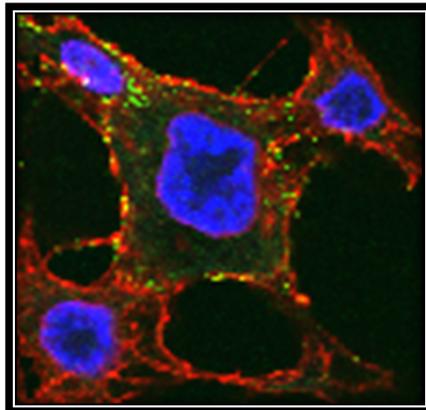


Aus dem Institut für Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE METALLOPROTEASE
ADAM17 –
POTENTIELLER TUMORMARKER UND
SCHLÜSSELREGULATOR IN DER
EPIDERMAL-GROWTH FACTOR RECEPTOR-EXPRESSION
VON PANKREASKARZINOMZELLEN



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
NINA HEDEMANN
aus Lüneburg
Kiel, 2013

Aus dem Institut für Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE METALLOPROTEASE
ADAM17 –
POTENTIELLER TUMORMARKER UND
SCHLÜSSELREGULATOR IN DER
EPIDERMAL-GROWTH FACTOR RECEPTOR-EXPRESSION
VON PANKREASKARZINOMZELLEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
NINA HEDEMANN
aus Lüneburg
Kiel, 2013

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Grötzinger

2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.01.2014

*meiner Familie,
dem Freundeskreis
und der AG Grö ;)*

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	ADAM17 und die Familie der Metalloproteasen	1
1.1.1	Zugehörigkeit und Nomenklatur	1
1.1.2	Struktur-Funktionsbeziehung der ADAM17-Domänen	3
1.1.3	<i>Shedding</i> als regulatorisches Element	5
1.1.4	Physiologische - und pathophysiologische Bedeutung von ADAM17	9
1.2	ADAM17 in Tumorerkrankungen	13
1.2.1	Expression und Lokalisation von ADAM17 in Tumoren	13
1.2.2	Einfluss von ADAM17 auf die potentiell tumorgenerierende Rezeptoren EGFR und Notch1	15
1.2.3	Verändertes Zellverhalten durch Dysregulation von ADAM17 in Tumoren	22
1.3	ADAM17 als Zielstruktur in der Krebsbehandlung	24
1.3.1	Therapeutische Ansätze in der Krebsbehandlung	24
1.3.2	Zielstrukturen der Inhibitor- und Antikörper-basierten Krebstherapie	25
1.3.3	ADAM17-Inhibitoren und Anti-ADAM17-Antikörper	26
1.4	Ziel der Arbeit	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Zelllinien	28
2.1.2	Zellkultur-Medien, -Reagenzien, -Stimulanzen und -Inhibitoren	29
2.1.3	Chemikalien	31
2.1.4	Puffer und Lösungen	31
2.1.5	Kits	34
2.1.6	Größenmarker	35
2.1.7	Antikörper	35
2.2	Methoden	38
2.2.1	Kultivierung adhärenter Zellen	38
2.2.2	Transfektion und Zellyse	38
2.2.3	Einsatz des γ -Sekretase-Inhibitors	39
2.2.4	BCA-Assay	39
2.2.5	Diskontinuierliche SDS-PAGE und Westernblot	39
2.2.6	Durchflusszytometrie	40
2.2.7	Immunozytochemie	41
2.2.8	Transfektion und Vorbereitung von Immunopräzipitations-Gelen für die Massenspektrometrie	42
2.2.9	Proliferations-Assay	44
2.2.10	<i>Scratch-Assay</i> (Wundheilungs-Assay)	45

3	Ergebnisse	46
3.1	ADAM17-Expression in humanen Krebszellen – Verifizierung der monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörper.....	46
3.1.1	ADAM17 ist in verschiedenen humanen Krebszellen detektierbar	46
3.1.2	Der Anti-ADAM17-Antikörper A300 detektiert ADAM17 spezifisch	47
3.1.3	Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche von humanen Krebszellen... ..	48
3.1.4	Sublokalisierung von ADAM17 in humanen Krebszellen.....	52
3.1.5	Kolokalisierung von ADAM17 mit der Zellmembran in Panc 89-Zellen.....	55
3.2	ADAM17 steigert die EGFR-Expression über Notch1-Rezeptor-Aktivierung in Panc 89-Zellen.....	58
3.2.1	ADAM17 steigert die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen	58
3.2.2	Beteiligung des Notch1-Rezeptors in der EGFR-Regulation	62
3.2.3	ADAM17 reguliert die EGFR-Expression über Notch1-Aktivierung	64
3.2.4	Der γ -Sekretase-Inhibitor reduziert die Entstehung des N ^{ICD}	64
3.2.5	EGFR-Expression wird durch Aktivierung des Notch1-Rezeptors über den γ -Sekretase-Komplex reguliert.....	65
3.2.6	ADAM17 steigert die Migration von Panc 89-Zellen.....	66
3.2.7	Identifikation physiologischer ADAM17-Substrate in Panc 89-Zellen.....	68
3.3	Etablierung geeigneter Antikörpertestsysteme und Testung der monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörper.....	70
3.3.1	Die Zelllinie Colo 357 eignet sich zur Überprüfung der Proliferation	70
3.3.2	Anti-ADAM17-Antikörper enthaltende Zellüberstände reduzieren die Proliferation von Colo 357-Zellen	72
3.3.3	Die gereinigten Anti-ADAM17-Antikörper können die Migration von Panc 89-Zellen nicht konstant reduzieren	76
4	Diskussion	79
4.1	Expression und Lokalisation von ADAM17 in humanen Krebszellen	79
4.1.1	ADAM17 als potentieller Tumormarker?	79
4.1.2	Subzelluläre Lokalisation von ADAM17.....	82
4.2	ADAM17 reguliert die EGFR-Expression in Pankreaskarzinomzellen über Notch1-Rezeptoraktivierung	84
4.3	ADAM17 steigert die Migration von Pankreaskarzinomzellen	86
4.4	Therapeutischer Einsatz von Anti-ADAM17-Antikörpern in der Krebstherapie?... ..	87
5	Zusammenfassung	92

6	Anhang	94
6.1	Zusätzliche Methoden und Ergebnisse	94
6.1.1	Struktur der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“	94
6.1.2	Experimenteller Einsatz der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“	94
6.1.3	Kopplung des HPC4 an Sepharosebeads	95
6.1.4	Oberflächenexpression von ADAM17 auf PBMCs	96
6.1.5	Immunhistochemische Färbung von OH1-Zellen mit dem Anti-ADAM17- Antikörper A318	97
6.1.6	<i>Lipid Raft</i> und ADAM17-Lokalisation in Panc 89-Zellen.....	98
6.2	Abkürzungsverzeichnis	99
6.3	Abbildungsverzeichnis	105
6.4	Tabellenverzeichnis	107
6.5	Literaturverzeichnis	108
6.6	Publikationen	116
6.7	Lebenslauf	117
6.8	Danksagung	118
6.9	Erklärung	123

1 EINLEITUNG

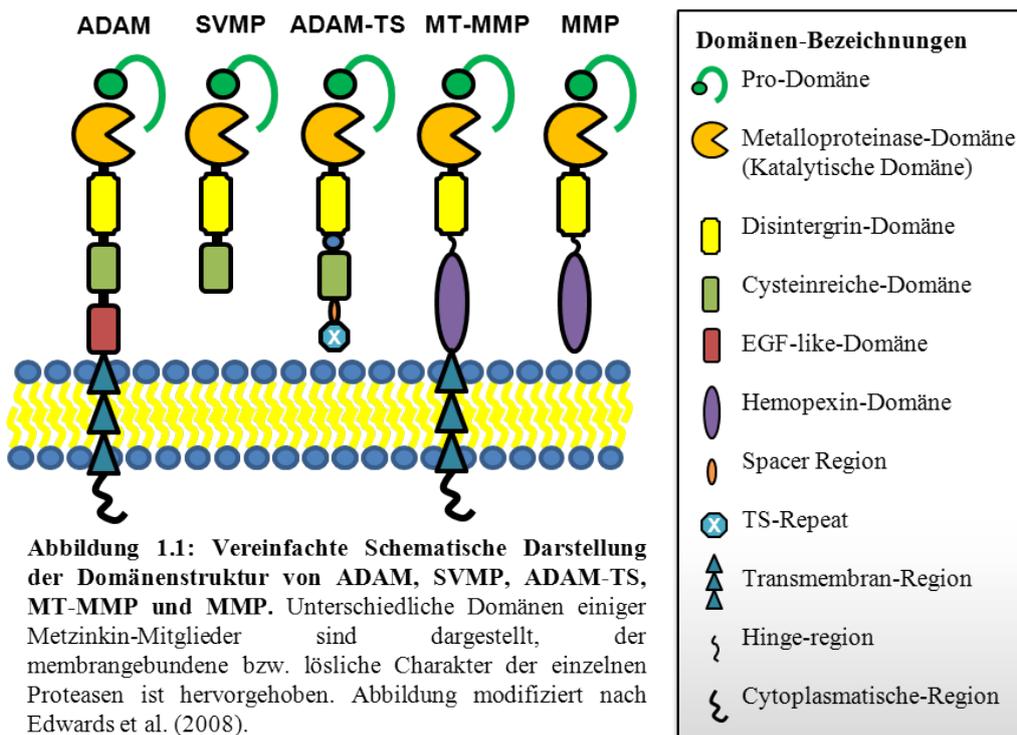
1.1 ADAM17 und die Familie der Metalloproteasen

1.1.1 Zugehörigkeit und Nomenklatur

Die Metalloprotease ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloprotease 17*) wurde erstmals unter dem Namen TACE - *TNF- α converting enzyme* - bekannt, da diese in der Lage ist das membranständige TNF- α in seine lösliche Form zu überführen (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Dieser Prozess der Proteolyse wird auch „*Shedding*“ genannt. Die Enzyme, welche dazu befähigt sind, werden dementsprechend als „Sheddase“ bezeichnet.

Die Metzinkine – Strukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Wie die anderen Mitglieder der ADAMs, der ADAM-TS (ADAMs mit Thrombospondin-Motiven) und der Klasse PIII der *Snake Venum* Metalloproteasen (SVMPs) gehört ADAM17 zur Subfamilie der Adamalysine und somit zur Familie der Metzinkine (Edwards et al., 2008). Zu dieser Gruppe von Enzymen zählen drei weitere Unterfamilien: Die MMPs (Matrix-Metalloproteasen), die Serralysine (bakterielle Proteasen) und die Astacine (Stöcker et al., 1995). Strukturelle Gemeinsamkeiten dieser Proteasen sind vorwiegend im N-terminalen Bereich der ADAMs, MMPs (Matrix-Metalloproteasen), MT-MMPs (*membrane-type* MMPs), ADAM-TS und SVMPs zu finden (siehe Abbildung 1.1).



Der Signalsequenz (hier nicht dargestellt) folgend schließen sich bei den in Abbildung 1.1 gezeigten Proteasen eine Pro-Domäne und eine Metalloprotease-Domäne an. In letzterer Domäne befindet sich auch ein in allen Mitgliedern konservierter Methioninrest, der sogenannte „*Met-Turn*“, welcher der Familie ihren Namen gab. Ein weiteres entscheidendes Merkmal im Bereich der katalytischen Domäne ist das HEXXHXXGXXH-Motiv. Die drei Histidinreste (H) des Motivs gewährleisten die Koordination des Zinkatoms im aktiven Zentrum, während das Glutamat (E) die Spaltung von Peptidbindungen katalysiert – durch seine Funktion als katalytische Base (Protonenakzeptor) kann das Glutamat Wassermoleküle polarisieren und somit einen nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung sowie die darauffolgende Spaltung derselbigen initiieren (Takeda, 2009).

C-terminal der katalytischen Domäne unterscheidet sich der Aufbau innerhalb der Subfamilien erheblich: In den ADAMs, ADAM-TS und SVMPs folgt eine Disintegrin-Domäne und eine Cysteinreiche- und/oder eine EGF-*like*-Domäne, in den MMPs eine Hemopexin-Domäne. Während die SVMPs und ADAM-TS keine Membranverankerung aufweisen und somit als lösliche Proteine vorkommen, folgen bei den ADAMs nach der Cysteinreichen- und/oder der EGF-*like*-Domäne eine Transmembran-Region und ein zytoplasmatischer Teil (Edwards et al., 2008).

Genetische, strukturelle und funktionelle Diversität der ADAMs

Die ADAMs gehören zu den Typ 1-Transmembranproteinen. Aufgrund unterschiedlicher Splicevarianten können sie darüber hinaus auch in löslicher Form vorkommen. So existieren für ADAM12 sowohl eine lange transmembranäre Form (ADAM12L) als auch eine kurze lösliche Form, ADAM12S (Wewer et al., 2006).

Je nach phylogenetischer Entwicklung lassen sich bei einigen ADAMs besondere strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten, sowie in vielen Fällen eine Gewebespezifität feststellen. Beispielsweise kommen ADAM2, 7, 18, 20, 21 und ADAM29 vorwiegend in Geschlechtsorganen vor und sind dort unter anderem für die Spermatogenese verantwortlich, ADAM8 wird v.a. im Hämatopoietischen System gefunden und ADAM12 in der Plazenta sowie in mesenchymalen und adulten Stammzellen. ADAM9, 10, 12, 15, 17 und 19 werden ubiquitär exprimiert (Gooz, 2010).

Insgesamt sind im humanen Genom 25 Gene bekannt, die für ADAMs kodieren. Davon sind vier Pseudogene, 13 der Gene kodieren für aktive und acht für inaktive Proteasen. Die aktiven Formen besitzen das für die Substratprozessierung erforderliche HEXXHXXGXXH-Motiv (Edwards et al., 2008; Murphy, 2009). Den inaktiven Formen fehlt entweder diese

zinkbindende Sequenz oder die katalytische Domäne geht während der intrazellulären Reifung verloren (Gooz, 2010). Daher sind diese, nicht zum Freisetzen von Ektodomänen befähigten, inaktiven Varianten vorwiegend für Funktionen bekannt, welche bei der interzellulären Kommunikation sowie Adhäsionsvorgängen eine Rolle spielen (Gooz, 2010). Ursächlich dafür ist ihre Wechselwirkung mit Integrinen, welche für Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion, wie das „*outside-in Signaling*“ und das „*inside-out Signaling*“ verantwortlich gemacht werden (Huveneers et al. 2007; nähere Erläuterung siehe 1.1.2).

1.1.2 Struktur-Funktionsbeziehung der ADAM17-Domänen

Die für die Hauptfunktionen der ADAMs notwendigen Domänen finden sich bereits in deren Nomenklatur „*A Disintegrin and Metalloprotease*“ wieder: So ist die Disintegrin-Domäne für die beschriebene Beeinflussung adhäsiver Eigenschaften verantwortlich, die Metalloprotease-Domäne für das Umsetzen von Substraten.

Im Folgenden wird die Struktur-Funktionsbeziehung der ADAM17-Domänen von N- nach C-terminal entsprechend der Abbildung 1.2 erläutert.

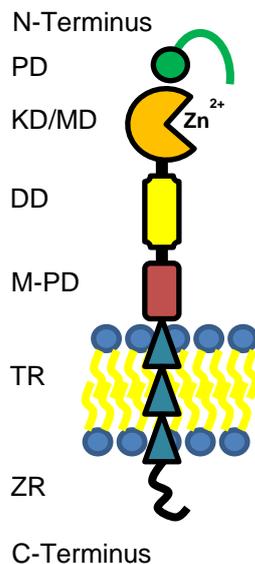


Abbildung 1.2: Vereinfachte schematische Darstellung der ADAM17-Domänen.

ADAM17 besteht aus einer Pro-Domäne (PD), einer katalytischen Metalloprotease-Domäne (KD/MD), einer Disintegrin-Domäne (DD), einer membranproximalen Domäne (M-PD), einer Transmembran-Region (TR) und einer Zytoplasmatischen-Region (ZR).

N-terminal befindet sich zunächst eine Signalsequenz (hier nicht dargestellt), welche dafür zuständig ist, das Protein auf den sekretorischen Weg zu leiten. C-terminal davon ist die Pro-Domäne lokalisiert. Sie wirkt als intramolekulares Chaperon und gewährleistet somit die richtige Proteinfaltung. Des Weiteren hält sie die Protease in einem inaktiven Zustand bis sie, während des intrazellulären Transports über das Trans-Golgi-Netzwerk, durch Furin, eine Proprotein-Konvertase, abgetrennt wird (Schlondorff et al., 2000; Edwards et al., 2008). Die darauf folgende Metalloprotease-Domäne ist, sofern sie das beschriebene HEXXHXXGXXH-Motiv trägt, für die Substratprozessierung verantwortlich. Sie ist, wie die katalytischen Domänen der anderen Metzinkin-Familienmitglieder, von globulärer Struktur, bestehend aus zwei Untereinheiten, die durch eine Furche getrennt werden. Hier befinden sich das aktive Zentrum und der erwähnte „*Met-Turn*“: Ein Methionin-Rest, welcher die Positionierung

der unteren Subdomäne zum Erhalt der katalytischen Furche gewährleistet (Edwards et al., 2008). Der katalytischen Domäne schließt sich die Disintegrin-Domäne an. Sie wurde zunächst für die erwähnte Wechselwirkung mit Integrinen (im Falle von ADAM17 mit dem $\alpha 5\beta 1$ -Integrin) (Bax et al., 2004) bekannt. Weiterhin wird angenommen, dass sie ihrer benachbarten C-terminalen Domäne als Gerüst (*scaffold*) dient (Takeda, 2009; Janes et al., 2005). Im Falle von ADAM10 und ADAM17 handelt es sich um atypische Mitglieder der ADAMs, sie enthalten keine cysteinreiche Domäne und eine EGF-*like*-Domäne konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Die, der Membran extrazellulär am nächsten gelegene Domäne, welche in der Literatur z.T. auch EGF-*like*-Domäne genannt wird, soll in dieser Arbeit daher weiterhin als nicht weiter klassifizierte „membran-proximale“ Domäne bezeichnet werden (Edwards et al., 2008; Janes et al., 2005).

Für diese membran-proximale Domäne, welche bei ADAM10 und ADAM17 vermutlich auch die Funktionen der fehlenden cysteinreichen Domäne übernimmt, wird eine Beteiligung bei der Aktivierung des Enzyms durch Entfernung des Propeptids, sowie eine Rolle bei der Substraterkennung vermutet (Milla et al., 1999; Lorenzen et al., 2012). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese für die Multimerisierung von ADAM17 von entscheidender Bedeutung ist (Lorenzen et al., 2011). Über die Transmembran-Region wird das Enzym in der Plasmamembran verankert, auch für sie wurde eine Funktion bei der Substraterkennung beschrieben (Li et al., 2007). Am C-Terminus schließt sich die zytoplasmatische Region an, welche - abhängig von unterschiedlichen Splicevarianten - in ihrer Länge variieren kann. Sie ist in der Lage mit intrazellulären Proteinen zu interagieren, die an der Signaltransduktion oder am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Darüber hinaus besitzt sie mehrere prolinreiche Motive, welche als Liganden für SH3-Domänen enthaltene Proteine fungieren können (Edwards et al., 2008).

Aufgrund dieser Motive wurde eine Beteiligung der Intrazellulären Domäne am „*inside-out Signaling*“ - also einer Regulation der Proteaseaktivität, ausgelöst durch intrazelluläre Ereignisse - diskutiert. Auch ein „*outside-in Signaling*“, eine intrazelluläre Rekrutierung von Adapterproteinen oder Signalmolekülen im Anschluss an das extrazelluläre Binden eines Substrats oder Interaktionspartners wird angenommen (Edwards et al., 2008; Gooz, 2010).

1.1.3 *Shedding* als regulatorisches Element

Die von der Metalloprotease-Domäne katalysierte Umsetzung von Substraten ist für eine Vielzahl zellulärer Regulationsmechanismen essentiell und wird daher an dieser Stelle gesondert besprochen.

***Shedding* - regulatorisches Element des Organismus**

Das präzise Schneiden eines Proteins spielt in vielen physiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle, so beispielsweise bei der Blutkoagulation durch sequentielle Aktivierung von Serin-Proteasen, bei der Apoptose durch autokatalytisches Spalten von Caspasen (Cystein-Proteasen) und nicht zuletzt bei der Regulation des Immunsystems durch Umwandlung membrangebundener Zytokinorstufen zu wirksamen Zytokinen (Edwards et al., 2008; Chalaris et al., 2010).

Ektodomänen-*Shedding*

Von allen membrangebundenen Proteinen werden ca. 10 % proteolytisch prozessiert. Dazu gehören integrale Proteine des Typs 1 und 2 sowie Membranproteine mit einem GPI-Anker (Scheller et al., 2011, a).

Da von den entsprechenden Substraten lediglich der extrazelluläre Bereich in eine lösliche Form überführt wird, spricht man von Ektodomänen-*Shedding* (Prenzel et al., 1999).

Ektodomänen-*Shedding*: Wirkradius und regulatorisches Spektrum

Je nach Wirkradius der freigesetzte Ektodomäne kann diese Einfluss auf verschiedene Zellen nehmen: Entweder auf dieselbe Zelle, von der sie proteolytisch gespalten wurde (autokriner Wirkmechanismus), auf benachbarte bzw. im direkten Umkreis liegende Zellen (para- bzw. juxtakrine Wirkung) oder auf entfernt liegende Zellen anderer Körperregionen, die über die Blutbahn erreicht werden (endokriner Mechanismus).

Der Effekt auf die Zielzelle kann dabei, abhängig vom prozessierten Bestandteil der Ursprungszelle, Substrat bzw. Rezeptor, sehr unterschiedlich sein.

Physiologische bzw. pathophysiologische Wirkungen werden jedoch nicht ausschließlich von der löslichen Ektodomäne hervorgerufen, auch der in der Membran der Ursprungszelle zurückgebliebene Rest (*stalk*) kann weiter prozessiert werden und in der Folge intrazelluläre Signalprozesse in Gang setzen oder inhibieren (Gooz, 2010; Edwards et al., 2008).

Die möglichen Szenarien extra- und intrazellulärer Regulation nach Ektodomänen-*Shedding* sind in Abb. 1.3 - 1.7 gezeigt und werden an dieser Stelle im Einzelnen erläutert:

Prozessiert eine Metalloprotease ein Substrat, welches nachfolgend einen Rezeptor aktiviert (siehe Abbildung 1.3), wie in diesem Falle ADAM17 das proHB-EGF, wird der Rezeptor (EGFR) durch das nun lösliche HB-EGF stimuliert. Daraufhin homo- oder heterodimerisiert der EGFR mit einem zweiten Rezeptor der EGFR-Familie. Dies führt zur Transphosphorylierung und Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinassen sowie der Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden, welche stimulierend auf das entsprechende Zellverhalten, z.B. die Proliferation und Migration wirken (Prenzel et al., 1999; Gooz, 2010; Kenny, 2007).

Für die EGFR-Liganden Epiregulin, TGF- α , Amphiregulin und HB-EGF stellt ADAM17 die Hauptsheddase dar (Sahin et al., 2004).

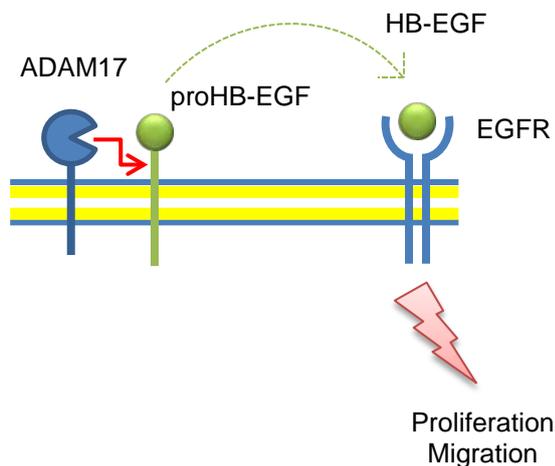


Abbildung 1.3: Vereinfachte schematische Darstellung der EGF-Rezeptor-Aktivierung nach Ektodomänen-*Shedding* durch ADAM17. Die membranständige Protease ADAM17prozessiert den extrazellulären Teil eines Substrats (proHB-EGF, grün), welches in seiner löslichen Form (HB-EGF, grüner Kreis) den EGF-Rezeptor (blau) bindet und diesen stimuliert. Nach Dimerisierung zweier Rezeptoren und Aktivierung intrazellulärer Signalwege resultiert eine vermehrte Zell-Proliferation und Migration.

Wird der Rezeptor selbst geschnitten kann dies verschiedene physiologische oder pathophysiologische Effekte zur Folge haben. Es kann zu einer antagonistischen bzw. inhibierenden Wirkung kommen, indem der Rezeptor entwederprozessiert wird, bevor er von seinem Substrat aktiviert werden kann (siehe Abbildung 1.4a), oder indem er als löslicher Rezeptor mit dem membranständigen Rezeptor um sein Substrat konkurriert (siehe Abbildung 1.4b).

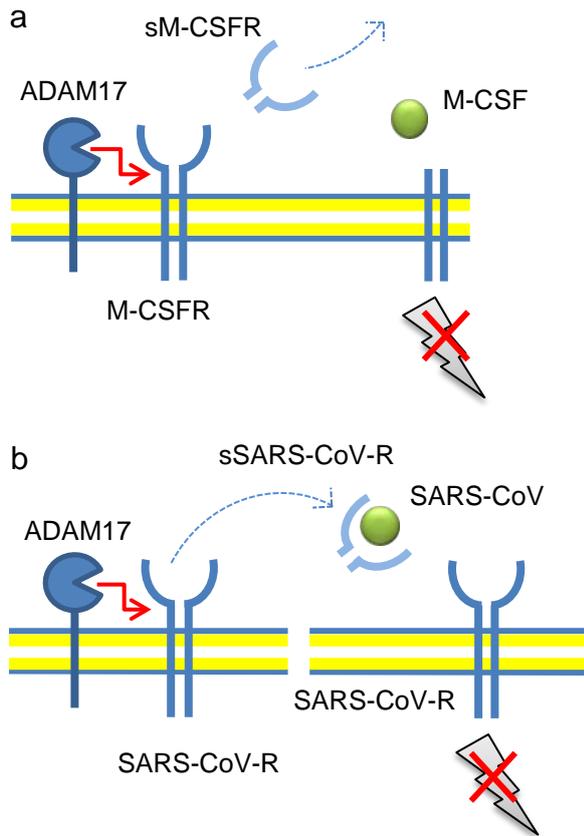


Abbildung 1.4: a) Vereinfachte schematische Darstellung der herabgesetzten M-CSF-Rezeptor-Aktivierung nach Ektodomänen-Shedding durch ADAM17.

Die membranständige Protease ADAM17 prozessiert den extrazellulären Teil des M-CSF- Rezeptor (macrophage colony-stimulating factor receptor, blau), welcher als lösliche Form (sM-CSFR, hellblau) in den extrazellulären Raum entlassen wird. Durch verminderte Verfügbarkeit des Rezeptors (M-CSFR) an der Zelloberfläche hat das Substrat (M-CSF, grün) keine Möglichkeit eine intakte Form des Rezeptors zu binden und zu stimulieren.

b) Vereinfachte schematische Darstellung der herabgesetzten SARS-CoV-Rezeptor-Aktivierung durch Konkurrenz des löslichen Rezeptors mit dem membranständigen Rezeptor nach Ektodomänen-Shedding durch ADAM17.

Die membranständige Protease ADAM17 prozessiert den extrazellulären Teil eines Rezeptors (SARS-CoV-R, blau), welcher in seiner löslichen Form (sSARS-CoV-R, hellblau) mit dem membranständigen Rezeptor (blau, rechts) einer anderen Zelle um das Substrat (SARS-CoV, grün) konkurriert. Der Rezeptor wird nicht aktiviert und der intrazelluläre Signalweg nicht stimuliert.

Ersteres, die proteolytische Spaltung eines Rezeptors vor Substratbindung, wurde beispielsweise für die Prozessierung des *Macrophage colony stimulating factor receptor* (M-CSFR) durch ADAM17 gezeigt, welches eine verminderte Aktivierung von Makrophagen zur Folge hat (Rovida et al., 2001). Die zweite Möglichkeit der Inhibition wurde für die Konkurrenz des löslichen Rezeptors des *severe-acute respiratory syndrom-coronavirus* (SARS-CoV-R, ACE2) mit dem membranständigen Rezeptor um sein Substrat (SARS-CoV) gezeigt. Auch hier wurde ADAM17 als verantwortliche Protease identifiziert (Lambert et al., 2005).

Statt einer inhibierenden Wirkung kann es nach Ektodomänen-Shedding auch zu einer aktivierenden Wirkung des Rezeptors kommen (siehe Abbildung 1.5): Im Falle des löslichen IL-6-Rezeptors wurde gezeigt, dass dieser nach proteolytischer Spaltung durch ADAM17 zusammen mit zwei membrangebundenen gp130-Molekülen eine zusätzliche Aktivierung des IL-6-Signaltransduktionswegs auf Zellen induzieren kann, in denen der IL-6-Rezeptor nicht exprimiert wird (Chalaris et al., 2010).

Dieser Effekt wurde als „*Transsignaling*“ beschrieben und spielt im Gegensatz zur klassischen Signalweitergabe über den membrangebundenen IL-6-Rezeptor eine entscheidende Rolle beim Fortschreiten chronischer Entzündungsreaktionen wie der Rheumathoiden Arthritis (Rose-John und Neurath, 2004; Nowell et al., 2003).

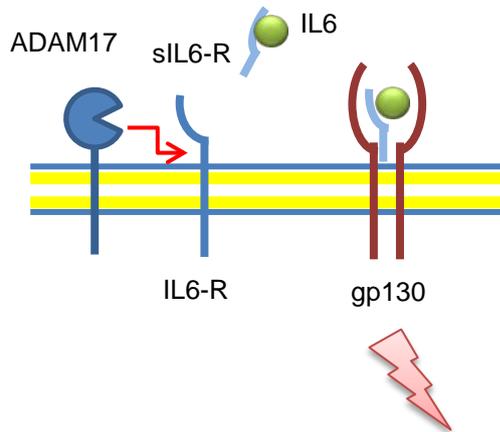


Abbildung 1.5: Vereinfachte schematische Darstellung des „*Transsignaling*“ nach Ektodomänen-*Shedding* des IL-6-Rezeptors durch ADAM17.

Die membranständige Protease ADAM17 schneidet den extrazellulären Teil des IL-6-Rezeptors (IL-6-R, blau). Dieser lösliche Rezeptor (sIL-6-R, hellblau) bindet in der Peripherie sein Substrat (IL-6, grün) und bildet mit diesem einen Komplex, welcher zusammen mit zwei membrangebundenen gp130-Molekülen (dunkelrot) durch „*Transsignaling*“ die intrazelluläre Signaltransduktion auslöst.

Auch intrazellulär können durch das Schneiden von Ektodomänen und gleichzeitiger Aktivierung des in der Membran verbliebenen Proteinteils verschiedene physiologische Prozesse beeinflusst werden. Dieser Prozess wird „*Regulated intramembrane Proteolysis*“ (RIP) genannt (Gooz, 2010).

Für einige Substrate z.B. das HB-EGF und das Neuroregulin wurde gezeigt, dass sie nach Aktivierung durch eine Metalloprotease in der Lage sind, durch ein C-terminal geschnittenes Fragment Informationen in den Nukleus zurückzugeben. Das beschriebene Phänomen wurde als „*Backwardsignaling*“ bezeichnet und kann dazu dienen, die Zelle nach Abspaltung des Rezeptors zu regulierenden Prozessen, wie beispielsweise zum Transport weiterer Faktoren an die Zelloberfläche anzuregen oder, wie in Abbildung 1.6 gezeigt, zum Fortschreiten des Zellzyklus führen (Nanba et al., 2003; Bao et al., 2003).

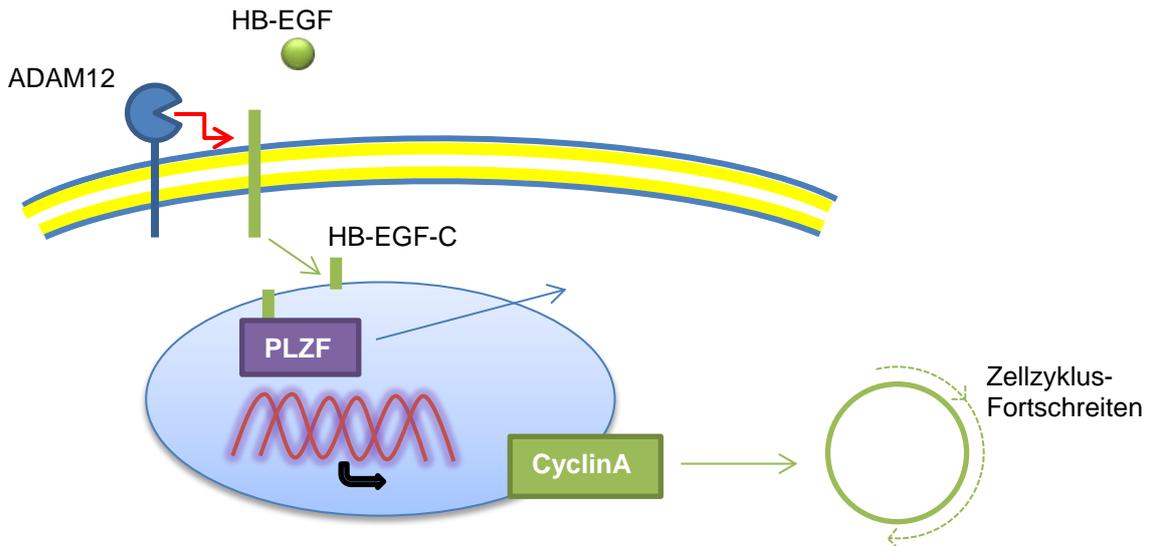


Abbildung 1.6: Vereinfachte schematische Darstellung des „Backwardssignaling“ nach Ektodomänen-Shedding. Nach Prozessierung des proHB-EGF (grüner Strich + Kreis, hier nicht als zusammenhängendes Protein dargestellt) durch ADAM12 (blau) entsteht neben der löslichen Ektodomäne (HB-EGF, grüner ausgefüllter Kreis) ein intrazelluläres C-terminales Fragment (HB-EGF-C). Dieses transloziert in den Nukleus und hebt die inhibierende Wirkung des PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*, violett) auf, indem dessen Bindung an die DNA gelöst wird (blauer Pfeil) und ermöglicht somit die Transkription des Gens für CyclinA (grün), welches für die Koordination des Zellzyklus-Fortschreitens zuständig ist. Abbildung modifiziert nach Nanba et al. (2003).

