, Thrombin, Histamin, TNF- $\alpha$  oder LPS induziert wird (Gavard *et al.*, 2006, Rabiet *et al.*, 1996, Andriopoulou *et al.*, 1999, Hofmann *et al.*, 2002, Gong *et al.*, 2008). Die Faktoren nehmen dabei Einfluss auf das Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin, indem durch Tyrosinphosphorylierung der VE-Cadherin/Catenin-Komplex umgebaut wird und so die Zell-Zell-Kontakte durchlässiger gemacht werden. Die Permeabilität des Endothels wird dabei erhöht.

Um zunächst zu klären, ob Metalloproteinasen bzw. im Speziellen ADAM10 einen Einfluss auf die Permeabilität einer HUVEC-Zellschicht haben, wurde zunächst in einem Permeabilitätsversuch die Durchlässigkeit mittels FITC-Dextran geprüft. Hierzu wurden HUVECs auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (0,4  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Konfluenz wurde mittels Calceinfärbung kontrolliert.

Für den Versuch wurden die Zellen mit DMSO, dem Breitbandmetalloproteinase-Inhibitor GM6001 [10  $\mu$ M] und dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu$ M] 30 min vorinkubiert. Die Permeabilität des Monolayers wurde gemessen, indem in jeden Filtereinsatz FITC-Dextran (40 kDa) [1 mg/ml] gegeben wurde und nach definierten Messzeiten die Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{EX}}$  485 nm,  $\lambda_{\text{EM}}$  525 nm) der Lösung in der unteren Kammer gemessen wurde.



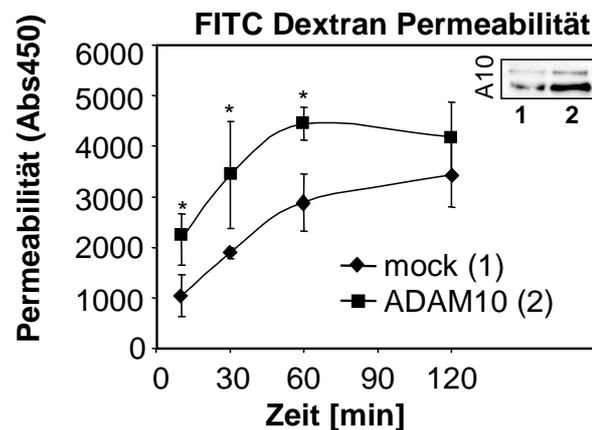
**Abb. 3.22: Einfluss von Metalloproteinase-Inhibitoren auf die Permeabilität**

HUVECs wurden auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (0,4  $\mu$ m) ausgesät und bis zu Konfluenz kultiviert. Die Konfluenz wurde mittels Calceinfärbung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden mit DMSO; GI254023X [10 $\mu$ M] bzw. GM6001 [10  $\mu$ M] für 30 min vorinkubiert. Die Permeabilität des HUVEC-Monolayers wurde mittels FITC-Dextran (40 kDa) bestimmt. Dazu wurde FITC-Dextran [1 mg/ml] auf die Zellen im Filtereinsatz gegeben und nach definierten Zeitintervallen (10, 120, 240 min) die Fluoreszenzintensität des Mediums im unteren Loch bei einer Fluoreszenz von  $\lambda_{\text{EX}}=485$  nm ( $\lambda_{\text{EM}}$  525 nm) gemessen. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P<0,05$  GI254023X vs DMSO behandelte Zellen.

Die Permeabilität DMSO behandelter Zellen nimmt im Vergleich zu den Metalloproteinase-Inhibitor behandelten Zellen stärker zu (Abb. 3.22). ADAM10-Inhibitor behandelte Zellen zeigen eine signifikant geringere Permeabilität als die DMSO behandelten Kontrollzellen. ADAM10 scheint also in der Lage zu sein, die Permeabilität einer Endothelzellschicht zu beeinflussen.

Um diesen Befund abzusichern, wurde im folgenden Experiment der Einfluss von ADAM10 auf die Permeabilität durch ADAM10 Überexpression untersucht. Hierbei wurden HUVECs auf die Permeabilität durch ADAM10 Überexpression untersucht. Hierbei wurden HUVECs mit ADAM10 bzw. als Kontrolle mit einem Leervektor (mock) transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Filtereinsätze (0,4  $\mu$ m) ausgesät und nach weiteren 24 h wurde die Zellen im Permeabilitätsversuch untersucht. Zuvor wurde die Konfluenz der Zellen durch Anfärben mit Calcein und anschließender Fluoreszenzkontrolle unter dem Mikroskop kontrolliert.

Die Permeabilität wurde mittels FITC-Dextran [1 mg/ml] durch Messung der Fluoreszenzintensität der Lösung in der unteren Kammer nach verschiedenen Zeitintervallen gemessen. Zur Überprüfung der Transfektion wurden Zelllysate der transfizierten Zellen im *Western Blot* mit einem ADAM10 Antikörper inkubiert



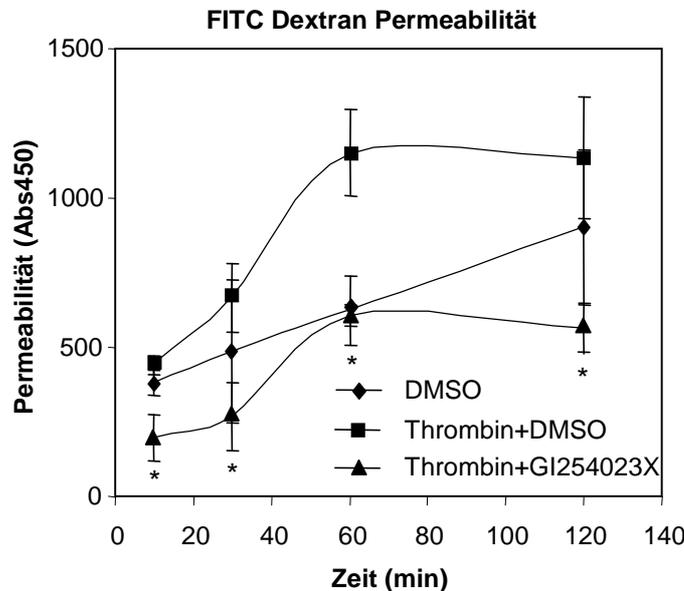
**Abb. 3.23: Einfluss von ADAM10-Transfektion auf die Permeabilität**

HUVECs wurden transient mit einem Leervektor (mock, 1) und ADAM10 (2) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (0,4  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zu Konfluenz kultiviert. Die Konfluenz wurde mittels Calceinfärbung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Die Permeabilität des HUVEC-Monolayers wurde bestimmt indem FITC-Dextran (40 kDa) [1 mg/ml] auf die Zellen in den Filtereinsätzen gegeben wurde. Nach definierten Zeitintervallen (10, 30, 60, 120 min) wurde die Fluoreszenzintensität des Mediums im unteren Loch bei einer Fluoreszenz von  $\lambda_{\text{EX}}=485 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{EM}} 525 \text{ nm}$ ) gemessen. Zelllysate der transfizierten Zellen wurden im *Western Blot* mit einem ADAM10 Antikörper inkubiert, um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  vs mock transfizierte Zellen. (mock: Leervektor, A10: ADAM10)

Der Permeabilitätsversuch in Abbildung 3.23 zeigt, dass die Permeabilität ADAM10-transfizierter Zellen im Vergleich zu den mit einem Leervektor (mock) transfizierten Zellen signifikant höher ist. Dies ist über einen Zeitraum von 10 bis 120 min zu beobachten. Zur Kontrolle der Transfektion wurden Zelllysate im *Western Blot* untersucht. Die Überexpression mit ADAM10 (2) und die Transfektion mit dem Leervektor (1) sind im *Western Blot* zu sehen. Die Proform und mature Form von ADAM10 sind dargestellt.

Für Thrombin wurde beschrieben, dass es in der Lage ist, die Permeabilität endothelialer Barrieren zu erhöhen (Rabiet *et al.*, 1996). Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob ADAM10 einen Einfluss auf die Thrombin-stimulierte Erhöhung der Permeabilität zukommt. Hierzu wurden HUVECs auf Filtereinsätze (0,4  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit DMSO bzw. dem ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu\text{M}$ ] für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Thrombin [1 U/ml] behandelt.

Dann wurde mittels FITC-Dextran (40 kDa) die Permeabilität des Monolayers gemessen, indem FITC-Dextran [1 mg/ml] in das obere Loch des Filtereinsatzes auf die Zellen gegeben wurde und nach definierten Messzeiten die Fluoreszenzintensität der Lösung in der unteren Kammer der 24-Loch Platte gemessen wurde.



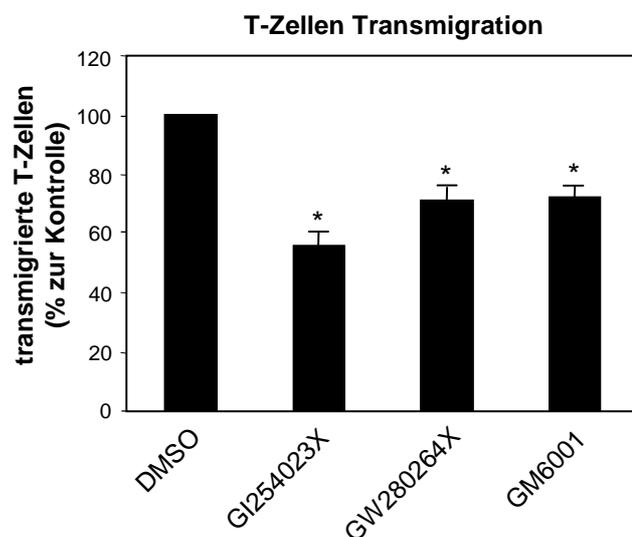
**Abb. 3.24: Einfluss von Thrombin in Gegenwart des ADAM10-Inhibitors auf die Permeabilität**

HUVECs wurden auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (0,4  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zu Konfluenz kultiviert. Zur Überprüfung der Konfluenz wurden die Zellen mit Calcein angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Die Zellen wurden mit DMSO bzw. GI254023X [10 $\mu\text{M}$ ] für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Thrombin [1 U/ mL] behandelt. Die Permeabilität des HUVEC-Monolayers wurde mittels FITC-Dextran (40 kDa) bestimmt. Dazu wurde FITC-Dextran [1 mg/ml] in den Filtereinsätzen auf die Zellen gegeben. Nach verschiedenen Messzeiten (10, 30, 60 und 120 min) wurde die Fluoreszenzintensität des Mediums im unteren Loch bei einer Fluoreszenz von  $\lambda_{\text{EX}}=485$  nm ( $\lambda_{\text{EM}}$  525 nm) gemessen. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  Thrombin + GI254023X vs Thrombin + DMSO behandelte Zellen.

Die Permeabilität der HUVEC Zellschicht (Abb. 3.24) nimmt in Gegenwart der Kontrolle DMSO über die Zeit linear zu. Die Behandlung von Thrombin in Gegenwart von DMSO führt zu einer deutlich stärkeren Zunahme der Permeabilität, die nach 60 min ihr Maximum aufweist. Danach nimmt die Durchlässigkeit der HUVEC Zellschicht wieder ab. Unter Einfluss des ADAM10-Inhibitors GI254023X zeigt Thrombin einen ähnlichen Kurvenverlauf wie mit Thrombin und DMSO. Auch hier steigt die Permeabilität deutlich an und erreicht nach 60 min den höchsten Wert. Die Permeabilität ist hierbei allerdings im Vergleich zu Thrombin und DMSO deutlich reduziert. Dies beweist, dass Thrombin in der Lage ist, die Permeabilität zu erhöhen. Darüberhinaus zeigt der Versuch, dass der ADAM10-Inhibitor in der Lage ist, die Zellbarriere des Endothels aufrechtzuerhalten, also den Effekt von Thrombin entgegenzuwirken. ADAM10 scheint also bedeutsam bei der Thrombin-vermittelten Permeabilität zu sein.

### 3.4.2 Die Transmigration von T-Zellen wird durch die Inhibition der Metalloproteinasen und durch ADAM10 siRNA gehemmt

Die Adhäsionskontakte des Endothels regulieren nicht nur die Permeabilität sondern auch den Prozess der Leukozytentransmigration. Wichtige Zelladhäsionsmoleküle sind hierbei VE-Cadherin, PECAM-1, CD99 und JAMs. Die funktionelle Bedeutung der VE-Cadherin Proteolyse auf die Transmigration von Leukozyten sollte in Transmigrationsversuchen untersucht werden. Zunächst sollte in diesen Versuchen die Funktion der Metalloproteinasen mittels Inhibitoren ausgeschaltet werden. Hierzu wurden HUVECs zunächst auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (3,0  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit DMSO, dem spezifischen ADAM10-Inhibitor GI254023X [10  $\mu\text{M}$ ], dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X [10  $\mu\text{M}$ ] und dem Breitband-metalloproteinase-Inhibitor GM6001 [10  $\mu\text{M}$ ] für 60 min vorinkubiert. Im Anschluss daran wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Phytohämagglutinin-stimulierte T-Zellen auf einen Filtereinsatz pipettiert. 24 h nach Zugabe der T-Zellen wurden die transmigrierten T-Zellen im unteren Loch der 24-Loch-Platte durch Zählung in einer Neubauerzählkammer bestimmt.



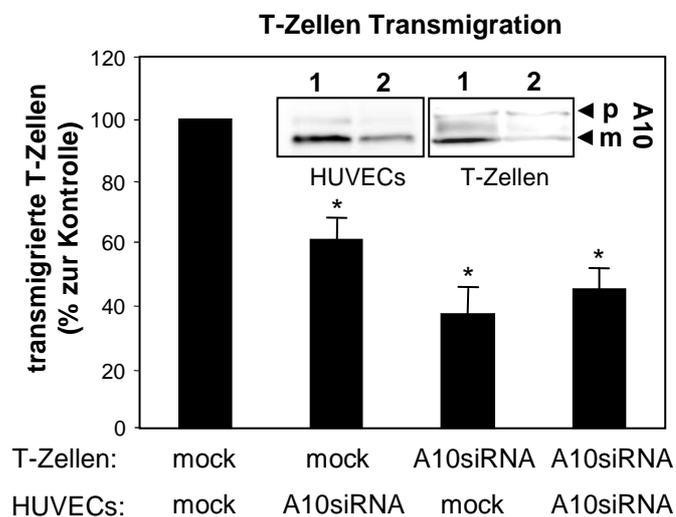
**Abb. 3.25: Einfluss von Metalloproteinase-Inhibitoren auf die Transmigration von T-Zellen**

HUVECs wurden auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (3,0  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Überprüfung der Konfluenz wurden die Zellen mit Calcein angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Die Zellen wurden mit DMSO, GI254023X [10 $\mu\text{M}$ ], GW280264X [10  $\mu\text{M}$ ] und GM6001 [10  $\mu\text{M}$ ] für 60 min vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium im oberen Loch gewechselt. Es wurden  $5 \times 10^5$  Phytohämagglutinin-stimulierte T-Zellen auf jeden Filtereinsatz pipettiert. Nach 24 h wurde die Zahl der transmigrierten Zellen im unteren Loch durch Zählung der Zellen in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  vs DMSO behandelte Zellen.