1.1.4 Physiologische - und pathophysiologische Bedeutung von ADAM17

1.1.4.1 Phenotyp

Aufgrund der Diversität der genannten Regulationsmöglichkeiten und mit ihren bisher über 70 bekannten Substraten - darunter Zytokine, Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren - übernimmt die Metalloprotease ADAM17 eine Schlüsselrolle in der Regulation physiologischer Prozesse (Scheller et al., 2011, b). Am deutlichsten wird diese außerordentliche Stellung von ADAM17 bei der Generierung konstitutiver *Knockout*mäuse, da ein Großteil von ihnen das Embryonalstadium nicht überlebt (Saftig und Reiss, 2011).

Um die Auswirkungen einer ADAM17-Inhibition bzw. Herunterregulierung auf den Organismus dennoch untersuchen zu können, wurden spezielle Verfahren entwickelt, um lebensfähige *Knockout*mäuse zu generieren. Diese *Knockout*mäuse sind entweder homozygot für eine inaktivierte Form von ADAM17 (ADAM^{Zn/Zn}-Mäuse) oder sie produzieren lediglich 5 - 10 % des ADAM17 *wildtyp*-Levels (hypomorphe Tiere: ADAM^{ex/ex}-Mäuse). Darüber hinaus werden konditionale *Knockout*mäuse, in denen das Gen für ADAM17 ausschließlich

in bestimmten Organen oder Zelltypen deletiert wurde, verwendet (Saftig und Reiss, 2011; Chalaris et al., 2010, a).

ADAM17^{Zn/Zn} wie auch die ADAM17^{ex/ex}-Mäuse weisen zahlreiche Störungen in der Entwicklung, insbesondere epithelialer Gewebe wie Haar, Haut, Herz und Lungen auf (Peschon et al., 1998; Chalaris et al., 2010, a). Des Weiteren ist das nicht geschlossene Augenlid ein deutliches Zeichen für eine Fehlregulation des Wachstums sowie für eine gestörte Fusion von Geweben der ADAM17^{Zn/Zn}-Mäuse (Saftig und Reiss, 2011).

Der Phänotyp der ADAM17-Knockoutmäuse gleicht dem von EGF-, EGFR- und TGF- α -Knockoutmäusen und bestätigt somit die entscheidende Rolle von ADAM17 in Bezug auf das EGFR-*Signaling* und die damit verbundenen Entwicklungsvorgänge. Darüber hinaus haben ADAM17, wie auch HB-EGF-null- und EGFR-null-Mäuse, aufgrund einer fehlenden Inhibition durch das BMP (*Bone morphogenic protein*) vergrößerte Herzklappen. Weitere Fehlregulationen wurden bei der Knochen- und Skelettentwicklung sowie der Hämatopoese gefunden (Peschon et al., 1998; Blobel, 2005).

1.1.4.2 Physiologische- und pathophysiologische Bedeutung von ADAM17

Anhand der beschriebenen Mausmodelle wurde die Rolle von ADAM17 für Entwicklungsprozesse und Organentstehung bei alleiniger Betrachtung des Phänotyps deutlich. In ausgewachsenen Tieren konnten darüber hinaus wichtige Erkenntnisse über die Regulation des Immunsystems, das Entzündungsgeschehen sowie Regeneration, Wundheilung und die Entstehung von Tumoren erlangt werden.

Im Immunsystem übernimmt ADAM17 eine entscheidende Funktion bei der Überleitung von primärer zu sekundärer Immunantwort. So werden durch Prozessierung des IL-6R von apoptotischen Neutrophilen, welche während der primären Immunantwort in das entzündete Gebiet einwandern, über *Transsignaling* Monozyten angelockt. Diese phagozytieren die sterbenden Neutrophilen, um Gewebeläsionen vorzubeugen (Chalaris et al., 2007; Scheller et al., 2011, a).

Das Prozessieren von Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin von Leukozyten und Neutrophilen wirkt sich ebenfalls auf die Regulation des Immunsystems sowie das Entzündungsgeschehen aus. In Mäusen mit einer nicht prozessierbaren L-Selektin-Variante wurde eine gesteigerte Neutrophileninvasion in das entzündete Gewebe beobachtet sowie eine verminderte Migration in die Milz. ADAM17 reguliert demnach das Wanderungsmuster und die Homöostase von Leukozyten (Venturi et al., 2003; Scheller et al., 2011).

Die entscheidende proinflammatorische Wirkung von ADAM17 wurde in einem „*Septic shock disease model*“ bestätigt. Mäuse mit einer gezielten Deletion des ADAM17-Gens in Neutrophilen und Monozyten erlitten nach Induktion von LPS keinen Endotoxinschock, was auf eine verminderte Freisetzung von löslichem TNF- α durch ADAM17 zurückzuführen war (Horiuchi et al., 2007).

In einem DSS (*Dextran sulphate sodium*) induzierten Colitis-Model wurde bei ADAM17^{ex/ex}-Mäusen dahingegen eine erhöhte Anfälligkeit für intestinale Entzündungen festgestellt. Als Ursache dafür wurde eine Beeinträchtigung des EGFR-Liganden-*Sheddings* beschrieben und ADAM17 somit als wichtiger Faktor für regenerative Vorgänge identifiziert (Chalaris et al., 2010, b).

Je nach geschnittenem Substrat kann ADAM17 demnach sowohl zu entzündlichen Prozessen als auch zur Regeneration von Geweben beitragen. Daher wird ADAM17 in genannten Szenarien oft als austarierender Faktor (bildlich als Waage siehe Abbildung 1.7) dargestellt.

Die Metalloprotease ADAM17 steht dabei im Mittelpunkt des Gleichgewichts zwischen den von ihr geschnittenen Liganden TNF- α , L-Selektin (CD62-L) und IL-6R auf der proinflammatorischen Seite und EGFR-Liganden sowie Notch1 auf der regenerativen Seite. Die überschießende Aktivierung letztgenannter führt häufig zu malignen Gewebsvermehrungen (Scheller et al., 2011, a).

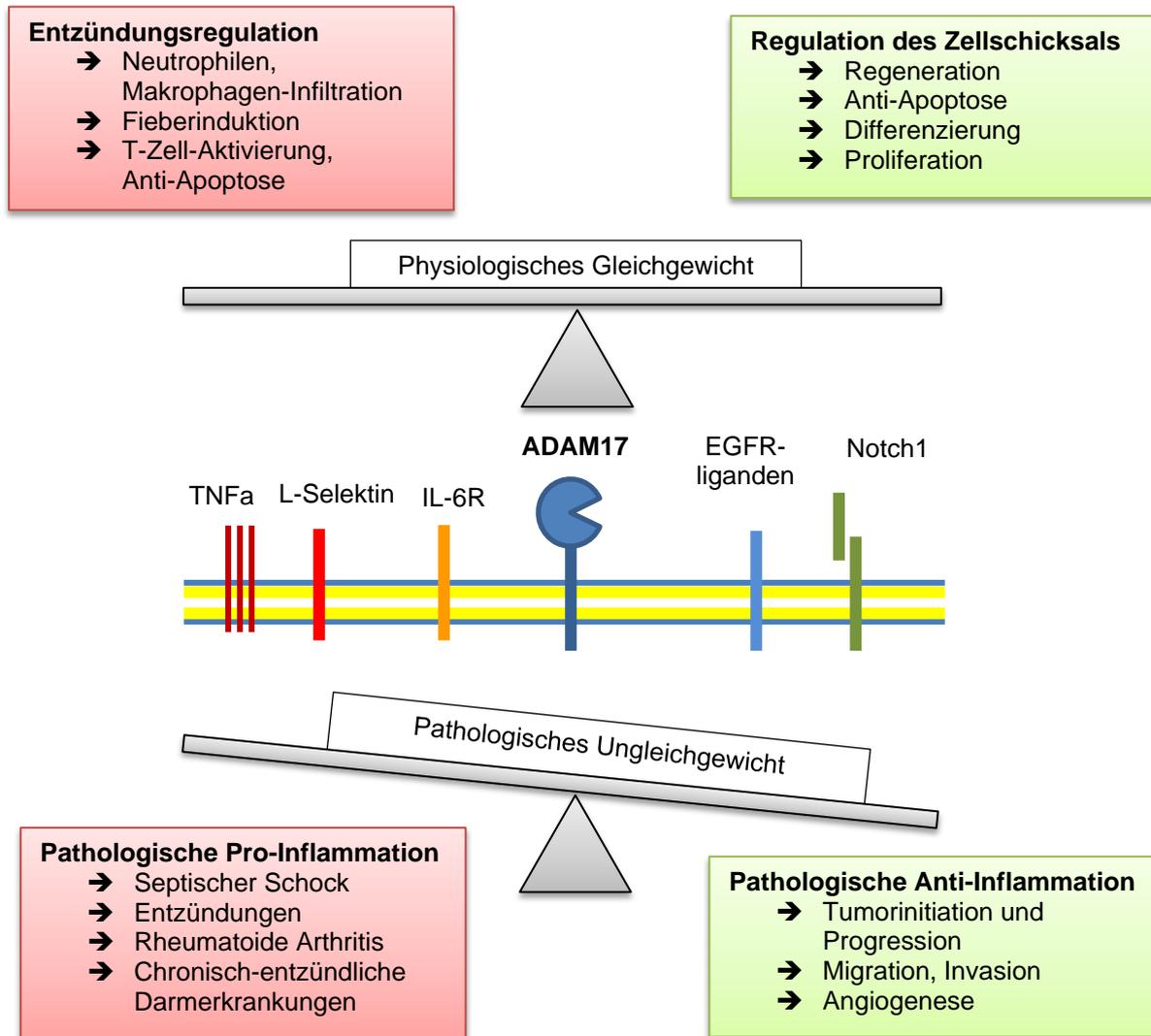


Abbildung 1.7: ADAM17 als gleichgewichtsbeeinflussender Faktor zwischen Entzündungsgeschehen und Regeneration. ADAM17 reguliert das Entzündungsgeschehen durch Aktivierung von TNF- α und IL-6R sowie durch Prozessierung von Adhäsionsmolekülen (L-Selektin). Durch Proteolyse von EGFR-Liganden und Notch1 trägt ADAM17 zur Regeneration und Differenzierung von Geweben bei. Beeinflusst ADAM17 das Gleichgewicht zu stark in die eine – oder andere Richtung kann dies zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, wie dem Septischen Schock und der rheumatoiden Arthritis auf der pro-inflammatorischen Seite sowie Gewebshyperplasien und Tumorbildung auf der Anti-inflammatorischen Seite. Abbildung modifiziert nach Scheller et al. (2011, a).

Zahlreiche weitere Krankheitsbilder wurden mit einer Dysregulation von ADAM17 in Verbindung gebracht. Darunter neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Multiple Sklerose, Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie Atherosklerose und andere kardiovaskuläre Erkrankungen sowie eine Vielzahl maligner Entartungen (Gooz, 2010; Saftig und Reiss, 2011).

1.2 ADAM17 in Tumorerkrankungen

1.2.1 Expression und Lokalisation von ADAM17 in Tumoren

1.2.1.1 Expression von ADAM17 in Tumoren und Korrelation mit dem Schweregrad der malignen Erkrankung

ADAM17 wurde in zahlreichen Krebszelllinien und Krebsarten nachgewiesen, darunter Brust-, Prostata-, Eierstock-, Magen-, Pankreas-, Lungen-, Kopf- und Halskrebs, sowie im Nierenzellkarzinom, Hauttumoren und Gliomen (Ringel et al., 2006; Gooz, 2010; Saftig und Reiss, 2011).

Die Stärke der ADAM17-Expression korreliert dabei oftmals mit dem Schweregrad der Erkrankung: Zhang et al. verglichen Gewebeschnitte von Magenkarzinompatienten mit gesundem Gewebe und fanden sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine signifikant erhöhte ADAM17-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe (Zhang et al., 2011). Die ADAM17-Expression korrelierte mit der Invasionstiefe, dem Umfang der Tumordifferenzierung sowie den Fern- und Lymphknotenmetastasen.

McGowan et al. zeigten vergleichbare Korrelationen in Brustkrebspräparaten. Sie untersuchten ca. 150 Tumoren mittels ELISA und Westernblot und stellten eine bedeutend höhere ADAM17-Expression in Tumoren fortgeschrittenen Stadiums „*high grade* Tumoren“ im Gegensatz zu Tumoren im Anfangsstadium „*low grade* Tumoren“ fest. Des Weiteren bedingte eine hohe ADAM17-Expression auch bei diesen Patienten einen verstärkten Lymphknotenbefall und ein höheres Maß an Metastasierung sowie eine zunehmende Tumorgöße und eine verringerte Überlebensrate der Patienten (McGowan et al., 2007).

1.2.1.2 Lokalisation, Reifung und Trafficking von ADAM17

Für das Auftreten maligner Erkrankungen ist nicht nur der Expressionslevel, sondern auch die Aktivierung, Reifung und Lokalisation von ADAM17 von Bedeutung.

Wo die Prozessierung des Substrats stattfindet und in welchen zellulären Kompartimenten sich das reife ADAM17 befindet ist noch nicht vollständig geklärt.

Schlondorf et al. zeigten, dass ADAM17 zumeist im perinukleären Bereich und zu einem geringeren Teil an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Schlondorff et al., 2000). Tellier et al. fanden eine Kolo-kalisation von ADAM17 mit cholesterinhaltigen Mikrodomänen, sogenannten *Lipid Rafts* (Tellier et al, 2006).

Man geht davon aus, dass ein Großteil der an der Oberfläche lokalisierten ADAM17-Proteasen der aktiven Form entspricht, da die inhibierende Pro-Domäne während des Transports zur Zelloberfläche innerhalb des Golgi-Apparats abgetrennt wird. Peiretti et al. zeigten hingegen, dass die Abspaltung der Pro-Domäne keinen essentiellen Schritt für den Transport an die Oberfläche darstellt, denn bei Inhibition der Proprotein-Konvertasen wurde auch die nicht-mature Form von ADAM17 an der Zelloberfläche identifiziert (Gooz, 2010). Soond et al. zeigten, dass der Eintritt von ADAM17 in den sekretorischen *Pathway* durch eine kinaseabhängige Phosphorylierung an einem Threoninrest (Thr 735) initiiert wird (Soond et al., 2005).

Doedens und Black fanden eine durch PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*), jedoch nicht durch physiologische Stimuli, wie GPCR (*g protein-coupled receptor*) auslösbare Rekrutierung von ADAM17 an die Zelloberfläche (Gooz, 2010). Da durch Phorbolestergabe (PMA) auch ADAM17-abhängiges *Shedding* induzierbar ist (Chalaris et al., 2011), bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei dem an der Zelloberfläche lokalisierten ADAM17 auch um seine aktive Form handelt.

Für die *Lipid Rafts* wurde eine Kompartimentierungs-Funktion gezeigt, welche gewährleistet, dass ADAM17 während der Reifung und des Transports räumlich getrennt von seinem Substrat vorliegt und somit einer unkontrollierten Prozessierung vorgebeugt wird. Durch Cholesterindepletion konnte eine erhöhte Umsetzung von ADAM17-Substraten gezeigt werden, was diese Kompartimentierungs-Theorie sowie das Vorkommen der murenen Form von ADAM17 in den *Rafts* unterstützt und diesen eine besondere Bedeutung bei Regulationsmechanismen der Substratprozessierung zuspricht (Tellier et al., 2006).

1.2.2 Einfluss von ADAM17 auf die potentiell tumorgenerierende Rezeptoren EGFR und Notch1

Wie in Abschnitt 1.1.4.1 beschrieben, wurde von verschiedenen Autoren gezeigt, dass ADAM17 eine Vielzahl von Substraten prozessieren kann, welche für die Krebsentstehung und -progression von Bedeutung sind. Darunter sind insbesondere der Notch1-Rezeptor und die Liganden des EGF-Rezeptors von Bedeutung (Sahin et al., 2004, Baumgart et al., 2010).

1.2.2.1 Der EGF-Rezeptor: Struktur, Funktion, Signaltransduktion und Rolle in der Tumorprogression

Struktur und Signaltransduktion

Mit den drei anderen Rezeptoren der ErbB-Familie: ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3), ErbB4 (HER4), welche ursprünglich nach ihrer Ähnlichkeit zum „Erythroblastom viralen Genprodukt“, v-ErbB, benannt wurden, gehört der EGF-Rezeptor (ErbB-1/HER1) funktionell zu den Rezeptortyrosinkinasen.

Der EGFR ist ein glykosiliertes Transmembranprotein mit einer aus vier Untereinheiten bestehenden Extrazellulär-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Domäne (siehe Abbildung 1.8), welche Kinase-Aktivität besitzt und als Anlagerungsregion für Phosphotyrosin-bindende Adaptermoleküle dient (Citri und Yarden, 2006; Herbst, 2004).

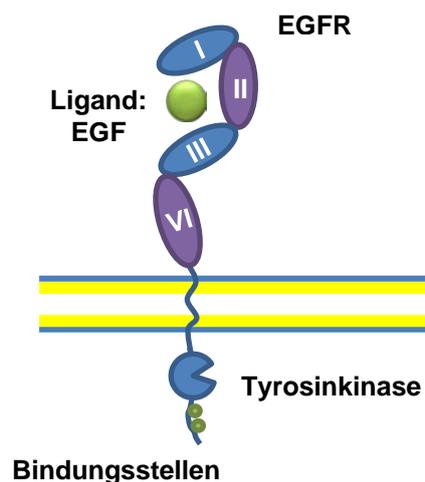


Abbildung 1.8: Vereinfachte schematische Darstellung der Domänen des EGF-Rezeptors. Der EGFR besteht aus einer Extrazellulär-Domäne mit vier Untereinheiten: Die zweite und die vierte Domäne (violett) sind cysteinreich, die erste und die dritte Domäne (blau) leucinreich. Die erste und dritte Domäne binden das Substrat und bilden zusammen mit der zweiten Domäne die Ligandenbindungstasche. Auf die vierte Domäne folgt eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit Kinaseaktivität (offener Kreis) sowie Bindungsstellen für Adaptermoleküle (grüne Kreise).

Nachdem ein Ligand des EGFR an die leucinreichen Extrazellulär-Domänen eins und drei bindet, homo- bzw. heterodimerisiert der Rezeptor mit einem weiteren Mitglied der ErbB-Familie. Daraufhin autophosphorylieren sich die intrazellulären Kinasen der Dimere

gegenseitig an bestimmten Tyrosinresten, und ermöglichen eine Rekrutierung von Bindungsmolekülen, welche SH2-Domänen bzw. Phosphotyrosin-bindende Domänen enthalten (siehe Abbildung 1.9). Dies sind beispielsweise Adaptermoleküle wie SHC (*Src-homology-2-containing*). Nach seiner Rekrutierung bildet SHC mit Grb2 (*growth-factor-receptor-bound-2*) und Sos (*son of sevenless*) einen Komplex, welcher über die Aktivierung von Ras zur Initiierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg (*mitogen activated protein kinase*) führt. Über eine Aktivierung der PI3 (Phosphoinositid-3-Kinase) werden auch der mTor- (*mammalian target of rapamycin*) und der NFκB-Signaltransduktionsweg (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) stimuliert (Zwick et al., 1999; Citri und Yarden, 2006).

Diese intrazellulären Signalkaskaden resultieren in erhöhter Proliferation, Angiogenese, Anti-Apoptose, Motilität und Adhäsion (Herbst, 2003).

Fehlregulationen und Mutationen des EGFR in malignen Erkrankungen

Oft entstehen maligne Veränderungen aufgrund einer Fehlregulation der genannten Signalwege oder aufgrund einer gesteigerten Expression des EGF-Rezeptors selbst.

Genamplifikationen oder erhöhte Translationsraten finden sich u.a. in Lungen-, Brust- und Pankreaskrebs. In 40 % der Gliome und in mindestens 80 % der Hals- und Kopfkrebse ist der EGF-Rezeptor überexprimiert, seine Expression korreliert dabei mit einer Reduktion der Patienten-Überlebensrate (Citri und Yarden, 2006). Von einer erhöhten EGFR-Expression sind nahezu alle soliden Tumoren epidermalen Ursprungs, wie nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (*non-small-cell lungcancer*), Nieren-, Eierstock-, und Kolonkrebs betroffen (Herbst, 2003; Kenny, 2007).

Neben der erhöhten Rezeptorexpression können auch aktivierende Mutationen Ursache für malignes Zellverhalten sein (Kenny, 2007). Mutationen des EGFR selbst sind oft in der Kinase-Domäne lokalisiert, welche einen konstitutiv aktiven Rezeptor mit erhöhter Autophosphorylierung zur Folge haben und mit zunehmendem Zellüberleben einhergehen (Citri und Yarden, 2006).

Aktivierende Mutationen des Ras-Gens, welche oft in Pankreas-, Kolorektal- und Schilddrüsenkrebs vorkommen, führen über eine erhöhte Aktivierung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs zu gesteigerter Zellproliferation, Anti-Apoptose und Angiogenese (Kenny, 2007; Herbst, 2004).

Auch Mutationen in der PI3-Kinase resultieren in einem malignen Phänotyp. Sie wurden in etwa einem Drittel allen untersuchten Brustkrebses diagnostiziert (Kenny, 2007).

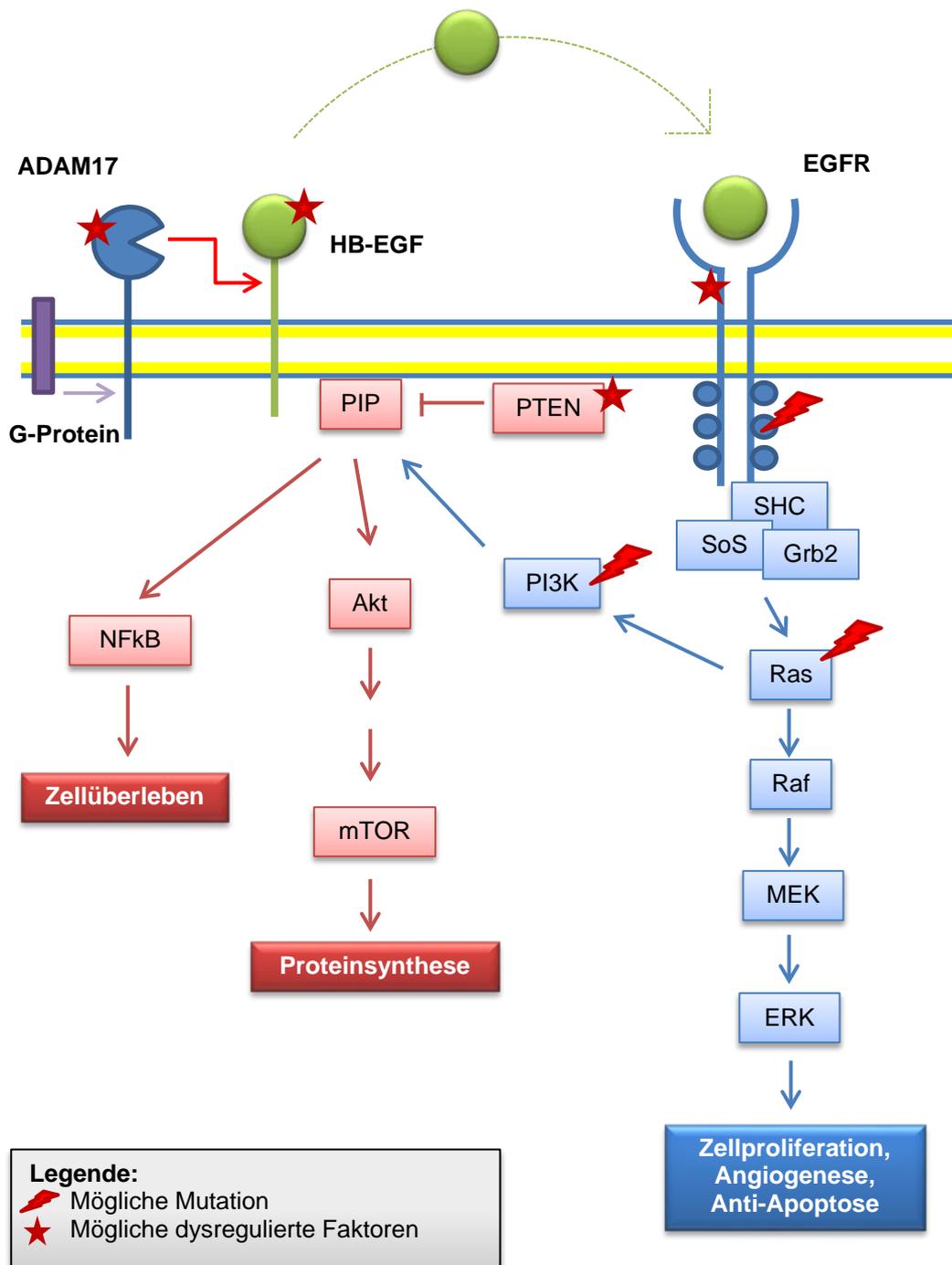


Abbildung 1.9: Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-Signalkaskade sowie mögliche tumorergezogene Dysregulationen und Mutationen.

Nach Ligandenbindung dimerisieren zwei Rezeptoren der ErbB-Familie und autophosphorylieren sich gegenseitig. Die entstehenden Phosphotyrosinreste (blaue Kreise) rekrutieren Adaptermoleküle (blaue zusammenhängende Kästen) und initiieren intrazelluläre Signalkaskaden, welche zu gesteigerter Proliferation, Zellüberleben, Anti-Apoptose, Angiogenese und Proteinsynthese führen.

Dysregulationen (roter Stern) können durch erhöhte EGF-Rezeptor-Expression oder gesteigerte EGFR-Liganden-Expression ausgelöst werden. Auch eine, beispielsweise durch G-Proteine (violetter Kasten) induzierte, Aktivitätssteigerung der Metalloprotease ADAM17, sowie eine Überexpression selbiger kann über erhöhte Liganden-Freisetzung die EGFR-Aktivität positiv beeinflussen. Aktivierende Mutationen (roter Blitz) der Kinaseregion des EGFR, des RAS-Gens und PI3K führen ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivierung der intrazellulären EGFR-Transduktionswege und entsprechend verstärktem malignem Zellverhalten. Abbildung modifiziert nach Kenny 2007.

Weitere Dysregulation können beispielsweise durch die Hemmung physiologisch inhibierender Proteine wie PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) ausgelöst werden, was über die ungehemmte Aktivierung des NF κ B und mTOR *Pathways* zu erhöhter Proteinsynthese und zum Zellüberleben führt. Nicht zuletzt wird eine verstärkte Stimulation des EGFR-*Signaling* durch gesteigerte Liganden-Verfügbarkeit ausgelöst (siehe Abbildung 1.9) (Kenny, 2007).

Sowohl für die Aktivierung einer Großzahl der EGFR-Liganden, darunter Epregrulin, TGF- α , Amphiregulin und HB-EGF, als auch für die Steigerung der EGFR-Expression wurde ADAM17 als entscheidender Faktor identifiziert (vgl. Abschnitt 1.1.3) (Sahin et al., 2004; Baumgart et al. 2010). Eine wichtige Möglichkeit der ADAM17-Aktivierung spielt sich auch im Rahmen des „*Inter-receptor crosstalk*“ ab. Durch Aktivierung von G-Proteinen (GPCR) wird ADAM17 zum Prozessieren seines Substrats stimuliert. Dieses bindet an den EGFR und führt zur Phosphorylierung desselbigen sowie zu den beschriebenen Signalkaskaden. ADAM17 trägt hier entscheidend zur Kommunikation zwischen Rezeptoren bei (Gooz, 2010).

1.2.2.2 Der Notch1-Rezeptor: Struktur, Funktion Signaltransduktion und Rolle in der Krebsentstehung

Struktur und Signaltransduktion

Der Notch1-Rezeptor gehört zu den *single-pass* Typ-I-Transmembranproteinen. Mit seinen drei Hauptabschnitten - extrazellulärer Domäne, transmembranärer Region und intrazellulärer Domäne - übernimmt er sowohl die Funktion eines Zelloberflächenrezeptors als auch eines Transkriptionsregulators (Yin et al., 2010).

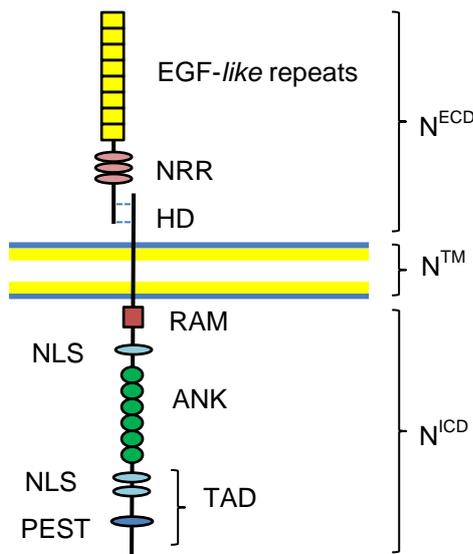


Abbildung 1.10: Vereinfachte schematische Darstellung des Notch1-Rezeptors.

Der Notch1-Rezeptor besteht aus drei Hauptabschnitten: Der extrazellulären Domäne mit *EGF-like repeats*, *Notch repeats* (NRR) und der Heterodimerisierungs-Domäne (HD), welche für die Aktivierung eine essentielle Rolle spielt. Darauf folgt eine transmembrane Untereinheit und eine intrazelluläre Domäne (N^{ICD}) mit RAM (DNA-bindendes Protein), nukleären Lokalisationsignalen (NLS), 6 Ankrin *repeats* (ANK) sowie einer Transaktivierungs-Domäne (TAD) bestehend aus zwei nukleären Lokalisationsignalen und einer konservierten *prolin/glutamic acid/ser/threo*-reichen Domäne (PEST). Abbildung modifiziert nach Yin et al, 2010 und Guo et al, 2011.

Während der intrazellulären Reifung wird eine Vorstufe des Notch1-Rezeptors von furinähnlichen Proteasen geschnitten (*S1-cleavage*). Die entstehenden Domänen, die Extrazelluläre Domäne (N^{ECD}) und die Transmembrane Untereinheit (N^{TM}) werden an der sogenannten Heterodimerisierungs-Domäne nicht kovalent zusammengefügt. Diese Domäne hält den Rezeptor in einem inaktiven Zustand bis er von einem seiner Liganden (*Jagged 1, 2, Delta-like ligand 1, 3, 4*) oder in Zellkultorexperimenten durch Zugabe des Chelators EGTA aktiviert wird und sich die beiden extrazellulären Notch1-Untereinheiten an der HD-Domäne trennen. Durch die darauffolgende Konformationsänderung wird ein erstes Prozessieren durch eine α -Sekretase (ADAM17) ermöglicht (siehe Abbildung 1.11). Dieser Schnitt wird auch *S2-cleavage* genannt, da er an der „site 2“ - einer definierten Schnittstelle 12 Aminosäuren oberhalb der Transmembran-Domäne - stattfindet. Er resultiert in der Entstehung zweier Fragmente: Einer löslichen extrazellulären Domäne (N^{ECD}) welche in die Umgebung entlassen wird, und eines noch mit der Zellmembran verbunden Restes (N^{EXT} : *Notch extracellular truncated*). Die Entstehung des N^{EXT} ermöglicht einen konsekutiven zweiten

Schnitt (*S3-cleavage*), welcher von dem γ -Sekretase-Enzymkomplex durchgeführt wird. Dieser Enzymkomplex wirkt im hydrophoben Zwischenraum der Doppellipidschicht und enthält bestimmte Enzyme wie z.B. Presenilin (Guo et al., 2011).

Er spaltet von dem noch im Transmembran-Bereich verankerten Proteinteil (N^{EXT}) ein intrazelluläres Fragment ab, die sogenannte N^{ICD} (Notch1 intrazelluläre Domäne). Die intrazellulär freigesetzte Notch1-Domäne kann anschließend in den Nucleus translozieren, mit DNA-bindenden Proteinen interagieren und die Induktion der Genexpression regulieren. Im Fall der ADAM17 bedingten Notch1-Aktivierung wurde für Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses (*non-small cell lung cancer*) gezeigt, dass die intrazelluläre Notch1-Domäne die Expression des EGFR steigert (Baumgart et al., 2010).