Die Zahl der transmigrierten T-Zellen, die durch die Zellschicht DMSO behandelter HUVECs wanderte, wurde 100 % gesetzt (Abb. 3.25). Im Vergleich zur DMSO Kontrolle zeigten alle verwendeten Metalloproteinase-Inhibitoren eine Abnahme der T-Zell-Transmigration. Die

stärkste Abnahme der Anzahl transmigrierter T-Zellen konnte mit dem spezifischen ADAM10-Inhibitor GI254023X erreicht werden. Hierbei wurde eine Reduktion der Transmigration um 45 % gemessen. Die Behandlung der Zellen mit GW280264X und GM6001 führte zu einer Abnahme der Transmigration um 30 %. Das Ergebnis, dass ADAM10 einen Einfluss auf die Transmigration von T-Zellen einnimmt, sollte in einem weiteren Versuch näher untersucht werden.

ADAM10 wird sowohl auf der Oberfläche des Endothels als auch auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert. Dabei stellte sich die Frage, auf welcher Seite die funktionelle Relevanz von ADAM10 bedeutsam wird. Es wurde daher untersucht, ob das endotheliale ADAM10 auf dem Endothel oder aber das in der Membran der T-Zellen lokalisierte ADAM10 wichtig für die Transmigration ist. Um diese Frage klären zu können, wurden sowohl HUVECs als auch T-Zellen transient mit ADAM10 siRNA bzw. mit Kontroll siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten HUVECs auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (3,0  $\mu\text{m}$ ) ausgesät. Nach weiteren 24 h wurde der Transmigrationsversuch durchgeführt. Dabei wurden  $5 \times 10^5$  Kontroll siRNA bzw. ADAM10 siRNA transfizierte T-Zellen in die Filtereinsätze auf Kontroll siRNA bzw. ADAM10 siRNA transfizierte HUVECs pipettiert. 24 h danach wurde die Zahl der transmigrierten T-Zellen im unteren Loch der 24-Loch-Platte mittels Neubauerzählkammer bestimmt.



**Abb. 3.26: Einfluss von ADAM10 siRNA auf die Transmigration von T-Zellen**

HUVECs wurden transient mit Kontroll siRNA (mock, 1) bzw. mit ADAM10 siRNA (2) transfiziert und auf Kollagen-beschichtete Filtereinsätze (3,0  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und bis zu Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit Calcein angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet, um so die Konfluenz der HUVECs zu überprüfen. T-Zellen wurden ebenfalls transient mit Kontroll siRNA (mock, 1) bzw. mit ADAM10 siRNA (2) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  Phytohämagglutinin-stimulierte T-Zellen pro Filtereinsatz pipettiert. Nach weiteren 24 h wurde die Zahl der transmigrierten Zellen im unteren Loch durch Zählung der T-Zellen in der Neubauerzählkammer bestimmt. Die ADAM10 Expression der mock-transfizierten (1) bzw. ADAM10 siRNA transfizierten (2) HUVECs und T-Zellen wurde im *Western Blot* untersucht. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  vs mock transfizierte Zellen. (p: Proform von ADAM10, m: mature Form von ADAM10, A10: ADAM10)

Zusätzlich wurden Zelllysate der transfizierten HUVECs bzw. T-Zellen im *Western Blot* auf die ADAM10 Expression hin analysiert.

Im Transmigrationsversuch diente als Kontrolle der Ansatz, bei dem sowohl die T-Zellen als auch die HUVECs mit Kontroll siRNA behandelt worden sind. Die Zahl der transmigrierten T-Zellen wurde hier 100 % gesetzt (Abb. 3.26). Ist ADAM10 mittels ADAM10 siRNA nur in den HUVECs herunterreguliert, so kann eine Abnahme der Transmigration um 40 % beobachtet werden. Dies stimmt mit dem Einsatz des ADAM10-Inhibitors in Abb. 3.26 überein, bei dem eine Reduktion der Transmigration um 45 % gemessen werden konnte. Ist ADAM10 hingegen nur in T-Zellen herunterreguliert, so reduziert sich die Transmigration um 60 %. Ist ADAM10 sowohl auf HUVECs als auch auf T-Zellen reduziert, so nimmt die Transmigration um 50 % ab. Die Herunterregulierung von ADAM10 in HUVECs und T-Zellen mittels ADAM10 siRNA wurde im *Western Blot* gezeigt (Abb. 3.26).

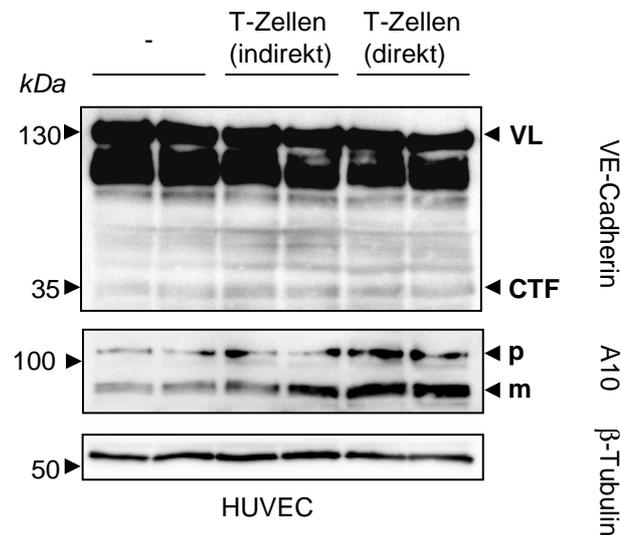
ADAM10 scheint demnach sowohl auf der Oberfläche von Endothelzellen, als auch auf der von T-Zellen eine bedeutsame Rolle bei der Transmigration zu spielen.

### **3.4.3 Die Co-Kultivierung von HUVECs mit T-Zellen verstärkt die ADAM10 Aktivität**

Um die Frage zu beantworten, ob T-Zellen das VE-Cadherin *Shedding* in HUVECs induzieren können, wurden Co-Kultivierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden auf eine konfluente HUVEC Zellschicht T-Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. In einem Ansatz wurden T-Zellen in einen 0,4 µm Filtereinsatz pipettiert, so dass nur lösliche, von den T-Zellen abgegebene Faktoren Einfluss auf die HUVECs nehmen konnten (indirekt). In einem anderen Ansatz wurden T-Zellen direkt auf eine HUVEC-Zellschicht gegeben, so dass die T-Zellen unmittelbar mit den HUVECs interagieren konnten (direkt). Als negative Kontrolle wurden keine T-Zellen zugegeben.

Der in Abbildung 3.27 dargestellte *Western Blot* zeigt, dass bei der indirekten als auch bei der direkten Zugabe von Phytohämagglutinin-stimulierten T-Zellen auf HUVECs im Vergleich zu unbehandelten HUVECs eine leichte Zunahme der C-terminalen Spaltfragmente zu beobachten ist. Diese Zunahme war allerdings nicht quantifizierbar, da das Verhältnis der Volllängenform zum CTF zu groß war. Weitere Untersuchungen zur Beurteilung der VE-Cadherin Proteolyse stehen noch aus. Daneben ist eine erhöhte ADAM10 Aktivität bei der indirekten als auch bei der direkten Zugabe von T-Zellen zu verzeichnen. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion von T-Zellen mit HUVECs, aber auch von den T-Zellen sekretierte lösliche Faktoren zu einer erhöhten ADAM10 Aktivität beitragen können. Es wurde bereits publiziert,

dass die Adhäsion von Polymorphkernigen Zellen (PMN) an HUVECs dazu führt, dass sich die VE-Cadherin-abhängigen endothelialen Adhäsionskontakte umorientieren (Del Maschino *et al.*, 1996, Allport *et al.*, 1997). Dies könnte auch im Fall der Inkubation von T-Zellen mit HUVECs zutreffend sein und möglicherweise auf eine verstärkte Aktivität von ADAM10 zurückzuführen sein.



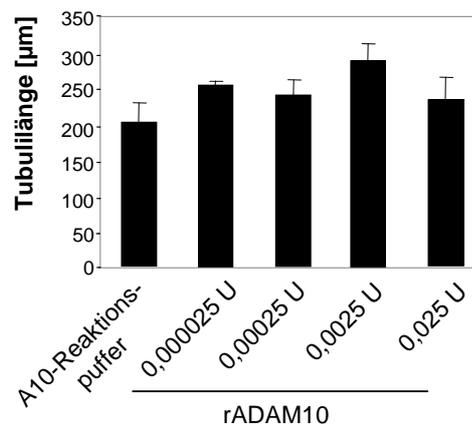
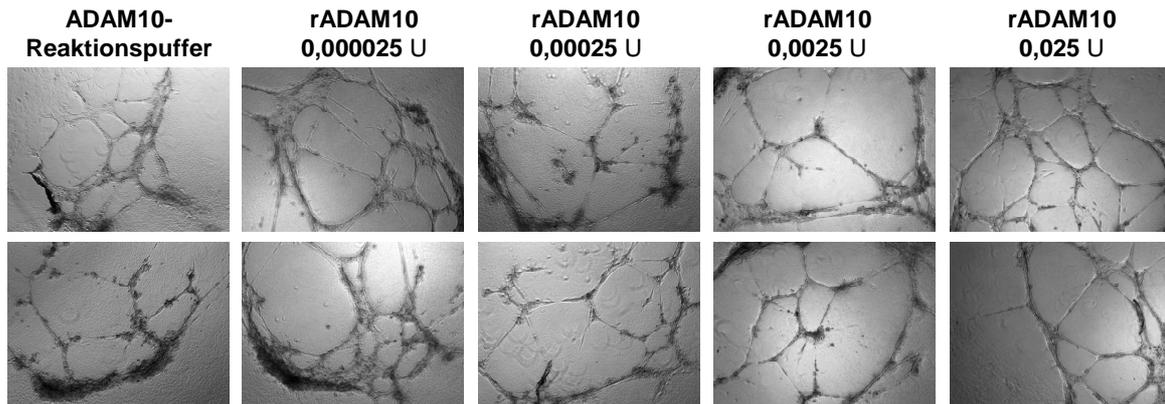
**Abb. 3.27: Co-Kultivierung von HUVECs mit T-Zellen**

HUVECs wurden ohne, indirekt (in einem 0,4 µm Filtereinsatz) und direkt mit  $14 \times 10^6$  Phytohämagglutinstimulierten T-Zellen für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und der *Western Blot* mit einem gegen den C-Terminus von VE-Cadherin gerichteten Antikörper inkubiert. Die Membran wurde nachfolgend mit einem Antikörper gegen ADAM10 inkubiert, um die Aktivierung von ADAM10 zu analysieren und mit einem gegen β-Tubulin gerichteten Antikörper inkubiert, um Varianzen in der Proteinkonzentration der Proben auszuschließen. (VL: Volllängenprotein, CTF: C-terminales Fragment, p: Proform von ADAM10, m: mature Form von ADAM10, \* Kontrast der CTF-Bande wurde verstärkt)

#### 3.4.4 Wirkung von rekombinantem ADAM10 auf die Angiogenese

Es ist bekannt, dass VE-Cadherin und PECAM eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielen (Matsumura *et al.*, 1997). Die Bildung von Gefäßen kann durch Ausplattieren von Zellen auf ein Matrigel studiert werden.

In diesem Versuch war zu überprüfen, ob rekombinantes ADAM10 einen Einfluss auf die Gefäßbildung und damit auf die Angiogenese hat. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen an rekombinantem ADAM10 auf Matrigel gegeben, welches daraufhin in das Gel diffundiert. Die überschüssige Lösung wurde wieder entfernt. Anschließend wurden HUVECs auf das Matrigel ausgesät und 24 h später mikroskopisch ausgewertet.



**Abb. 3.28: Einfluss von rekombinantem ADAM10 auf die Angiogenese von HUVECs**

ECM-Gel (*Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma*) wurde in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurden dem ECM-Gel verschiedene Konzentrationen an rekombinantem ADAM10 [0,000025 U; 0,00025 U; 0,0025 U; 0,025 U] bzw. der ADAM10-Reaktionspuffer als Kontrolle hinzugesetzt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Puffer vom ECM-Gel abpipettiert und HUVECs in einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 96-Loch ausgesät. 24 h nach Aussaat der Zellen wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht und die Tubulilänge gemessen.

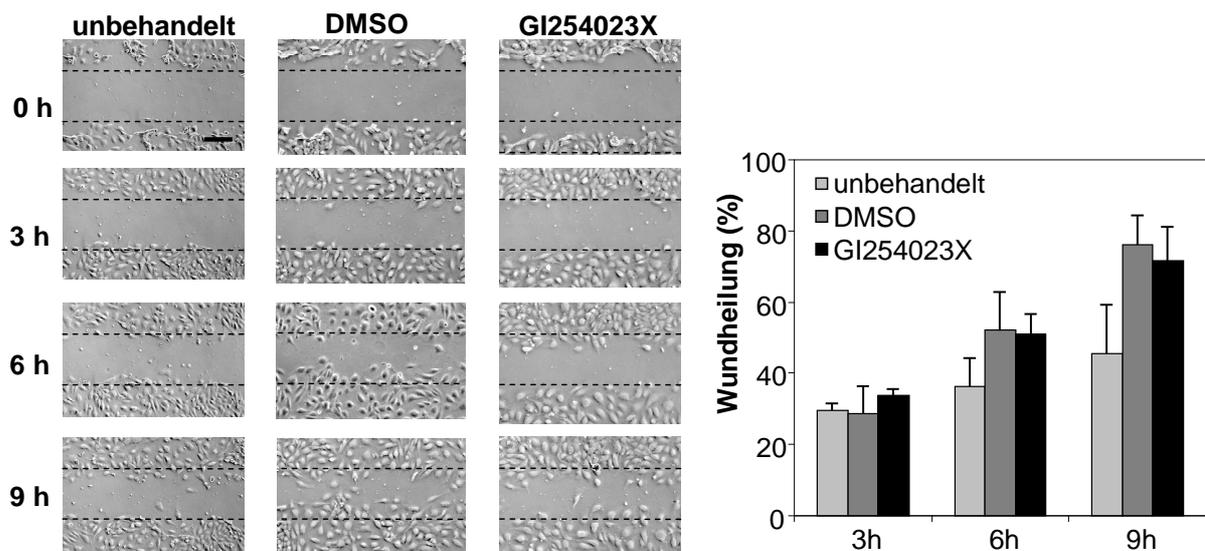
Abbildung 3.28 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen und die Auswertung der Gefäßbildung in Form der Messung der Tubulilänge. Die Konzentration an rekombinantem ADAM10 von 0,0025 U hatte die beste Wirkung auf die Ausbildung von Gefäßen. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede für die verschiedenen ADAM10 Konzentrationen festgestellt werden. Hiernach scheint rekombinantes ADAM10 keinen signifikanten Einfluss auf die Angiogenese zu haben.