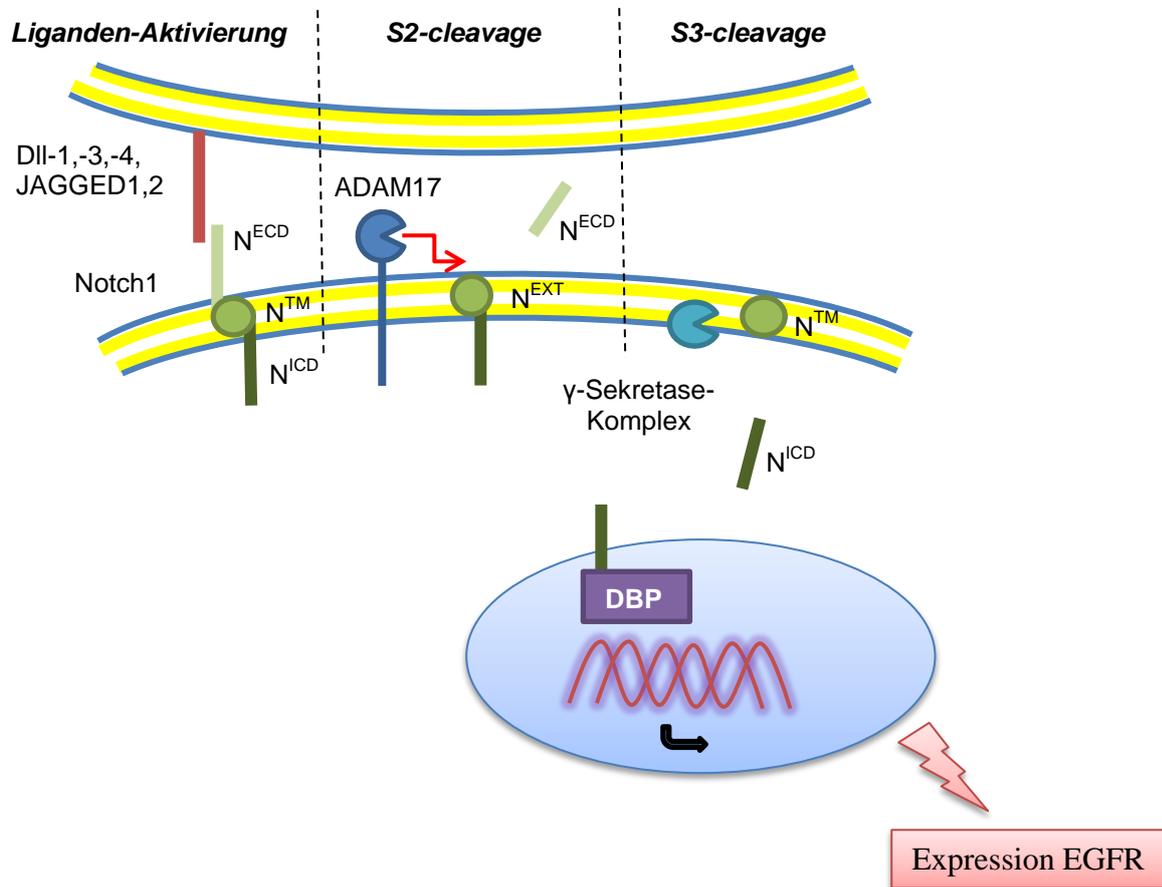


Abbildung 1.11: Vereinfachte schematische Darstellung der Notch1-Aktivierung durch „Ripping“.

Nach Binden eines Liganden (DII-1,-2 und -4, JAGGED1, 2, dunkelrot) an den Notch1-Rezeptor (grün) prozessiert die membranständige Protease ADAM17 (blau) die extrazelluläre Domäne des Rezeptors (N^{ECD} , hellgrün). Der in der Membran verbliebene Rest (N^{EXT} : *Notch extracellular truncated*, mittel + dunkelgrün) wird durch den γ -Sekretase-Komplex (hellblau) prozessiert. Es entsteht ein löslicher intrazellulärer Teil (N^{ICD} : *Notch1 intracellular domain*, dunkelgrün), welcher in den Nucleus transloziert und dort durch Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen (DBP, violett) für die Expression von Genen (z.B. EGFR) verantwortlich ist. Abbildung modifiziert nach Guo et al. (2011).

Physiologische und Pathophysiologische Funktionen des Notch1-Rezeptors

Physiologisch spielt der Notch1-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Entwicklung und dem Erhalt von Geweben sowie der Angiogenese, dem Zellstoffwechsel, Immunfunktionen und der Selbsterneuerung von Zellen (Guo et al., 2011).

Eine Dysregulation des Notch1-Rezeptors wurde in zahlreichen Tumoren gefunden, darunter Hämatologische Tumore, wie Leukämien und Lymphome, sowie solide Tumore wie Brustkrebs, Melanome, Kolon- und Pankreaskrebs. Dabei wirkt der Notch1-Rezeptor je nach Art des Tumors limitierend oder beschleunigend auf das Tumor-Wachstum (Herbst, 2003; Yin et al., 2010; Guo et al., 2011). Für Tumore der Brust und des Pankreas wurden vorwiegend tumorfördernde Wirkungen des Notch1-Rezeptors gefunden. Beim Brustkrebs wurden neben einer erhöhten Notch1-Expression auch eine gesteigerte Expression seines Liganden Jagged1 gefunden. Dies korrelierte mit einer verringerten Überlebensrate der Brustkrebspatientinnen. In der überwiegenden Mehrzahl der Pankreas-Krebs-Patienten, wurde eine erhöhte Notch1-, Jagged1- und Dll4-Expression nachgewiesen. Im Pankreas-Gang-Adenokarzinom konnte das Krebswachstum durch Inhibition des oben genannten γ -Sekretase-Enzymkomplexes gehemmt werden (Yin et al., 2010).

Zusammenfassung: ADAM17 und dessen Einfluss auf den EGF-Rezeptor

ADAM17 kann einerseits über die Transaktivierung, also durch proteolytische Spaltung von EGFR-Liganden, die Aktivität des EGF-Rezeptors steigern. Andererseits kann ADAM17 über Prozessierung des Notch1-Rezeptors die Expression des EGFR erhöhen und somit zusätzlich eine gesteigerte Aktivierbarkeit des Rezeptors auslösen (siehe Abbildung 1.12).

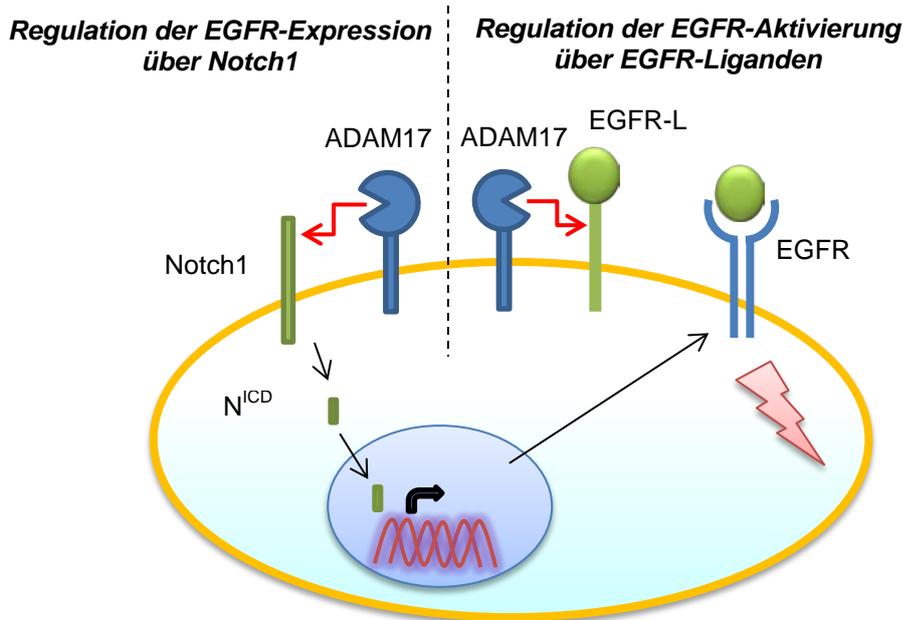


Abbildung 1.12: Vereinfachte schematische Darstellung der Regulationsmechanismen der EGF-Rezeptor-Expression und Aktivierung durch ADAM17.

ADAM17 (blau, rechts) stimuliert durch Prozessierung eines EGFR-Liganden (grün) den EGFR (blau) [Transaktivierung]. Das Prozessieren des Notch1-Rezeptors durch ADAM17 (dunkelblau, links) und dem γ -Sekretase-Komplex (nicht dargestellt) resultiert in der Freisetzung eines intrazellulären Teils des Notch1-Rezeptors (N^{ICD}), welcher mit DNA-bindenden Proteinen interagiert. Darauf folgt eine veränderte Genexpression zu Gunsten einer erhöhten EGFR-Verfügbarkeit auf der Membran. Beide Wege führen zu einem gesteigerten EGFR-Signaling und dementsprechend zu verändertem Zellverhalten wie Proliferation und Migration.

1.2.3 Verändertes Zellverhalten durch Dysregulation von ADAM17 in Tumoren

Die abnorm gesteigerte Expression von ADAM17 und seinen Substrate (EGFR-Liganden und Notch1) in Tumoren, geht mit zahlreichen funktionellen Veränderungen der Krebszelle einher:

Mit Hilfe von *in vitro* Studien konnten McGowan et al. durch Überexpression von ADAM17 in MCF-7 Brustkrebszellen deren Fähigkeit zur Proliferation und Invasion erhöhen, eine Herunterregulation von ADAM17 in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 verringerte dieses progressive Zellverhalten (McGowan et al., 2007). Kenny und Bissell untersuchten den Einfluss von ADAM17 auf Brustkrebstumore in einem dreidimensionalen Zell-Modell.

Sowohl durch Herunterregulation der ADAM17-Expression durch siRNA, als auch durch Einsatz des Metalloproteasen-Inhibitors TAPI-2, konnte in Folge eines verminderten *Sheddings* von TGF- α und Amphiregulin der maligne Phenotyp von epithelialen Brustkrebszellen (T4-2) in einen weniger malignen Phenotyp mit Zellpolarität und ursprünglicher Azinusstruktur des Brustgewebes umgewandelt werden (Kenny und Bissell, 2007).

Auch Zheng et al. fanden einen Einfluss von ADAM17 auf die Zellproliferation und Invasion von Brustkrebszellen (MDA-MB-231). Darüber hinaus konnten sie eine gesteigerte Angiogenese und ein ADAM17-abhängiges *Shedding* von VEGF und TGF- α beobachten. Sie zeigten, dass der maligne Phänotyp der Brustkrebszellen durch eine gesteigerte Aktivierung des EGFR-PI3K-AKT-Signalwegs ausgelöst wurde (Zheng et al., 2009).

In Gliomen wurde eine gesteigerte Zellmigration und Invasion nach Stimulation von ADAM17 über eine erhöhte Freisetzung von TGF- β 1 gezeigt (Lu et al., 2011).

Für das Nierenzellkarzinom zeigten Lee und Franovic eine ADAM17-abhängige TGF- α -Sekretion. *Silencing* von ADAM17 führte in der humanen Nierenzellkarzinom Zelllinie 786-0 zu einer Reduktion des TGF- α -*Sheddings*, einer verminderten EGFR-Phosphorylierung sowie einer verringerten Migrations- und Proliferationsrate der Tumorzellen. Diese Beobachtungen konnten auch auf ein Xenograft-Modell übertragen werden. Eine Unterdrückung von ADAM17 führte in Nackt-Mäusen zu einer herabgesetzten Tumorzellproliferation und Tumorgenese sowie einer verringerten tumorbedingten Entzündungsreaktion (Franovic et al., 2006).

Ringel et al. zeigten für Krebszelllinien des Pankreasdrüsengangkarzinoms (CAPAN-1) ein durch ADAM17 induzierbares *Shedding* von TNF- α . Durch Herunterregulation von ADAM17 konnte die Invasion minimiert werden, während die Proliferation unbeeinflusst blieb (Ringel et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Überexpression von ADAM17 oft durch verändertes Zellverhalten wie Proliferation, Migration, Invasion und Angiogenese zu einem malignen Phänotyp führt und entscheidend zu Tumorinitiation, -progression und Metastasierung beiträgt.

1.3 ADAM17 als Zielstruktur in der Krebsbehandlung

Aufgrund der genannten Bedeutung von ADAM17 in der Krebsentstehung und -progression ist die Verwendung dieser Protease als Tumormarker und insbesondere eine Inhibition der selbigen in malignen Erkrankungen von großem therapeutischem Interesse.

1.3.1 Therapeutische Ansätze in der Krebsbehandlung

Neben den konventionellen Krebstherapien wie Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie kommt heutzutage den antikörperbasierten Therapien und dem Einsatz spezifischer Inhibitoren eine immer größere Bedeutung zu. Bisher werden Inhibitoren und Antikörper klinisch lediglich für die Behandlung bestimmter Tumore eingesetzt, weswegen der Einsatz von klassischen Zytostatika immer noch die überwiegende Behandlungsstrategie darstellt (Herdegen, 2008). Jedoch steigt die Anzahl von Forschungsgruppen, die sich mit der Identifizierung neuer Tumor-spezifischer Antigene, sowie deren spezifischer Blockierung beschäftigen, was ein künftig breiteres Spektrum der klinisch einsetzbaren Antikörper erwarten lässt (Kenny, 2007).

Vorteil der Antikörper-basierten Therapien im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie sind unter anderem die Reduktion toxischer Effekte auf gesundes Gewebe und die daraus resultierenden Nebenwirkungen (Zahorowska, 2009; Aly, 2012). Bekannte systemische und lokale Konsequenzen der klassischen Chemotherapie sind beispielsweise Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und Haarausfall, welche durch den generalisiert hemmenden Einfluss auf schnell proliferierende Zellen, wie Krebszellen, aber auch Zellen der Magenschleimhaut und des Haares ausgelöst werden (Herdegen, 2008).

Auch treten bei Zytostatikagabe oft Resistenz- bzw. *Escape*-Mechanismen auf, beispielsweise durch Überexpression von *ABC-containing drug efflux* Transportern, welche den Transport von über 80 % der Chemotherapeutika regulieren. Sie sind bei verschiedenen Krebsarten dysreguliert und steigern beispielsweise die Chemoresistenz bei der Behandlung von Brustkrebs (Tien, 2000).

1.3.3 ADAM17-Inhibitoren und Anti-ADAM17-Antikörper

Da auch die Metalloprotease ADAM17 in zahlreichen Tumoren überexprimiert wird, und viele der von ihr prozessierten Substrate in der Lage sind den EGF-Rezeptor zu aktivieren, bietet diese Protease einen vielversprechenden Ansatzpunkt das Wachstum bzw. die Metastasierungsrate von Tumoren einzudämmen. In den frühen 1990ern wurden bereits einige Inhibitoren gegen Matrixmetalloproteasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet, so beispielsweise Bastimastat (BB-94) und Marimastat, die beide in Xenograft-Modellen wie auch im transgenen Mausmodell des Pankreaskrebses effektiv das Tumorwachstum hemmen konnten. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in Phase III-Studien mit Krebspatienten validiert werden. Eine der Problematiken war beispielsweise das Auftreten eines muskulo-skeletalen Syndroms, welches die Menge der Inhibitorgabe einschränkte (Kenny, 2007).

Später entwickelten zahlreiche Firmen Inhibitoren, die ADAM17-spezifisch hemmen sollten. Ro-32-7315 (Roche) inhibierte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das TNF- α -Shedding nach LPS-Stimulation. GW-3333 (GlaxoSmithKline) konnte ADAM17 funktionell hemmen und zeigte Wirkung in einem adjuvanten Arthritis-Modell in Ratten. Die meisten dieser Inhibitoren sind jedoch nicht ADAM17 spezifisch, sondern wirken auch hemmend auf andere Metalloproteasen (Kenny, 2007).

Spezifischere ADAM17-Inhibitoren zu generieren, beispielsweise in Form von Anti-ADAM17-Antikörpern, ist daher weiterhin von großem Interesse. Bisher gab es nur wenige Antikörper die eine inhibitorische Wirkung auf ADAM17 zeigten (Tape et al., 2010; Richards et al., 2012).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die im Rahmen des SFB877 generierten monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörper hinsichtlich ihrer antigenspezifischen Bindungsfähigkeit zu verifizieren und ihren Einsatz in biochemischen, molekularbiologischen und potentiell diagnostischen Anwendungen zu etablieren. Gleichzeitig soll die Expression von ADAM17 in den verwendeten Tumorzelllinien analysiert werden.

Für einige Zelllinien wurde eine ADAM17-Expression bereits gezeigt, z.B. MDA-MB-231 (Zheng et al., 2009) und NCI-H292 (Baumgart et al., 2010), für andere, beispielsweise für die Pankreaszelllinien Panc 89 und Panc TuII, lagen zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns nach unserer Kenntnis keine Ergebnisse vor.

Des Weiteren sollen in den pankreatischen Krebszelllinien, die im Hinblick auf ADAM17 bislang weniger gut untersucht wurden, Signaltransduktionswege geprüft werden, die für Krebsentstehung und Progression essentiell sind, beispielsweise das EGFR-*Signaling* und der Einfluss des Notch1-Rezeptors. Die funktionelle Bedeutung von ADAM17 in diesen Zelllinien soll evaluiert, neue Substrate und Interaktionspartner von ADAM17 sollen identifiziert werden.

Zudem galt es, die generierten Antikörper auf ihre physiologische Funktion hin zu prüfen und eine mögliche Antikörper-induzierte Inhibition von ADAM17 zu untersuchen. Hierzu mussten zunächst geeignete zellbasierte *Readout*-Systeme optimiert und standardisiert werden, um ein möglichst zuverlässiges, zügig durchführbares Test-Verfahren zu etablieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Panc 89	Humane Zelllinie des duktales Pankreaskarzinom Ursprung: Lymphknotenmetastase Synonym: T3M4 Zur Verfügung gestellt von Prof. Holger Kalthoff, UKSH, Kiel
Colo 357	Humane Zelllinie des nicht endokrinen pankreatischen Krebses Ursprung: Lymphknotenmetastase Zur Verfügung gestellt von Prof. Holger Kalthoff, UKSH, Kiel
Panc TuII	Humane Zelllinie des duktales Pankreaskarzinom Ursprung: Pankreas, Primärtumor Synonym: Panc TuI, PaCa2, PaTu-I, Panc2, Pc2 Zur Verfügung gestellt von Prof. Holger Kalthoff, UKSH, Kiel
MDA-MB-231	Humane Zelllinie des Brustkrebses, Adenokarzinom Ursprung: Pleura Erguss Zur Verfügung gestellt von Prof. Holger Kalthoff, UKSH, Kiel
NCI-H292	Humane Krebszelllinie des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses, mukoepidermoid Karzinom Ursprung: Halslymphknoten Metastase Zur Verfügung gestellt von Dr. Anja Baumgart, TU München

NCI-H292-shA17 humane Krebszelllinie des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses, mukoepidermoid Karzinom, stabil transfiziert mit shRNA (*short hairpin RNA*) gegen ADAM17 (Baumgart et al., 2010)
Ursprung: Halslymphknoten Metastase
Zur Verfügung gestellt von Dr. Anja Baumgart, TU München

2.1.2 Zellkultur-Medien, -Reagenzien, -Stimulanzen und -Inhibitoren

Medien

RPMI RPMI 1640 ohne L-Glutamin,
ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS)

RPMI (mit Additiven)
für NCI-H292 RPMI 1640 ohne L-Glutamin
ergänzt mit:
10 % fötalem Kälberserum (FCS)
5 % Penicillin/Streptomycin
2 nM Glutamin
10 nM HEPES
1 mM Natrium Pyruvat
4500 mg/L Glucose
1500 mg/L Natrium Bicarbonat
für NCI-H292-shA17 siehe RPMI (mit Additiven)
+ 5 ng/ml EGF

Antibiotika

Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH,
Pasching, Austria)

Transfektionsreagenzien

Transfektion mit siRNA gegen ADAM17	a) siRNA gegen ADAM17 „ <i>Flexi tube siRNA ADAM17</i> “; Negativkontrolle „ <i>AllStars Negative Control siRNA</i> “ Transfektionsreagenz „ <i>HiPerFect</i> “ (Qiagen, Hilden) b) „ <i>ON-TARGETplus SMARTpool siRNA ADAM17</i> “; Negativkontrolle „ <i>siGENOME Non-Targeting siRNA</i> “; Transfektionsreagenz „ <i>DharmaFECT</i> “ (ThermoFisher, Schwerte)
Transfektion mit mut16	Turbofect (Fermentas, St. Leon-Rot)

Zellstimulanzien und Inhibitoren

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure 0,1 M (in dH ₂ O); pH 8 (Roth, GmbH, Karlsruhe)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt)
Proteasom-Inhibitor	MG-132 (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt)
γ -Sekretase-Inhibitor	γ -Sekretase-Inhibitor IX (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt)
Anti-ADAM17-Antikörper	siehe Kapitel 2.1.7

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGAA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) erworben.

2.1.4 Puffer und Lösungen

10 x PBS	80 g NaCl
	2 g KCl
	14,4 g Na ₂ HPO ₄
	2 g KH ₂ PO ₄
	ad 1000 ml dH ₂ O

1 x PBS	100 ml 10 x PBS
	ad 1000 ml dH ₂ O

Lyse-Puffer	2,4 g Tris
	8,8 g NaCl
	0,6 g EDTA
	10 ml Triton X-100
	pH 7,5
	ad 100 ml dH ₂ O

pro 50 ml eine Tablette „*Complete*“ Protease Inhibitor
ohne EDTA (Roche applied science, Mannheim)

Lysispuffer/8 mM CaCl ₂	50 ml Lysepuffer
	+ 0.4 ml 1M CaCl ₂

Westernblot

10 x TBS
60,57 g Tris
116,88 g NaCl
pH 7,4
ad 1000 ml dH₂O

1 x TBS
100 ml 10 x TBS
ad 1000 ml dH₂O

1 x TBS-T
100 ml 10 x TBS
500 µl Tween
ad 1000 ml dH₂O

10 x Transferpuffer
30,3 g Tris
144,1 g Glycin
ad 1000 ml dH₂O

1 x Transferpuffer
100 ml 10 x Transferpuffer
200 ml Methanol
ad 1000 ml dH₂O

Blockier-Puffer
5 % Milchpulver in TBS-T

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer
2 % bzw. 5 % FCS in PBS 0,05 % NaN₃
Apoptosemarker
Propidiumiodid (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Colloidal-Coomassie-G250 Staining

Fixierlösung
50 ml Methanol (50 % v/v)
2 ml Phosphorsäure (2 % v/v)
48 ml dH₂O

Equilibrierlösung	34 ml Methanol (34 % v/v) 2 ml Phosphorsäure (2 % v/v) 17 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 61 ml dH ₂ O
Färbelösung	34 ml Methanol (34 % v/v) 6 µg Coomassie G250 (0.066 % w/v) 2 ml Phosphorsäure (2 % v/v) 61 ml dH ₂ O 17 g (NH ₄) ₂ SO ₄
Immunzytochemie	
PFA 4 %	1 g Paraformaldehyd in 15 ml dH ₂ O auf 60 °C erhitzen mit 1 N NaOH-Lösung auf pH 7 ad 25 ml dH ₂ O
Mowiol/DAPKO+DAPI	100 µl DABCO 1 ml Mowiol 1 µl DAPI
Immunopräzipitation	
Beads	NHS-aktivierte Sepharose <i>Beads 4 Fast Flow</i> (GE Healthcare, München)
2.1.5 Kits	
Bestimmung von Proteinkonzentrationen	BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Perbioscience Deutschland, Bonn)
Proliferations-Assay	<i>CellTiter-Blue Cell Viability Assay</i> (Promega GmbH, Mannheim)

2.1.6 Größenmarker

Größenbestimmung
von Proteinen *Unstained molecular weight marker* 14,4-116 kDa
(Thermoscientific, Lithuania)

Prestained molecular weight marker 20-120 kDa
(Thermoscientific, Lithuania)

PageRuler™ Plus, Prestained Protein Ladder
10-250 kDa (Thermoscientific, Lithuania)

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti- β -Aktin-Antikörper Monoklonaler Antikörper; Ursprungsspezies: Maus
(C4, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, California,
USA); detektiert humanes und murines β -Aktin;
Konzentration: 1:1000 (Westernblot)

Anti-EGFR-Antikörper Monoklonaler Antikörper; Ursprungsspezies Maus
(F4, sc-53274, Santa Cruz Biotechnology, California,
USA); detektiert humanes β -Aktin;
Konzentration: 1:500 (Westernblot)

Anti-aktivierter
Notch1-Antikörper Polyklonaler Antikörper; Ursprungsspezies:
Kaninchen (ab8925, Abcam Cambridge, UK); detektiert
den humanen und murinen aktivierten Notch1-Rezeptor;
Konzentration: 1:500 (Westernblot)

Anti-ADAM17-Antikörper Monoklonaler Antikörper; Ursprungsspezies: Maus
(Klon A300-A318); bindet ein Epitop der Disintegrin-
Domäne von ADAM17 (Herstellung siehe Trad et al.,
2011); Konzentration: 1:1000 (Westernblot: A300),
1:20 (FACS: A300, A318), 1 μ g/ml (Antikörpertestung)

Anti-ADAM17-Antikörper	Monoklonaler Antikörper; Ursprungsspezies: Maus (Klon E20-1 – E20-28, A300E); bindet ein Epitop der membran-proximalen Domäne von ADAM17, (Herstellung siehe Trad et al., 2011); Konzentration: 1:1000 (Westernblot: A300E), 1:20 (FACS: A300E), 1:200 (Immunfluoreszenz: 300E), 1 µg/ml (Antikörpertestung)
Anti-ADAM17-Antikörper	Monoklonaler Antikörper; Ursprungsspezies: Maus (Klon A26-1 – A26-27); bindet ein Epitop der katalytischen von ADAM17 (Herstellung siehe Trad et al., 2011); Konzentration: 1 µg/ml (Antikörpertestung)
Isotypkontrolle	Purified Mouse IgG1, κ Isotyp Ctrl, MOPC-21 (BioLegend, San Diego, CA, USA)
Sekundäre Antikörper	
Anti-Maus-Antikörper (<i>Westernblot</i>)	Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Maus IgG (H+L) (Thermoscientific, Waltham, MA, USA) Konzentration: 1:5000
Anti-Kaninchen-Antikörper (<i>Westernblot</i>)	Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper IgG (H+L) (Thermoscientific, Waltham, MA, USA); Konzentration: 1:5000

Anti-Maus-Antikörper
(*Immunfluoreszens*)

Alexa Fluor 594-gekoppelter IgG₁
Ziege Anti-Maus-Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe)
Konzentration: 1:300

Alexa 466-gekoppelter IgG₁ Ziege Anti-Maus-
Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe)
Konzentration: 1:300

Anti-Maus-Antikörper
(*FACS*)

Allophycocyanin (APC)-konjugierter *AffiniPure*
F(ab')₂-Fragment Ziege Anti-Maus-Antikörper IgG
(H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.,
West Grove, PA, USA); Konzentration: 1:50

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung der adhärenter Zelllinien Panc 89, Colo 357, Panc TuII, MDA-MB-231, NCI-H292 und NCI-H292-shA17 erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS (ggf. mit Additiven, siehe Material Kapitel 2.1.2) bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator (Herocell, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold).

Gewöhnlich wurden die Zellen nach Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz je nach Zelllinie alle 4 - 5 Tage mit 2 - 5 ml Trypsin-EDTA (PAA Labor, Pasching) für 3 - 5 min inkubiert und wenn erforderlich zusätzlich mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Im Anschluss wurde zentrifugiert (287 g, 3 min, 25 °C), im Verhältnis 1:5 bis 1:20 gesplittet und mit 10 ml frischem Medium in eine neue 10 cm-Zellkulturschale transferiert.

2.2.2 Transfektion und Zellyse

Einen Tag vor Durchführung der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen in 6-well-Platten ausgesät, um zu Versuchsbeginn eine Konfluenz von etwa 75 % zu erhalten.

Die Transfektion wurde entweder mit „*Flexi tube siRNA ADAM17*“ (5 nM) bzw. Negativkontrolle „*AllStars Negative Control siRNA*“ (5 nM) und dem „*HiPerFect*“ Transfektionsreagenz (12 µl für ein Gesamtvolumen von 2300 µl) (Qiagen, Hilden) oder mit „*ON-TARGETplus SMARTpool siRNA ADAM17*“ (25 nM) bzw. Negativkontrolle „*siGENOME Non-Targeting siRNA*“ (25 nM) und dem Transfektionsreagenz „*DharmaFECT*“ (10 µl für Gesamtvolumen von 2000 µl) (ThermoFisher, Schwerte) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die 6-well-Platte wurde für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag 4 wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. 2 ml eiskaltes PBS wurden hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst, resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (400 g, 5 min, 25 °C) wurde der Überstand abgegossen und das Zell-Pellet je nach Größe in 50 - 100 µl Lysispuffer aufgenommen. Die 2 ml-Reaktionsgefäße wurden in einem 50 ml-Röhrchen mit Zellstoff fixiert und 1 h im Kühlraum bei 4 °C gerollt. Im Anschluss an eine 30-minütige Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C wurde der Protein enthaltene Überstand in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Das DNA- und unlösliche Zellbestandteile enthaltende Pellet wurde entsorgt.

2.2.3 Einsatz des γ -Sekretase-Inhibitors

5×10^5 Zellen wurden in 6-*well*-Platten am Tag vor Versuchsdurchführung ausgesät. 1 μ M, 5 μ M bzw. 10 μ M des γ -Sekretase Inhibitors IX (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) wurden in gleichen Volumina DMSO gelöst. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen eine Stunde mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 (Endkonzentration: 2 μ mol) behandelt und 30 min mit EGTA (Endkonzentration: 2 mmol) aktiviert. Die Lyse der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben.

2.2.4 BCA-Assay

Um die Gesamteinkonzentration der Lysate zu bestimmen wurde der BCA-Assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Die Erstellung der Eichgeraden erfolgte mit dem im Kit enthaltenen Serumalbumin nach Herstellerprotokoll. Die Proben wurden als 1:10 Verdünnung vorbereitet. Als Verdünnungsmittel wurde der zur Lysatherstellung eingesetzte Lysispuffer verwendet.

Je 10 μ l der Proben wurden in Dreifachansätzen in eine 96-*well*-Platte mit flachem Boden pipettiert. Die Reaktionsreagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt und pro *well* je 100 μ l des Reagenzes mit einer Multipipette hinzugefügt. Nach 5-minütigem Schütteln im Dunkeln inkubierten die Proben für 30 min bei 37 °C und weitere 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Fluoreszenz bei 562 nm mit dem Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) gemessen. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

2.2.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE und Westernblot

Zur Auftrennung und Detektion von Proteinen wurden die Methoden der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (1970) und des Westernblots verwendet.

Lysate eines Proteingehalts von etwa 45 μ g wurden mit 2 x bzw. 5 x reduzierendem Laemmli-Puffer 5 min bei 95 °C erhitzt und im Anschluss ca. 15 sec in einer Tischzentrifuge (Qualitron Inc., Korea) zentrifugiert. Die zehn Taschen eines selbst hergestellten 10-prozentigen SDS-Gels (1 mm) wurden in einer mit SDS-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit den Proben sowie einem Molekulargewichtsmarker („*Prestained Protein Molecular Weight Marker*“, Fermentas, St. Leon-Rot) beladen. Die Proben wurden innerhalb von 60 - 70 min bei 200 V elektrophoretisch getrennt. Eine Polyvinylidenfluorid-

Membran (PVDF-Membran) wurde vor Einbau in die Blotkammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 20 sec mit Methanol aktiviert, dreimal mit ddH₂O gespült und wie das Gel 10 min in Transferpuffer geschwenkt. Die Kassette des „*Mini Trans-Blot Cell-Systems*“ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) wurde nach Herstellerprotokoll zusammengebaut und die Kammer an eine Stromquelle (*PowerPac-Basic*, Bio-Rad, CA, USA) angeschlossen. Nach dem Transfer (120 min, 200 mA) erfolgte die Blockierung der Membran für 1 h in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver. Dann wurde die Membran einmal mit TBS-T gespült und 2 h mit dem primären Antikörper in TBS-T mit 1 % Magermilchpulver in einem 50 ml-Sarstedtröhrchen bei Raumtemperatur gerollt (je nach AK 1:500 bis 1:1000). Nach dreimaligem 10-minütigem Waschen mit TBS-T, wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Maus POD; 1:5000) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in TBS-T mit 1 % Magermilchpulver über Nacht inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen, auf einer Klarsichtfolie platziert und die Entwicklerlösung (a) ECL-Plus („*AmershamTM ECL Plus Western Blotting Detection System*“, GE-Healthcare, München), oder (b) „*LumiGLO Reagent and Peroxide*“ (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) (c) „*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Detektion erfolgte in einem *Luminescent Image Analyser*, LAS-1000 CH (Fujifilm, Düsseldorf) bei einer Expositionszeit von 15 - 30 min.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie wurden Oberflächenmoleküle auf nicht permeabilisierten Zellen nachgewiesen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie am Versuchstag eine Konfluenz von etwa 80 % aufwiesen. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst, resuspendiert, bei 287 g und 15 °C für 5 min zentrifugiert, gezählt und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Es wurde permanent auf Eis bzw. bei 4 °C gearbeitet.

Das Pellet wurde dreimal mit 1 ml PBS (0,05 % Natriumazid) gewaschen, und pro Waschgang einmal bei 400 g, 5 min und 4 °C zentrifugiert. Es wurden pro Versuchsansatz je 1×10^6 Zellen in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. In diesem Experiment wurden pro Zell-Linie 3 - 4 Versuchsansätze vorbereitet: Unmarkiert, Isotypkontrolle und 1 - 2 Anti-ADAM-17-Antikörper. Die Antikörper wurden mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml in einem Volumen von 50 µl PBS (5 % FCS) zu den Zellen in die Reaktionsgefäße gegeben.

Nach einer einstündigen Inkubation mit zwischenzeitlichem Resuspendieren nach 30 min wurden die Proben dreimal mit PBS (0,05 % Natriumazid) gewaschen und stets bei 400 g, 5 min und 4 °C zentrifugiert. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µl des mit Allophycocyanin konjugierten, sekundären Antikörpers (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) in 50 µl PBS (5 % FCS) verdünnt (Endkonzentration: 20 µg/ml) und auf die Zellen gegeben. 10 µl des Apoptosemarkers Propidiumiodid (PI, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurden zu mindestens 2 Proben einer Zelllinie gegeben, um bei der Messung apoptotische Zellen aus der Analyse auszugrenzen.

Die Zellen wurden 1 h unter Lichtausschluß inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (5 % FCS) und Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in 500 µl PBS (5 % FCS) aufgenommen und in 5 ml-*Flow-Cytometry*-Röhren (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Mittels Durchflußzytometrie wurde die Fluoreszenz der Zellen bestimmt (*FACSCanto* und *FACS DIVA* Software, BD Bioscience, Heidelberg). Die Ergebnisse wurden in Form von Histogrammen dargestellt.

2.2.7 Immunozytochemie

Zur Darstellung intrazellulärer und extrazellulärer, membrangebundener Proteine wurde die Immunozytochemie durchgeführt.

Deckgläschen wurden in 6-*well*-Platten platziert und Zellen darauf in verschiedenen Konzentrationen (1×10^5 - 1×10^6) ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und die Gläschen dreimal mit 1 ml PBS gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 % FCS in PBS inkubiert. Die Deckgläschen wurden dreimal gewaschen, für 20 min in 4-prozentigem PFA fixiert und für 5 min mit 0,2 % Saponin enthaltendem PBS permeabilisiert. Zur Absättigung freier Aldehydgruppen des PFA wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,12 % Glycin enthaltenem PBS (0,05 % Saponin) inkubiert und ein weiteres Mal mit 1 ml PBS (0,2 % Saponin) gewaschen. Der Primärantikörper (Anti-ADAM17-Antikörper: A300E) wurde in 10 % FCS enthaltenem PBS (0,2 % Saponin) 1:200 verdünnt (Endkonzentration: 5 µg/ml) und pro Deckgläschen 50 µl der Lösung auf Parafilm in einer feuchten Kammer vorgelegt. Darauf wurde das Deckgläschen mit der zellbeschichteten Seite nach unten platziert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Fünf 50 ml-Bechergläser wurden mit je 20 ml PBS (0,2 % Saponin) gefüllt und der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 594 oder Alexa Fluor 466 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper [2 mg/ml], Invitrogen, Karlsruhe) wurde

1:300 in 10 % FCS enthaltenem PBS (0,2 % Saponin) verdünnt und je 50 µl der Lösung in der feuchten Kammer vorgelegt.

Jedes Deckgläschen wurde mit einer Pinzette aufgenommen, 8 - 10-mal langsam in den 5 Gläsern der Reihe nach auf und ab bewegt und auf der vorgelegten Antikörperlösung platziert. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gläschen wie oben beschrieben gewaschen mit 15 µl „Mowiol/DABCO“ + „DAPI“ auf dem Objektträger fixiert und bei 4 °C gelagert. Für die Darstellung extrazellulärer bzw. membrangebundener Proteine wurde die Fixierung nach dem auf die Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgenden Waschschrift durchgeführt; es wurde durchgängig PBS ohne Zusatz von Saponin verwendet. Eine Färbung der Zellmembranen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml *Rhodamine-labeled Wheat Germ Agglutinin* (WGA, Vector-Laboratories, Burlingame, CA, USA) 10 min vor Fixierung erreicht. Die Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenz Mikroskop (Olympus IX 81, CLSM FV 1000, Olympus, Hamburg).

2.2.8 Transfektion und Vorbereitung von Immunopräzipitations-Gelen für die Massenspektrometrie

Transfektion

In zwanzig 10 cm-Zellkulturschalen wurden je 4×10^6 Zellen (Panc 89) ausgesät, um am Tag der Transfektion einen etwa 70 - 75 % konfluenten Zellrasen zu erhalten. Am Tag 2 wurden 18 der Schalen mit dem Konstrukt „mut16“ (einer inaktiven ADAM17-Variante mit PC-TAG; Struktur und Verwendung siehe Anhang Kapitel 6.1.1, 6.1.2) und zwei der Schalen mit eGFP transfiziert. Dafür wurden 6 µg DNA mit 15 µl Turbofect (Fermentas, St. Leon-Rot) in 1 ml serumfreiem Medium für 20 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der 20 Schalen abgenommen, 5 ml frisches Medium dazugegeben und nach Ablauf der Inkubation je 1 ml des Transfektionsansatzes auf die Schalen pipettiert. Am Folgetag wurde das Medium durch 5 % FCS enthaltenes Medium ersetzt. Einen Tag später wurde die Transfektionseffizienz anhand der Fluoreszenz der mit eGFP transfizierten Zellen kontrolliert (Olympus CKX41, Hamburg). Bei ausreichender Transfektion erfolgte Stimulation und anschließende Zellyse.

Stimulation und Zellyse

In einem 50 ml-Röhrchen wurde das zur Stimulation notwendige Medium vorbereitet: Pro Schale wurden je 2 ml RPMI 1640 Medium (10 % FCS) mit 1 µg/ml *Phorbol-12-myristat-13-acetat* (PMA, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) versetzt.

Das Kulturmedium wurde durch das PMA enthaltene Medium ersetzt und nach zwei Minuten Stimulation wieder abgenommen. Die Zellen wurden mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen mit 1 ml frischem PBS versetzt, zügig mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 287 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 250 µl Lysispuffer versetzt und resuspendiert. Das 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde in einem 50 ml-Röhrchen mit Zellstoff fixiert und 30 min bei 4 °C gerollt. Im Anschluss an eine 15-minütige Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Immunpräzipitation

Die 18 Lysate der mit „mut16“ transfizierten Zellen wurden zusammen in ein 15 ml-Röhrchen pipettiert, ebenso wie die 2 Lysate der eGFP Kontrolle in einem 2 ml-Reaktionsgefäß zusammengeführt wurden.

Die in Ethanol gelagerten HPC4-gekoppelten Sepharosebeads (Kopplung wurde durchgeführt von Stefan Düsterhöft, Protokoll siehe Anhang Kapitel 6.1.3) wurden für die Immunpräzipitation vorbereitet: Nach 5-minütiger Zentrifugation der, die *Beads* enthaltenden, 1,5 ml-Reaktionsgefäße bei 500 g und 8 °C wurde das Ethanol abgenommen, die *Beads* mit 500 µl Lysepuffer/8 mM CaCl₂ gewaschen und unter gleichen Bedingungen ein weiteres Mal zentrifugiert. Im Anschluss wurde mit 500 µl Lysepuffer/8 mM CaCl₂ resuspendiert und die Beadsuspension zu gleichen Teilen zu dem „mut16“-Lysat im 15 ml-Röhrchen und dem eGFP-Lysat im 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 4 °C gerollt um eine Bindung des Konstrukts an die *Beads* zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde der Ansatz aus *Beads* und Lysat 5 min bei 500 g und 8 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die im Pellet enthaltenen *Beads* in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und fünfmal mit 1 ml Lysepuffer/8 mM CaCl₂ gewaschen.

SDS-Page und Colloidale-Coomassie Färbung

Der Puffer (Lysepuffer/8 mM CaCl₂) wurde abgenommen und die *Beads* in 30 µl reduzierendem zweifach Laemmli-Puffer 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 g und 8 °C wurden die Proben wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben auf ein 18-prozentiges Gel aufgetragen und 100 min bei 200 V elektrophoretisch getrennt. Danach folgte die Fixierung und Färbung des Gels, deren Schritte unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen mit stets frischen Handschuhen sowie unter dem Abzug durchgeführt wurden um Kontamination des Gels, v.a. mit Keratin, zu vermeiden (Neuhoff et al., 1988).

Nachdem das Gel über Nacht in Fixierlösung geschwenkt wurde, folgten drei 30-minütige Waschgänge mit Millipore-Wasser und eine einstündige Equilibrierung (Equilibrierlösung für Colloidal-Coomassie-Färbung, siehe Material 2.1.2). Anschließend wurde das Gel vier Tage in einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung geschwenkt, zur Entfärbung kurz mit Millipore-Wasser gespült, weitere 10 min equilibriert und eingeschweißt. Die anschließende Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Daten-Analyse wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Bart von den Berg am Institut für Experimentelle Medizin des UKSH durchgeführt (Z2 Unit des SFB877).

2.2.9 Proliferations-Assay

Um die Beteiligung von ADAM17 bei der Zell-Proliferation zu überprüfen und die Wirkung verschiedener Antikörper auf die Zell-Vermehrung zu testen, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt. Dazu wurden 5×10^3 Zellen in 100 µl Medium in 96-well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit 12,5 ng siRNA gegen ADAM17 („*Flexi tube* siRNA ADAM17“, Qiagen, Hilden) über 6 Tage nach Herstellerprotokoll behandelt oder mit Antikörper-Überständen (~1 µg/ml) bzw. gereinigten Antikörpern (1 µg/ml) über vier Tage inkubiert. Die Proliferationsmessung erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Blue Assays* (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerprotokoll.

Im Anschluss an die Messung mit einem „Lambda Fluoro 320 Fluorimeter“ (ex-filter 530/25, em-filter 590/35, Sensitivität 75) wurden die gemessenen Werte nach verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des nach 0 min gemessenen Werts normalisiert (Excel, Microsoft, USA). Die Einheit der Messung wurde in RLU (*Relative Light Units*) angegeben.

2.2.10 Scratch-Assay (Wundheilungs-Assay)

Mit Hilfe des Wundheilungs-Assays wurde der Einfluss verschiedener Substanzen (ADAM17-Inhibitor, monoklonale Anti-ADAM17-Antikörper) auf die Migration von Zellen untersucht.

Einen Tag vor Durchführung des Experiments wurden 6×10^5 Zellen in 12-well-Platten ausgesät, um am Folgetag einen 100 % konfluenten Zellrasen zu erhalten. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit frischem Medium (0,3 % FCS) gewaschen. Auf der Unterseite der Platte wurde mit einem wasserfesten feinen Stift eine waagerechte Orientierungslinie durch den Durchmesser der 12-well-Platte gezeichnet. Unter Anlegen eines Lineals wurde senkrecht zu dieser Orientierungslinie ein Kratzer (*Scratch*) im Zellrasen erzeugt. Dabei wurde eine 100 µl Pipettenspitze (Eppendorf AG, Eppendorf, Hamburg) in einem Winkel von ca. 45 ° zügig entlang des Lineals durch den Zellrasen gezogen. Im Anschluss wurde die Platte einmal mit 0,3 % FCS enthaltenem Medium gewaschen und 1 ml Medium (0,3 % FCS) inklusive des zu untersuchenden, zuvor filtrierten (0,20 µm sterile Filter) Anti-ADAM17-Inhibitors (nicht publiziert) (4 µM) bzw. Anti-ADAM17-Antikörpers (8 µg/µl) zugegeben. Die Breite des *Scratches* wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus CKX41; Kamera DP71, Hamburg) und der zugehörigen Software „cell[^]B“ (Olympus, Hamburg) fotografiert (4er Objektiv, Belichtungszeit 10 ms, Sensitivität ISO 400). Nach 7 - 24 h wurde die Messung wiederholt und die Migrationsunterschiede in Prozent mit den Programmen AxioVision (Carl Zeiss AG, Oberkochen) und Excel (Microsoft GmbH, USA) berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 ADAM17-Expression in humanen Krebszellen – Verifizierung der monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörper

Zur Validierung der Bindungsfähigkeit von den im Rahmen des SFB877 generierten monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörpern wurden verschiedene Krebszelllinien auf ihre ADAM17-Expression hin untersucht. Es handelt sich dabei um die pankreatische Krebszelllinie Colo 357, die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und die *non-small-cell-lung cancer* Zelllinie NCI-H292, deren ADAM17-Expression auf mRNA-Ebene (Colo 357) bzw. Proteinebene (MDA-MB-231, NCI-H292) bereits beschrieben wurde (Ringel et al., 2006; Baumgart et al., 2010; Zheng et al., 2009). Als Negativkontrolle sollte die mit shRNA transfizierte Zelllinie NCI-H292-shA17 fungieren (Baumgart et al., 2010). Für die Zelllinien Panc 89 und Panc TuII wurde, zumindest nach unserem Kenntnisstand, bis zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch keine ADAM17-Expression beschrieben.

Geeignete Antikörper sollten für die Westernblot-Analyse, die Durchflusszytometrie und die Immunocytochemie validiert und die entsprechenden Methodenparameter etabliert werden.

3.1.1 ADAM17 ist in verschiedenen humanen Krebszellen detektierbar

Um die ADAM17-Expression mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A300 zu validieren, wurden zunächst Westernblot-Analysen der oben genannten Zelllinien durchgeführt. Die Krebszelllinien Panc 89, Colo 357, Panc TuII, MDA-MB-231, NCI-H292 und die Negativkontrolle NCI-H292-shA17 wurden jeweils in 6-*well*-Platten vier Tage lang kultiviert und 45 µg Gesamtprotein ihrer Lysate über SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Für die Westernblot-Analyse wurde der monoklonale Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A300 als Primärantikörper und ein POD-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet (siehe Abbildung 3.1).

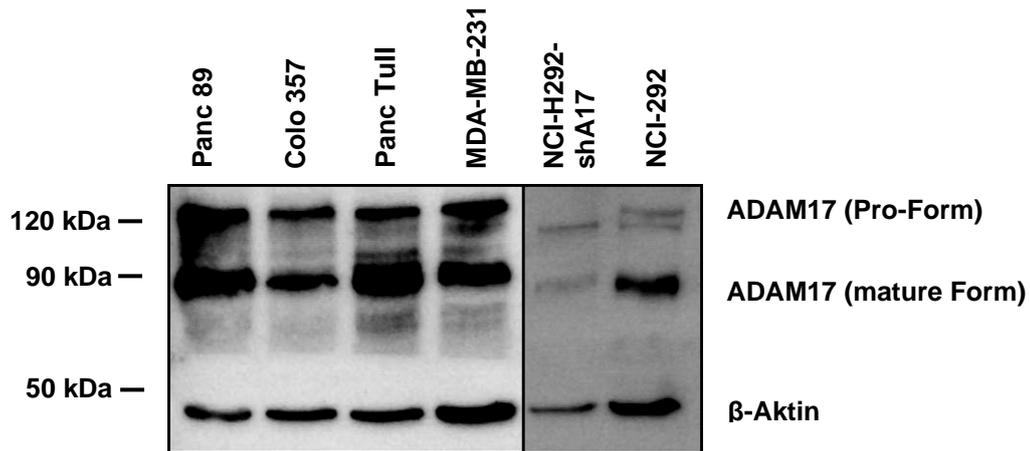


Abbildung 3.1: ADAM17-Expression in humanen Krebszelllinien.

Krebszelllinien wurden 4 Tage in 6-well-Platten gezüchtet, lysiert und 45 µg des Proteinlysats unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE getrennt. Als primärer Antikörper wurde der A300 (Anti-Distintegrin-Domäne) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper. Visualisiert wurde über ECL-Detektion.

In allen fünf Krebszelllinien konnten mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A300 zwei definierte Banden nachgewiesen werden. Verglichen mit dem verwendeten Molekulargewichtsmarker haben die den Banden entsprechenden Proteine ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa bzw. 90 kDa. Die detektierbaren ADAM17-Formen entsprechen der inaktiven Pro-Form von ADAM17 (120 kDa) und der aktiven maturen Form von ADAM17 (90kDa) (Trad et al., 2011).

In der Negativkontrolle NCI-H292-shA17 sind diese Banden nur schwach erkennbar. Die Eignung des Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörpers A300 für Westernblot-Analysen kann somit bestätigt werden. Des Weiteren kann eine ADAM17-Expression in den fünf verwendeten Krebszelllinien validiert werden.

3.1.2 Der Anti-ADAM17-Antikörper A300 detektiert ADAM17 spezifisch

Zur Prüfung der Spezifität des Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörpers A300, wurde die ADAM17-Expression in den drei Krebszelllinien Colo 357, Panc 89, Panc TuII und MDA-MB-231 mittels siRNA unterdrückt und mittels Westernblot untersucht.

Hierzu wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät, mit siRNA gegen ADAM17 vier Tage lang transfiziert und die ADAM17-Expression mittels Westernblot-Analyse detektiert (siehe Abbildung 3.2).

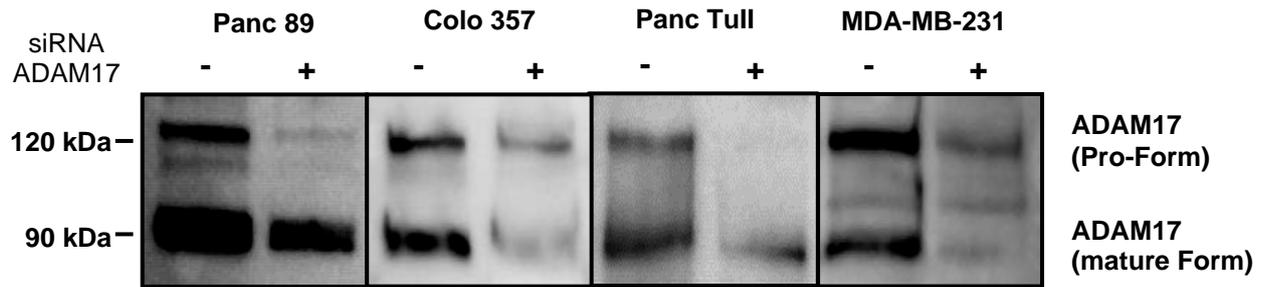


Abbildung 3.2: ADAM17-Expression in humanen Krebszelllinien, transfiziert mit siRNA gegen ADAM17.

Krebszelllinien wurden in 6-well-Platten ausgesät, je ein *well* pro Zelllinie wurde mit siRNA gegen ADAM17 transfiziert (+) und je ein Kontroll-*well* blieb unbehandelt (-). Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, lysiert und 45 µg des Proteinlysats über SDS-PAGE getrennt sowie die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Als primärer Antikörper wurde der A300 (Anti-Distintigrin-Domäne-ADAM17-Antikörper) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper, visualisiert wurde über ECL-Detektion.

In allen verwendeten Zelllinien führt die Transfektion mit der siRNA gegen ADAM17 zu einer verminderten Expression der Pro-Form sowie der maturaen Form von ADAM17, welche mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A300 spezifisch nachgewiesen werden kann. Die Validierung dieser Ergebnisse für Panc 89 und Panc TuII mit β -Aktin-Ladekontrolle finden sich unter Abschnitt 3.2.

3.1.3 Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche von humanen Krebszellen

Um die Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche von humanen Krebszellen zu untersuchen und die Bindungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper im FACS zu verifizieren, wurden die Krebszelllinien Panc 89, Colo 357, Panc TuII und MDA-MB-231 mit verschiedenen Anti-ADAM17-Antikörpern (A300, A318 und A300E) markiert und über Durchflusszytometrie analysiert.

Pro Ansatz wurden je 1×10^6 Zellen verwendet. Als Primärantikörper wurden die Anti-Disintegrin-Domänen-ADAM17-Antikörper A300 und A318 und der Anti-Membranproximale-Domänen-ADAM17-Antikörper A300E in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Als Sekundärantikörper fungierte ein mit Allophycocyanin gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration 20 µg/ml). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von ADAM17 untersucht (siehe Abbildungen 3.3, 3.4, 3.5).

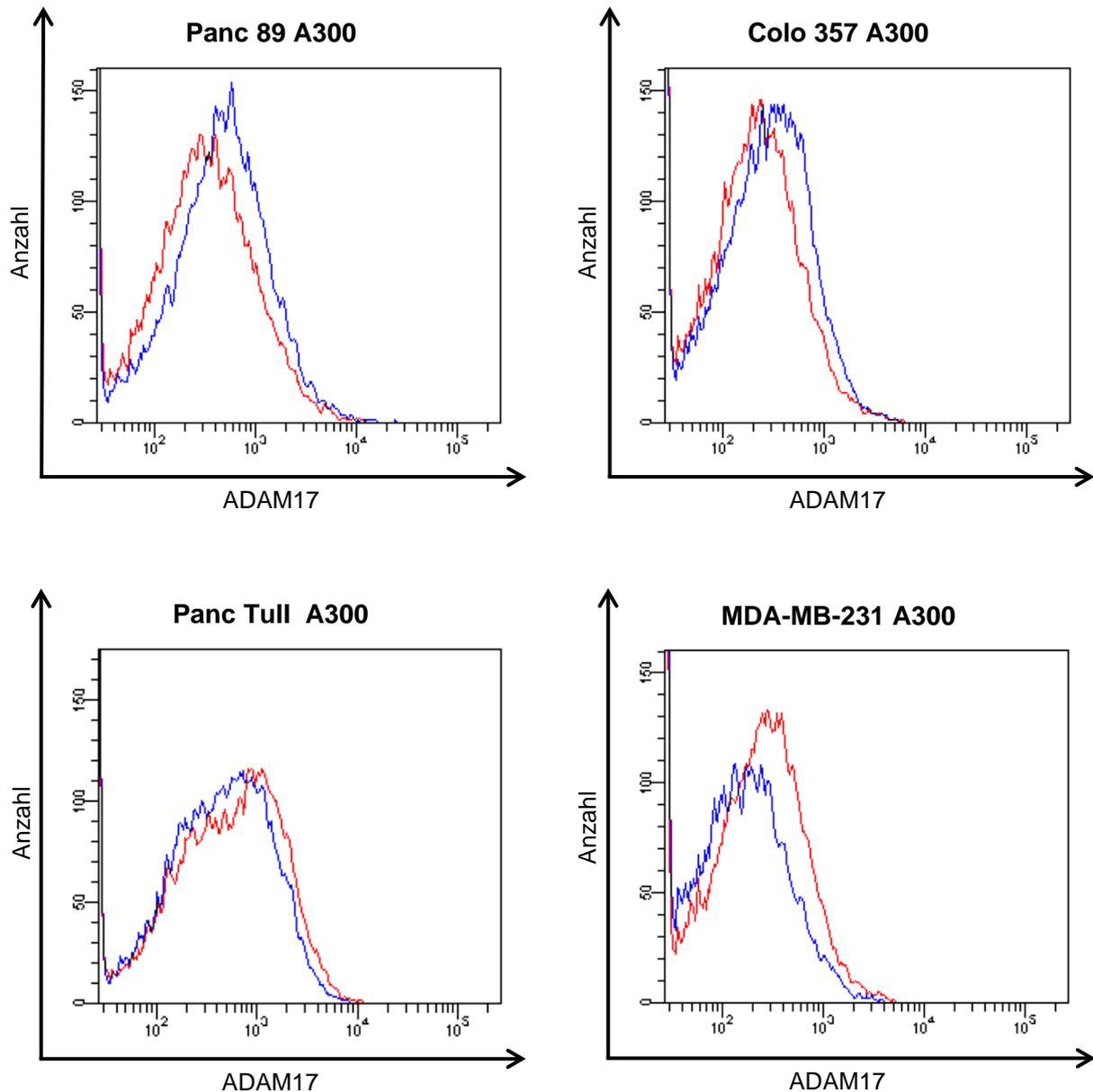


Abbildung 3.3: ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszelllinien detektiert mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A300.

Krebszelllinien wurden in 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Pro zu messendem Ansatz wurden 1×10^6 Zellen verwendet, mit PBS gewaschen, und mit $50 \mu\text{g/ml}$ primärem Antikörper (A300) bzw. entsprechender Menge der Isotypkontrolle (IgG1) versetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein mit Allophycocyanin konjugierter Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration $20 \mu\text{g/ml}$). Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Mit den Anti-Disintegrin-Domänen-ADAM17-Antikörpern A300 und A318 lässt sich die Zelloberflächenexpression von ADAM17 nicht eindeutig bestätigen (siehe Abbildung 3.3, 3.4). Bei Verwendung des Anti-Membran-proximale-Domänen-Antikörpers A300E hingegen zeigt sich in der Histogramm-Darstellung aller vier Zelllinien ein deutlicher *Shift* von den mit A300E markierten Zellen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (siehe Abbildung 3.5).

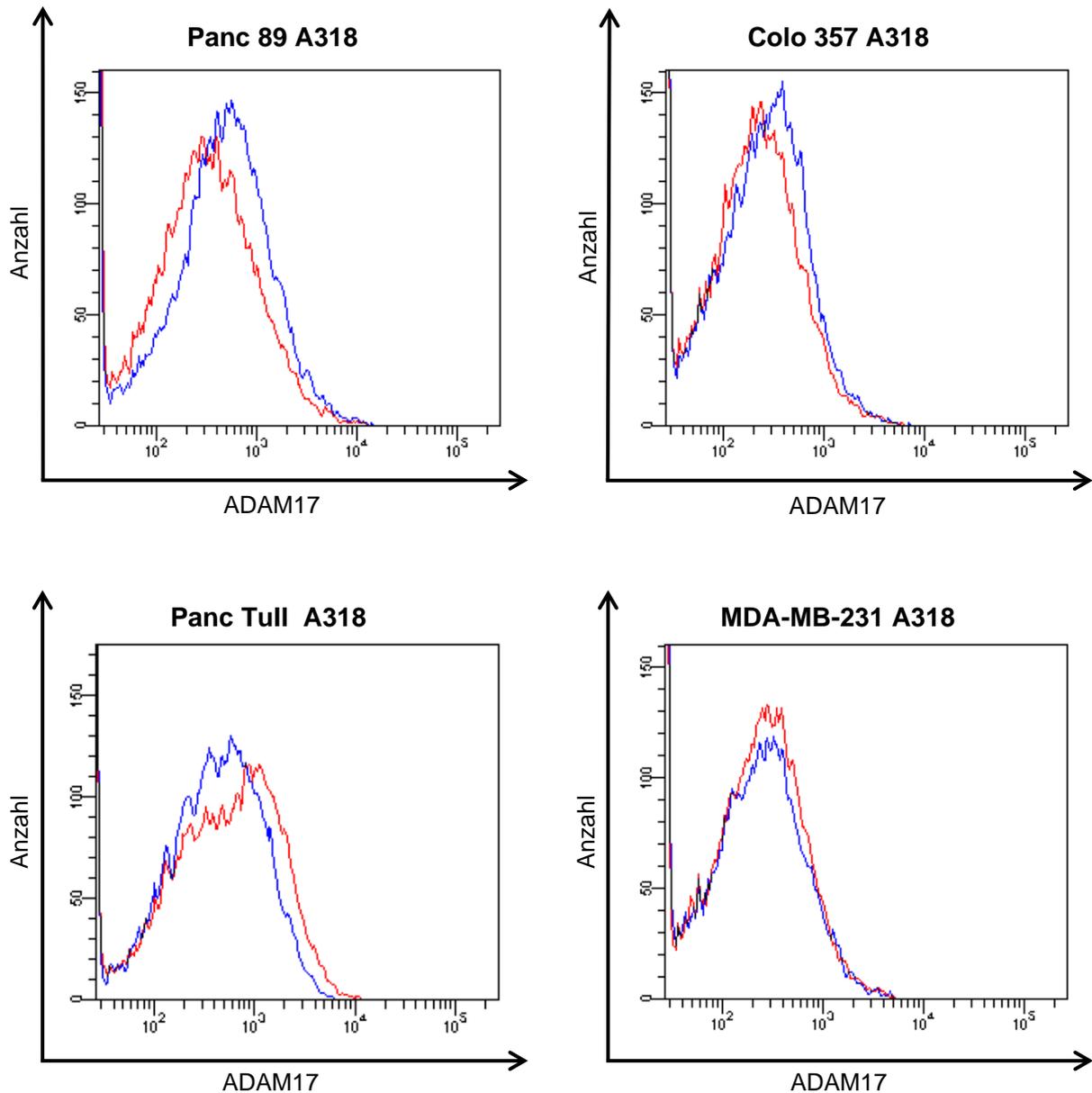


Abbildung 3.4: ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszelllinien, detektiert mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A318.

Krebszelllinien wurden in 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Pro zu messendem Ansatz wurden 1×10^6 Zellen verwendet, mit PBS gewaschen, und mit 50 $\mu\text{g/ml}$ primärem Antikörper (A318) bzw. entsprechender Menge der Isotypkontrolle (IgG1) versetzt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein mit Allophycocyanin konjugierter Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration 20 $\mu\text{g/ml}$). Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Dieser *Shift* ist bei der Untersuchung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) nicht vorhanden. Ein repräsentatives Ergebnis von vier Blutuntersuchungen ist in Abbildung 3.5 dargestellt, weitere Untersuchungsergebnisse finden sich im Anhang Kapitel 6.1.4.

Die Ergebnisse der A300E-Markierung für die PBMCs, die MDA-MB-231- und die Colo 357-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Ahmad Trad zur Verfügung gestellt.

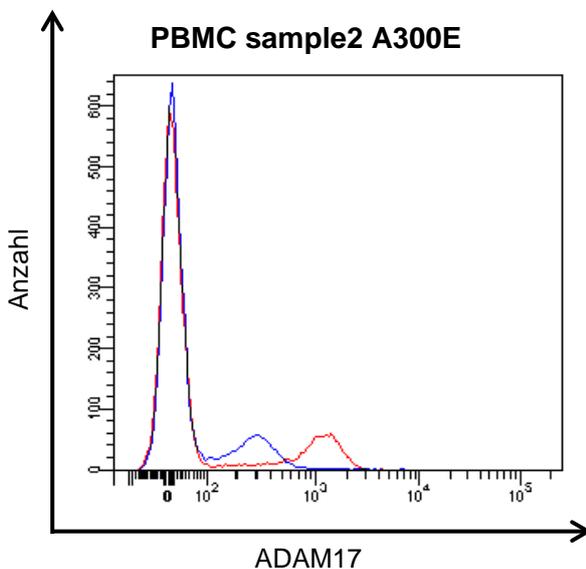
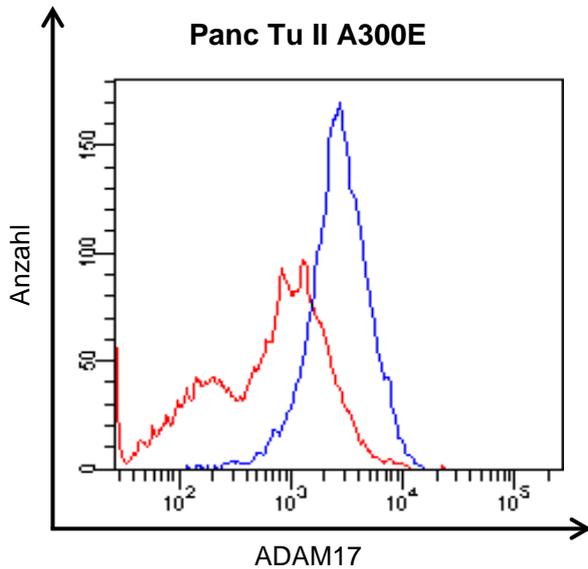
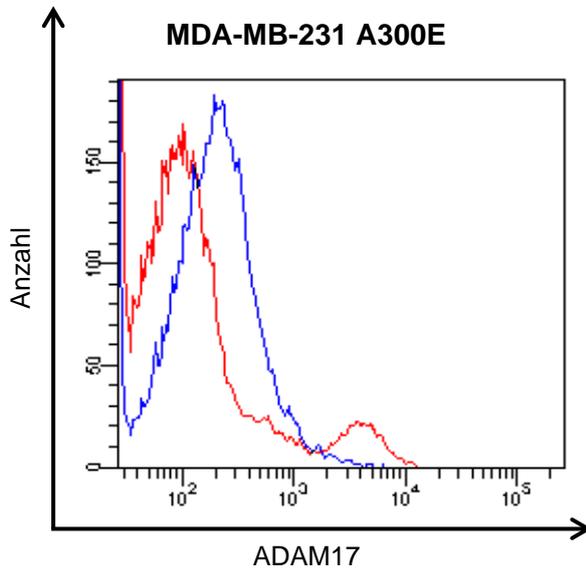
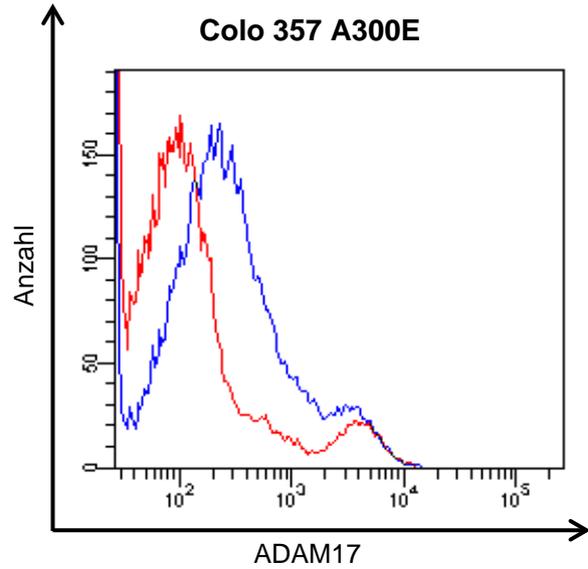
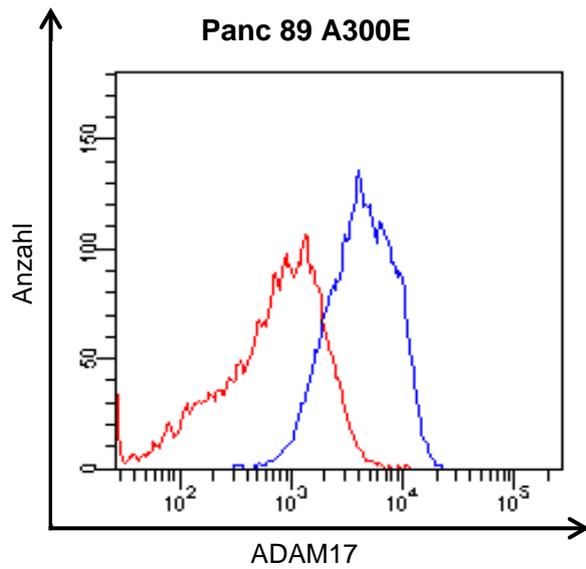


Abbildung 3.5: ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszellen und PBMCs, detektiert mit dem Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper A300E.