### 3.4.5 Die Inhibition von ADAM10 beeinflusst die Migration von HUVECs nicht

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss von ADAM10 auf die Migration von HUVECs untersucht werden. Wie bereits für das verwandte Zelloberflächenmolekül E-Cadherin gezeigt

werden konnte, hat die Inhibition von ADAM10 einen Einfluss auf die Migration E-Cadherin exprimierender Zellen (Maretzky *et al.*, 2005a).

Hier sollte in einem *in vitro wound healing assay* geprüft werden, inwiefern der ADAM10-Inhibitor GI254023X einen Einfluss auf die Migration von HUVECs hat. Hierzu wurde mittels einer Pipettenspitze die konfluente Zellschicht von HUVECs lokal zerstört und anschließend unter mikroskopischer Kontrolle die Zellwanderung in Anwesenheit von DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] beobachtet.



**Abb. 3.29: Einfluss des ADAM10-Inhibitors auf die Migration von HUVECs**

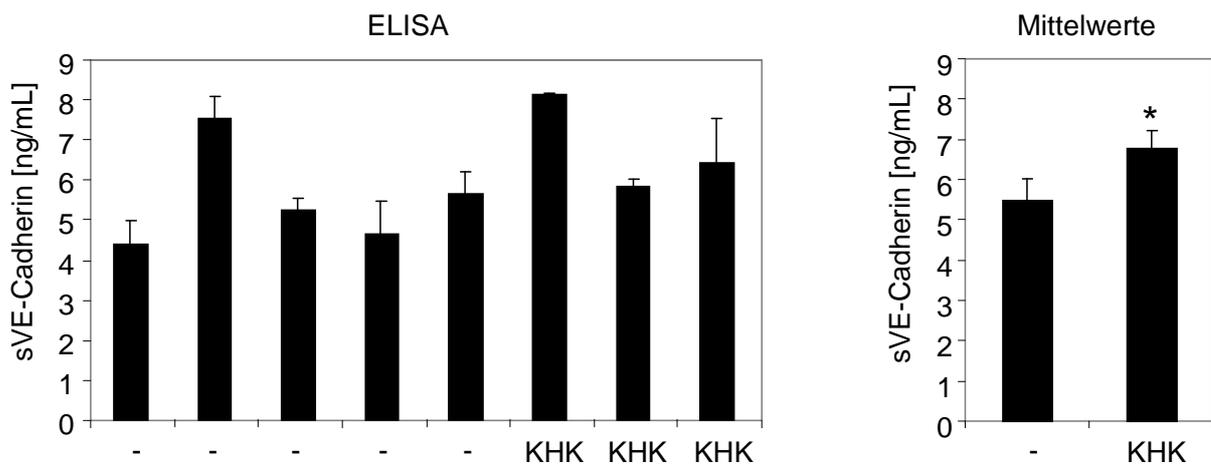
HUVECs wurden in 6-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurde mit einer Pipettenspitze ein Querstrich durch die Zellschicht gezogen und so die Zellschicht zerstört. Nachfolgend wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von DMSO bzw. GI254023X [10  $\mu$ M] inkubiert oder unbehandelt belassen. Nach verschiedenen Zeitintervallen (0, 3, 6 und 9 h) wurden mikroskopische Bilder von der Zellschicht aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100  $\mu$ m.

Abbildung 3.29 zeigt die Zellwanderung DMSO, ADAM10-Inhibitor behandelter und unbehaltener HUVECs nach verschiedenen Zeitintervallen. Nach 9 h kann die Migration der DMSO und ADAM10-Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehaltenden Zellen beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen DMSO und ADAM10-Inhibitor Behandlung auf die Migration der HUVECs konnte nicht beobachtet werden.

#### 3.4.6 Serumproben von KHK-Patienten zeigen im Vergleich zu gesunden Patienten eine verstärkte Freisetzung von löslichem VE-Cadherin

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Sekretion von VE-Cadherin in epikardialen Arterien mit der Dichte koronarer Arteriosklerosen assoziiert ist. Dabei wurde die

Plasmakonzentration von VE-Cadherin in peripheren Blut und in koronaren Sinus von Patienten mit akutem Herzinfarkt, mit stabiler Angina pectoris, mit altem Herzinfarkt und einer Kontrollgruppe ohne koronarer arterieller Stenose miteinander verglichen (Soeki *et al.*, 2004). An dieser Stelle sollte anhand von Patientenseren die Konzentration an löslichem VE-Cadherin überprüft werden. Verglichen wurden hierbei die Seren von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und gesunden Patienten. Zur Messung des Gehaltes an löslichen VE-Cadherin kam ein VE-Cadherin-ELISA zum Einsatz.



**Abb. 3.30: Bestimmung des löslichen VE-Cadherins von gesunden- und KHK-Patientenseren**

Das lösliche VE-Cadherin wurde quantitativ im Serum gesunder Patienten (-) und Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) mittels VE-Cadherin-ELISAs bestimmt. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$  vs gesunde Patientenseren.

In Abbildung 3.30 ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Menge des löslichen VE-Cadherins in KHK-Patientenseren und löslichem VE-Cadherin in gesunden Patientenseren zu beobachten. So zeigen Seren von KHK-Patienten eine höhere Konzentration des löslichen VE-Cadherins als Seren von gesunden Patienten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Konzentration von löslichem VE-Cadherin vermutlich mit der Arteriosklerose korreliert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Proteolyse von VE-Cadherin

Das Gefäßsystem stellt ein wichtiges Netzwerk dar, in dem Blut bis in die Peripherie des Körpers und wieder zurück zum Herzen fließt. Endothelzellen nehmen hierbei eine besondere Stellung ein. Sie kleiden die innerste Wandschicht von Blut- und Lymphgefäßen aus. Die Endothelzellen eines menschlichen Körpers treten dabei auf einer Fläche von 4.000 bis 7.000 m<sup>2</sup> mit dem Blut in Kontakt.

Eine der wesentlichen Aufgaben von Endothelzellen ist die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität. Die Endothelzellen bilden eine endotheliale Barriere aus, dabei kontrollieren sie die Passage von löslichen Stoffen und Entzündungszellen aus dem Blut in das Gewebe. Zur Regulation dieser Barrierefunktion nutzen benachbarte Endothelzellen Adhäsionskontakte und Verschlußkontakte, um enge Zell-Zell-Verbindungen aufrechtzuerhalten (Dejana, 2004). Eine Destabilisierung der vaskulären Barriere tritt auf, wenn die Interaktion zwischen den interendothelialen Zelladhäsionsmolekülen gestört wird. Von kritischer Bedeutung ist hier besonders das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin. So führt die Behandlung mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin *in vitro* zur Zerstörung der endothelialen Barriere (Corada *et al.*, 2001). Weiterhin führt der Einsatz von VE-Cadherin Antikörpern *in vivo* zu einer Erhöhung der Permeabilität (Corada *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die für die proteolytische Ektodomänenspaltung von VE-Cadherin verantwortliche Metalloproteinase identifiziert werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob das *Shedding* durch ausgewählte Stimulantien induziert werden kann. Von Interesse war zudem die funktionelle Bedeutung der VE-Cadherin Proteolyse zu charakterisieren.

Herren *et al.* beschrieben bereits, dass VE-Cadherin durch eine noch unbekannte Metalloproteinase während der Apoptose freigesetzt wird (Herren *et al.*, 1998). Mittels spezifischer und Breitbandmetalloproteinase-Inhibitoren konnte die Beteiligung einer Metalloproteinase an der Proteolyse von VE-Cadherin bestätigt werden. Die Inhibition von ADAM10 im Speziellen führte zu signifikanten Reduktion des CTFs und einer Reduktion des löslichen VE-Cadherins in Zellüberständen.

Da im Falle der VE-Cadherin verwandten Adhäsionsmoleküle E-Cadherin (Maretzky *et al.*, 2005a) und N-Cadherin (Reiss *et al.*, 2005) ebenfalls die Beteiligung der Metalloproteinase ADAM10 bei deren Spaltung ausgemacht werden konnte, spricht das erhaltene Ergebnis dafür, dass dies auch für das *Shedding* des Adhäsionsmolekül VE-Cadherin gilt.

In der Regel generiert eine derartige Proteolyse ein C-terminales VE-Cadherin Fragment, welches ein Substrat für die intramembrane Proteolyse darstellt. Die bei der  $\gamma$ -Sekretase Spaltung entstandenen Fragmente besitzen häufig die Fähigkeit direkt die Signaltransduktion via Translokation in den Zellkern zu vermitteln (De Stropper *et al.*, 2005). Dieses „RIPping“ umfasst zahlreiche zelluläre Antworten und ist entscheidend für die Signalweiterleitung von aktivierten Rezeptoren. Das bekannteste Beispiel stellt der Notch-1 Rezeptor dar, dessen intrazelluläre Domäne (IZD) nach dem RIPping in den Zellkern transloziert und dort eine transkriptionelle Antwort induziert (Kramer *et al.*, 2000).

Mittlerweile wurde bereits für eine Vielzahl der transmembranen Moleküle gezeigt, dass diese sowohl durch ADAMs als auch durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden. So erfolgt das *Shedding* der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin (Maretzky *et al.*, 2005a) und N-Cadherin (Reiss *et al.*, 2005) zunächst durch ADAM10 und anschließend durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Die Substrate CD44 (Murakami *et al.*, 2003), L1 (Maretzky *et al.*, 2005) und APP (Selkoe, 1998) werden neben ADAM10 ebenfalls durch ADAM17 in der extrazellulären Domäne und im Anschluss daran durch die  $\gamma$ -Sekretase in der transmembranen Domäne geschnitten.

Die Rolle der C-terminalen Fragmente für die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und N-Cadherin sind zum Teil bekannt. So führt das *Shedding* von E-Cadherin durch ADAM10 zur Modulation der subzellulären  $\beta$ -Catenin Lokalisation und zur Signaltransduktion (Gottardi *et al.*, 2001) Die ADAM10 Überexpression in epithelialen Zellen erhöht dosis-abhängig die Expression des  $\beta$ -Catenin Zielgens *cyclin D1* und verstärkt die Zellproliferation (Maretzky *et al.*, 2005a). Das ADAM10-vermittelte N-Cadherin *Shedding* resultiert, ähnlich wie bei E-Cadherin, in einem Wechsel der Zelladhäsivität und führt zu einer dramatischen Umverteilung des  $\beta$ -Catenins von der Zelloberfläche zum zytoplasmatischen Pool, wobei Einfluss auf die Expression der  $\beta$ -Catenin Zielgene genommen wird (Reiss *et al.*, 2005).

Neben der Möglichkeit, dass nach der Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase eine intrazelluläre Domäne eine transkriptionelle Antwort induziert oder das  $\beta$ -Catenin freigesetzt als Signalmolekül in der Zelle agiert, gibt es noch eine dritte Variante bei dem das freigesetzte Fragment eine Funktion ausübt. Dies konnte im Falle von N-Cadherin beobachtet werden. Dabei führt die Proteolyse von N-Cadherin durch die  $\gamma$ -Sekretase zu der Bildung eines C-terminalen Fragments, welches an den Transkriptionsfaktor CBP (CREB *binding protein*) bindet und die Degradation durch das Proteasom fördert. Dadurch wird die CRE (*cyclic AMP response element*)-abhängige Transaktivierung inhibiert. Das CTF fungiert in diesem Fall als Repressor der CBP/CRE-vermittelten Transkription (Marambaud *et al.*, 2003).

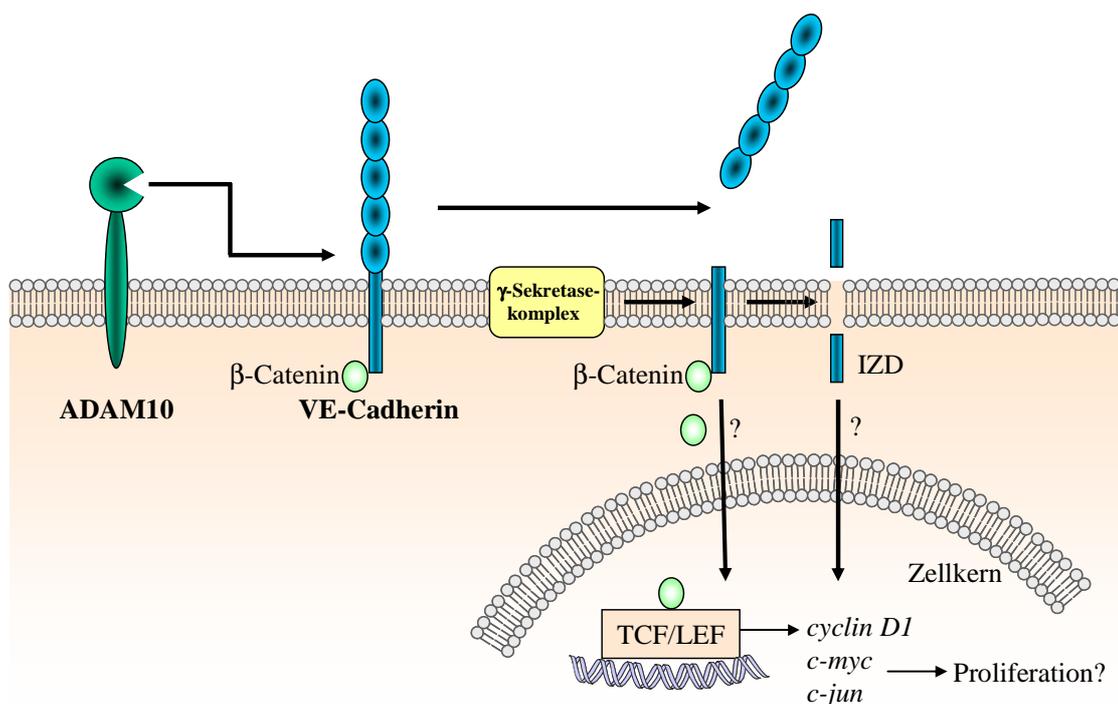
Hierbei stellt sich die Frage, ob auch die Proteolyse von VE-Cadherin einen Einfluss auf die Signaltransduktion nimmt. So könnte das *Shedding* von VE-Cadherin bewirken, dass  $\beta$ -Catenin in den Zellkern transloziert, an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T cell formation/ lymphoid enhance factor*) bindet und so die Expression der  $\beta$ -Catenin Zielgene, wie beispielsweise *cyclin D1*, *c-myc* und *c-jun* hervorruft. Diese Zielgene sind zuständig für Apoptose, genomische Instabilität, Wachstum, Transformation, Proliferation, Angiogenese und Differenzierung (Ponziellie *et al.*, 2005). Die Hauptwirkung der Zielgene auf das Endothel ist die Proliferation von Endothelzellen, welches im Rahmen der Gefäßneubildung von Bedeutung ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Expression der  $\beta$ -Catenin Zielgene *cyclin D1* und *c-myc* sowohl nach Stimulation der VE-Cadherin Proteolyse als auch nach der Inhibition des *Sheddings* untersucht. Die Ergebnisse waren allerdings sehr inhomogen, so dass letztlich keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden konnte, ob die Prozessierung von VE-Cadherin eine  $\beta$ -Catenin-Signalweiterleitung bewirkt.

Der Befund, dass die VE-Cadherin Proteolyse durch ADAM10 vermittelt wird, wurde in RNA-Interferenz Experimenten bestätigt. Hierbei konnte belegt werden, dass die Abnahme der ADAM10 Expression gleichzeitig eine Reduktion der VE-Cadherin Proteolyse nach sich zieht. ADAM10 ist bedeutsam für die Entwicklung während der frühen Embryogenese, insbesondere der Herz- und ZNS-Entwicklung, der Vaskulogenese und Somitogenese (Hartmann *et al.*, 2002). Gleichsam spielt für die Vaskulogenese das VE-Cadherin eine essentielle Rolle (Vittet *et al.*, 1997). Möglicherweise findet hier eine Überlappung der Funktionen von ADAM10 und VE-Cadherin statt. So fällt auf, dass sowohl ADAM10-defiziente Mäuse als auch VE-Cadherin-defiziente Mäuse am Embryonaltag E9,5 sterben. Der Prozess der Vaskulogenese findet während der Tage E6,5 bis E9,5 im Mausembryo statt (Drake und Fleming, 2000). Denkbar wäre, dass während der Vaskulogenese eine Neuorientierung der Endothelzellen stattfindet und hierbei ADAM10 für das Aufbrechen fester VE-Cadherin-Verbindungen eine Rolle spielt. Dies könnte in immunhistochemischen Färbungen E9,5 alter Embryonen eingehender untersucht werden.

In Versuchen mit APMA konnte gezeigt werden, dass ADAM10 direkt für die VE-Cadherin vermittelte Proteolyse verantwortlich ist. Dabei verstärkte APMA die VE-Cadherin Proteolyse nur in Anwesenheit von ADAM10. Die Wirkung von APMA konnte bereits für eine Reihe von transmembranen Molekülen als Aktivator von Metalloproteinasen bestätigt werden, so konnte eine Aktivierung der pro-TGF- $\alpha$  Proteolyse durch TACE mittels APMA gezeigt werden (Merlos-Suarez *et al.*, 2001), ebenfalls konnte das ADAM10 vermittelte Ektodomänen *Shedding* von einer Vorstufe von Betacellulin durch APMA aktiviert werden (Sanderson *et al.*,

2005) und für das konstitutive *Shedding* von CD44 durch ADAM10 konnte ebenfalls eine Aktivierung durch APMA gezeigt werden (Stoeck *et al.*, 2006).

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen kann folgendes Modell aufgestellt werden (Abb. 4.1). VE-Cadherin ist Substrat von ADAM10 und dem  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Bei der proteolytischen Spaltung von VE-Cadherin wird sequentiell zunächst die Ektodomäne von VE-Cadherin durch ADAM10 freigesetzt. Anschließend erfolgt die Spaltung der transmembranen Domäne durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Es wäre vorstellbar, dass durch das *Shedding* von VE-Cadherin, ähnlich wie bei N-Cadherin, es zu einem Ablösen des  $\beta$ -Catenins kommt, welches daraufhin in den Zellkern transloziert und dort die Zielgene aktiviert (Reiss *et al.*, 2005, Marambaud *et al.*, 2003). Desweiteren könnte die Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase eine intrazelluläre Domäne generieren, die in den Zellkern gelangt und dort mit Aktivatoren oder Repressoren interagiert und so die Expression von Zielgenen beeinflusst.



**Abb. 4.1: Schematisches Modell der ADAM10-abhängigen VE-Cadherin Proteolyse**

ADAM10 ist in der Lage, VE-Cadherin konstitutiv in einen löslichen VE-Cadherin Anteil und in ein C-terminales Fragment zu spalten. Das C-terminale Fragment kann im weiteren Prozess intramembran durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert werden. Die entstehende intrazelluläre Domäne (IZD) könnte an Signaltransduktionswegen beteiligt sein oder direkt in den Zellkern wandern, dort mit Aktivatoren oder Repressoren interagieren und die Expression bestimmter Zielgene beeinflussen. Ebenso kann das an VE-Cadherin gebundene  $\beta$ -Catenin in den Zellkern translozieren, an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T cell formation/ lymphoid enhance factor*) binden und so die Expression der  $\beta$ -Catenin Zielgene, so beispielsweise *cyclin D1*, hervorrufen.

#### 4.2 Regulation der VE-Cadherin Proteolyse

Das *Shedding* transmembraner Proteine kann durch eine Vielzahl äußerer Faktoren verstärkt werden, wie z. B. PMA, Ionomycin und Zytokine. ADAM10 ist neben ADAM17 eine der wichtigsten Metalloproteinasen, die die proteolytische Spaltung vieler transmembraner Moleküle vollzieht. Dabei ist ADAM17 oftmals für das induzierte *Shedding* und ADAM10 für das konstitutive *Shedding* verantwortlich. Das induzierbare *Shedding* von VE-Cadherin wurde unter Einsatz einer Reihe verschiedener Stimulantien eingehender untersucht.

Die bei Herren *et al.* beschriebene erhöhte Freisetzung von VE-Cadherin während der Apoptose unter Serumentzug (Herren *et al.*, 1998) konnten in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit Staurosporin eine Zunahme des VE-Cadherin *Sheddings*. Das durch Staurosporin induzierte *Shedding* konnte durch Inhibition von ADAM10 aufgehoben werden. Staurosporin wirkt als potenter Inhibitor der Proteinkinase C (PKC), der Thrombozytenaggregation und induziert Apoptose in vielen Säugetier-Zelltypen. Neben Staurosporin existieren auch physiologische Substanzen die Proteinkinase C inhibieren, wie natürliche Bisindolylmaleimide die die Schleimpilze *Arcyria major* beziehungsweise *Arcyria denudata* produzieren (Steglich, 1989) oder das Calphostin C aus *Cladosporium cladosporioides* (Kobayashi *et al.*, 1989).

Die Inhibition der Proteinkinase C hatte keinen Einfluss auf die Proteolyse von VE-Cadherin, daher wird vermutlich der Einfluss von Staurosporin auf deren Wirkung als Induktor der Apoptose begründet sein.

Die Konsequenzen für die Staurosporin-stimulierten Endothelzellen könnte eine verstärkte Aufhebung der Endothelzelladhäsion beinhalten. In immunzytochemischen Färbungen von PAEC (Porcine Endothelzellen) unter Staurosporin-Einfluss zeigten Studien, dass nach 10 min bereits eine Aufhebung der Zellgrenzen zu beobachten war und nach 60 min kaum noch feste Zellverbindungen zu erkennen waren (Kabir *et al.*, 2002). Für E-Cadherin ist beschrieben worden, dass die Behandlung von H184A1 (humane Epithelzelllinie) Zellen mit Staurosporin die Bildung zweier Fragmente generiert. Unter Einsatz des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors TAPI konnte beobachtet werden, dass das größere Fragment in der Menge abnahm und das kleinere Fragment zunahm (Steinhusen *et al.*, 2000). Staurosporin scheint auch für das Metalloproteinase-abhängige *Shedding* anderer Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Behandlung der Zellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin, welches den extrazellulären Calcium-Einstrom in die Zelle bewirkt, führt zur Aktivierung des *Sheddings* von VE-Cadherin. Die durch Ionomycin induzierte Spaltung nahm durch gleichzeitige ADAM10 Inhibition

wieder ab. Die mit Ionomycin erhöhte VE-Cadherin Spaltung korrelierte in der Immunzytochemie mit einem verstärkten Verlust von Zellkontakten. Die gleichzeitige Inhibition von ADAM10 hob den Effekt von Ionomycin vollständig auf.

Für CD44 konnte in anderen Studien beobachtet werden, dass der durch Ionomycin verursachte Calcium-Einstrom zu einem verstärkten ADAM10 vermittelten *Shedding* von CD44 führt (Nagano *et al.*, 2004). Dieser Effekt wird darauf zurückgeführt, dass ADAM10 durch die Assoziation mit Calmodulin reguliert wird. Strömt Calcium in die Zelle, so bindet das an ADAM10 assoziierte Calmodulin Calcium, dies bewirkt eine Konformationsänderung des Calmodulins, die die Dissoziation von ADAM10 fördert. Infolgedessen zeigt ADAM10 ohne assoziiertes Calmodulin eine erhöhte Sekretaseaktivität, was ein verstärktes *Shedding* der ADAM10 Substrate hervorruft. Ein vergleichbarer Mechanismus wäre auch für die VE-Cadherin Proteolyse denkbar. Extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom bewirkt eine hohe Zellmotilität durch eine verminderte Zell-Matrix-Adhäsion (Nagano *et al.*, 2004). Der Calcium-Einstrom aus Calciumspeichern im Endoplasmatischen Retikulum erfolgt nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch ihre Liganden. Dabei kommt es zur Spaltung des in der Zytoplasmamembran lokalisierten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> wechselwirkt mit dem im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten IP<sub>3</sub>-Rezeptor, ein Liganden-regulierter Calciumkanal, und führt zum Calcium-Einstrom ins Zytosol.

Verschiedene vasoaktive Substanzen, wie Histamin und Thrombin, führen ebenfalls zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration. In der Folge führt dies sehr wahrscheinlich ebenso zu einer Aktivierung von ADAM10. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, führte die Stimulation mit Thrombin zu einer verstärkten VE-Cadherin Proteolyse. RNA-Interferenz Experimente zeigten die Beteiligung von ADAM10 bei dem Thrombin-induzierten *Shedding* von VE-Cadherin. In immunzytochemischen Färbungen führte Thrombin zu einer reversiblen Abnahme von VE-Cadherin in den Zellkontakten. Die Inhibition von ADAM10 verhinderte weitgehend den Verlust von VE-Cadherin. Thrombin ist eine multifunktionelle Serinprotease, die an Orten der Gefäßverletzung gebildet wird. Offene Zellzwischenräume erhöhen die Permeabilität des Endothels, in der Folge dringen vermehrt Blutzellen in das Gewebe um an den Ort der Entzündung zu gelangen. Zudem dringt verstärkt Flüssigkeit in das Gewebe und führt zur Ausbildung eines Ödems (Dejana *et al.*, 2009).

Thrombin ist darüber hinaus ein Blutgerinnungsfaktor und ein wichtiges Protein in der Gerinnungskaskade, so wandelt es lösliches Fibrinogen in nicht lösliches Fibrin um und katalysiert eine Reihe anderer Koagulations-verwandter Reaktionen. Thrombin ist in der

physiologischen und der pathologischen Koagulation involviert. Zudem ist Thrombin ein wichtiger Faktor beim Vasospasmus, einer plötzlich krampfartigen Verengung eines Gefäßes gefolgt von einer subarachnoidalen Blutung. Dabei setzt verklumptes Blut zerstörter zerebraler Aneurysmen Thrombin frei. Dies induziert eine akute und ausgedehnte Stenose des Blutgefäßes, was in einer Minderdurchblutung des Gehirns und zu einem Schlaganfall führen kann (Licari und Kovacic, 2009).

Eine verstärkte VE-Cadherin Proteolyse durch Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  als auch dem PKC-Agonist PMA konnte nicht nachgewiesen werden. Für E-Cadherin wurde gezeigt, dass die Stimulation mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  in humanen Keratinozyten ein verstärktes *Shedding* des Adhäsionsmoleküls induziert. Die Zunahme der E-Cadherin Freisetzung wurde durch MAP Kinase Signalwege aktiviert. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  waren zudem in der Lage die Aktivität von ADAM10 zu erhöhen (Maretzky *et al.*, 2008). Da in unseren Versuchen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  keinen Effekt auf das stimulierte *Shedding* von VE-Cadherin ausübten, kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass dieser Effekt Zelltyp-abhängig ist.

#### **4.3 Einfluss von ADAM10 auf die Permeabilität des Endothels**

Das konfluente Endothel bildet eine selektive Barriere zwischen dem vaskulären Raum des Blutgefäßes und dem Gewebe aus. Die Barrierefunktion des Endothels als Antwort von inflammatorischen Mediatoren, wie beispielsweise Thrombin, wird begleitet durch das Abrunden der Zellen während der Leukozytentransmigration und der Ausbildung endothelialer Lücken zwischen den Endothelzellen. Die endotheliale Integrität ist abhängig vom Zytoskelett, welches die Bildung von Aktin Stressfasern sicherstellt und über Aktomysin-getriebene Kontraktion die Zellgestalt und Adhäsion reguliert (Bogatcheva *et al.*, 2002).

Die endotheliale Barriere wird durch eine Reihe von Zelladhäsionsmolekülen, darunter VE-Cadherin, PECAM-1, CD99 und den JAMs, reguliert. Vor allem VE-Cadherin scheint besonders die Permeabilität zu modulieren (London *et al.*, 2009). Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit war, dass ADAM10 die Permeabilität einer HUVEC Zellschicht beeinflusst. Die Inhibition von ADAM10 führt zu einer Abnahme der Permeabilität. Die Überexpression von ADAM10 hingegen trug zu einer deutlichen Zunahme der Permeabilität bei. ADAM10 ist demnach in der Lage die endotheliale Permeabilität zu moduliert.

In Versuchen mit vasoaktiven Substanzen konnte beobachtet werden, dass die Stimulation mit Thrombin eine Zunahme der Permeabilität während einer Stunde bewirkt. Die gleichzeitige

Inhibition von ADAM10 in Gegenwart von Thrombin reduzierte die Permeabilität, konnte den durch Thrombin hervorgerufenen Effekt allerdings nicht vollständig aufheben. Dieser Befund zeigt, dass die Aktivität von ADAM10 zu dem Thrombin-Effekt beiträgt, dass aber auch noch andere Faktoren auf die Permeabilität einen Einfluss ausüben. Denkbar wäre, dass noch andere Zelladhäsionsmoleküle einer proteolytischen Prozessierung nach Thrombin-Stimulation ausgesetzt sind oder die Moleküle einer Endozytose unterliegen.