Krebszelllinien wurden in 10 cm-Kulturschalen kultiviert, PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut isoliert. Es wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet, mit PBS gewaschen, und mit $50 \mu\text{g/ml}$ primärem Antikörper (A300E) bzw. entsprechender Menge der Isotypkontrolle (IgG1) versetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein mit Allophycocyanin konjugierter Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration $20 \mu\text{g/ml}$). Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich von den getesteten Antikörpern lediglich der Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E zur Detektion der nativen Form von ADAM17 mittels Durchflusszytometrie eignet. Zudem exprimieren alle getesteten Krebszelllinien ADAM17 auf ihrer Zelloberfläche im Gegensatz zu den nicht tumorassoziierten PBMCs.

3.1.4 Sublokalisierung von ADAM17 in humanen Krebszellen

Um die Lokalisation von ADAM17 in humanen Krebszellen zu untersuchen, wurde der Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E in der Immunocytochemie eingesetzt, da dieser die native Form von ADAM17 erkennt (siehe Kapitel 3.1.3).

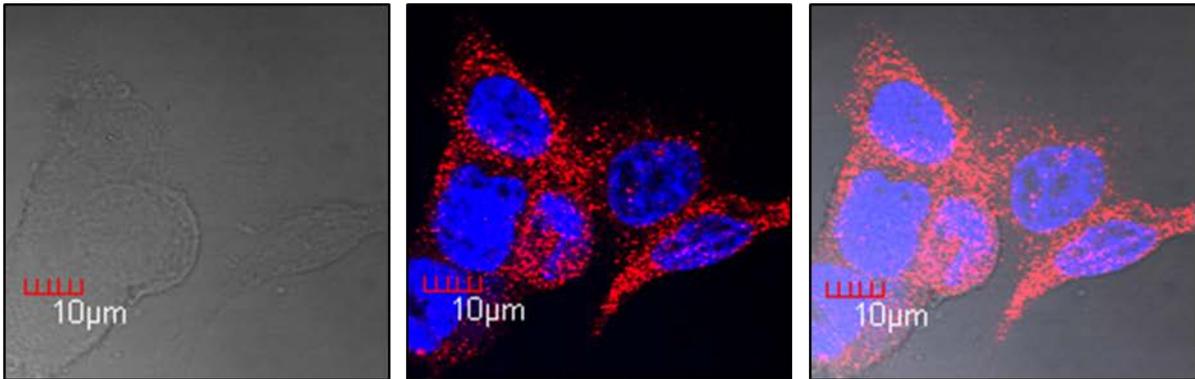
Die Zellen wurden einen Tag lang auf Deckgläschen kultiviert, mit 4-prozentigem PFA fixiert und permeabilisiert (0,2 % Saponin). Als primärer Antikörper wurde der Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E (Endkonzentration 5 µg/ml) eingesetzt, als Sekundärintikörper fungierte der Alexa Fluor 594 gekoppelte Ziege Anti-Maus-Antikörper.

Für die Färbung der nicht permeabilisierten Zellen wurde die PFA-Fixierung erst nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper durchgeführt, da die Verwendung von PFA mit einer Schädigung der Zellmembran einhergeht.

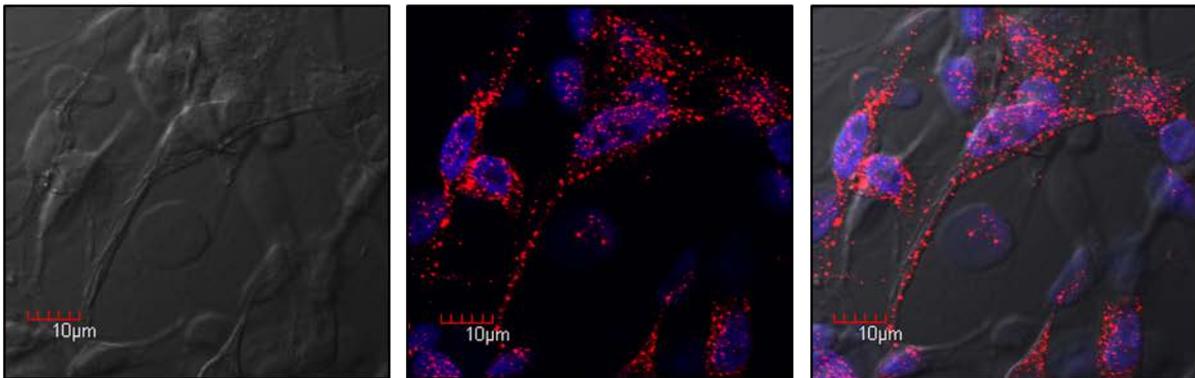
Die Ergebnisse der permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen sind in Abbildung 3.6 bzw. 3.7 dargestellt.

In den permeabilisierten Panc 89-Zellen sind punktförmige Signale über das gesamte Zytoplasma nahezu gleichmäßig verteilt, einzelne Ballungszentren, beispielsweise in Zellausläufern, sind erkennbar. In den Colo 357-Zellen sind etwas weniger Signale vorhanden, sie sind ebenfalls punktförmig und im Zytoplasma lokalisiert. Die Färbung der Panc TuII-Zellen ist besonders im membranahen Zytoplasma, möglicherweise auch in der Membran selbst, recht ausgeprägt. In den MDA-MB-231-Zellen sind die punktförmigen Signale über das gesamte Zytoplasma verteilt, sie sind insbesondere in einigen Zellausläufern deutlich erkennbar.

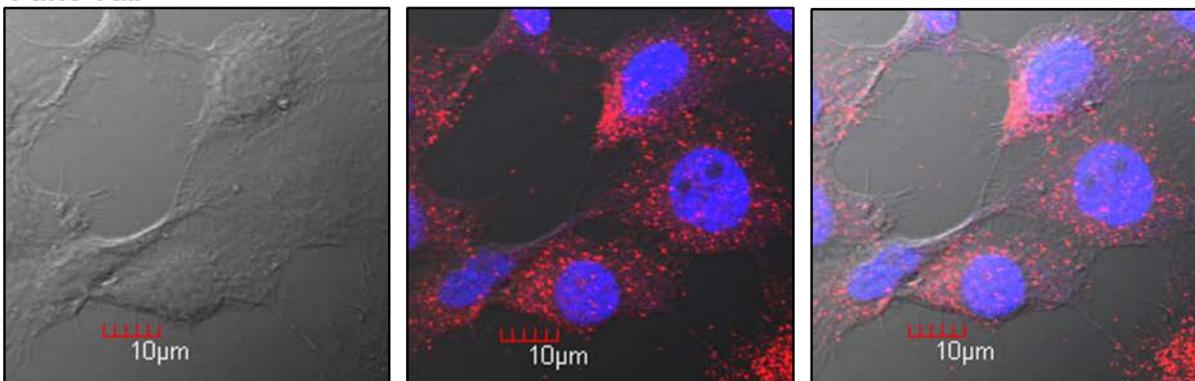
Panc 89



Colo 357



Panc Tull



MDA-MB-231

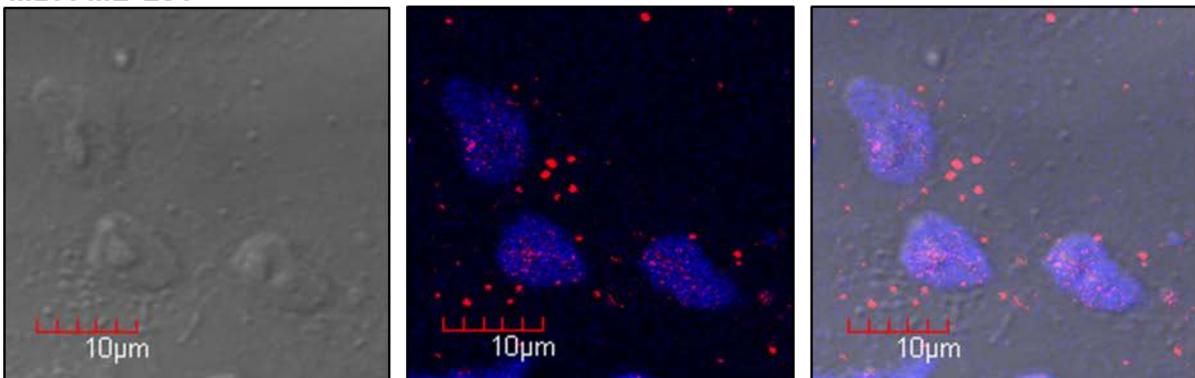
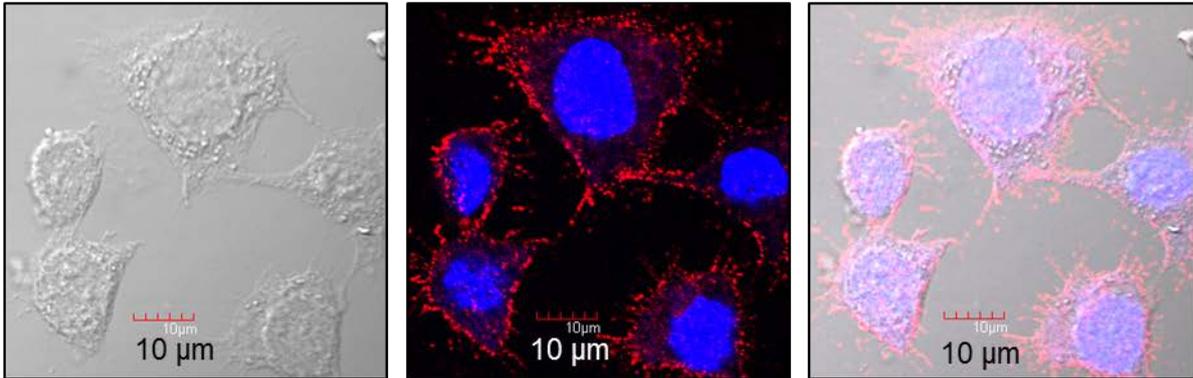
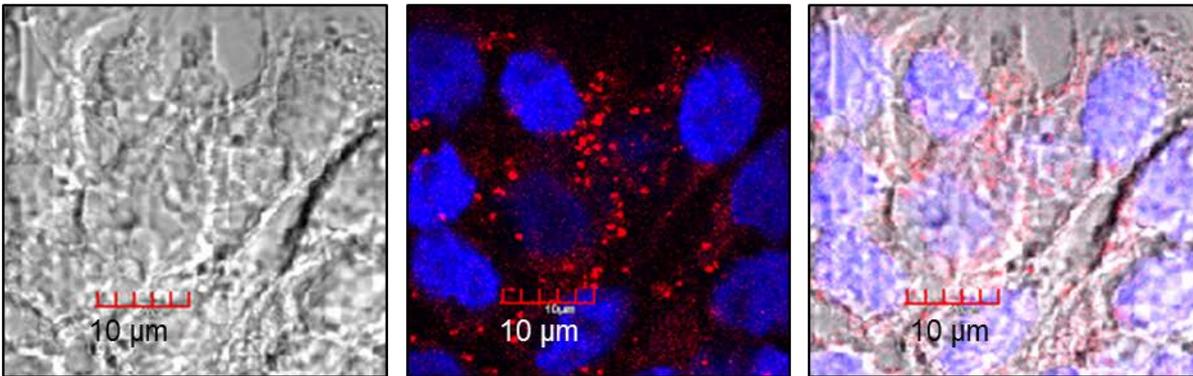
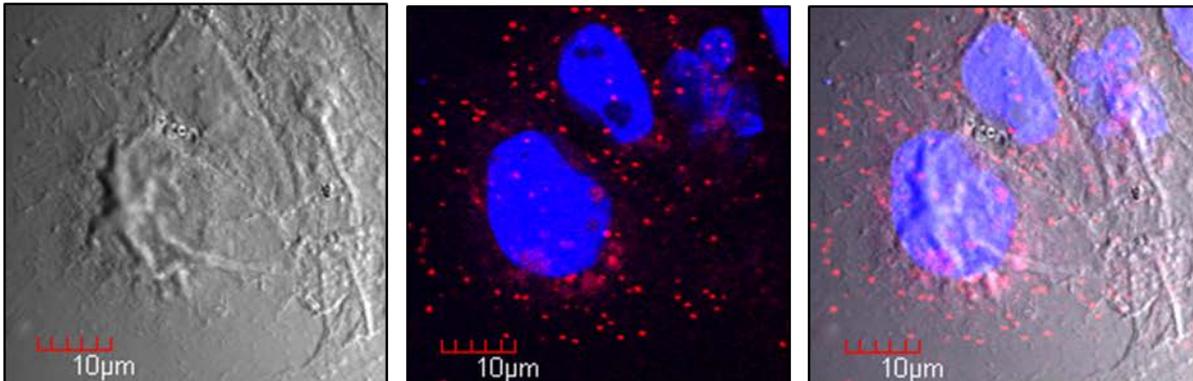
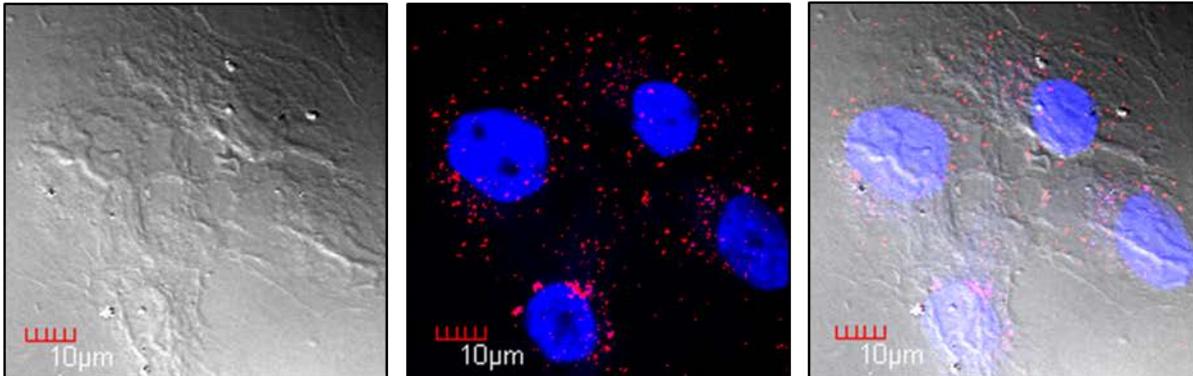


Abbildung 3.6: ADAM17-Lokalisation in permeabilisierten Krebszelllinien.

Krebszelllinien wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät, am Folgetag fixiert, permeabilisiert und mit 5 µg/ml des Anti-ADAM17-Antikörpers (A300E) versetzt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein Alexa Fluor 594 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. Links: Phasenkontrast, Mitte: ADAM17 - rot; Nuklei - blau (DAPI), rechts: Überlagerung Phasenkontrast, ADAM17, Nuklei.

Panc 89**Colo 357****Panc Tull****MDA-MB-231****Abbildung 3.7: ADAM17-Lokalisation in nicht permeabilisierten Krebszelllinien.**

Krebszelllinien wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und am Folgetag mit 5 µg/ml primärem Antikörper (A300E) versetzt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein Alexa Fluor 594 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. Im Anschluss wurde mit PFA fixiert. Links: Phasenkontrast; Mitte: ADAM17 - rot; Nuklei - blau (DAPI); Rechts: Überlagerung Phasenkontrast, ADAM17, Nuklei.

In den nicht permeabilisierten Panc 89-Zellen ist besonders der membranäre bzw. membran-nahe Bereich, inklusive der Zellausläufer, intensiv gefärbt. In den anderen drei Zelllinien finden sich die punktförmigen Signale relativ gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, teilweise sind sie nahe dem Nukleus lokalisiert, zum Teil befinden sie sich nahe der Plasmamembran.

In allen vier Krebszelllinien konnte ADAM17 mittels Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E sowohl in permeabilisierten als auch in nicht permeabilisierten Zellen spezifisch nachgewiesen werden. ADAM17 ist zum einen in den umschriebenen punktförmigen Bereichen innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert, welche möglicherweise vesikuläre Struktur haben. Zum anderen ist ADAM17 in der Nähe der Plasmamembran und in Zellausläufern lokalisiert. Besonders in den nicht permeabilisierten Panc 89-Zellen ist eine vermehrte Signaldichte im Bereich der Plasmamembran zu verzeichnen, was auf eine Kolokalisation mit der Zellmembran hinweist.

Die Mikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Christine Desel durchgeführt.

3.1.5 Kolokalisation von ADAM17 mit der Zellmembran in Panc 89-Zellen

In Panc 89-Zellen wurde zur Bestätigung der Kolokalisation von ADAM17 mit der Zellmembran (siehe Kapitel 3.1.4) zusätzlich zur ADAM17-Markierung eine Membranfärbung mit *Rhodamine-labeled Wheat Germ Agglutinin* durchgeführt (siehe Abbildung 3.8/3.9).

Hierzu wurden die Zellen auf beschriebene Art und Weise mit Antikörpern markiert und im Anschluss 10 Minuten mit 1 µg/ml *Rhodamine-labeled Wheat Germ Agglutinin* inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde für dieses Experiment ein grünemittierender Alexa Fluor 466 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper verwendet, um ein vom rot emittierenden Rhodamin differierendes Emissionsspektrum zu erhalten.

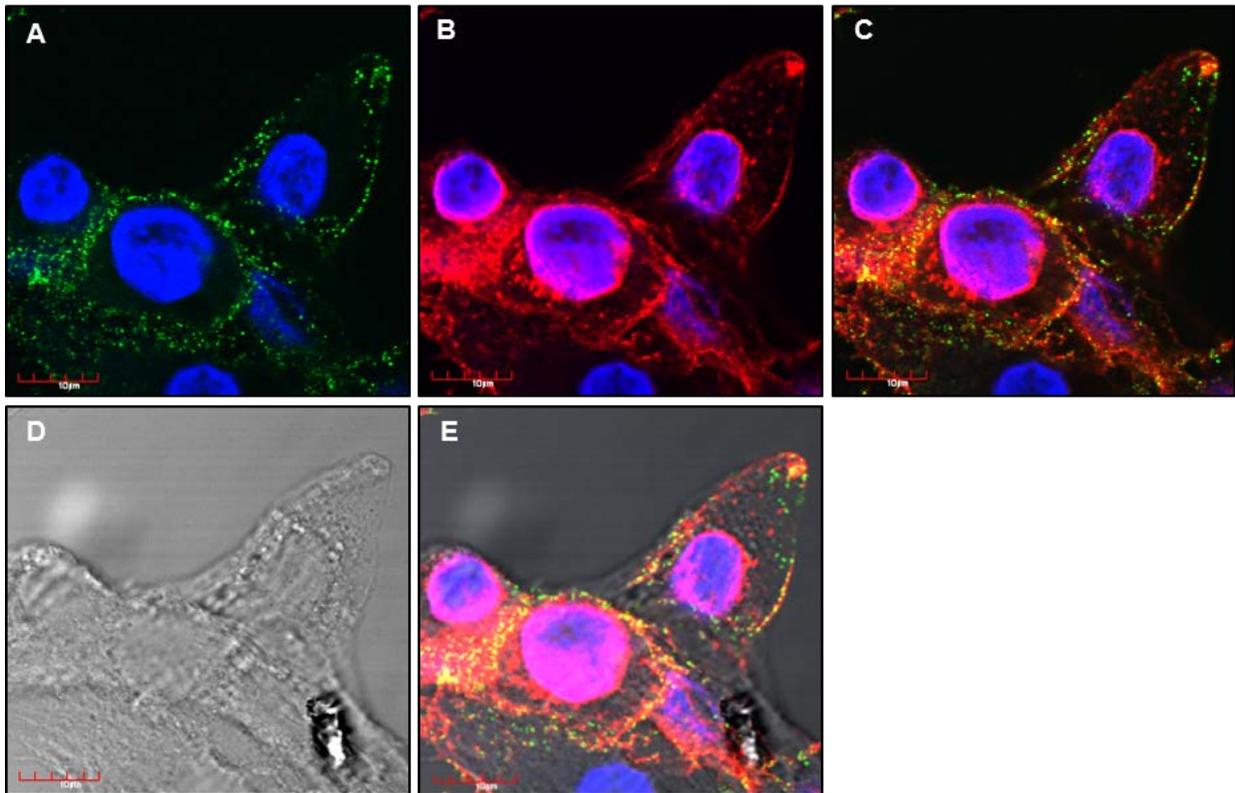


Abbildung 3.8: ADAM17-Kolokalisation mit der Zellmembran in nicht permeabilisierten Panc 89-Zellen.

Panc 89-Zellen wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und am Folgetag mit 5 µg/ml primärem Antikörper (A300E) versetzt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein Alexa Fluor 466 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (grün) (A). Für die Membranfärbung wurde vor der PFA-Fixierung 10 Minuten mit 1 µg/ml *Rhodamine-labeled Wheat Germ Agglutinin* inkubiert (rot) (B). Die kolokalisierten Bereiche von ADAM17 mit der Membran sind in Gelb dargestellt (C). (D) Differentialkontrast. (E) Differentialkontrast kombiniert mit Kolokalisation von ADAM17- und Membranfärbung. Zellkerne sind in blau dargestellt (DAPI). Roter Balken entspricht 10 µm.

In nicht permeabilisierten Panc 89-Zellen zeigt sich eine Kolokalisation (gelb) von ADAM17 (grün) mit der Zellmembran (rot). Insbesondere in den Zellausläufern lassen sich eine Kolokalisation von ADAM17 mit der Zellmembran und eine gesteigerte ADAM17-Präsenz im Vergleich zu anderen zellulären Kompartimenten nachweisen.

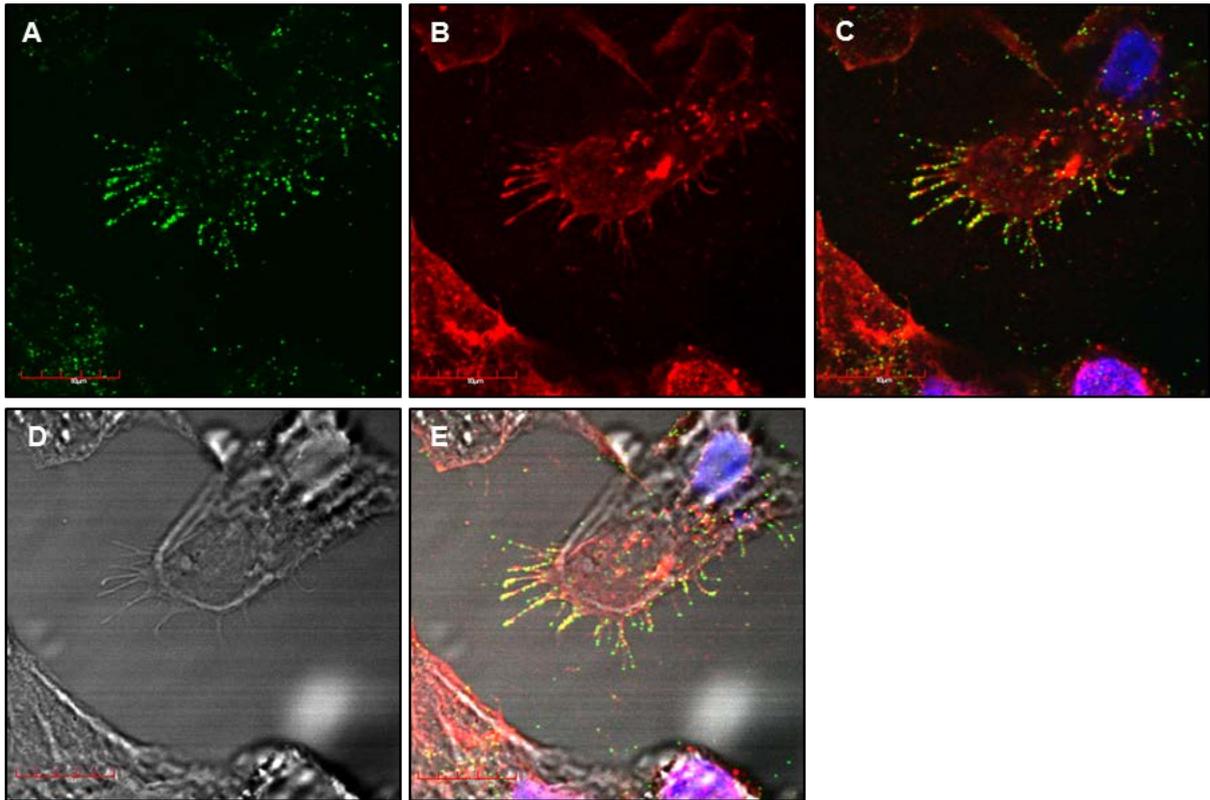


Abbildung 3.9: ADAM17-Lokalisation in Zellausläufern nicht permeabilisierter Panc 89-Zellen.

Krebszelllinien wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät, am Folgetag mit 5 µg/ml primärem Antikörper (A300E) versetzt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein Alexa Fluor 466 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (grün) (A). Für die Membranfärbung wurde vor der PFA-Fixierung 10 Minuten mit 1 µg/ml *Rhodamine-labeled Wheat Germ Agglutinin* inkubiert (rot) (B). Die kolokalisierten Bereiche von ADAM17 mit der Zellmembran sind in Gelb dargestellt (C). (D) Differentialkontrast. (E) Differentialkontrast kombiniert mit Kolokalisation von ADAM17- und Membranfärbung. Zellkerne sind in blau dargestellt (DAPI). Roter Balken entspricht 10 µm.

3.2 ADAM17 steigert die EGFR-Expression über Notch1-Rezeptor-Aktivierung in Panc 89-Zellen

Entstehung und Progression verschiedener Krebsarten sind nachweislich auf eine Überexpression bzw. Überaktivierung des EGF-Rezeptors zurückzuführen (Herbst, 2003; Kenny, 2007). Neueste Publikationen zeigen, dass ADAM17 nicht nur die Aktivierung des EGFR initiieren, sondern auch zu einer erhöhten Expression des EGF-Rezeptors beitragen kann (Baumgart et al., 2010).

Da dies entscheidende therapeutische Relevanz hat, sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein solcher Zusammenhang auch in den Zelllinien Panc 89 oder Panc TuII besteht, welche diesbezüglich nicht untersucht wurden.

3.2.1 ADAM17 steigert die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen

Um den Einfluss von ADAM17 auf die Expression des EGF-Rezeptors zu prüfen, wurde in Panc 89 und Panc TuII-Zellen die Expression von ADAM17 durch Verwendung von siRNA unterdrückt.

Hierfür wurden Zellen mit 5 nM *Flexi tube* siRNA ADAM17 (Qiagen, Hilden) bzw. *non-silencing* Kontroll-siRNA transfiziert („*HiPerFect*“-Transfektionsreagenz; Qiagen, Hilden). Zur Kontrolle der reduzierten ADAM17-Expression wurden 45 µg Gesamtproteinlysate mittels Westernblot analysiert. Als Primärantikörper wurden der Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17 A300 (1 µg/ml), ein Anti-EGFR-Antikörper und ein Anti-β-Aktin-Antikörper eingesetzt (siehe Abbildung 3.10).

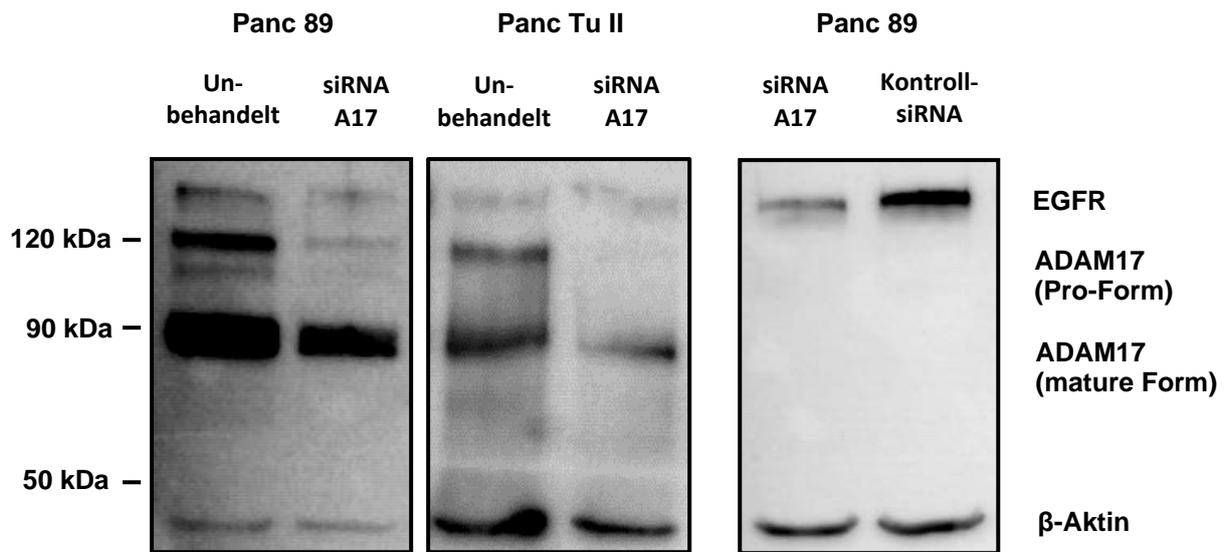


Abbildung 3.10: Einfluss von ADAM17 auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen und Panc TuII-Zellen.

Panc 89-Zellen und Panc TuII-Zellen wurden mit siRNA gegen ADAM17 sowie *non-silencing* Kontroll-siRNA in 6-well-Platten transfiziert, nach 4 Tagen geerntet, lysiert und 45 µg des Proteinlysats unter reduzierenden Bedingungen über SDS-PAGE getrennt. Als primärer Antikörper wurden der A300 (Anti-Distintigrin-Domäne) für ADAM17, der Anti-EGFR-Antikörper (F4, sc-53274, Santa Cruz) und der Anti-β-Aktin-Antikörper (C4, sc-47778, Santa Cruz) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper, visualisiert wurde über ECL-Detektion.

Nach viertägiger Transfektion von Panc 89- und Panc TuII-Zellen mit siRNA gegen ADAM17 verschwand die Pro-Form von ADAM17 nahezu vollständig, während die Menge der maturen Form etwa um die Hälfte reduziert war. In den mit siRNA gegen ADAM17 transfizierten Panc TuII-Zellen ließ sich kein Effekt im Hinblick auf die EGFR-Expression feststellen. Bei den Panc 89-Zellen ist unter Verwendung von siRNA gegen ADAM17 nicht nur die Expression der Protease, sondern auch die des EGFR reduziert. Dabei wurde die Spezifität dieses Effekts durch den Einsatz einer Kontroll-siRNA, welche keine Zielsequenz in humanen Zellen besitzt, gewährleistet. Dementsprechend zeigt dieses Experiment, dass ADAM17 in Panc 89-Zellen die Expression des EGFR positiv beeinflusst.

Des Weiteren ist deutlich, dass nach viertägiger Transfektion mit dem *HiPerfect* Transfektionssystem von Qiagen noch etwa die Hälfte der ursprünglichen ADAM17-Menge vorhanden ist.