Im Rahmen der Untersuchung der Permeabilität kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt von ADAM10 nicht auch auf der Proteolyse anderer Zelladhäsionsmoleküle beruht.

Ein wichtiges Adhäsionsmolekül ist unter anderem PECAM-1. PECAM-1 spielt eine Rolle in der Angiogenese, vaskulären Wundheilung und Kontrolle der Leukozytenextravasation (Newman *et al.*, 1990, DeLisser *et al.*, 1994, Muller *et al.*, 1993). Des Weiteren wird es nicht nur auf Endothelzellen sondern auch auf Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und bestimmten T-Zell-Subgruppen exprimiert. Es ist diffus auf subkonfluent wachsenden Endothelzellen verteilt, aber konzentriert in Zell-Zellgrenzen sowie in Endothelzellkontakten vorhanden und vermittelt eine homophile Interaktion (Albelda *et al.*, 1991). Es gibt zahlreiche Hinweise die zeigen, dass PECAM-1 ein Schlüsselprotein in der Adhäsionskaskade ist, die zur Extravasation von Leukozyten während entzündlicher Prozesse führt. Muller *et al.* zeigte, dass durch die Behandlung von Monozyten und Neutrophilen mit PECAM-1 spezifischen Antikörpern die Emigration quer über die Endothelzellschicht inhibiert werden kann. Wird die endotheliale Zellverbindung PECAM-1 blockiert, wird ebenso effektiv die Leukozytentransmigration inhibiert, dies ist ein Indiz dafür, dass PECAM-1 auf beiden Seiten - auf Endothelzellen ebenso wie auf der Leukozytenseite - auf den Transmigrationsprozess einwirkt (Muller *et al.*, 1993).

Das *Shedding* von PECAM-1 konnte in einigen Studien bereits beobachtet werden. So führt die Behandlung von HIV-infizierten PBMCs mit CCL2 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*) zum induzierten *Shedding* von PECAM-1 (Eugenin *et al.*, 2006). Weiterhin unterliegt PECAM-1 während der Apoptose einer Proteolyse und wird von der Zelloberfläche geschnitten, wobei ein 100 kDa lösliches Protein im Zellkulturmedium akkumuliert. Das *Shedding* von PECAM-1 wird durch eine Metalloproteinase vermittelt, da die Spaltung durch GM6001 inhibiert werden kann (Ilan *et al.*, 2001).

Neben VE-Cadherin und PECAM-1 spielen noch weitere Zelladhäsionsmoleküle eine Rolle beim Aufbau der endothelialen Permeabilität. Für das transmembrane Glykoprotein JAM-A (*junctional adhesion molecule-A*), konnte gezeigt werden, dass dieses durch die Metalloproteinase ADAM17 und in einem geringeren Maße auch durch ADAM10

proteolytisch prozessiert wird (Koenen *et al.*, 2009). JAM-A gehört zur Immunglobulin Superfamilie und wird in Endothel- und Epithelzellen sowie in Leukozyten und Thrombozyten exprimiert (Weber *et al.*, 2007, Nourshargh *et al.*, 2006, Bradfield *et al.*, 2007). JAM-A ist in der Organisation von Verschlusskontakten involviert, wobei es die Schaffung einer vaskulären Diffusionsbarriere schafft (Mandell *et al.*, 2006, Aurrand-Lions *et al.*, 2001). Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Migration und Angiogenese von kultivierten Endothelzellen (Cooke *et al.*, 2006, Naik und Naik, 2006). JAM-A wird konstitutiv von Endothelzellen und Epithelzellen durch Proteolyse freigesetzt. Die Freisetzung von JAM-A wird durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , durch PMA und PAF (*Platelet-activating factor*) verstärkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  die Aktivität von ADAM17 hochregulieren. Mittels des ADAM10/ADAM17-Inhibitors GW280264X konnte sowohl das konstitutive als auch das induzierte *Shedding* durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , PMA und PAF von JAM-A inhibiert werden. Die Metalloproteinase ADAM17 wurde bereits als relevante Protease des PMA-induzierten *Sheddings* von L-Selektin, VCAM und CX3CL1 im Rahmen der Leukozytenrekrutierung ausgemacht (Peschon *et al.*, 1998, Garton *et al.*, 2003, Garton *et al.*, 2001, Hundhausen *et al.*, 2003). Zudem zeigte die Studie, dass lösliches JAM-A einen antagonistischen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung hat, die Migration von Neutrophilen somit limitiert werden kann (Koenen *et al.*, 2009).

Für das Zelladhäsionsmolekül CD99 konnte bisher keine proteolytische Ektodomänenspaltung durch eine Metalloproteinase nachgewiesen werden. CD99 ist ein 32 kDa Typ I Transmembranprotein und ist präsentiert auf Thymozyten, T-Zellen und vielen anderen hämatopoetischen Zelltypen (Schenkel *et al.*, 2002).

Wird davon ausgegangen, dass die Proteolyse von VE-Cadherin durch ADAM10 Einfluss auf die Permeabilität nimmt, nimmt die Menge des VE-Cadherins auf der Zelloberfläche während der Proteolyse ab. Gleichzeitig kommt es zu einem Verlust von Zell-Zell-Verbindungen, welches eine gesteigerte Permeabilität der Vaskulatur nach sich zieht. In Studien konnte gezeigt werden, dass die ADAM10 Expression in endothelialen Zellen durch LPS oder TNF- $\alpha$  hochreguliert wird (Boulday *et al.*, 2001). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass vor allem während Entzündungsreaktionen verbunden mit einer erhöhten ADAM10 Expression die VE-Cadherin Proteolyse eingeleitet wird und dies wiederum eine verstärkte Durchlässigkeit der Endothelzellen zur Folge hat. In unseren Experimenten konnten wir keine VE-Cadherin Proteolyse unter Einwirkung von TNF- $\alpha$  beobachten. Es wurde aber gezeigt, dass TNF- $\alpha$  die Permeabilität unter gleichzeitiger Reduktion der VE-Cadherin Expression induziert (Hofmann *et al.*, 2002). Daher ist anzunehmen, dass TNF- $\alpha$  nur indirekt die VE-Cadherin Expression auf

der Zelloberfläche beispielsweise durch Aufnahme von VE-Cadherin in intrazelluläre Vesikel verringert und dass eine erhöhte *Shedding*-Aktivität von VE-Cadherin durch TNF- $\alpha$  keine Rolle spielt.

#### 4.4 Einfluss von ADAM10 auf die Transmigration

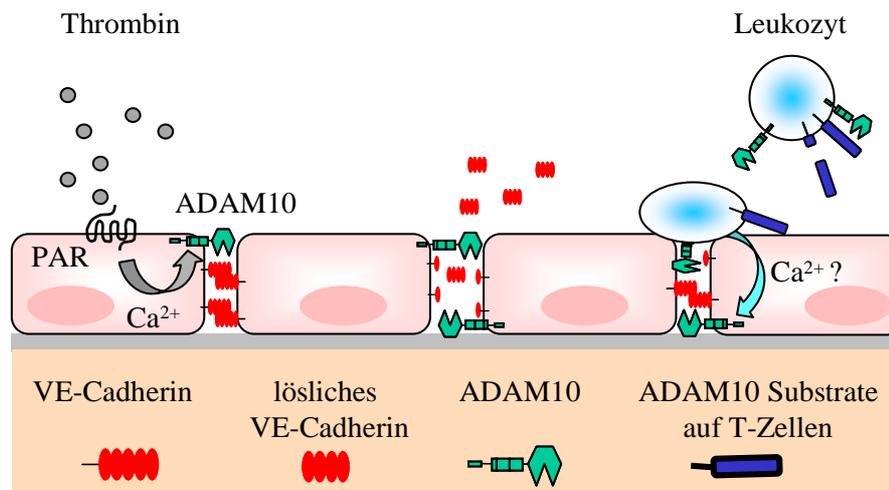
Das Endothel formt die Hauptbarriere für eine Reihe von Makromolekülen und für zirkulierende Leukozyten zwischen Blutstrom und Gewebe. Es galt in der Folge zu klären, inwieweit ADAM10 einen Effekt auf die Transmigration von Leukozyten ausübt.

Zu Beginn wurde der Einfluss von Metalloproteinasen auf die Transmigration von T-Zellen durch eine HUVEC-Zellschicht untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Metalloproteinasen die Transmigration der T-Zellen verringert. Insbesondere die Inhibition von ADAM10 hatte einen deutlichen Einfluss auf die Transmigration. Die Herunterregulierung der ADAM10 Expression zeigte ebenfalls eine Abnahme der Transmigration von T-Zellen. Eine deutliche Reduktion der T-Zell-Transmigration war festzustellen, wenn die ADAM10 Expression auf den T-Zellen herunterreguliert wurde.

Die Transmigration über das Endothel resultiert in der Dissoziation und dem Verlust des VE-Cadherin-Komplexes. In Studien konnte gezeigt werden, dass PMNs, wenn sie auf TNF- $\alpha$  behandelte Zellen gegeben werden, die interendothelialen VE-Cadherin Verbindungen aufbrechen (Maschino *et al.*, 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass PMNs und TNF- $\alpha$  Behandlung zu einer Reduktion der VE-Cadherin Menge auf der Zelloberfläche führen (Allport *et al.*, 1997). In indirekten Immunfluoreszenzaufnahmen konnte beobachtet werden, dass die Adhäsion von Neutrophilen den Verlust des VE-Cadherin-Komplexes innerhalb einer Endothelzellschicht induziert (Allport *et al.*, 1997). Möglicherweise wird durch eine derartige Interaktion auch eine Zunahme der ADAM10 Aktivität induziert.

Im Folgenden soll auf die in dieser Arbeit untersuchten Ereignisse am Endothel eingegangen werden.

### ADAM10 reguliert die VE-Cadherin-abhängige Zelladhäsion



**Abb. 4.2: Schematisches Modell der ADAM10-abhängigen endothelialen Permeabilität**

Thrombin bindet an seinen Rezeptor PAR-1 und induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, die die ADAM10-abhängige VE-Cadherin Proteolyse aktiviert. Dieser Effekt führt zur endothelialen Zelldissoziation und Ausbildung einer Lücke zwischen den Endothelzellen. Weiterhin reguliert ADAM10 die Transmigration von T-Zellen durch das Endothel. Sehr wahrscheinlich induziert die Bindung von aktivierten T-Zellen an das Endothel intrazelluläre Signalkaskaden in den Endothelzellen, die zur ADAM10-Aktivierung und verstärkter VE-Cadherin Proteolyse führen. Das auf T-Zellen exprimierte ADAM10 kann ebenso an der Regulation des Transmigrationsprozesses durch proteolytische Spaltung von Zelladhäsionsmolekülen auf der T-Zelloberfläche oder durch *Trans-shedding* des endothelialen VE-Cadherins beisteuern.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte ein schematisches Modell aufgestellt werden, bei der ADAM10 eine wichtige Rolle bei der endothelialen Permeabilität und der Transmigration von Leukozyten spielt (Abb. 4.2).

Danach ist Thrombin in der Lage, über die Aktivierung des Thrombin-Rezeptors intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  freizusetzen. Der  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom aktiviert ADAM10, indem das Calcium-bindende Calmodulin von ADAM10 dissoziiert. Damit verfügt ADAM10 über eine erhöhte Sekretaseaktivität (Nagano *et al.*, 2004), was in der Folge zum *Shedding* von VE-Cadherin führt. Es besteht die Hypothese, dass die Aktivierung von ADAM10 durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auch als Folge einer Bindung von Leukozyten über Zelladhäsionsmoleküle an das Endothel und durch eine Aktivierung der Endothelzellen eingeleitet wird. So induziert beispielsweise die Bindung der Leukozyten über Integrine an deren Rezeptor ICAM-1 auf den Endothelzellen eine Calciumerhöhung, Aktivierung der Rho GTPase und Phosphorylierung verschiedener Proteine einschließlich der FAK (*focal adhesion kinase*) (Pfau *et al.*, 1995, Etienne-Manneville *et al.*, 2000). Ebenso führt die Bindung an VCAM-1 zu einem erhöhten intrazellulären Calciumeinstrom, Rho-abhängige RAC Aktivierung und ROS Generierung (Matheny *et al.*, 2000, van Wetering *et al.*, 2003, Cook-

Mills *et al.*, 2004). Eine weitere Aktivierung der ADAMs durch ROS kann diskutiert werden, so wurde bereits mehrfach beschrieben, dass ROS das ADAM17-abhängige *Shedding* induziert (Zhang *et al.*, 2001). Dies gilt vermutlich auch für ADAM10 (Fischer *et al.*, 2004). Neben der Aktivierung der ADAMs auf den Endothelzellen kann theoretisch auch das auf den Leukozyten exprimierte ADAM10 zur Regulation der Transmigration beitragen, indem die proteolytische Spaltung des VE-Cadherins durch *Trans-shedding* erfolgt. Dabei wird das VE-Cadherin auf den Endothelzellen durch ADAM10 der Leukozyten gespalten. In *Trans-shedding* Experimenten konnte beobachtet werden, dass das VE-Cadherin ADAM10-defizienter MEFs, die mit VE-Cadherin transfiziert und mit T-Zellen co-inkubiert wurden, einer vollständigen Proteolyse oder Degradation unterlag, da weder das Volllängenprotein noch das Spaltfragment nachweisbar waren. Deshalb sind keine Aussagen über das *Trans-shedding* von VE-Cadherin möglich. Weiterhin besteht jedoch die Möglichkeit, dass T-Zellen Substanzen sezernieren, die die Aktivität von ADAM10 auf den Endothelzellen heraufregulieren. In Co-Kultivierungsstudien konnten wir dies bereits beobachten. Hierbei wurden T-Zellen einerseits indirekt mit HUVEC Zellen co-kultiviert, wobei die Zellen durch einen 0,4 µm Filtereinsatz voneinander getrennt wurden und andererseits T-Zellen direkt mit HUVEC Zellen inkubiert. In beiden Fällen konnte eine Zunahme der Pro- und maturen Form von ADAM10 beobachtet werden. Die direkte Inkubation der T-Zellen mit den HUVEC Zellen zeigte eine stärkere Aktivierung von ADAM10 als die indirekte Co-Kultivierung. Die direkte Bindung von Leukozyten an das Endothel bewirkt demnach eine stärkere Aktivierung der Metalloproteinase. Dies kann möglicherweise durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen oder aber durch Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von ADAM10 beispielsweise auch durch die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ , die von T-Zellen sekretiert werden, heraufgesetzt wird (Boulday *et al.*, 2001, Bandyopadhyay *et al.*, 2006).

#### 4.5 Rolle der ADAMs bei der Angiogenese

Die Funktionen des Endothels sind vielfältig. Neben der Rekrutierung und Transmigration der Leukozyten oder auch der Regulation des Gefäßtonus durch vasoaktive Substanzen spielen auch die Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, und die Migration der Endothelzellen eine Rolle.

Trochon *et al.* konnten zeigen, dass die Inhibition der ADAMs die dosis-abhängige *Tube Formation* und damit die Angiogenese reduziert (Trochon *et al.*, 1998). Demnach scheinen

ADAMs eine Funktion bei der Angiogenese zu haben. Der Einsatz von rekombinantem ADAM10 konnte in dieser Arbeit keinen Effekt auf die Angiogenese bestätigen. Insofern könnten andere ADAMs in die Gefäßneubildung involviert sein. So konnte ADAM17 bereits als wichtiger Regulator verschiedener Schlüsselschritte während der Angiogenese ausgemacht werden. Der *knockdown* von ADAM17 durch siRNA als auch die Inhibition von ADAM17 zeigte eine Destabilisierung des kapillaren Netzwerkes auf dreidimensionalem Matrigel (Gööz *et al.*, 2009). ADAM8 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Proliferation und Migration von Endothelzellen während der Angiogenese (Mahoney *et al.*, 2009). ADAM15 ist möglicherweise auch in der Angiogenese involviert (Komiya *et al.*, 2005). ADAMs spielen demnach eine wichtige Funktion während der Angiogenese.

Trochon *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass die Inhibition der ADAMs dosis-abhängig die Migration von HMEC-1 (*human dermal microvascular endothelial cells*) unterbindet (Trochon *et al.*, 1998). Mit dem spezifischen ADAM10-Inhibitor konnte kein Unterschied bezüglich der Migration von HUVECs im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt werden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass es sich bei den HMEC-1 um mikrovaskuläre Endothelzellen handelt, die HUVECs aber makrovaskuläre Endothelzellen sind. Des Weiteren haben Trochon *et al.* in der Studie einen allgemeinen ADAM-Inhibitor verwendet, wohingegen unsere Versuche mit dem spezifischen ADAM10-Inhibitor durchgeführt wurden. In Glioblastomzellen fördert das ADAM10-vermittelte *Shedding* von N-Cadherin die Zellmigration (Kohutek *et al.*, 2009). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in humanen Mesangialzellen die spezifische ADAM10-Inhibition durch siRNA zu einer Reduktion der Zellmigration führte (Schramme *et al.*, 2008). Auch die Inhibition von ADAM10 auf E-Cadherin exprimierenden HaCaTs (humane Keratinozyten) zeigte einen Einfluss auf die Migration (Maretzky *et al.*, 2005a). Scheinbar hat ADAM10 keine Bedeutung bei der Migration von HUVECs. Möglicherweise bedarf es noch anderer Metalloproteinasen, die eine Delokalisation anderer Zelladhäsionsmoleküle bewirken und damit die Migration der HUVECs ermöglichen.

Interessanterweise zeigten die mit ADAM10-Inhibitor behandelten HUVECs im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine weitaus längere Lebensdauer. Es ist zu vermuten, dass die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verbindung eine wichtige Rolle beim Überleben der Zellen spielt. So scheint das Verhindern der VE-Cadherin Proteolyse durch Inhibition von ADAM10, den Erhalt der VE-Cadherin-Verbindungen zu bewirken und eine längere Lebensdauer nach sich zu ziehen. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von VE-Cadherin mit VEGFR-2 entscheidend für das Überleben der Endothelzellen ist (Carmeliet *et al.*, 1999).

#### 4.6 Die Bedeutung von ADAM10 bei der Arteriosklerose

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die klinische Relevanz der proteolytischen Ektodomänen-spaltung von VE-Cadherin. In einer Studie konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte VE-Cadherin Freisetzung in epikardialen Arterien mit koronarer Arteriosklerose assoziiert war (Soeki *et al.*, 2004). Dies konnte in eigenen Versuchen bestätigt werden. Dazu wurde das Serum gesunder Patienten mit dem von Patienten, die an der koronaren Herzkrankheit erkrankt waren, verglichen. Hierbei konnte ebenfalls ein signifikant erhöhter Level an löslichem VE-Cadherin in den Patientenserum mit koronarer Herzkrankheit gemessen werden. Demnach scheint es einen wichtigen Zusammenhang zwischen VE-Cadherin Proteolyse und Arteriosklerose zu geben. Zu Überlegen wäre, ob der Einsatz des ADAM10-Inhibitors zur therapeutischen Behandlung bei einer Arteriosklerose sinnvoll ist. Bislang wurde ADAM10 als Ziel für Anti-Krebs-Therapien diskutiert (Moss *et al.*, 2008). So suchen pharmazeutische Unternehmen aktiv ADAM10-Inhibitoren für die Behandlung von Krebserkrankungen bei denen bekannt ist, dass ADAM10 die Freisetzung des ErbB Rezeptors bewirkt. Dabei wird HER2/ErbB2 von der Zellmembran geschnitten, was ein notwendiges Ereignis für die Proliferation von HER2 positiven Tumorzellen ist (Moss *et al.*, 2008). Weiterhin ist ADAM10 fähig die Prozessierung von Betacellulin zu vermitteln. Ein Inhibitor gegen ADAM10 kann gegen EGFR/ErbB1 und HER4/ErbB4 Rezeptor positive Tumorzellen die Betacellulin-abhängig sind eingesetzt werden (Moss *et al.*, 2008). In einem anderen Fall ist ADAM10 die Hauptquelle für das *Shedding* von HER2. Die Inhibition von ADAM10 bietet einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Brustkrebs und verschiedener weiterer Krebsarten die eine HER2 Signalübertragung aufweisen (Liu *et al.*, 2006). ADAM10 weist für viele verschiedene Moleküle die mit der Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration von Krebs eingehen eine Sekretaseaktivität auf, darunter Notch, E-Cadherin, CD44 und L1. ADAM10 stellt hierbei ein Schlüsselmolekül dar, bei dem durch spezifische Inhibition, die pharmakologische Behandlung gegen Krebserkrankungen möglich ist. Es bleibt noch zu klären, ob neben der Behandlung von Tumoren auch die Behandlung von Arteriosklerose unter Verwendung eines ADAM10-Inhibitors sinnvoll wäre.

In einer weiteren Studie konnte VE-Cadherin als Marker für die Progression von arteriosklerotischen Plaques ausgemacht werden. In carotiden Plaques konnte eine starke Expression von VE-Cadherin beobachtet werden, die verbunden war mit einer Plaque Instabilität, hohen Dichte an Stenosen und klinischen Ereignissen (Sigala *et al.*, 2003). Arteriosklerose und thrombotische Komplikationen treten auch verstärkt bei gesunden Frauen postmenopausal auf. Im Rahmen einer Hormontherapie wirkt die Gabe von Östrogenen

cardioprotektiv. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Verabreichung von Östrogenen zu einer signifikanten Abnahme des löslichen VE-Cadherins im Serum führt (Christodoulakos *et al.*, 2004). Eine Verringerung der VE-Cadherin Proteolyse scheint auch hier einen schützenden Effekt auf die Gefäße auszuüben.

Interessanterweise konnte auch beobachtet werden, dass oxidiertes LDL (oxLDL) VE-Cadherin innerhalb der endothelialen Verbindungen herunterreguliert (Hashimoto *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass oxLDL die Initiation von Monozyten während der transendothelialen Migration während der Arteriosklerose fördert. Für das oxLDL wurde beschrieben, dass es einen breiten Effekt auf Zellen der Vaskulatur ausübt. So fördert es die Arteriogenese, indem Zelladhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 und MCP-1 auf den Endothelzellen herunterreguliert werden (Kume *et al.*, 1992, Klouche *et al.*, 1999, Mertens *et al.*, 2001). Für arteriosklerotische Läsionen *in vivo* wurde beschrieben, dass oxLDL vorrangig subendothelial akkumuliert, möglicherweise weil ein relativ geringes Level an Antioxidantien in der subendothelialen Schicht im Vergleich zum Plasma vorkommt (Dhaliwal *et al.*, 1999).

Lösliches VE-Cadherin ist ebenso involviert in die Pathogenese des ovariellen Hyperstimulationssyndroms und ist wahrscheinlich ein Indikator der Corpus Luteum Funktion nach ovarieller Hyperstimulation (Villansantei *et al.*, 2008). Ebenfalls ist im Serum von Patienten mit multiplen Myelomen verstärkt lösliches VE-Cadherin vorzufinden (Wrobel *et al.*, 2006).

Insgesamt zeigen die hier erhobenen Daten, dass ADAM10 ein wichtiger Regulator für die Funktion des Endothels darstellt.

#### 4.7 Ausblick

Um die Bedeutung des VE-Cadherin *Sheddings* am Endothel zu klären, wäre es wichtig noch weitere Erkenntnisse zur Proteolyse von VE-Cadherin zu erhalten. Interessant wäre es zu zeigen, ob  $\beta$ -Catenin nach der Spaltung von VE-Cadherin die Expression von Zielgenen im Zellkern reguliert. Um dies zu überprüfen, könnte man HUVEC Zellen mit ADAM10 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfizieren und in Gegenwart bzw. Abwesenheit eines Stimulanz inkubieren. Die Zelllysate sollten anschließend auf deren  $\beta$ -Catenin Zielgene hin wie *cyclin D1*, *c-myc* und *c-jun* miteinander verglichen werden. Ein Ausbleiben der Induktion dieser Zielgene bei den ADAM10 siRNA-transfizierten Zellen wäre dann ein Hinweis, dass durch das *Shedding* des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin  $\beta$ -Catenin freigesetzt wird und in den Zellkern transloziert.

Ein weiteres Ziel könnte sein, der Frage nach der Bedeutung der VE-Cadherin Proteolyse während der Arteriosklerose nachzugehen. So könnten arteriosklerotische Gefäße mit gesunden Gefäßen im Hinblick auf die Expression und Lokalisation von VE-Cadherin und ADAM10 miteinander verglichen werden.

Grundsätzlich bleibt auch zu klären, welche physiologischen Faktoren neben Thrombin noch an der Aktivierung der VE-Cadherin Proteolyse beteiligt sind. In diesem Zusammenhang könnten noch andere vasoaktive Substanzen, wie Histamin oder Serotonin auf deren Einfluss auf das VE-Cadherin *Shedding* untersucht werden.

Weiterhin ist noch offen, welche Stellung die VE-Cadherin Proteolyse während der Leukozytentransmigration einnimmt. Hier bleibt die Frage zu klären, ob Leukozyten während der Transmigration durch das Endothel VE-Cadherin durch *Trans-shedding* spalten oder ob andere Mechanismen einen Verlust der VE-Cadherin Zellkontakte hervorrufen und damit die Migration der Leukozyten über das Endothel ermöglichen.

Um letztendlich herauszufinden, ob die ADAM10-vermittelte VE-Cadherin Proteolyse *in vivo* relevant ist, wären Untersuchungen am Mausmodell sinnvoll. Einerseits könnte die Generierung einer konditionalen ADAM10 *knockout* Maus, bei der ADAM10 nur im Gefäßsystem ausgeschaltet ist, generiert werden. An so einem Modell könnte dann die Bedeutung von ADAM10 auf die Ausbildung von Adhärenzkontakten oder auch auf die Transmigration von Leukozyten untersucht werden. Andererseits könnte eine Transgene Maus untersucht werden, die Gefäßspezifisch z. B. durch einen VE-Cadherin- oder Tie2-Promoter reguliert wird. Hieran könnte unter anderem die Gefäßpermeabilität, aber auch pathophysiologische Vorgänge, wie Arteriosklerose, Krebs und Wundheilung analysiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin ist ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül, welches in den Adhäsionskontakten von Endothelzellen lokalisiert ist. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität und der endothelialen Permeabilität, sowie bei der Regulation der Leukozytentransmigration und der Angiogenese.

Eine erhöhte Freisetzung von löslichem VE-Cadherin konnte im Zusammenhang mit der Arteriosklerose beobachtet werden. Frühere Daten zeigten, dass die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin von einer unbekanntem Metalloproteinase während der Apoptose freigesetzt wird. In dieser Arbeit wurde die proteolytische Spaltung von VE-Cadherin in primären Endothelzellen aus humaner Nabelschnur (HUVECs) in Inhibitionsversuchen, Stimulationsversuchen und RNA-Interferenz Experimenten untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Ektodomäne von VE-Cadherin spezifisch durch die Disintegrin-ähnliche Metalloproteinase ADAM10 gespalten wird. Durch das *Shedding* entsteht eine lösliche Ektodomäne, welche in den extrazellulären Raum freigesetzt wird und ein C-terminales Fragment, welches in der Membran verbleibt. Dieses membrangebundene C-terminale Fragment ist Substrat für den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex und wird innerhalb der transmembranen Domäne proteolytisch prozessiert.

Die ADAM10-vermittelte Proteolyse von VE-Cadherin konnte durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und Staurosporin Behandlung induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass das ADAM10-vermittelte *Shedding* von VE-Cadherin zu einem Auflösen der Adhäsionskontakte beispielsweise während der Aktivierung von Endothelzellen oder der Apoptose führt. Die Aktivierung oder Hemmung von Proteinkinase C zeigte keinen Einfluss auf die Prozessierung von VE-Cadherin.

Eine erhöhte ADAM10 Expression führte zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität. Zudem trägt ADAM10 zur Thrombin-induzierten Abnahme der endothelialen Zelladhäsion bei. Der *knockdown* von ADAM10 in HUVECs sowie in T-Zellen durch siRNA beeinträchtigte die Transmigration von T-Zellen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ADAM10 als neuer Regulator der vaskulären Permeabilität identifiziert werden konnte. Ebenso konnte gezeigt werden, dass ADAM10 bei der Regulation der VE-Cadherin-abhängigen endothelialen Zellkontakte und der trans-endothelialen Migration von Leukozyten über das Endothel eine wesentliche Rolle spielt.

## 5 summary

The vascular endothelial (VE)-cadherin is an important cell adhesion molecule, which is localized in the adherens junctions of endothelial cells. It plays an essential role in maintaining vascular integrity and endothelial permeability, as well as in the regulation of leukocyte transmigration and angiogenesis.

An increased release of soluble VE-cadherin was observed in the context of atherosclerosis. Previous data showed that the extracellular domain of VE-cadherin is released by an unknown metalloproteinase during apoptosis.