Transfektionsoptimierung

Um eine effizientere Reduktion des reifen ADAM17s zu erreichen, sollten die Transfektionsparameter optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden Panc 89-Zellen über unterschiedlich lange Zeiträume (3, 4 und 5 Tage) mit siRNA gegen ADAM17 transfiziert. Zudem wurde das *ON-TARGETplus SMARTpool* siRNA Transfektionssystem (Thermoscientific, Schwerte) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

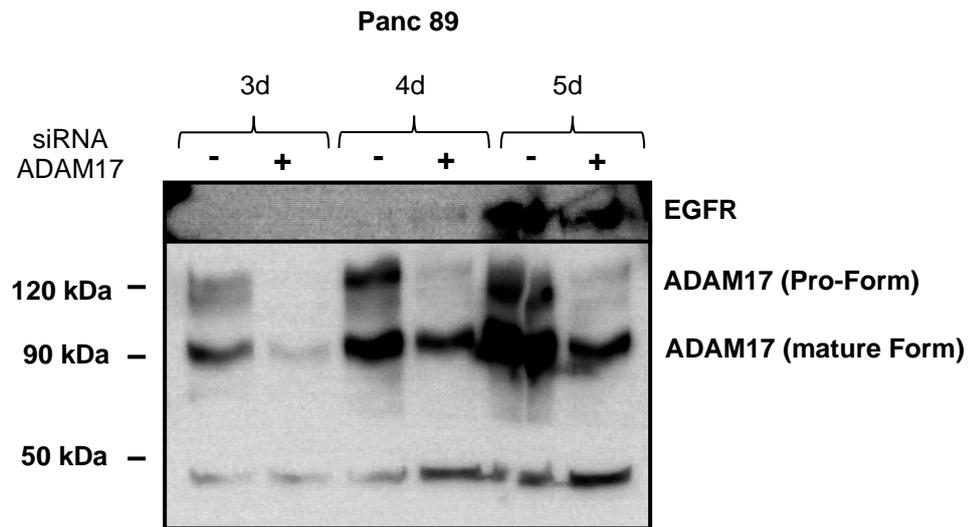


Abbildung 3.11: Einfluss von ADAM17 auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen - Transfektionsoptimierung

Panc 89-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät, je ein well pro Zelllinie wurde mit siRNA gegen ADAM17 transfiziert (+), je ein Kontroll-well blieb unbehandelt (-). Nach 3, 4 bzw. 5 Tagen wurden die Zellen geerntet, lysiert und 45 µg des Proteinlysats unter reduzierenden Konditionen über SDS-PAGE getrennt. Als primärer Antikörper wurde der A300 (Anti-Distintegrin-Domäne-ADAM17), der Anti-EGFR-Antikörper (F4, sc-53274, Santa Cruz) und der Anti-β-Aktin-Antikörper (C4, sc-47778, Santa Cruz) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper, visualisiert wurde über ECL-Detektion.

Nach dreitägiger Transfektion war die reife Form von ADAM17 nahezu vollständig verschwunden, nach vier bzw. fünf Tagen ließ sich etwa die Hälfte der ursprünglichen Menge der reifen ADAM17-Form nachweisen.

Der Effekt der siRNA gegen ADAM17 ist demnach nach dreitägiger Transfektion am deutlichsten ausgeprägt, wobei in Betracht zu ziehen ist, dass auch die Gesamtmenge von ADAM17 in der nicht transfizierten Kontrolle nach 3 Tagen geringer ist als die Gesamtmenge nach 4 bzw. 5 Tagen Zellkultivierung.

Des Weiteren wurde geprüft, wie sich der Effekt der EGFR-Reduktion nach den verschiedenen langen Transfektionszeiträumen verhält. An Tag 3 und 4 war der EGFR kaum bzw. gar nicht detektierbar. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der geringen Zelldichte zum Zeitpunkt

des Zellerntens begründet. In vorangehenden Experimenten (hier nicht gezeigt) war ebenfalls eine Korrelation der EGFR-Expression mit der Zelldichte zum Zeitpunkt des Erntens zu verzeichnen, eine geringere Zelldichte hatte z.T. eine geringere EGFR-Expression zur Folge. Die Zellen wurden im dargestellten Optimierungsansatz (Abbildung 3.11) in geringerer Anzahl ausgesät, um die Experimente für die verschiedenen Transfektionszeiträume (3, 4 und 5 Tage) der Vergleichbarkeit halber parallel durchzuführen und ein Wachstum über einen längeren Zeitraum von 5 Tagen zu gewährleisten. Nach 5 Tagen war im Gegensatz zu Tag 3 und Tag 4 genügend EGFR für die Detektion vorhanden.

Um einen stärkeren *Silencing*-Effekt von ADAM17 zu erzielen und gleichzeitig eine ausreichende EGFR-Expression zu gewährleisten, wurde für die folgenden Experimente das gleiche *well* zweimal in Folge mit siRNA gegen ADAM17 transfiziert (an Tag 1 und Tag 3 nach Zellaussaat). Für die erste Transfektion wurde somit eine optimale Zelldichte ausgenutzt (ca. 75 % Konfluenz) für die zweite Transfektion eine optimale Transfektionsdauer von 3 Tagen. Insgesamt war mit einem Kultivierungszeitraum von 6 Tagen eine detektierbare Menge des EGFR gewährleistet.

EGFR- und ADAM17-Expression nach Transfektionsoptimierung

Um die Transfektionsoptimierung zu validieren, wurde das zu Beginn des Kapitels 3.2.1 beschriebene Experiment erneut mit den optimierten Parametern durchgeführt. Es wurde die *ON-TARGETplus SMARTpool* siRNA gegen humanes ADAM17 (Thermoscientific, Schwerte) verwendet und zwei aufeinanderfolgende Transfektionen (an Tag 1 und 3 nach Aussaat), wie im vorangehenden Absatz beschrieben, durchgeführt (siehe Abbildung 3.12).

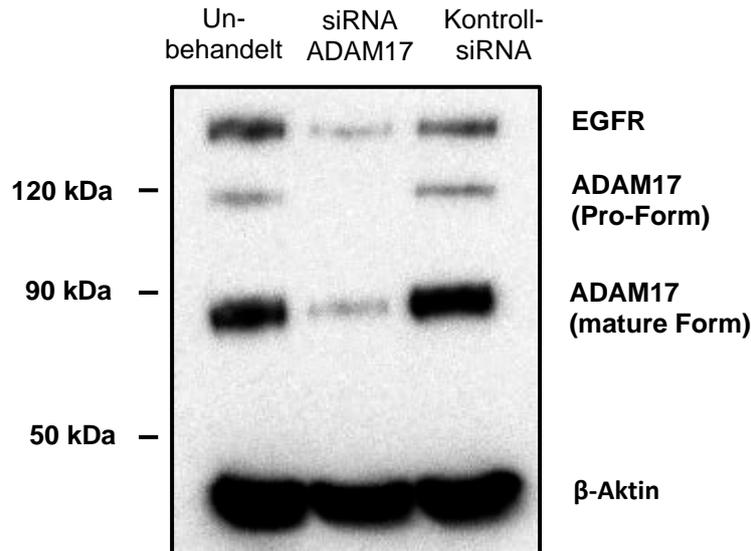


Abbildung 3.12: Einfluss von ADAM17 auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen.

Panc 89-Zellen wurden mit siRNA gegen ADAM17 sowie *non-silencing* Kontroll-siRNA in 6-well-Platten an Tag 1 und Tag 3 nach dem Aussähen transfiziert, nach 6 Tagen geerntet, lysiert und 45 µg des Proteinlysats unter reduzierenden Konditionen über SDS-PAGE getrennt. Als primärer Antikörper wurde der A300 (Anti-Distintegrin-Domäne) für ADAM17, der Anti-EGFR-Antikörper F4, sc-53274 (Santa Cruz) und der Anti-β-Aktin-Antikörper C4, sc-47778 (Santa Cruz) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper, visualisiert wurde über ECL-Detektion.

Die Pro-Form von ADAM17 ist im transfizierten Ansatz nicht zu detektieren und die aktive Form von ADAM17 ist etwa auf ein Viertel reduziert. Auch der Effekt auf die EGFR-Reduktion zeigt sich deutlicher als in den vorangehenden Experimenten.

3.2.2 Beteiligung des Notch1-Rezeptors in der EGFR-Regulation

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Steigerung der EGFR-Expression durch ADAM17, wie bereits für *non-small-cell lung cancer* beschrieben (Baumgart et al., 2010), auch für die pankreatische Krebszelllinie Panc 89 über eine Notch1-Rezeptor-Aktivierung zu erklären ist.

Die Aktivierung des Notch1-Rezeptors wurde als dreistufiger Prozess beschrieben: Nach Aktivierung des Rezeptors über Ligandenbindung bzw. externe Zugabe von EGTA, prozessiert zunächst eine α-Sekretase, wie ADAM17, und anschließend der γ-Sekretase-Enzymkomplex den noch transmembranären Notch1-Rezeptor (nähere Erläuterungen siehe Einleitung Kapitel 1.2.2.2). Diese Aktivierung führt zur Entstehung einer intrazellulären Notch1-Domäne (N^{ICD}), welche mit spezifischen Anti-Notch1-Antikörpern detektiert werden

kann. Da die N^{ICD} jedoch relativ schnell abgebaut wird, werden Proteasominhibitoren verwendet, um eine Akkumulation der N^{ICD} zu erzielen und ihre Detektion zu gewährleisten.

Bei der Verwendung des Notch1-Antikörpers ab8925 sind im Westernblot mehrere Banden unterschiedlicher Größe detektierbar, daher war zunächst die Identifikation der korrekten Bande für die intrazelluläre Notch1-Domäne notwendig (siehe Abbildung 3.13).

Panc 89-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen des Proteasominhibitors MG-132 (1 μ M bzw. 10 μ M) sowie über verschiedene Zeiträume 1 h bzw. 8 h behandelt und der Notch1-Rezeptor durch Zugabe von 2 mmol EGTA aktiviert. Die Proteindetektion erfolgte wie oben beschrieben mittels Westernblot-Analyse. Als Primärantikörper wurde der Anti-Notch1-Antikörper ab8925 verwendet (siehe Abbildung 3.13)

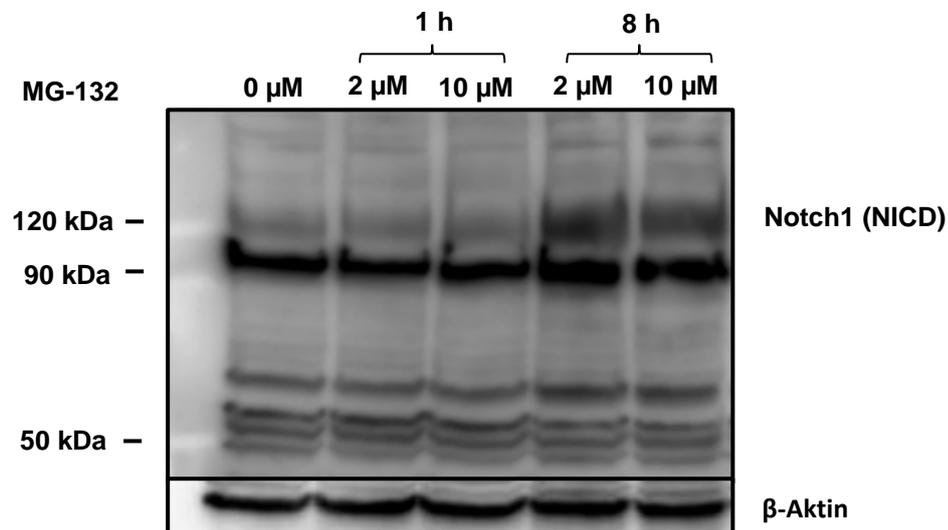


Abbildung 3.13: Identifizierung der intrazellulären Notch1-Domäne (N^{ICD}) – Bande.

Panc 89-Zellen wurden mit 2 μ M bzw. 10 μ M Proteasominhibitor MG-132 über 1 h bzw. 8 h behandelt, mit EGTA über eine Stunde stimuliert sowie lysiert. Anschließend wurden 45 μ g des Proteinlysats unter reduzierenden Bedingungen über SDS-PAGE getrennt. Als primärer Antikörper wurden der Anti-Notch1-Antikörper ab8925 (abcam) und der Anti- β -Aktin-Antikörper C4, sc-47778 (Santa Cruz) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper bzw. einem Anti-Kaninchen-Antikörper für die Notch1-Detektion. Visualisiert wurde über ECL-Detektion.

Nach achtstündiger Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG-132 ließ sich eine deutliche Akkumulation eines Proteins mit einer Größe von etwa 120 kDa nachweisen.

Da der Proteasominhibitor wie oben beschrieben den Abbau der intrazellulären Notch1-Domäne inhibiert, kann somit festgehalten werden, dass die Bande für die intrazelluläre Notch1-Domäne (N^{ICD}) in Panc 89-Zellen der 120 kDa Bande entspricht.

3.2.3 ADAM17 reguliert die EGFR-Expression über Notch1-Aktivierung

Um den Einfluss von ADAM17 auf die Aktivierung des Notch1-Rezeptors zu bestätigen, wurde die Expression von ADAM17 reduziert und die Expression des Notch1-Rezeptors mittels Westernblot detektiert (siehe Abbildung 3.14).

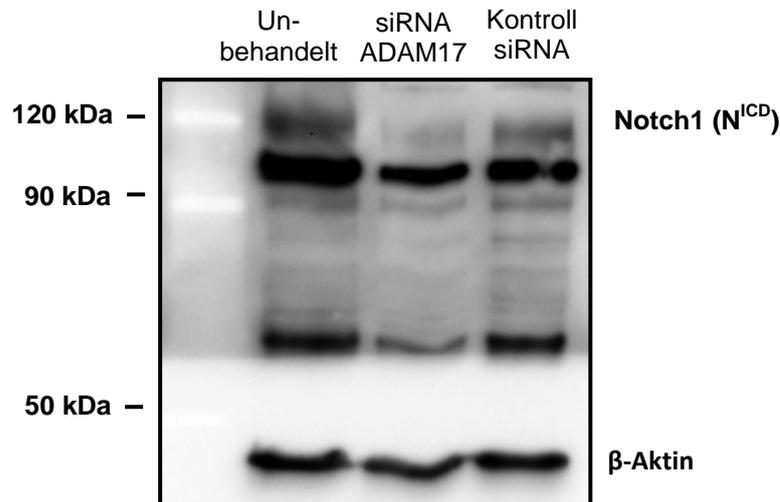


Abbildung 3.14: Einfluss von ADAM17 auf die Notch1-Expression in Panc 89-Zellen.

Panc 89-Zellen wurden mit siRNA gegen ADAM17 sowie *non-silencing* Kontroll-siRNA in 6-well-Platten an Tag 1 und Tag 3 nach Zellaussaat transfiziert, nach 6 Tagen geerntet, lysiert und 45 µg des Proteinlysats unter reduzierenden Konditionen über SDS-PAGE getrennt. Der Notch1-Antikörper ab8925 (abcam) und der Anti-β-Aktin-Antikörper C4, sc-47778 (Santa Cruz) fungierten als primäre Antikörper. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper bzw. einem Anti-Kaninchen-Antikörper für die Notch1-Detektion. Visualisiert wurde über ECL-Detektion.

Eine verminderte ADAM17-Expression führte zu einer Reduktion der intrazellulären Notch1-Domäne (Bande auf Höhe von 120 kDa). Somit ist der Einfluss von ADAM17 auf die Aktivierung des Notch1-Rezeptors in der pankreatischen Krebszelllinie Panc 89 bestätigt.

3.2.4 Der γ-Sekretase-Inhibitor reduziert die Entstehung des N^{ICD}

Um sicherzustellen, dass die Verwendung des γ-Sekretase-Inhibitors IX (Merck KGaA, Darmstadt) auch in der humanen Pankreaskrebszelllinie Panc 89 die Prozessierung des Notch1-Rezeptors verhindert, wurde nach Verwendung des Inhibitors die N^{ICD}-Expression im Westernblot kontrolliert.

Panc 89-Zellen wurden mit 2 µM bzw. 5 µM des γ-Sekretase-Inhibitors oder der entsprechende Menge DMSO, als Negativkontrolle, über Nacht behandelt. Nach einstündiger Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG-132 (2 µM) und 30-minütiger Aktivierung des

Notch1-Rezeptors mit EGTA wurden die Zellen lysiert. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

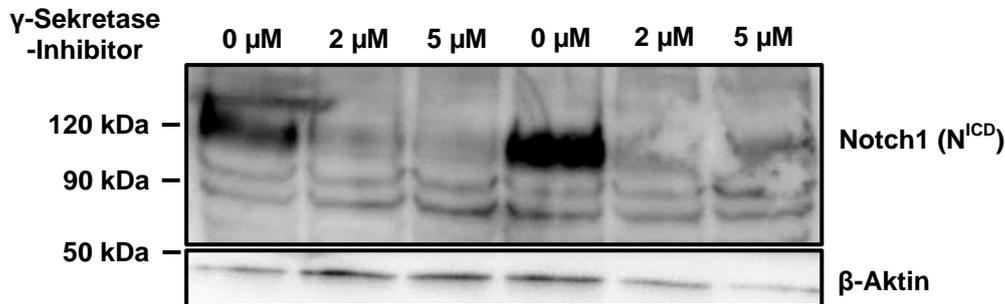


Abbildung 3.15: Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors in Panc 89-Zellen.

Panc 89-Zellen wurden mit 2 μ M bzw. 5 μ M γ -Sekretase-Inhibitor bzw. äquivalenter Menge DMSO (0 μ M) über Nacht behandelt. Nach einstündiger Inkubation mit MG-132 sowie 30-minütiger Aktivierung des Notch1-Rezeptors durch EGTA wurden die Zellen lysiert. Die Detektion erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mittels Westernblot-Analyse.

Durch Einsatz von 2 μ M bzw. 5 μ M des γ -Sekretase-Inhibitors verschwindet die Bande der N^{ICD} nahezu. Die Entstehung der intrazellulären Notch1-Domäne scheint durch die Inhibition des γ -Sekretase-Enzymkomplexes deutlich, jedoch nicht vollständig, reduziert zu sein.

3.2.5 EGFR-Expression wird durch Aktivierung des Notch1-Rezeptors über den γ -Sekretase-Komplex reguliert

Zur Untersuchung des Einflusses der Notch1-Aktivierung über den γ -Sekretase-Komplex und einer konsekutiven Beeinflussung der EGFR-Expression wurde nach Einsatz des γ -Sekretase-Inhibitors die EGFR-Expression mittels Westernblot-Analyse geprüft (siehe Abbildung 3.16).

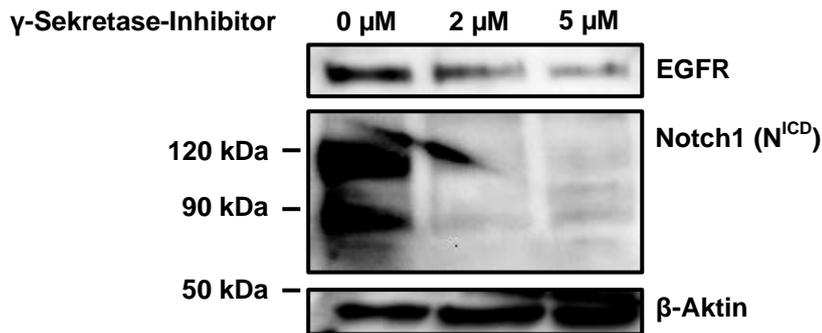


Abbildung 3.16: Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen.

Panc 89-Zellen wurden mit 2 μ M bzw. 5 μ M γ -Sekretase-Inhibitor bzw. äquivalenter Menge DMSO über Nacht behandelt. Nach einstündiger Inkubation mit MG-132 sowie Aktivierung des Notch1-Rezeptors durch EGTA vor Zellyse erfolgte die Detektion wie in Kapitel 3.2.1 bzw. 3.2.2 beschrieben, mittels Westernblot-Analyse.

Nach Inhibition des γ -Sekretase-Enzymkomplexes zeigte sich eine verminderte Expression des EGF-Rezeptors. Dies bestätigt den Einfluss der Notch1-Rezeptoraktivierung auf die Expression des EGFR.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in der humanen Krebszelllinie Panc 89 über eine ADAM17 regulierte Aktivierung des Notch1-Rezeptors, sowie eine konsekutive Prozessierung desselbigen durch den γ -Sekretase-Komplex, die Expression des EGF-Rezeptors induziert wird. Diese Beobachtung wurde bereits für Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses beschrieben (Baumgart et al., 2010).

3.2.6 ADAM17 steigert die Migration von Panc 89-Zellen

Um zu erörtern, ob ADAM17 eine funktionelle Bedeutung in den humanen Pankreaskrebszellen Panc 89 hat, wurde ein Zell-Migrations-Assay (*Scratch-Assay*) durchgeführt. Ein spezifischer Anti-ADAM17-Inhibitor (nicht veröffentlicht) (bzw. die entsprechende Menge DMSO als Negativkontrolle) wurde in einer Endkonzentration von 4 μ M in 1 ml 0,3 % FCS enthaltendem Medium eingesetzt. In Abbildung 3.17 ist je ein repräsentativer *Scratch* der unbehandelten Zellen im Vergleich zu den mit DMSO bzw. mit ADAM17-Inhibitor behandelten Zellen dargestellt. Abbildung 3.18 zeigt die Durchschnittswerte der mit DMSO bzw. ADAM17-Inhibitor behandelten Zellen, normalisiert auf die Werte der unbehandelten Zellen. Angegeben sind die Resultate dreier unabhängiger Experimente mit je drei *Scratches* pro *well*.

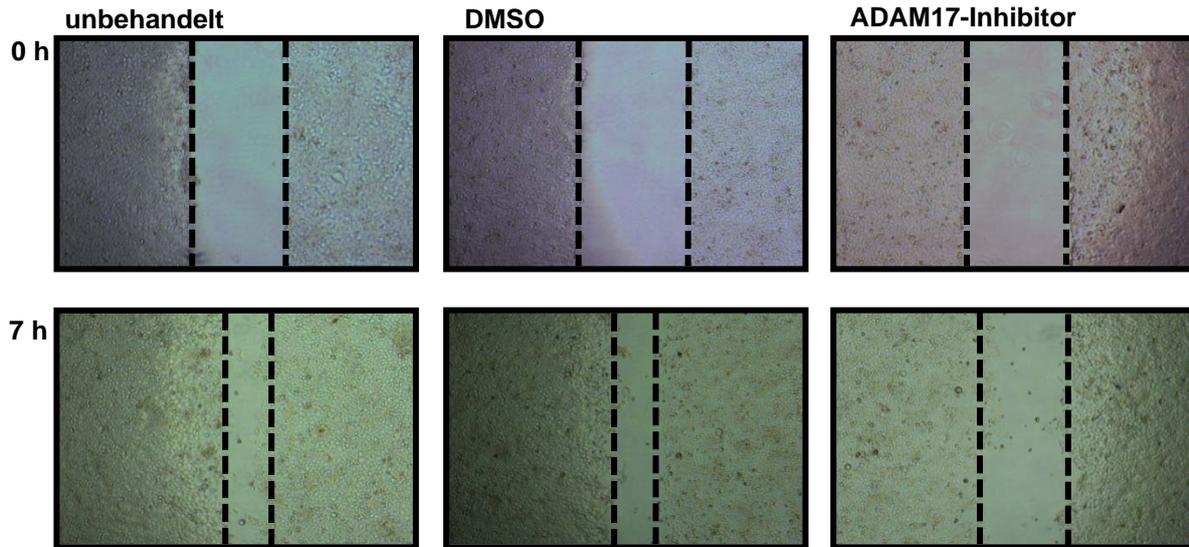


Abbildung 3.17: Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit spezifischem ADAM17-Inhibitor.

Panc 89-Zellen wurden über 7 h mit einem ADAM17-Inhibitor bzw. entsprechender Menge DMSO behandelt und ihre Migration im *Scratch-Assay* gemessen. Dargestellt ist je ein repräsentativer *Scratch* von unbehandelten, mit DMSO bzw. mit Inhibitor behandelten Zellen.

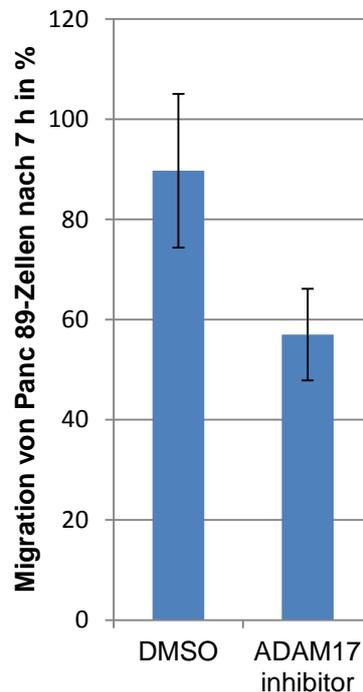


Abbildung 3.18: Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit spezifischem ADAM17-Inhibitor.

Panc 89-Zellen wurden über 7 h mit einem ADAM17-Inhibitor bzw. entsprechender Menge an DMSO behandelt und ihre Migration im *Scratch-Assay* gemessen. Dargestellt ist die Differenz der *Scratch*-Flächen in Prozent, welche nach 0 h und 7 h gemessen wurde, normalisiert auf die Migration der unbehandelten Panc 89-Zellen.

Der ADAM17-Inhibitor reduzierte die Migration von Panc 89-Zellen um etwa 36 % ($89,7 \pm 15,4$ % ohne, $57,0 \pm 9,1$ % mit ADAM17-Inhibitor). Mit einem p-Wert von 0,035 ist das Ergebnis signifikant. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhöhte ADAM17-Expression in Panc 89-Zellen zu einer gesteigerten Zellmigration führt.

3.2.7 Identifikation physiologischer ADAM17-Substrate in Panc 89-Zellen

Für ADAM17 ist bereits eine Vielzahl von Substraten bekannt (Scheller et al., 2010). Einige davon sind recht prominent in vielen Zelllinien vertreten, andere wurden bisher nur für einzelne Zelllinien beschrieben, wie beispielsweise Notch1 in *non-small-cell lung cancer cells* (Baumgart et al., 2010). Um weitere, speziell für die Zelllinie Panc 89 physiologisch bzw. pathologisch relevante ADAM17-Substrate zu identifizieren wurden Panc 89-Zellen mit dem Konstrukt „mut16“ (einer inaktiven ADAM17 Variante mit PC-TAG; Struktur und Verwendung siehe Anhang Kapitel 6.1.1, 6.1.2) transfiziert und anschließend die aus der Immunopräzipitation gewonnenen Substrate elektrophoretisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

In der verwendeten Mutante („mut16“) wurden zwei Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums ausgetauscht (HEXXHXXGXXH, HXXHXXGXXE), sodass die dortige Komplexierung des Zinkatoms weiterhin stattfindet. Dadurch sollte die Bindung des Substrats in der Bindungstasche gewährleistet, jedoch eine Prozessierung desselbigen inhibiert werden. Als zweite wichtige Komponente enthält die Mutante einen PC-Tag, der seine Anwendung in der anschließenden Immunopräzipitation findet.

Zunächst wurden Panc 89-Zellen mit $6 \mu\text{g}$ „mut16“, respektive eGFP als Negativkontrolle, transfiziert und nach 2 Tagen mit $1 \mu\text{g/ml}$ Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), zur ADAM17-Aktivierung, für zwei Minuten stimuliert.

Die Lysate wurden über Nacht mit HPC4-gekoppelten Sepharosebeads bei 4°C inkubiert. Das nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit Lysepuffer gewaschen und die Proben mittels SDS-PAGE getrennt. Im Anschluss wurde das Gel mittels einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung gefärbt (siehe Abbildung 3.19).

Die weitere Probenaufbereitung, massenspektrometrische Analyse und Daten-Auswertung wurde von Dr. Bart von den Berg am Institut für Experimentelle Medizin des UKSH durchgeführt (Z2 Unit des SFB877).

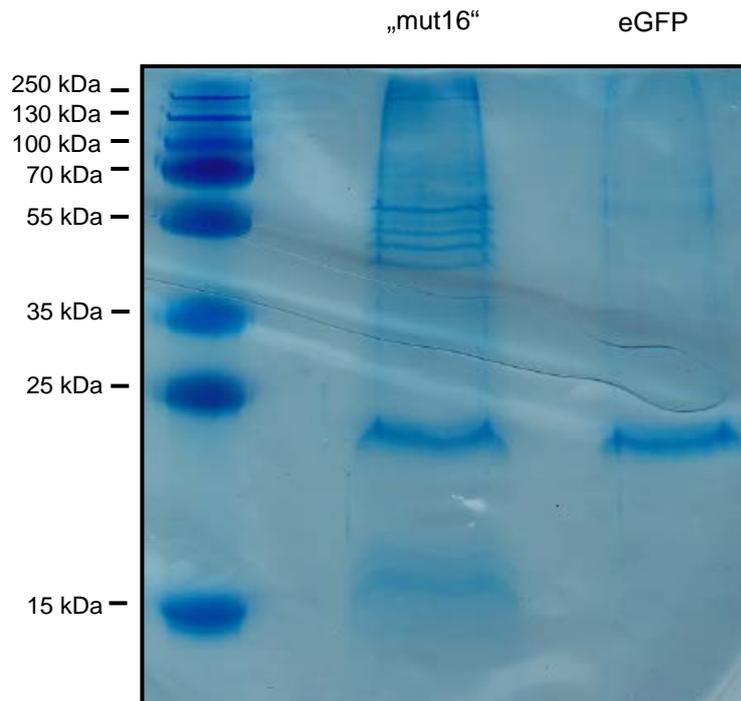


Abbildung 3.19: Identifikation physiologischer ADAM17-Substrate in Panc 89-Zellen.

Zellen wurden mit dem Konstrukt „mut16“ (einer inaktiven ADAM17 Variante mit PC-TAG) bzw. eGFP (als Negativkontrolle) transfiziert und nach 2 Tagen für 2 Minuten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ *Phorbol-12-myristat-13-acetat* (PMA) stimuliert. Nach Zellyse erfolgten die Immunopräzipitation mit HPC4-gekoppelten Sepharosebeads sowie die elektrophoretische Trennung in einem 18-prozentigen SDS-Gel.

In der SDS-PAGE ist deutlich zu erkennen, dass in den mit „mut16“ transfizierten Zellen eine größere Anzahl an Proteinen vorhanden ist, als in der eGFP Kontrolle. Auf Höhe von etwa 50 kDa und 25 kDa finden sich die schwere bzw. die leichte Kette der verwendeten Antikörper.

Einige interessante Interaktionspartner und Substrate waren beispielsweise Integrin beta der *Tumor-associated calcium signal transducer 2* sowie die *Ras-related* Proteine Rab-7a und Rab-1b.

Da dieses Experiment einmalig durchgeführt wurde, können die Ergebnisse lediglich als Hinweis auf mögliche Interaktionspartner und Substrate dienen.

3.3 Etablierung geeigneter Antikörpertestsysteme und Testung der monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörper

Da ADAM17 in verschiedenen Erkrankungen (u.a. in Krebserkrankungen) überexprimiert ist bzw. eine erhöhte Aktivität aufweist, sollten verschiedene Anti-ADAM17-Antikörper auf ihre Fähigkeit überprüft werden, die Funktion von ADAM17 zu hemmen bzw. die Substratumsetzung zu inhibieren. Hierzu wurden Antikörper gegen die Disintegrin- und die membran-proximale Domäne verwendet, da für selbige eine Rolle bei der Substraterkennung beschrieben wurde (Lorenzen et al., 2011).

Weiterhin sollten Antikörper gegen die katalytische Domäne von ADAM17 getestet werden. Sie könnten entweder kompetitiv wirken, und die Substratbindungsstelle belegen, oder allosterische Effekte auslösen.

Die zuvor von Dr. Ahmad Trad durchgeführten *Shedding*-Assays, mit denen die Prozessierung einzelner ADAM17-Substrate (z.B. IL1-RII und IL-6R) quantifiziert wurde, zeigten nach Einsatz der Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper keinen inhibitorischen Effekt (nicht veröffentlichte Daten). Da ADAM17 jedoch eine Vielzahl von Substraten prozessiert (Scheller et al., 2010), deren Abdeckung in diesem Experiment schwierig und umfangreich ist, sollte ein weiter gefächerter Ansatz gewählt werden, um zunächst einen generellen Effekt auf das Zellverhalten statt eines substratspezifischen Effekts zu prüfen. Hierzu sollten geeignete zelluläre Testsysteme etabliert werden, die eine Untersuchung des Einflusses der Anti-ADAM17-Antikörper auf Zellfunktionen, wie Proliferation bzw. Migration ermöglichen.

3.3.1 Die Zelllinie Colo 357 eignet sich zur Überprüfung der Proliferation

Um eine geeignete Zelllinie für das Testen der Anti-ADAM17-Antikörper, bezogen auf die Zell-Proliferation zu finden, wurde der Einfluss von ADAM17 auf das Wachstum unterschiedlicher Krebszellen mit dem *CellTiter-Blue*-Proliferations-Assay gemessen. Da dieses Experiment lediglich dem *Screening* einer geeigneten Zelllinie dienen sollte, wurde es in dieser Art nur einmal als 3-facher Ansatz durchgeführt.