In this study, the proteolytic cleavage of VE-cadherin was investigated in primary endothelial cells from human umbilical cord (HUVECs) by inhibition experiments, stimulation experiments and RNA interference experiments.

It was shown that the ectodomain of VE-cadherin is cleaved specifically by the disintegrin and metalloproteinase ADAM10. The shedding results in the generation of soluble ectodomain, which is released into the extracellular space and a carboxyl-terminal fragment, which remains in the membrane. This membrane-bound carboxyl-terminal fragment is a substrate for the  $\gamma$ -secretase complex and is proteolytically processed within the transmembrane domain.

The ADAM10-mediated proteolysis of VE-cadherin could be induced by  $\text{Ca}^{2+}$  influx and staurosporine treatment. This suggests that the ADAM10-mediated shedding of VE-cadherin leads to a dissolution of adherens junctions, for example, during the activation of endothelial cells or apoptosis. The activation or inhibition of protein kinase C had no effect on the processing of VE-cadherin.

Increased expression of ADAM10 led to an increase in endothelial permeability. Moreover ADAM10 contributes to thrombin-induced decrease of endothelial cell adhesion. The knockdown of ADAM10 in HUVECs as well as in T cells by siRNA impaired the transmigration of T cells.

In summary, these data show that ADAM10 could be identified as a novel regulator of vascular permeability. In addition, it was shown that ADAM10 plays an important role in the regulation of VE-cadherin-dependent endothelial cell contacts and in the transendothelial migration of leukocyte across the endothelium.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B and others. 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(10):6362-72.
2. Alahari SK, Reddig PJ, Juliano RL. 2002. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol* 220:145-84.
3. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114(5):1059-68.
4. Albrecht S, Wang S, Holz A, Bergter A, Paululat A. 2006. The ADAM metalloprotease Kuzbanian is crucial for proper heart formation in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 123(5):372-87.
5. Alcaide P, Newton G, Auerbach S, Sehrawat S, Mayadas TN, Golan DE, Yacono P, Vincent P, Kowalczyk A, Luscinskas FW. 2008. p120-Catenin regulates leukocyte transmigration through an effect on VE-cadherin phosphorylation. *Blood* 112(7):2770-9.
6. Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW. 1997. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med* 186(4):517-27.
7. Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Mullberg J. 2000. 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(9):2624-31.
8. Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G. 2000. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 473(3):275-9.
9. Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V and others. 1998. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435(1):39-44.
10. Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. 2001. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *Faseb J* 15(10):1837-9.
11. Anders L, Mertins P, Lammich S, Murgia M, Hartmann D, Saftig P, Haass C, Ullrich A. 2006. Furin-, ADAM 10-, and gamma-secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 26(10):3917-34.

12. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. 1999. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(10):2286-97.
13. Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, Passaniti A, Hasday JD, Goldblum SE. 2006. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(6):L1232-45.
14. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114(Pt 4):629-41.
15. Aurrand-Lions M, Ducan L, Ballestrem C, Imhof BA. 2001. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276(4):2733-41.
16. Bandyopadhyay S, Hartley DM, Cahill CM, Lahiri DK, Chattopadhyay N, Rogers JT. 2006. Interleukin-1alpha stimulates non-amyloidogenic pathway by alpha-secretase (ADAM-10 and ADAM-17) cleavage of APP in human astrocytic cells involving p38 MAP kinase. *J Neurosci Res* 84(1):106-18.
17. Baumer S, Keller L, Holtmann A, Funke R, August B, Gamp A, Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Deutsch U, Vestweber D. 2006. Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* 107(12):4754-62.
18. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382(6592):638-42.
19. Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3(6):401-10.
20. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S and others. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33.
21. Blaschuk OW, Rowlands TM. 2002. Plasma membrane components of adherens junctions (Review). *Mol Membr Biol* 19(2):75-80.
22. Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y. 1990. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* 139(1):227-9.
23. Blobel CP. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):32-43.
24. Blobel CP. 2000. Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev Reprod* 5(2):75-83.

25. Blobel CP, White JM. 1992. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr Opin Cell Biol* 4(5):760-5.
26. Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356(6366):248-52.
27. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C. 2009. Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett* 583(19):3221-4.
28. Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W. 1993. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331(1-2):134-40.
29. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. 2002. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry* 67(1):75-84.
30. Boulday G, Coupel S, Coulon F, Soulillou JP, Charreau B. 2001. Antigrft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype. *Circ Res* 88(4):430-7.
31. Bradfield PF, Nourshargh S, Aurrand-Lions M, Imhof BA. 2007. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(10):2104-12.
32. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87(2):630-41.
33. Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(8):1229-39.
34. Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2):267-83.
35. Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P. 1992. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10075-8.
36. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M and others. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98(2):147-57.

37. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. 2001. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 7(4):425-9.
38. Chantry A, Gregson NA, Glynn P. 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 264(36):21603-7.
39. Christodoulakos G, Lambrinouadaki I, Panoulis C, Papadias C, Economou E, Creatsas G. 2004. Effect of hormone therapy and raloxifene on serum VE-cadherin in postmenopausal women. *Fertil Steril* 82(3):634-8.
40. Chubinskaya S, Mikhail R, Deutsch A, Tindal MH. 2001. ADAM-10 protein is present in human articular cartilage primarily in the membrane-bound form and is upregulated in osteoarthritis and in response to IL-1alpha in bovine nasal cartilage. *J Histochem Cytochem* 49(9):1165-76.
41. Clegg DO, Wingerd KL, Hikita ST, Tolhurst EC. 2003. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front Biosci* 8:d723-50.
42. Cooke VG, Naik MU, Naik UP. 2006. Fibroblast growth factor-2 failed to induce angiogenesis in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(9):2005-11.
43. Cook-Mills JM, Johnson JD, Deem TL, Ochi A, Wang L, Zheng Y. 2004. Calcium mobilization and Rac1 activation are required for VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) stimulation of NADPH oxidase activity. *Biochem J* 378(Pt 2):539-47.
44. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, Mc Donald DM, Ward PA, Dejana E. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17):9815-20.
45. Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. 2001. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* 97(6):1679-84.
46. Coughlin SR. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3(8):1800-14.
47. Dehmel T, Goebel HH, Hartung HP, Lehmann H, Wiendl H, Kieseier BC. 2008. The metalloproteinase-disintegrin ADAM10 is exclusively expressed by type I muscle fibers. *Muscle Nerve* 38(2):1049-51.
48. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* 16(2):209-21.
49. Dejana E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4):261-70.

50. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* 9(10):910-8.
51. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. 1994. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15(10):490-5.
52. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. 1996. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135(2):497-510.
53. De Strooper B. 2005. Nicastrin: gatekeeper of the gamma-secretase complex. *Cell* 122(3):318-20.
54. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. 1999. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 286(1-2):191-205.
55. Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. 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(6):2031-44.
56. Drake CL, Fleming PA. 2000. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 95(5):1671-9.
57. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, Luis de la Pompa J, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B and others. 1999. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol* 162(5):3022-30.
58. Edelman GM. 1985. Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 54:135-69.
59. Endres K, Anders A, Kojro E, Gilbert S, Fahrenholz F, Postina R. 2003. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* 270(11):2386-93.
60. Endres K, Postina R, Schroeder A, Mueller U, Fahrenholz F. 2005. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *Febs J* 272(22):5808-20.
61. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 ( Pt 13):1853-65.
62. Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. 2000. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol* 165(6):3375-83.

63. Eugenin EA, Gamss R, Buckner C, Buono D, Klein RS, Schoenbaum EE, Calderon TM, Berman JW. 2006. Shedding of PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS. *J Leukoc Biol* 79(3):444-52.
64. Evans JP. 1999. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci* 4:D114-31.
65. Fan H, Derynck R. 1999. Ectodomain shedding of TGF- $\alpha$  and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *Embo J* 18(24):6962-72.
66. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 10(6):1337-45.
67. Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Prenzel N, Ullrich A. 2004. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*. 24(12):5172-83.
68. Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362(9387):869-75.
69. Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1(1):27-31.
70. Folkman J. 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 3(7):643-51.
71. Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16):10931-4.
72. Fortini ME. 2001. Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* 13(5):627-34.
73. Franzke CW, Tasanen K, Schacke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C, Zigrino P, Sunnarborg S, Lee DC, Fahrenholz F and others. 2002. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *Embo J* 21(19):5026-35.
74. Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Lee BP, Imhof BA. 2008. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 2):203-11.
75. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW. 2001. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276(41):37993-8001.
76. Gavard J, Gutkind JS. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8(11):1223-34.
77. Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A. 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(4):633-42.

78. Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, Barany F, Paty P, Notterman D, Domany E and others. 2007. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* 67(16):7703-12.
79. Gechtman Z, Alonso JL, Raab G, Ingber DE, Klagsbrun M. 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem* 274(40):28828-35.
80. Gong P, Angelini DJ, Yang S, Xia G, Cross AS, Mann D, Bannerman DD, Vogel SN, Goldblum SE. 2008. TLR4 signaling is coupled to SRC family kinase activation, tyrosine phosphorylation of zonula adherens proteins, and opening of the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J Biol Chem* 283(19):13437-49.
81. Gonzales PE, Solomon A, Miller AB, Leesnitzer MA, Sagi I, Milla ME. 2004. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem* 279(30):31638-45.
82. Gööz P, Gööz M, Baldys A, Hoffman S. 2009. ADAM-17 regulates endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 380(1):33-8.
83. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. 2001. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153(5):1049-60.
84. Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Rychlewski M, Dempsey PJ, Raines EW. 2004. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 172(6):3678-85.
85. Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S. 1990. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 195(2):168-71.
86. Gumbiner BM. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148(3):399-404.
87. Gutwein P, Mechttersheimer 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(2):292-4.
88. Haas IG, Frank M, Véron N, Kemler R. 2005. Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *J Biol Chem* 280(10):9313-9.
89. Halama T, Staffler G, Hoch S, Stockinger H, Wolff K, Petzelbauer P. 1999. Vascular-endothelial cadherin (CD144)- but not PECAM-1 (CD31)-based cell-to-cell contacts convey the maintenance of a quiescent endothelial monolayer. *Int Arch Allergy Immunol* 120(3):237-44.

90. Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H. 2000. CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 165(12):6703-9.
91. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena Illert A, von Figura K and others. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11(21):2615-24.
92. Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Tsujioka K, Kajiya F. 2007. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis* 194(2):e9-17.
93. Hatta M, Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M. 1991. Genomic organization and chromosomal mapping of the mouse P-cadherin gene. *Nucleic Acids Res* 19(16):4437-41.
94. Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289(5483):1360-5.
95. Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE. 2001. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):8018-23.
96. Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, Gulino-Debrac D. 2003. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 278(16):14002-12.
97. Herren B. 2002. ADAM-mediated shedding and adhesion: a vascular perspective. *News Physiol Sci* 17:73-6.
98. Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. 1998. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 9(6):1589-601.
99. Herren B, Raines EW, Ross R. 1997. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo. *Faseb J* 11(2):173-80.
100. Higashiyama S, Nanba D. 2005. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta* 1751(1):110-7.
101. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. 1994. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 125(6):1327-40.
102. Hofmann S, Grasberger H, Jung P, Bidlingmaier M, Vlotides J, Janssen OE, Landgraf R. 2002. The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression. *Eur J Med Res* 7(4):171-6.

103. Howard L, Lu X, Mitchell S, Griffiths S, Glynn P. 1996. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317 ( Pt 1):45-50.
104. Howard L, Zheng Y, Horrocks M, Maciewicz RA, Blobel C. 2001. Catalytic activity of ADAM28. *FEBS Lett* 498(1):82-6.
105. Huang X, Huang P, Robinson MK, Stern MJ, Jin Y. 2003. UNC-71, a disintegrin and metalloprotease (ADAM) protein, regulates motor axon guidance and sex myoblast migration in *C. elegans*. *Development* 130(14):3147-61.
106. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. 1996. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59(1):3-10.
107. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V and others. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102(4):1186-95.
108. Huovila AP, Almeida EA, White JM. 1996. ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol* 8(5):692-9.
109. Huovila AP, Turner AJ, Peltto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30(7):413-22.
110. Hussain I, Hawkins J, Shikotra A, Riddell DR, Faller A, Dingwall C. 2003. Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J Biol Chem* 278(38):36264-8.
111. Hynes RO. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 9(12):M33-7.
112. Igarashi T, Araki S, Mori H, Takeda S. 2007. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalsin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett* 581(13):2416-2422.
113. Ilan N, Mohsenin A, Cheung L, Madri JA. 2001. PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics. *Faseb J* 15(2):362-72.
114. 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(50):7080-90.
115. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52(11):2745-56.

116. Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, Blobel CP, Himanen JP, Lackmann M, Nikolov DB. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123(2):291-304.
117. Kabir J, Lobo M, Zachary I. 2002. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J* 367(Pt 1):145-55.
118. Karkkainen I, Rybnikova E, Pelto-Huikko M, Huovila AP. 2000. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 15(6):547-60.
119. Kauffman RF, Taylor RW, Pfeiffer DR. 1980. Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 255(7):2735-9.
120. Klouche M, May AE, Hemmes M, Messner M, Kanse SM, Preissner KT, Bhakdi S. 1999. Enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3):784-93.
121. Ko SY, Lin SC, Wong YK, Liu CJ, Chang KW, Liu TY. 2007. Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 245(1-2):33-43.
122. Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. 1989. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 159(2):548-53.
123. Koenen RR, Pruessmeyer J, Soehnlein O, Fraemohs L, Zerneck A, Schwarz N, Reiss K, Sarabi A, Lindbom L, Hackeng TM and others. 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* 113(19):4799-809.
124. Kohutek ZA, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM. 2009. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci* 29(14):4605-15.
125. Komiya K, Enomoto H, Inoki I, Okazaki S, Fujita Y, Ikeda E, Ohuchi E, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y. 2005. Expression of ADAM15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis. *Arthritis Res Ther* 7(6):R1158-73.
126. Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. 2003. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(2):L434-42.
127. Kopan R, Ilagan MX. 2004. Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(6):499-504.

128. Kramer H. 2000. RIPPing notch apart: a new role for endocytosis in signal transduction? *Sci STKE* 2000(29):pe1.
129. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. 1992. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90(3):1138-44.
130. 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 U S A* 96(7):3922-7.
131. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118(6):1511-22.
132. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17):8263-7.
133. LaVoie MJ, Selkoe DJ. 2003. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* 278(36):34427-37.
134. Le Gall SM, Auger R, Dreux C, Mauduit P. 2003. Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J Biol Chem* 278(46):45255-68.
135. Licari LG, Kovacic JP. 2009. Thrombin physiology and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 19(1):11-22.
136. Liu C, Hermann TE. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253(17):5892-4.
137. Liu PC, Liu X, Convington M, Wynn R, Huber R, Hillman M, Yang G, Ellis D, Marando C, Katiyar K, Bradley J, Abremski K, Stow M, Zhuo J, LiYL, Lin Q, Burns D, Xu M, Zhang C, Qian DQ, He C, Sharief V, Weng L, Agrios C, Shi E, Metcalf B, Newton R, Friedman S, Yao W, Scherle P, Hollis G, Burn TC. 2006. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 5(6):657-64.
138. Liu Q, Zhang J, Tran H, Verbeek MM, Reiss K, Estus S, Bu G. 2009. LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener* 4:17.
139. London NR, Whitehead KJ, Li Dy. 2009. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis* 12(2):149-58.
140. Lou O, Alcaide P, Luscinskas FW, Muller WA. 2007. CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J Immunol* 178(2):1136-43.

141. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. 2005. 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(2):161-71.
142. Lum L, Reid MS, Blobel CP. 1998. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem* 273(40):26236-47.
143. Mahoney ET, Benton RL, Maddie MA, Whittemore SR, Hagg T. 2009. ADAM8 is selectively up-regulated in endothelial cells and is associated with angiogenesis after spinal cord injury in adult mice. *J Comp Neurol* 512(2):243-55.
144. Mandell KJ, Holley GP, Parkos CA, Edelhauser HF. 2006. Antibody blockade of junctional adhesion molecule-A in rabbit corneal endothelial tight junctions produces corneal swelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(6):2408-16.
145. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z and others. 2002. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* 21(8):1948-56.
146. 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(5):635-45.
147. Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. 2005a. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26):9182-7.
148. Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K. 2005b. 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* 25(20):9040-53.
149. Maretzky T, Scholz F, Köten B, Proksch E, Saftig P, Reiss K. 2008. ADAM10-mediated E-Cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol* 128(7):1737-46.
150. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö6976. *J Biol Chem* 268(13):9194-7.
151. Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. 2000. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol* 164(12):6550-9.

152. Martin-Padura I, De Castellarnau C, Uccini S, Pillozzi E, Natali PG, Nicotra MR, Ughi F, Azzolini C, Dejana E, Ruco L. 1995. Expression of VE (vascular endothelial)-cadherin and other endothelial-specific markers in haemangiomas. *J Pathol* 175(1):51-7.
153. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A and others. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142(1):117-27.
154. Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. 1997. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol* 158(7):3408-16.
155. Matthews V, Schuster B, Schutze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ and others. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278(40):38829-39.
156. McCulloch DR, Akl P, Samaratunga H, Herington AC, Odorico DM. 2004. Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res* 10(1 Pt 1):314-23.
157. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Jr., Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S and others. 1994. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 370(6490):558-61.
158. Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V and others. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155(4):661-73.
159. Menon C, Ghartey A, Canter R, Feldman M, Fraker DL. 2006. Tumor necrosis factor-alpha damages tumor blood vessel integrity by targeting VE-cadherin. *Ann Surg* 244(5):781-91.
160. Merlos-Suarez A, Ruiz-Paz S, Baselga J, Arribas J. 2001. Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J Biol Chem* 276(51):48510-7.
161. Mertens A, Holvoet P. 2001. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J* 15(12):2073-84.
162. Millichip MI, Dallas DJ, Wu E, Dale S, McKie N. 1998. The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 245(2):594-8.
163. Milner R, Campbell IL. 2002. The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res* 69(3):286-91.

164. Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. 2001. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 61(2):577-81.
165. Moss ML, Bomar M, Liu Q, Sage H, Dempsey P, Lenhart PM, Gillispie PA, Stoeck A, Wildeboer D, Bartsch JW and others. 2007. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* 282(49):35712-21.
166. Moss ML, Lambert MH. 2002. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem* 38:141-53.
167. Moss ML, Stoeck A, Yan W, Dempsey PJ. 2008. ADAM10 as a target for anti-cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 9(1):2-8.
168. Moss ML, White JM, Lambert MH, Andrews RC. 2001. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today* 6(8):417-426.
169. Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med* 170(2):399-414.
170. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178(2):449-60.
171. Murakami D, Okamoto I, Nagano O, Kawano Y, Tomita T, Iwatsubo T, De Strooper B, Yumoto E, Saya H. 2003. Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* 22(10):1511-6.
172. Murphy G, Knauper V, Lee MH, Amour A, Worley JR, Hutton M, Atkinson S, Rapti M, Williamson R. 2003. Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem Soc Symp*(70):65-80.
173. Nagano O, Murakami D, Hartmann D, De Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T, Nakajima M, Shinohara M, Saya H. 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(6):893-902.
174. Naik MU, Naik UP. 2006. Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta specific. *J Cell Sci* 119(Pt 3):490-9.
175. Nakamura T, Abe H, Hirata A, Shimoda C. 2004. ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 3(1):27-39.
176. Navarro P, Ruco L, Dejana E. 1998. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol* 140(6):1475-84.

177. Nelson WJ, Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303(5663):1483-7.
178. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247(4947):1219-22.
179. Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258(5080):304-7.
180. Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. 2006. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol* 80(4):714-8.
181. Pan D, Rubin GM. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90(2):271-80.
182. Parkin E, Harris B. 2009. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-mediated ectodomain shedding of ADAM10. *J Neurochem* 108(6):1464-79.
183. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN and others. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282(5392):1281-4.
184. Petzelbauer P, Halama T, Groger M. 2000. Endothelial adherens junctions. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5(1):10-3.
185. Pfau S, Leitenberg D, Rinder H, Smith BR, Pardi R, Bender JR. 1995. Lymphocyte adhesion-dependent calcium signaling in human endothelial cells. *J Cell Biol* 128(5):969-78.
186. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386(Pt 1):15-27.
187. Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* 104(1):141-9.
188. Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. 1996. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(3):488-96.
189. Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 181(1):64-78.
190. Ranscht B. 1994. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr Opin Cell Biol* 6(5):740-6.

191. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. 2008. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10). *FASEB J* 22(10):3716-27.
192. Red-Horse K, Crawford Y, Shojaei F, Ferrara N. 2007. Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. *Dev Cell* 12(2):181-94.
193. Reiss K, Maretzky T, Haas IG, Schulte M, Ludwig A, Frank M, Saftig P. 2006. Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281(31):21735-44.
194. Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J* 24(4):742-52.
195. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *Faseb J* 6(3):886-92.
196. Risau W, Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
197. Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP. 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274(6):3531-40.
198. Rose-John S, Heinrich PC. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 300 ( Pt 2):281-90.
199. 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(5):769-79.
200. Sanderson MP, Erickson SN, Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Raines EW, Dunbar AJ, Dempsey PJ. 2005. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J Biol Chem* 280(3):1826-37.
201. Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C. 2001. Ca(2+) signalling and PKCalpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol* 533(Pt 2):433-45.
202. Schachinger V, Zeiher AM. 2000. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol* 89 Suppl 9:IX/70-4.
203. Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. 2002. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 3(2):143-50.
204. Schlondorff J, Becherer JD, Blobel CP. 2000. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347 Pt 1:131-8.

205. 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 ( Pt 21):3603-17.
206. Schramme A, Abdel-Bakky MS, Gutwein P, Obermuller N, Baer PC, Hauser IA, Ludwig A, Gauer S, Schafer L, Sobkowiak E and others. 2008a. Characterization of CXCL16 and ADAM10 in the normal and transplanted kidney. *Kidney Int* 74(3):328-38.
207. Schramme A, Abdel-Bakky MS, Kampfer-Kolb N, Pfeilschifter J, Gutwein P. 2008b. The role of CXCL16 and its processing metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 in the proliferation and migration of human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 370(2):311-6.
208. Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de Strooper B, Janssen O, Saftig P. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* 14(5):1040-9.
209. Schulz JG, Annaert W, Vandekerckhove J, Zimmermann P, De Strooper B, David G. 2003. Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling. *J Biol Chem* 278(49):48651-7.
210. Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteinases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17(1):7-30.
211. Selkoe DJ. 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8(11):447-53.
212. Sigala F, Vourliotakis G, Georgopoulos S, Kavantzias N, Papalambros E, Agapitos M, Bastounis E. 2003. Vascular endothelial cadherin expression in human carotid atherosclerotic plaque and its relationship with plaque morphology and clinical data. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 26(5):523-8.
213. Six E, Ndiaye D, Laabi Y, Brou C, Gupta-Rossi N, Israel A, Logeat F. 2003. The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13):7638-43.
214. Smith CW. 2008. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol* 121(2 Suppl):S375-9; quiz S414.
215. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. 2004. Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J* 68(1):1-5.
216. Steglich W. 1989. Slime moulds (Myxomycetes) as a source of new biologically active metabolites. *Pure Appl Chem* 61(3):281-88.
217. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. 2001. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276(7):4972-80.

- 
218. Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P. 2006. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393(Pt 3):609-18.
219. Stone AL, Kroeger M, Sang QX. 1999. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem* 18(4):447-65.
220. Suzuki S, Sano K, Tanihara H. 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* 2(4):261-70.
221. Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S. 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 25(11):2388-2396.
222. Takeichi M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75(2 Pt 1):464-74.
223. Takeichi M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7(5):619-27.
224. Takeichi M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102(4):639-55.
225. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135(2):397-402.
226. Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Pfeifer M. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2):91-100.
227. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. 2002. Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39(4-5):173-85.
228. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Belleverque P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamell L, Charon D, Kirilovsky J. 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266(24):15771-81.
229. Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. 2006. (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78(1):24-46.
230. Tousseyn T, Thathiah A, Jorissen E, Raemaekers T, Konietzko U, Reiss K, Maes E, Snellinx A, Serneels L, Nyabi O and others. 2009. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 284(17):11738-47.

231. Trochon V, Li H, Vasse M, Frankenne F, Thomaidis A, Soria J, Lu H, Gardner C, Soria C. 1998. Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 2(3):277-85.
232. Tsakadze NL, Sithu SD, Sen U, English WR, Murphy G, D'Souza SE. 2006. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* 281(6):3157-64.
233. Uccini S, Pillozzi E, Stoppacciaro A, Angeloni A, Santarelli R, Faggioni A, Baroni CD, Ruco LP, Sirianni MC, Vincenzi L and others. 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 is not detectable in peripheral blood mononuclear cells of the relatives of sporadic KS patients. *J Invest Dermatol* 108(1):119-20.
234. van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP, Collard JG, Hordijk PL. 2002. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci* 115(Pt 9):1837-46.
235. van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R, ten Klooster JP, Zwaginga JJ, Hordijk PL. 2003. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2):C343-52.
236. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R and others. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440):735-41.
237. Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 19(1):8-15.
238. Villasante A, Pacheco A, Pau E, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. 2008. Soluble vascular endothelial-cadherin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 23(3):662-7.
239. Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, Grassi J, Lopez-Perez E, Checler F. 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(41):37743-6.
240. Vincent PA, Xiao K, Buckley KM, Kowalczyk AP. 2004. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5):C987-97.
241. Vitolo D, Paradiso P, Uccini S, Ruco LP, Baroni CD. 1996. Expression of adhesion molecules and extracellular matrix proteins in glioblastomas: relation to angiogenesis and spread. *Histopathology* 28(6):521-8.
242. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. 1997. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12):6273-8.

243. von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD and others. 2005. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280(18):17777-85.
244. Wang Y, Pampou S, Fujikawa K, Varticovski L. 2004. Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC beta. *J Cell Physiol* 198(1):53-61.
245. Watkins H, Farrall M. 2006. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet* 7(3):163-73.
246. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7(6):467-77.
247. Weis SM, Cheresh DA. 2005. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437(7058):497-504.
248. Whitefield JF, MacManus JP, Gillan DJ. 1973. Calcium-dependent stimulation by a phorbol ester (PMA) of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation. *J Cell Physiol* 82(2):151-6.
249. Willert K, Nusse R. 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8(1):95-102.
250. Wolfsberg TG, White JM. 1996. ADAMs in fertilization and development. *Dev Biol* 180(2):389-401.
251. Wrobel T, Mazur G, Wolowiec D, Jazwiec B, Sowinska E, Kuliczkowski K. 2006. sVE-cadherin and sCD146 serum levels in patients with multiple myeloma. *Clin Lab Haematol* 28(1):36-9.
252. Wu E, Croucher PI, McKie N. 1997. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun* 235(2):437-42.
253. Yoshimura T, Tomita T, Dixon MF, Axon AT, Robinson PA, Crabtree JE. 2002. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *J Infect Dis* 185(3):332-40.
254. Zhang Z, Oliver P, Lancaster JJ, Schwarzenberger PO, Joshi MS, Cork J, Kolls JK. 2001. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *Faseb J* 15(2):303-5.
255. Zheng Y, Saftig P, Hartmann D, Blobel C. 2004. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 279(41):42898-906.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karina Reiß für die Vergabe des spannenden Themas, für die intensive Betreuung der Arbeit und die wertvollen Anregungen und Ratschläge.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Paul Saftig für die wertvollen Hinweise und für die Bereitstellung eines sehr angenehmen und gut ausgestatteten Arbeitsplatzes sowie für die hervorragende wissenschaftliche Atmosphäre.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Manuela Dittmar bedanken für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates meiner Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen. Ich danke Michael Schwake, Judith Blanz, Bernd Schröder, Christian Beimgraben, Marion Willenborg, Marc Schulte, Andrea Rittger, Alexander Schneede, Jenny Schröder, Christina Wehling, Telly Savallas, Silvio Weber, Johannes Prox, Christina Zachos, Maria Sperrhacker, Astrid Evers, Nancy Speck, Johann Groth, Mia Schmied, Nadine Kartschuk, Wienke Lange, Katharina Rothe, Hauke Carstens, Samadhi Aparicio, Stefanie Jessen, Björn Ahrens, Sebastian Held, Tobias Lehmann, Meryem Senkara, Malies Rusch, Katharina Stiebeling, Inez Götting, Prof. Jens Schröder, Prof. Jürgen Harder, Ulrich Gerstel, Joachim Bartels, Maren Simanski, Britta Hansmann, Kerstin Hinrichsen, Ties Latendorf, Jan Fischer, Graziella Podda, Heilwig Janßen, Anke Rose, Jutta Quitzau, Elvira Jeske, Cornelia Wilgus, Claudia Mehrens und Eske Voss.

Des Weiteren danke ich Björn Ahrens, Maria Sperrhacker, Astrid Evers und Nancy Speck, die mir bei der Durchsicht der Arbeit behilflich waren.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in allen Phasen meines Studiums unterstützt haben.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

- dass die Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.
- dass die Arbeit noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.
- dass ich bisher kein früheres Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet habe.

Kiel, den 20.07.2010

---