5×10^3 Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und am Folgetag mit 12,5 ng siRNA gegen ADAM17 transfiziert. Nach 6 Tagen wurde die Proliferation über das *CellTiter-Blue Assay* gemessen. Die Ergebnisse der mit siRNA gegen ADAM17 transfizierten Zellen (rote Balken) im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (blaue Balken) sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

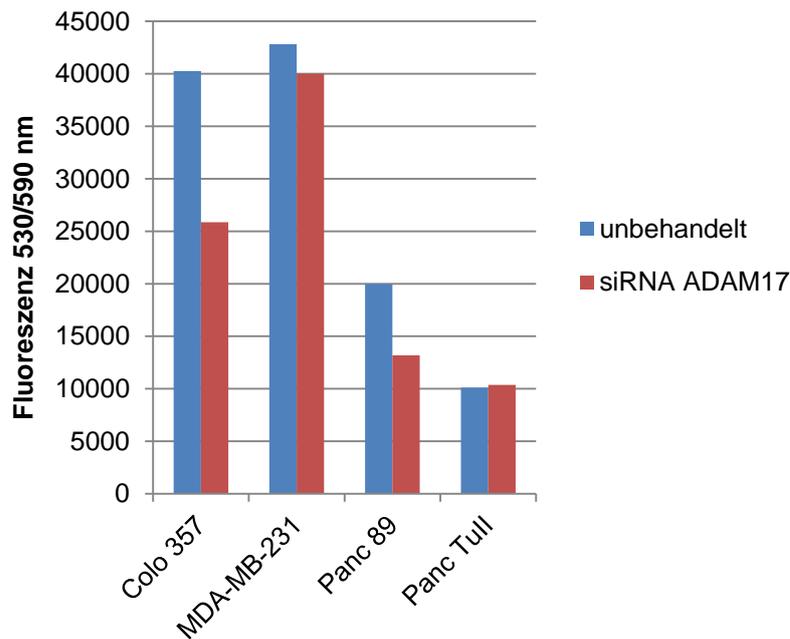


Abbildung 3.20: Proliferation humaner Krebszellen nach Transfektion mit siRNA gegen ADAM17.

Colo 357-, MDA-MB-231-, Panc 89- und Panc TuII-Zellen wurden mit siRNA gegen ADAM17 transfiziert und ihre Proliferation 6 Tage später mit Hilfe des *CellTiter-Blue Assays* gemessen. Angegeben sind die RLU (*relativen light units*) der normalisierten Werte.

Unter Verwendung von siRNA gegen ADAM17 war in den Colo 357-Zellen und den Panc 89-Zellen das Wachstum innerhalb von 6 Tagen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen um etwa 36 % respektive 34 % reduziert, in den MDA-MB-231-Zellen war diese Tendenz mit 7 % deutlich geringer ausgeprägt. In den Panc TuII-Zellen konnte kein vergleichbarer Effekt festgestellt werden. Da in der pankreatischen Zelllinie Colo 357 der Einfluss der siRNA gegen ADAM17 am deutlichsten ausgeprägt war, wurde selbige für die weitere Antikörper-Testung im Proliferations-Assay verwendet.

3.3.2 Anti-ADAM17-Antikörper enthaltende Zellüberstände reduzieren die Proliferation von Colo 357-Zellen

Um den Effekt der Anti-ADAM17-Antikörper auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde die Zelllinie Colo 357 mit Anti-ADAM17-Antikörpern behandelt und im Anschluss das *CellTiter-Blue Assay* durchgeführt. 5×10^3 Zellen wurden in einem Volumen von in 100 μl Medium in 96-well-Platten ausgesät und am Folgetag mit gereinigten Antikörpern ($\sim 1 \mu\text{g/ml}$) bzw. Antikörperüberständen ($\sim 1 \mu\text{g/ml}$ in einem Volumen von etwa 50 μl) inkubiert. Nach vier Tagen wurde die Proliferation mit dem *CellTiter-Blue Assay* gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 für die Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper und in Abbildung 3.22 für die Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper dargestellt.

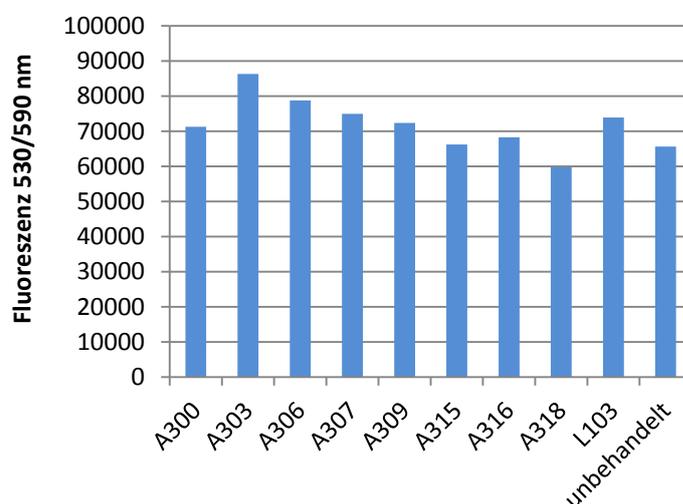


Abbildung 3.21: Proliferation von Colo 357-Zellen nach Inkubation mit gereinigten Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörpern.

Colo 357-Zellen wurden über vier Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ gereinigten Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper behandelt und ihre Proliferation mit dem *CellTiter-Blue Assay* gemessen. Angegeben sind die RLU (*relativen light units*) der normalisierten Werte.

Nach viertägiger Behandlung mit gereinigten Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörpern ließ sich kein proliferationsreduzierender Effekt auf die Colo 357-Zellen feststellen.

Ergebnisse

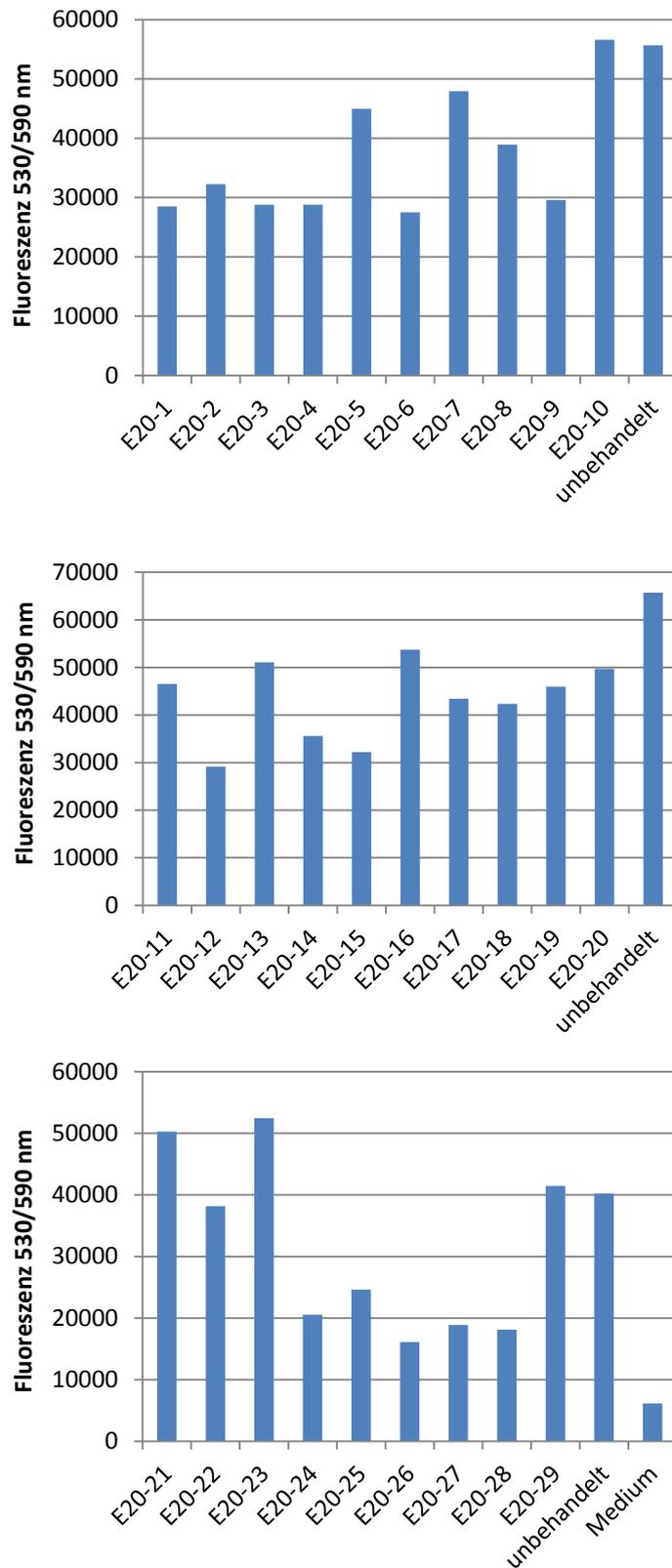


Abbildung 3.22: Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit Antikörperüberständen der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörpern – 1. Testdurchgang.

Colo 357-Zellen wurden über vier Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ (etwa 50 μl Antikörperüberstände) der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper behandelt und ihre Proliferation mit dem *CellTiter-Blue Assay* gemessen. Angegeben sind die RLU (*relative light units*) der normalisierten Werte.

Nach Verwendung der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper konnte in mehreren Ansätzen eine verringerte Zell-Proliferation festgestellt werden. Die betreffenden Antikörper (E20-1, -2, -3, -4, -6, -9, -10, -12, -14, -15, -21, -24, -25, -26, -27, -28) wurden ein weiteres Mal auf gleiche Art und Weise getestet. Als Negativkontrolle sollte der Anti-NOD2 Antikörper L 103 dienen. Die Ergebnisse des zweiten Testdurchgangs sind in Abbildung 3.23 gezeigt.

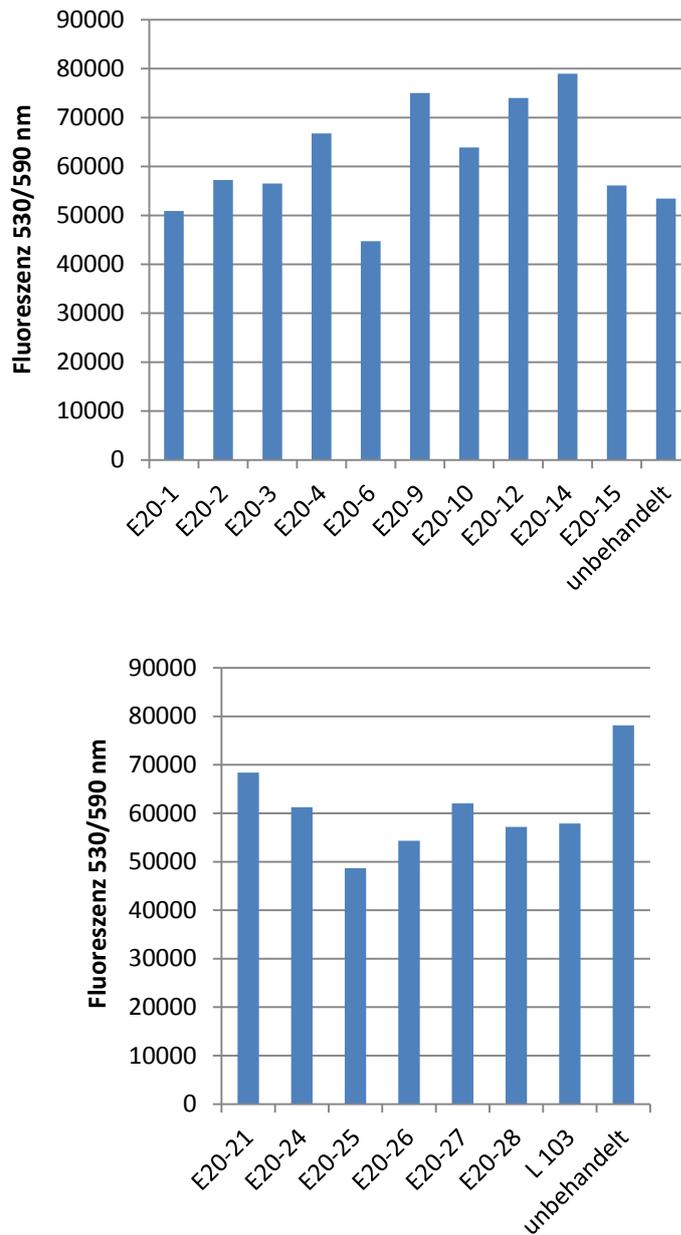


Abbildung 3.23: Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit Antikörperüberständen der Anti-Membran-proximale-ADAM17-Antikörpern – 2. Testdurchgang.

Colo 357-Zellen wurden über vier Tage mit 1 µg/ml (etwa 50 µl Antikörperüberstände) der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper behandelt und ihre Proliferation mit dem *CellTiter-Blue Assay* gemessen. Angegeben sind die RLU (*relative light units*) der normalisierten Werte.

Nach der zweiten Testung der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper wurden die Antikörper mit dem stärksten proliferationsreduzierendem Effekt (E20-10, E20-21, E20-6, E20-25, E20-26) in einem dritten Durchgang wie in Abbildung 3.24 dargestellt, getestet.

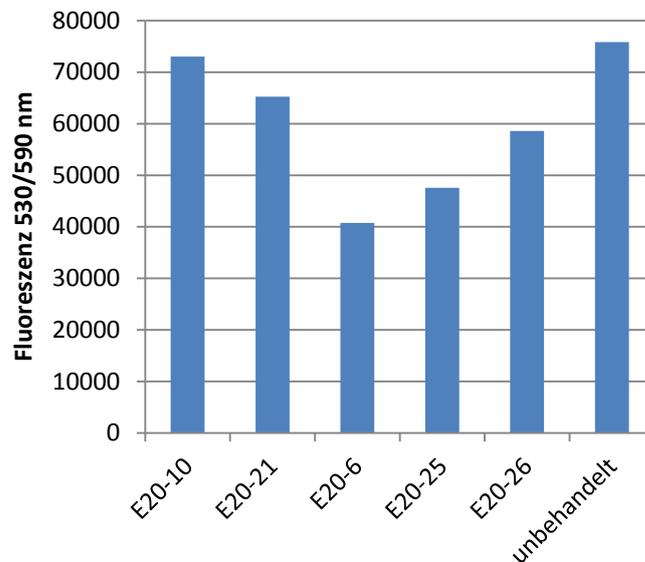


Abbildung 3.24: Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit Antikörperüberständen der Anti-Membran-proximale-ADAM17-Antikörpern – 3. Testdurchgang.

Colo 357-Zellen wurden über vier Tage mit 1 µg/ml (etwa 50 µl Antikörperüberstände) der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper behandelt und ihre Proliferation mit dem *CellTiter-Blue Assay* gemessen. Angegeben sind die RLU (*relativen light units*) der normalisierten Werte.

Nach der dritten konsekutiven Testung der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper wirkten drei Antikörper, E20-6, E20-25 und E20-26 nach wie vor hemmend auf die Proliferation.

Da der Antikörper E20-6 in durchflusszytometrischen Analysen die besten Bindungseigenschaften zu ADAM17 aufwies (durchflusszytometrische Analysen wurden von Dr. Ahmad Trad durchgeführt, hier nicht gezeigt), wurde der E20-6 gereinigt, um diesen erneut in Proliferations-Assays einzusetzen. Der zuvor gemessene proliferationsminimierende Effekt ließ sich mit dem gereinigten Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper E20-6 nicht bestätigen.

3.3.3 Die gereinigten Anti-ADAM17-Antikörper können die Migration von Panc 89-Zellen nicht konstant reduzieren

Um den Einfluss der Anti-ADAM17-Antikörper auf die Zell-Migration zu untersuchen, wurden die gereinigten Antikörper gegen die membran-proximale Domäne (E20-6 und E20-27) sowie die Antikörper gegen die katalytische Domäne (A26-1, A26-3, A26-6, A26-7) verwendet.

Hierzu wurden 6×10^5 Zellen wie oben beschrieben in 12-well-Platten ausgesät, ein *Scratch* im Zellrasen erzeugt und die filtrierte Antikörper in einer Endkonzentration $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0,3 % FCS enthaltendem Medium zugesetzt. Die Ergebnisse des ersten Test-Durchgangs sind in Abbildung 3.25 dargestellt.

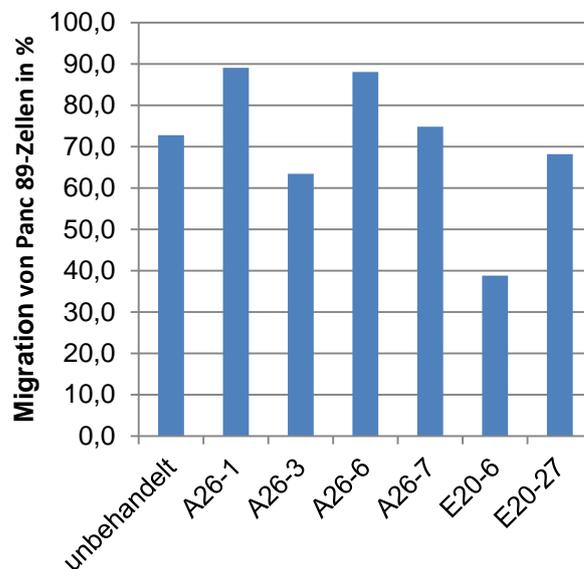


Abbildung 3.25: Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit gereinigten Anti-ADAM17-Antikörpern gegen die katalytische Domäne und die membran-proximale Domäne.

Panc 89-Zellen wurden über 24 h mit Membran-proximale-Domäne-ADAM17- bzw. Anti-katalytische-Domäne-ADAM17-Antikörpern ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt und ihre Migration im *Scratch-Assay* gemessen. Dargestellt ist die Differenz der *Scratch*-Flächen in Prozent, welche nach 0 h und 24 h gemessen wurde.

Die Anti-katalytische-Domäne-ADAM17-Antikörper A26-1, A26-3, A26-6, A26-7 und der Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper E20-27 konnten die Migration der Panc 89-Zellen nicht bedeutend reduzieren. Der E20-6 konnte im ersten Testdurchgang die Migration um etwa 25 % senken.

Um die Bindungsfähigkeit des E20-6 und der Anti-katalytische-Domäne-ADAM17-Antikörper an die native Form von ADAM17 zu bestätigen, wurden FACS-Analysen wie in

Kapitel 3.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Testung der Anti-katalytische-Domäne-ADAM17-Antikörper wurde von Dr. Ahmad Trad durchgeführt und ist an dieser Stelle nicht abgebildet. Für diese konnte keine Bindung an die native Form von ADAM17 nachgewiesen werden. Das Ergebnis der FACS-Analyse des Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörpers E20-6 ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

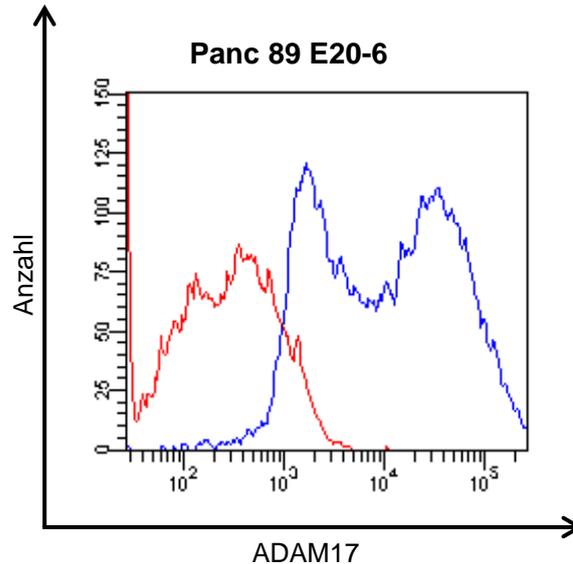


Abbildung 3.26: ADAM17-Oberflächenexpression in Panc 89-Zellen, detektiert mit dem Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper E20-6.

Panc 89-Zellen wurden in 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Es wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet, mit PBS gewaschen, und mit 50 $\mu\text{g/ml}$ primärem Antikörper (E20-6) bzw. entsprechender Menge der Isotypkontrolle (IgG1) versetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein mit Allophycocyanin konjugierter Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration 20 $\mu\text{g/ml}$). Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie.

Mit dieser FACS-Analyse konnte bestätigt werden, dass auch der gereinigte Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper E20-6 die native Form von ADAM17 erkennt und somit eine Validierung des Antikörpers im Migrations-Assay sinnvoll ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

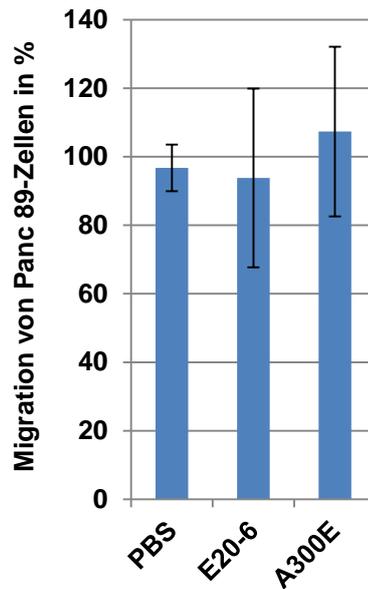


Abbildung 3.27: Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit gereinigten Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörpern E20-6 und A300E.

Panc 89-Zellen wurden über 24 h mit Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörpern (8 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und ihre Migration im *Scratch-Assay* gemessen. Dargestellt ist die Differenz der *Scratch*-Flächen in Prozent, welche nach 0 h und 24 h gemessen wurde, normalisiert auf die Migration der unbehandelten Panc 89-Zellen.

Die migrationsinhibierende Wirkung des Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörpers E20-6 unterlag in den durchgeführten Experimenten starken Schwankungen und konnte nicht bestätigt werden.

4 DISKUSSION

4.1 Expression und Lokalisation von ADAM17 in humanen Krebszellen

4.1.1 ADAM17 als potentieller Tumormarker?

Die Metalloprotease ADAM17, welche erstmals unter dem Namen TACE (*TNF- α converting enzyme*) bekannt wurde, da sie das membrangebundene TNF- α in seine lösliche Form überführen kann, spielt sowohl physiologisch, beispielsweise bei der Entwicklung von Geweben, als auch pathophysiologisch in der Entstehung von Krankheiten eine entscheidende Rolle (Black et al., 1997; Saftig und Reiss, 2011).

Eine Dysregulation von ADAM17 wurde mit einer Reihe entzündlicher Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, sowie Herz-Kreislauf-erkrankungen und Diabetes assoziiert. Für eine Vielzahl von Tumoren wurde eine erhöhte Expression von ADAM17 bzw. eine gesteigerte *Shedding*-Aktivität des Enzyms beschrieben (Gooz, 2010).

Eine erhöhte ADAM17-Expression wurde bereits für Brustkrebszellen (McGowan, 2007), Zellen des Nierenzell-Karzinoms (Franovic et al., 2006) und Zellen des humanen Pankreasgang-Adenokarzinoms (Ringel et al., 2006) beschrieben.

Mit den im Rahmen des SFB877 generierten Anti-ADAM17-Antikörpern konnte die gesteigerte Expression von ADAM17 in Brustkrebszellen (MDA-MB-231) und humanen Pankreaskarzinomzellen (Panc 89, Colo 357 und Panc TuII) unter Verwendung verschiedener molekularbiologischer und biochemischer Methoden bestätigt werden. Der Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörper A300 detektiert ADAM17 spezifisch mittels Westernblot-Analysen. Dieser wurde fortan von Mitgliedern des SFB877 als Primärantikörper zur ADAM17-Detektion verwendet (siehe Abbildung 4.1). Des Weiteren konnten mit einer Kombination des A300 und den Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörpern A309 bzw. A318 zwei spezifische *Sandwich*-ELISA etabliert werden, die zur Detektion von humanem bzw. murinem ADAM17 verwendet werden können (Trad et al., 2011). Dementsprechend stellen diese *Sandwich*-ELISA ein sensitives Hilfsmittel zur Detektion von ADAM17 in Zelllysaten dar und könnten künftig Anwendung in der Diagnostik finden.

In durchflußzytometrischen Analysen eignete sich neben den Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörpern A300 und A318, welche ADAM17 in ADAM17-überexprimierenden HEK293-Zellen detektieren (Trad et al., 2011) insbesondere der Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E für die Detektion der nativen Form von ADAM17. Dieser erkannte

ADAM17 spezifisch in der Durchflusszytometrie und Immunzytochemie. Die Tatsache, dass die Antikörper A300 und A318 in durchflusszytometrischen Analysen von humanen Krebszellen schlechtere Eigenschaften in Bezug auf die ADAM17-Erkennung aufwiesen als der A300E könnte mit einer unterschiedlichen Epitoperkennung der unterschiedlichen Antikörper oder einer höheren Affinität des A300E zu ADAM17 erklärt werden. Die Funktionsweise der Antikörper A300 und A318 bei der Detektion von ADAM17 auf ADAM17 überexprimierenden HEK293-Zellen sowie bei der Anwendung im ELISA steht jedoch nicht mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen im Widerspruch, da in erstgenannten Experimenten eine größere Menge Antigen vorhanden war.

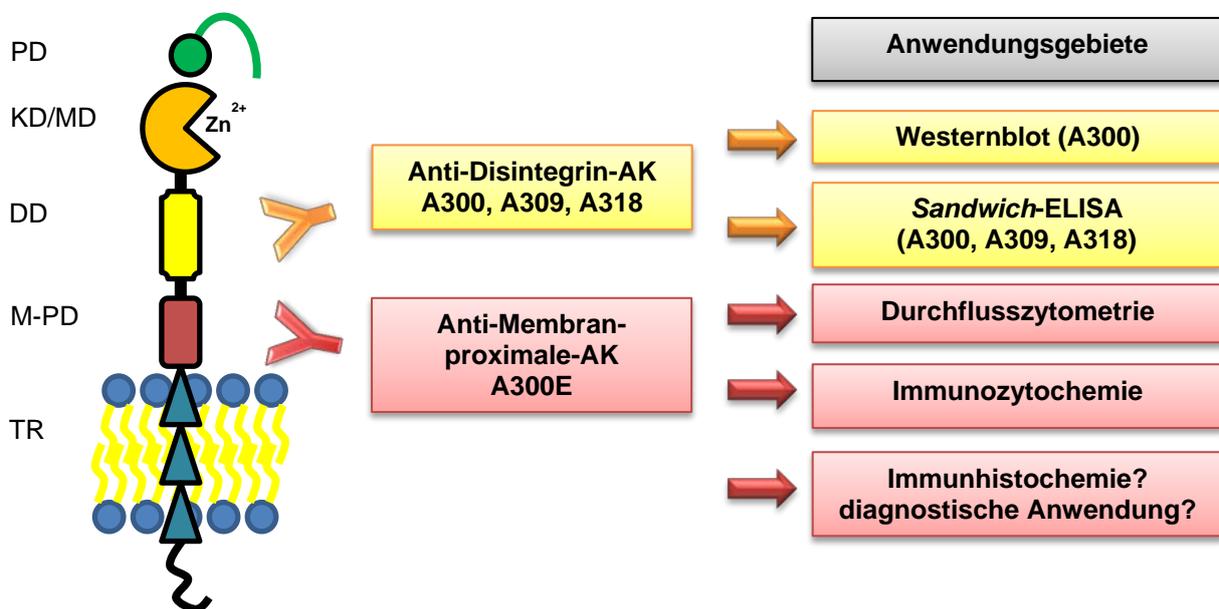


Abbildung 4.1: Vereinfachte schematische Darstellung der ADAM17 Domänen, Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper und methodische Anwendungsgebiete. ADAM17 besteht aus einer Pro-Domäne (PD), einer katalytischen bzw. Metalloprotease-Domäne (MD/KD), einer Disintegrin-Domäne (DD), einer membran-proximalen Domäne (M-PD), einer Transmembran-Region (TR) und einer Zytoplasmatischen-Region (ZR). Die diagnostisch relevanten Antikörper sind gegen die Disintegrin- und die membran-proximale Domäne gerichtet. Der Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörper A300 erkennt ADAM17 spezifisch im Westernblot; in Kombination mit dem A300 und den Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörpern A309 bzw. A318 wurden zwei spezifische Sandwich-ELISA entwickelt. Der Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E detektiert die native Form von ADAM17 in Durchflusszytometrie und Immunozytochemie. Eine diagnostische Anwendung des A300E scheint vielversprechend und müsste in der Immunhistochemie validiert werden.

Neben den Pankreasgang-Adenokarzinomzellen (Panc-I und CAPAN-1) (Ringel et al., 2006) konnte mit Hilfe der genannten Methoden auch in den pankreatischen Krebszelllinien Panc 89 und Panc TuII eine erhöhte ADAM17-Expression nachgewiesen werden, was die postulierte Überexpression in pankreatischen Krebszelllinien bestätigt. Die in dieser Arbeit untersuchten

Zelllinien Panc 89 und Panc TuII wurden zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung unseres Wissens nach noch nicht auf ihre ADAM17-Expression hin untersucht. In Panc 89-Zellen wurde zwar 2008 von Egberts et al. ein gesteigertes TNF- α -*Shedding* beschrieben, jedoch fehlte zu diesem Zeitpunkt eine Assoziation mit der erhöhten ADAM17-Expression (Egberts et al., 2008).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Krebszelllinien wiesen im Vergleich zu nicht Krebs-assoziierten mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) eine erhöhte Oberflächenexpression von ADAM17 auf (Abbildung 3.5). Diese Ergebnisse unterstützen den von Kenny diskutierten Ansatz, ADAM17 als spezifischen Tumormarker einzusetzen (Kenny, 2007). Auch immunhistochemische Untersuchungen und mRNA-Expressionsanalysen von PDAC-Gewebe (*Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) zeigten im Vergleich zu Gewebeschnitten chronischer Pankreatitis sowie gesundem Pankreasgewebe eine erhöhte ADAM17-Expression (Ringel et al., 2006). Aufgrund dieser Beobachtungen scheint es erfolgsversprechend, monoklonale Anti-ADAM17-Antikörper auch für diagnostische Gewebefärbungen in der Immunhistochemie einzusetzen, um malignes von nicht malignem Gewebe zu unterscheiden.

Da ADAM17 in einer Vielzahl von Zellarten physiologische Funktionen erfüllt, müssten zunächst geeignete *Screening*-Verfahren entwickelt werden, um ein tumorspezifisches Binden von ADAM17 in diesen Geweben zu validieren. Ein initiales Experiment der Gewebeanalyse mit den institutseigenen Anti-ADAM17-Antikörpern wurde in Kollaboration mit Prof. Dr. Schumacher (UKE, Hamburg) durchgeführt (siehe Anhang Kapitel 6.1.5). Die Antikörpermarkierung wurde jedoch zum damaligen Zeitpunkt mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörper A318 durchgeführt, der, wie Durchflusszytometrie-Analysen zeigen die native Form von ADAM17 im Vergleich zu dem später getesteten Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E weniger gut erkennt. Zwar wurden vereinzelte Signale mit dem A318 detektiert, es erscheint jedoch vielversprechend diesen immunhistochemischen Ansatz mit dem, mittels verschiedener Methoden validierten und etablierten Antikörper A300E zu wiederholen. Könnte der A300E Tumorgewebe von Nicht-Tumorgewebe sicher und eindeutig unterscheiden, wäre eine potentielle Verwendung dieses Anti-ADAM17-Antikörpers für diagnostische Gewebefärbungen denkbar.

4.1.2 Subzelluläre Lokalisation von ADAM17

Um die Lokalisation von ADAM17 in den verwendeten Krebszellen zu untersuchen, wurden immunozytochemische Färbungen durchgeführt und mit den generierten Anti-ADAM17-Antikörpern etabliert. Spezifische ADAM17-Signale traten vorwiegend in lokalisierten Ballungszentren definierter, rundlicher Struktur auf, was auf eine Lokalisation von ADAM17 in mikrodomänenartiger bzw. vesikulärer Struktur hinweist. Des Weiteren wurde ADAM17 in unmittelbarer Nähe der Zellmembran detektiert (siehe Abbildungen 3.7, 3.8). Die vesikulären, mikrodomänenartigen Strukturen könnten, wie von Tellier et al. beschrieben, zur *Lipid Raft*-Fraktion gehören (Tellier et al., 2006); Die durchgeführte *Lipid Raft*-Einzelfärbung in Panc 89-Zellen zeigte eine ähnliche Lokalisation wie die der ADAM17-Markierung (siehe Anhang Kapitel 6.1.6). Eine definitive Aussage über die Lokalisation in *Lipid Rafts* kann mit dieser Einzelfärbung jedoch nicht getroffen werden; eine Kollokalisationsanalyse konnte aufgrund der speziesspezifisch identischen Primärantikörper (beide Anti-Maus) nicht durchgeführt werden.

Auch eine Lokalisation von ADAM17 in endosomalen Strukturen wäre vorstellbar. Wie Trad et al. zeigten, konnte in MDA-MB-231-Zellen eine Internalisierung von ADAM17 nachgewiesen werden, welche bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C erfolgte. Bei 4 °C hingegen verblieb ein Großteil von ADAM17 an der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse ließen sich auch mit durchflußzytometrischen Analysen verifizieren (Trad et al., 2012; z.T. unveröffentlichte Daten). Die hier beschriebenen Daten würden eine Lokalisation von ADAM17 in endozytotischen Vesikeln, Endosomen oder Endolysosomen unterstützen. Um diese Annahme zu bestätigen, müssten Kollokalisationsanalysen von ADAM17 mit den entsprechenden Strukturen durchgeführt werden.

Auch die in Abbildung 3.5 gezeigte durchflußzytometrische Analyse nicht permeabilisierter pankreatischer Krebszellen, welche eine auffällig membranäre Lokalisation von ADAM17 zeigt, fand bei 4 °C statt. Die immunozytochemischen Analysen (ebenfalls nicht permeabilisierten Zellen) wurden bei 37 °C durchgeführt und beschreiben eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisation (vgl. Abbildung 3.7). Dies lässt auch für die drei Zelllinien Panc 89, Colo 357 und die Panc TuII, einen ähnlichen Internalisierungsmechanismus von ADAM17 vermuten, wie er bereits für MDA-MB-231-Zellen beschrieben wurden (Trad et al., 2012). Die Tatsache, dass das *ras related protein* Rab-7a, in den Massenspektrometrischen Untersuchungen als Interaktionspartner von ADAM17 identifiziert wurde (siehe Kapitel 3.2.7), könnte als weiterer Hinweis für die räumliche Nähe von ADAM17 zu Endosomen

bzw. Lysosomen dienen, denn Rab-7a wurde als Schlüsselregulator beim endo-lysosomalen *trafficking* beschrieben (Cantalupo et al., 2001).

Bei den Panc 89-Zellen zeigte sich in der immunzytochemischen Färbung eine starke Kollokalisierung von ADAM17 mit der Plasmamembran, sowie eine besondere Häufung der ADAM17-Signale in den Zellausläufern. Ob es sich bei dieser membranären Form um die aktive oder die inaktive Form von ADAM17 handelt, konnte in der vorliegenden Arbeit, wie auch in den bisher veröffentlichten Arbeiten, nicht vollständig geklärt werden.

Bislang wurde die Lokalisation der reifen Form von ADAM17 divers diskutiert, einerseits wurde angenommen, dass die membranäre Form von ADAM17 hauptsächlich der aktiven Form entspricht, da die inhibitorische Pro-Domäne während des Transports zur Zelloberfläche entfernt wird. Andererseits wurde festgestellt dass die Abspaltung der Pro-Domäne keinen essentiellen Schritt für den Transport an die Zelloberfläche darstellt und somit auch die inaktive Form an der Plasmamembran zu finden sein könnte (Gooz, 2010).

Die Tatsache, dass ADAM17 in Panc 89-Zellen den membranständigen Notch1-Rezeptor zum Substrat hat (siehe Kapitel 4.2) könnte jedoch in diesem Zusammenhang als weiterer Hinweis für die Existenz der aktiven Form von ADAM17 auf der Zellmembran von Panc 89-Zellen dienen; Denn für die erste Prozessierung des Notch1-Rezeptors (*S2-cleavage*), welche durch α -Sekretasen wie ADAM17 durchgeführt wird, ist eine Lokalisation der Protease an der Zellmembran Voraussetzung (Guo et al., 2011).

4.2 ADAM17 reguliert die EGFR-Expression in Pankreaskarzinomzellen über Notch1-Rezeptoraktivierung

Der tumorfördernde Effekt von ADAM17 wird insbesondere auf die enge Verknüpfung von ADAM17 mit dem EGFR-*Signaling* zurückgeführt. Mausmodelle zeigten einen ähnlichen Phänotyp von ADAM17-*Knockout*-Mäusen verglichen mit EGF-, EGFR- und TNF- α -*Knockout*-Mäusen (Peschon et al., 1998; Blobel, 2005). Die Aktivierung des EGFR resultiert in intrazellulären Signalkaskaden, welche zu gesteigertem Zellüberleben, Proliferation und Migration führen (Kenny, 2007; Franovic et al., 2006). Diese Effekte wurde bislang hauptsächlich mit der ADAM17-abhängigen Prozessierung von EGFR-Liganden und der darauffolgenden Aktivierung des EGF-Rezeptors begründet (Sahin et al., 2004).

Neueste Publikationen zeigen, dass in bestimmten Krebsarten nicht nur eine gesteigerte Freisetzung der EGFR-Liganden stattfindet, sondern darüber hinaus auch eine erhöhte Expression des EGFR durch ADAM17 ausgelöst werden kann (Baumgart et al., 2010). Dies führte zu der Fragestellung, ob auch in anderen Tumoren die EGFR-Expression über ADAM17 beeinflusst wird, was insbesondere im Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten der Anti-EGFR-basierten Krebstherapien relevante Konsequenzen hätte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der pankreatischen Krebszelllinie Panc 89 eine solche ADAM17-induzierte EGFR-Expressionssteigerung bestätigt werden, welche mit einer Notch1-Rezeptoraktivierung erklärt werden konnte. Der Einfluss des Notch1-Rezeptors wurde auch in Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses als Ursache für die ADAM17-abhängige EGFR-Expressionssteigerung beschrieben (Baumgart et al., 2010).

Nach Analyse der EGFR-Expression in mit siRNA gegen ADAM17 behandelten Panc 89-Zellen wurde eine ADAM17-abhängige Verminderung der EGFR-Expression beobachtet. Auch ließ sich nach ADAM17-*Silencing* eine verminderte Freisetzung der intrazellulären Notch1-Domäne feststellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Expression von einer konsekutiven Prozessierung des Notch1-Rezeptors durch den γ -Sekretase-Enzymkomplex abhängt. Eine Inhibition desselbigen führte zu einer verminderten EGFR-Expression.

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Expression auch in der pankreatischen Krebszelllinie Panc 89 von einer ADAM17 und dem γ -Sekretase-Enzymkomplex getriggerten Notch1-Rezeptoraktivierung abhängig ist (siehe Abbildung 4.1). Diese Beobachtung macht ADAM17 als therapeutische Zielstruktur zunehmend attraktiver. Denn über eine ADAM17-Inhibition könnte das EGFR-Signaling in den genannten Tumorarten auf zwei sich ergänzenden Ebenen beeinflusst werden: auf Aktivierungsebene, durch Reduktion der EGFR-Liganden-Freisetzung und auf Expressionsebene durch Reduktion des EGFR selbst.

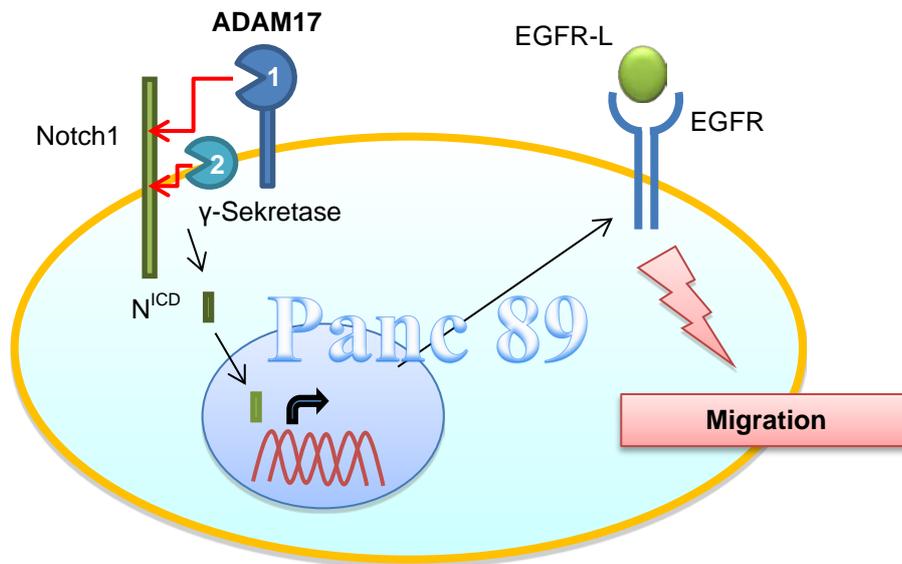


Abbildung 4.1: Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-Expression über eine ADAM17-assoziierte Notch1-Rezeptor-Aktivierung in Pankreas-Karzinomzellen.

ADAM17 (dunkelblau) und der γ -Sekretase-Enzymkomplex (hellblau) prozessieren den Notch1-Rezeptor von Panc 89-Zellen. Dies resultiert in der Freisetzung der intrazellulären Notch1-Domäne (N^{ICD}), welche mit DNA-bindenden Proteinen interagiert. Darauf folgt eine veränderte Genexpression zu Gunsten einer erhöhten EGFR-Verfügbarkeit auf der Membran. Dies ist in Panc 89-Zellen vermutlich einer der Gründe für die ADAM17-assoziierte Migrationssteigerung.

Besonders für die Behandlung des bisweilen schlecht therapierbaren Pankreas-Krebses, welcher oft nicht operabel ist und nur in geringen Maßen auf Chemotherapien anspricht, könnten diese Erkenntnisse über tumorfördernde Mechanismen, wie die Beeinflussung der EGFR-Expression über ADAM17 neue Anstöße für alternative Behandlungsstrategien geben (Vincent et al., 2011).

4.3 ADAM17 steigert die Migration von Pankreaskarzinomzellen

Malignes Zellverhalten wie eine gesteigerte Proliferation, Zell-Migration und Invasion wurde für eine Reihe von Krebszellarten bereits beschrieben und mit einer Überexpression bzw. Dysregulation von ADAM17 assoziiert (Zheng et al., 2009; Lu et al., 2011; Franovic et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte auch in der Krebszelllinie Panc 89 eine ADAM17-abhängige Migrationssteigerung gezeigt werden. Durch Einsatz eines spezifischen ADAM17-Inhibitors (nicht veröffentlicht) wurde die Migrationsrate von Panc 89-Zellen, welche mittels „Scratch-Assays“ detektiert und quantifiziert wurde, um 36 % reduziert. Diese migrationsbeeinflussende Wirkung von ADAM17 könnte auf eine verringerte Freisetzung von EGFR-Liganden zurückzuführen sein. Franovic et al. zeigten Vergleichbares bereits für das humane Nierenzellkarzinom. Sie assoziierten ein ADAM17-abhängiges *Shedding* von TGF- α mit einer gesteigerten EGFR-Phosphorylierung und einer Migrations- und Proliferationssteigerung der Zellen (Franovic et al., 2006). Ähnliches postulierten Zheng et al. für eine ADAM17-getriggerte Freisetzung von TGF- α in humanen Brustkrebszellen (Zheng et al., 2009).

Bei der Zelllinie Panc 89 könnte darüber hinaus die ADAM17-induzierte Expressionssteigerung des EGFR zur Erklärung dieses Effekts beitragen (vgl. Kapitel 4.2). Initiale Beobachtungen in Migrations-Assays zeigten eine EGFR- und Notch1-abhängige Migration. Einsatz eines γ -Sekretase-Inhibitors, welcher die Entstehung der intrazellulären Notch1-Domäne verhindert und Verwendung des Anti-EGFR-Antikörpers, Cetuximab, zeigten in ersten Experimenten die Tendenz einer Migrationsreduktion. Jedoch sollte in Betracht gezogen werden, dass der EGF-Rezeptor und Notch1 auch in anderen tumorfördernder Szenarien eine Rolle spielen, für die bisher noch keine Assoziation mit ADAM17 bekannt wurde. Daher können diese Beobachtungen der Migrationsreduktion nicht als alleiniger Beweis für die funktionelle Assoziation des in Kapitel 4.2 postulierten Signaltransduktionswegs dienen. Ein derartiger Zusammenhang ist jedoch durchaus möglich und müsste durch weitere Experimente validiert werden.

4.4 Therapeutischer Einsatz von Anti-ADAM17-Antikörpern in der Krebstherapie?

Aufgrund teilweise starker Nebenwirkungen und geringer Spezifität sowie zunehmendem Auftreten von Resistenzmechanismen während der Behandlung mit Chemotherapeutika wird das Interesse einer *target*-gerichteten Krebstherapie zunehmend größer (Kenny, 2007). Hierbei dienen bestimmte, in Krebszellen überexprimierte Zielstrukturen als Angriffspunkt von chemischen Inhibitoren oder spezifischen Antikörpern (Kenny, 2007). Für einige Krebsarten werden diese antigenspezifischen Substanzen klinisch bereits eingesetzt, beispielsweise Cetuximab, ein Anti-EGFR-Antikörper, bei der Behandlung von Kolorektalem Krebs und Trastuzumab, ein Anti-HER2-Antikörper, bei der Behandlung des Mammakarzinoms (Kenny, 2007; Bernier, 2006; Gooz, 2010).

Auch ADAM17 stellt ein interessantes Zielmolekül in der Krebstherapie dar, da es einerseits auf vielen Krebszellen hochreguliert ist und andererseits krebsfördernde Signaltransduktionswege wie das EGFR-*Signaling* entscheidend beeinflusst (Zheng et al., 2009; Sahin et al., 2004; Kenny, 2007).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität von ADAM17 darüber hinaus während chemotherapeutischer Behandlung mit 5-Fluorouracil in Kolorektalem Krebs erhöht ist (Kyula et al., 2010). Eine gesteigerte ADAM17-Aktivität kann dementsprechend zur Entstehung folgeschwerer Kompensationsmechanismen und Resistenzen führen, beispielsweise über eine erhöhte EGFR-Aktivierung, welche das Krebswachstum, die Metastasierung sowie Angiogenese fördert (Kyula et al., 2010; Herbst, 2003). Aufgrund dieser Erkenntnisse gewinnt die Generierung potenter Anti-ADAM17-Antikörper beträchtlich an therapeutischer Relevanz.

Bislang gibt es nur wenige Antikörper, die eine inhibitorische Wirkung auf ADAM17 zeigen konnten oder ADAM17 als Zielstruktur für induzierte Zelllyse nutzen (Tape et al., 2011; Yamamoto et al., 2012). Einer dieser Anti-ADAM17-Antikörper wurde dem Pool der von Dr. Ahmad Trad im Rahmen des SFB877 generierten und in dieser Arbeit getesteten Antikörper entnommen: der Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E. Dieser Antikörper wurde zur Erzeugung des bispezifischen ADAM17-CD3-Antikörper zur Induktion von T-Zell-induzierter Lyse humaner Prostatakrebszellen verwendet (Yamamoto et al., 2012). Eine Toxin gekoppelte Variante des A300E konnte in weiterführenden Untersuchungen zytotoxische Effekte in Mammakarzinomzellen entfalten (Trad et al., 2012).

Mit dem Ziel auf verschiedene Weise die Substraterkennung bzw. -prozessierung zu beeinflussen sind die im Rahmen des SFB877 generierten monoklonalen Antikörper gegen unterschiedliche Domänen von ADAM17 gerichtet (siehe Abbildung 4.3).

Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit Proteinen der membran-proximalen Domäne, der Disintegrin-Domäne und Peptiden der katalytischen Domäne von ADAM17 immunisiert.

Da für die extrazellulären Domänen von ADAM17 eine C-förmige Anordnung angenommen wird, was in einer räumlichen Nähe der membran-proximalen Proteasen Regionen zur katalytischen Domäne resultiert, ist eine Beteiligung derselbigen bei der Substraterkennung denkbar (Takeda, 2009).

Für die membran-proximale Domäne wurde eine Funktion bei der Substraterkennung bereits beschrieben (Li et al., 2007; Lorenzen et al., 2012). Die entsprechenden Antikörper sollten eine Interaktion von ADAM17 mit seinem Substrat minimieren, um eine Prozessierung desselbigen zu verhindern. Im Falle der Disintegrin-Domäne wurde gezeigt, dass die ADAM17-Aktivität durch Bindung an Integrine reduziert wird (Gooz et al., 2012). Durch Einsatz von Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörpern wäre die Induktion einer ähnlicher sterischer Inhibition von ADAM17 denkbar.

Antikörper gegen die katalytische Domäne sollten im Idealfall die Aktivität der katalytischen Domäne entweder auf kompetitive oder allosterische Weise beeinflussen und somit ebenfalls die Umsetzung des Substrats reduzieren.

Die Anti-ADAM17-Antikörper wurden im Vorfeld zunächst in *Shedding-Assays* auf ihre Funktionalität hin getestet (nicht veröffentlichte Daten), jedoch konnte für keines der beiden untersuchten Substrate: IL1-RII und IL-6R eine Inhibition des *Sheddings* beobachtet werden. Da ADAM17 für das Prozessieren von über 70 Substraten verantwortlich ist und eine Testung aller Substrate zeit- und arbeitsintensiv wäre, wurde die Strategie geändert und die Antikörper im Rahmen dieser Arbeit in zellbasierten *Assays* geprüft, die Aufschluss über die Proliferations- und Migrationseigenschaften der Zellen geben sollten – Eigenschaften, welche in verschiedenen Tumoren nachweislich mit ADAM17 assoziiert sind (Scheller et al., 2011; McGowan et al., 2007; Franovic et al., 2006; Zheng et al., 2009).

Für die Anti-Disintegrin- und die Anti-katalytischen-Domäne-ADAM17-Antikörper konnten weder in Proliferations-*Assays* noch bei Überprüfung der Zellwanderung ein inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Grund dafür könnte neben ihrer inhibitorischen Unwirksamkeit die geringe Bindungsfähigkeit der Antikörper an die native Form von ADAM17 sein.

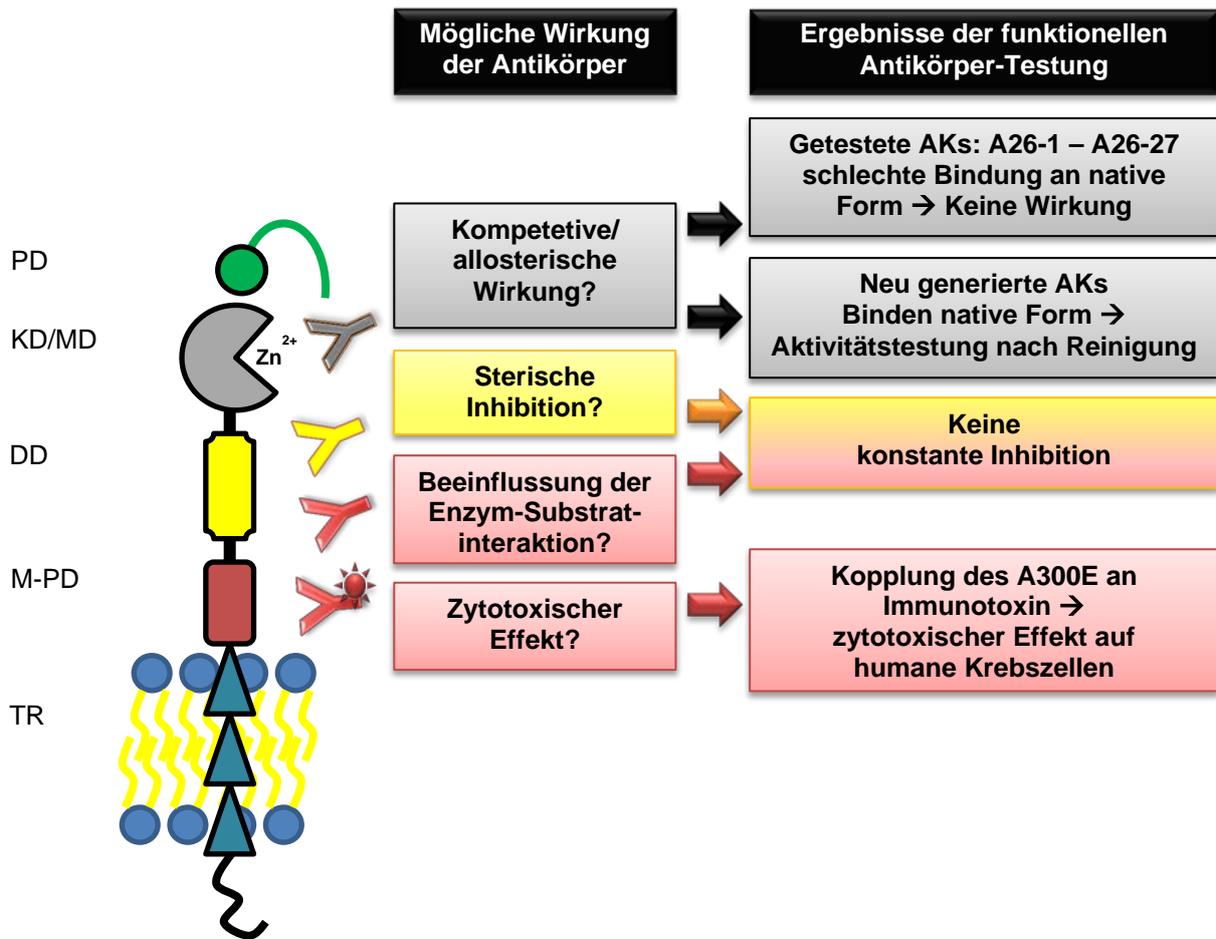


Abbildung 4.3: Vereinfachte schematische Darstellung der ADAM17-Domänen, den Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper sowie möglicher therapeutischer Effekte. ADAM17 besteht aus einer Pro-Domäne (PD), einer katalytischen bzw. Metalloprotease-Domäne (MD/KD), einer Disintegrin-Domäne (DD), einer membran-proximale Domäne (M-PD), einer Transmembran-Region (TR) und einer Zytoplasmatischen-Region (ZR). Die Antikörper (AK) mit möglicher therapeutischer Funktion sind gegen die katalytische, die Disintegrin- und die membran-proximale Domäne gerichtet. Sie sollten entweder kompetitiv bzw. allosterisch wirken (Anti-katalytische-Domäne-Antikörper), sterische Effekte induzieren (Anti-Disintegrin-Domäne-Antikörper) bzw. die Enzym-Substrat-Interaktion beeinflussen (Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper). In der funktionellen Testung konnte die erste Generation der Antikörper keinen inhibitorischen Effekt erzielen. Die Anti-katalytischen Antikörper wiesen schlechte Bindungseigenschaften zur nativen Form auf; es wurden neue Antikörper generiert, die bessere Bindungseigenschaften haben. Diese werden nach der Reinigung auf ihre Funktion geprüft. Der an ein Immunotoxin gekoppelte Anti-Membran-proximale-Antikörper A300E konnte in humanen Krebszellen zytotoxische Effekte entfalten und soll für eine mögliche therapeutische Anwendung optimiert werden.

Bei den Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörpern sah die Inhibitions-Tendenz zunächst vielversprechend aus. Die initial getesteten Antikörper-Überstände schienen die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen zu reduzieren (siehe Abbildung 3.2.2, 3.2.3, 2.3.4). Hier konnten die drei Antikörper E20-6, E20-25 und E20-26 nach mehrfacher Testung einen wiederholbaren inhibitorischen Effekt erzielen. Dies hätte die Vermutung zulassen können, dass die genannten Antikörper gegen die Membran-proximale-Domäne an Epitope binden, welche mit der Substraterkennung assoziiert sind. Der gereinigte Anti-Membran-proximale-

Domäne-Antikörper E20-6 war jedoch nicht in der Lage die Proliferation der Krebszellen zu minimieren. Möglicherweise war der inhibitorische Effekt auf im Antikörperüberstand enthaltene Substanzen zurückzuführen. Die parallel mit dem gereinigten E20-6-Antikörper durchgeführten Migrations-*Assays* schienen zunächst ebenfalls aussichtsreich und zeigten einen antikörperinduzierten hemmenden Effekt auf die Zellwanderung. Die Ergebnisse der Migrations-*Assays* unterlagen jedoch starken Schwankungen, was eine Vorhersage über die inhibitorische Potenz des E20-6 nicht zulässt. Um eine unzureichende Bindungsfähigkeit des E20-6 an die native Form von ADAM17 als Ursache für den nicht wiederholbaren inhibitorischen Effekt auszuschließen, wurde dieser erneut mittels Durchflusszytometrie auf seine ADAM17-spezifische Detektionssicherheit hin überprüft. Der E20-6 erwies sich hierbei als äußerst potent die native Form von ADAM17 zu erkennen, was eine geringe Bindungsfähigkeit des E20-6 an die aktive Form von ADAM17 als mögliche Ursache für die schlecht replizierbaren Ergebnisse ausschließt.

Ausgehend von der Annahme, dass der E20-6 von Panc 89-Zellen internalisiert wird, ähnlich wie der A300E von MDA-MB-231-Zellen (Trad et al., 2012) könnte dies möglicherweise als Hinweis für einen hohen Membran-Umsatz von ADAM17 gewertet werden. Ein hoher Membran-Umsatz gäbe der Zelle die Möglichkeit, nicht-Antikörper-gebundene und dementsprechend nicht inhibierte ADAM17-Proteine schnell zurück an die Zelloberfläche zu bringen. Um diesen Effekt auszugleichen, könnte unter Umständen eine wiederholte Antikörpergabe zu einem konstanteren inhibitorischen Effekt führen.

Da in den genannten zellbasierten *Assays* keine inhibitorischen Eigenschaften der Anti-ADAM17-Antikörper zu detektieren waren, wurden weiterführende experimentelle Strategien entwickelt, um therapeutische Effekte der Anti-ADAM17-Antikörper zu untersuchen. Für diese Folgeexperimente, welche größtenteils Dr. Ahmad Trad durchführte, wurde der A300E ausgewählt, da dieser eine hohe Affinität zur nativen Form von ADAM17 aufweist.

Ein Ansatz die therapeutische Einsatzfähigkeit des A300E zu überprüfen bestand darin, seine Potenz zur Komplementaktivierung bzw. zur Aktivierung von NK-Zellen zu testen. Mit dem *complement-dependent cytotoxic activity assay* (CDC) und dem *antibody-dependent cellular-assay* (ADCC) konnte jedoch kein cytotoxischer Effekte in MDA-MB-231 Zellen detektiert werden, was unter anderem mit der hohen Internalisierungsrate von ADAM17 begründet werden könnte.

Die bis dahin aussichtsreichste Strategie den A300E für therapeutische Zwecke einzusetzen war die Kopplung desselbigen an Doxorubizin, ein Toxin, welches, nach Internalisierung in

die jeweilige Zelle, zytotoxische Effekte entfaltet und letztendlich den Zelltod einleitet. Sinnvoll erschien dieser Ansatz, da zuvor eine zunehmende Internalisierung des A300E in bestimmten Krebszellen beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.2; Trad et al., 2012). Doxorubizin wurde bereits als ungekoppelte Variante zur Behandlung von Tumoren eingesetzt, jedoch gab es hier zunehmend Nebenwirkungen, besonders die kardiotoxischen Effekte des Doxorubizins schränkten die systemische Anwendung ein (Pastan et al., 2007). Die Idee Doxorubizin spezifisch an Krebszellmarker zu koppeln wurde bereits mit Dox-anti-CD74-Antikörpern im humanen Burkitt-Lymphom erfolgreich verwirklicht (Griffiths et al., 2003). Der an Doxorubizin gekoppelte Anti-Membran-proximale-Antikörper A300E konnte in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) zytotoxische Effekte entfalten. Diese Wirkung wurde mit einem weiteren Antikörper-Doxorubizin-Kopplungsprodukt als Negativkontrolle nicht erreicht, was auf die spezifische Internalisierung des A300E in ADAM17-exprimierenden Zellen zurückzuführen ist. Der Toxin-gekoppelte Anti-Membran-proximale-Antikörper A300E scheint nach diesen Untersuchungen therapeutisches Potential zu haben (Trad et al., 2012).

Die Spezifität dieses Effekts müsste jedoch weiter evaluiert werden, da Toxine dazu tendieren, durch Bindung an Endothelzellen Nebenwirkungen wie Ödembildung und Tachykardie hervorzurufen (Pastan et al., 2007; Ma et al., 2012). Anwendungskonditionen für einen klinischen Einsatz müssten dementsprechend geprüft und optimiert werden.

Einen weiteren vielversprechenden Ansatz der ADAM17-Inhibition stellen die kürzlich generierten Anti-katalytische-Domäne-ADAM17-Antikörper dar. Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Anti-katalytischen Antikörpern weist die neue Antikörpergeneration äußerst gute Bindungseigenschaften zur nativen Form von ADAM17 auf (bislang unveröffentlichte Daten).

Besonders vor dem Hintergrund, der durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnis, dass ADAM17 in mehr als einer – der bisher bekannten Zelllinie des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses NCI-H292 – Einfluss auf die EGFR-Expression nimmt, gewinnt die funktionelle Testung dieser potentiell inhibierender Antikörper zunehmend an Bedeutung.

Insbesondere in der Therapie des bisweilen schwer behandelbaren Pankreaskarzinoms könnte einer Inhibition von ADAM17 durch den engen Bezug zur EGFR-Expression ein wesentlich höherer Stellenwert eingeräumt werden, als dies bisher der Fall war.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloprotease ADAM17 besitzt ein großes Spektrum an Substraten, deren Prozessierung zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse beeinflussen kann. Eine besondere Bedeutung kommt ADAM17 in der Entstehung und Progression von Tumoren zu. Diese wurde bisweilen hauptsächlich mit einer gesteigerten ADAM17-abhängigen Freisetzung von EGFR-Liganden erklärt.

Neueste Erkenntnisse zeigten neben einer ADAM17-assoziierten EGFR-Aktivierungssteigerung auch eine ADAM17-abhängige Erhöhung der EGFR-Expression, welche mit einer Notch1-Rezeptor-Aktivierung begründet wurde.

Diese Tatsache macht ADAM17 als therapeutische Zielstruktur insbesondere für eine *target*-gerichtete Krebs-Therapie zunehmend bedeutender.

In der vorliegenden Arbeit konnte die erwähnte ADAM17-induzierte EGFR-Expressionssteigerung, welche bisher lediglich für eine Krebsart - den *non-small-cell lung cancer* - beschrieben wurde auch für Zellen des Pankreaskarzinoms beobachtet werden. In den verwendeten Panc 89-Zellen wurde eine gesteigerte Notch1-Rezeptoraktivierung als Ursache für die ADAM17 induzierte EGFR-Expressionssteigerung ermittelt.

Des Weiteren konnte in diesen Pankreaskrebszellen eine ADAM17-abhängige Migrationssteigerung gezeigt werden. Eine Kolo-kalisierung von ADAM17 mit der Zellmembran sowie eine Häufung von ADAM17 in Zellausläufern wurden ebenfalls detektiert.

Aufgrund der Bedeutsamkeit von ADAM17 in Bezug auf verschiedene Krankheiten, insbesondere Tumoren, wurden die im Rahmen des SFB877 generierten, monoklonalen Anti-ADAM17-Antikörper auf ihre diagnostischen und therapeutischen Fähigkeiten hin getestet. Antikörper, welche gegen die Disintegrin- bzw. die membran-proximale Domäne gerichtet waren, konnten ADAM17 spezifisch mittels verschiedener biochemischer und molekularbiologischer Methoden wie Westernblot, Durchflusszytometrie, Immunzytochemie und ELISA detektieren. Für eine mögliche diagnostische Anwendung zeigte sich der gegen die membran-proximale Domäne gerichtete Antikörper A300E als besonders geeignet, da dieser in verschiedenen *Assays* die native Form von ADAM17 erkennen konnte. Geeignete Überprüfungen der Sensitivität und Spezifität desselbigen müssten durch Verwendung in immunhistochemischen Ansätzen überprüft werden.

Der funktionellen Testung der Antikörper vorangehend wurden zunächst geeignete Testverfahren etabliert, die Zellfunktionen wie Proliferation und Migration überprüfen sollten. Obwohl nach Einsatz von Antikörperüberständen im Proliferations-Assay ein inhibierender Einfluss, insbesondere des Anti-Membran-proximale-Antikörpers E20-6, festgestellt wurde, konnten die gereinigten Antikörper keinen gleichbleibenden inhibitorischen Effekt erzielen.

Folgeexperimente, welche die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der Anti-ADAM17-Antikörper überprüfen sollten, verliefen hingegen erfolgreich. Der an Doxorubizin gekoppelte Anti-ADAM17-Antikörper A300E wurde von ADAM17 überexprimierenden NCI-H292-Zellen und MDA-MB-231-Zellen internalisiert und entfaltete zytotoxische Effekte (Trad et al., 2012).

Könnten die Zytotoxizität dieses Toxin gekoppelten Antikörpers auf andere Zellarten dosisabhängig minimiert und die Effekte des A300E auch *in vivo* verifiziert werden, stellt der Einsatz eines solchen Toxin gekoppelten Anti-ADAM17-Antikörpers eine ernstzunehmende und interessante Perspektive in der Zielmolekül orientierten Krebstherapie dar. Diese gewinnt insbesondere vor dem Hintergrund einer Chemotherapie-induzierten ADAM17-Aktivitätssteigerung und den daraus resultierenden Kompensationsmechanismen zunehmend an Bedeutung.

6 ANHANG

6.1 Zusätzliche Methoden und Ergebnisse

6.1.1 Struktur der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“

Bei der inaktiven ADAM17 Mutante 16 („mut16“) wurden im aktiven Zentrum von ADAM17 zwei Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht: an Position 406 wurde Glutamat (E) gegen Histidin (H) getauscht, an Position 415 Histidin gegen Glutamat (siehe Abbildung 6.1). Dadurch soll die Bindung des Substrats in der Bindungstasche gewährleistet, jedoch eine Prozessierung desselbigen inhibiert werden.

„Mut16“ wurde freundlicherweise von Dr. Inken Lorenzen, die Abbildungen von Stefan Düsterhöft zur Verfügung gestellt.



Abbildung 6.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur des aktiven Zentrums der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“. Durch Austausch der Aminosäuren Glutamat (E) gegen Histidin (H) an Position 406 bzw. der Aminosäuren Histidin gegen Glutamat an Position 415 wird das aktive Zentrum von ADAM17 inaktiviert, es entsteht die inaktive Mutante 16.

6.1.2 Experimenteller Einsatz der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“

Nachdem Krebszellen mit der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“ transfiziert wurden, folgte die Zellstimulation mit PMA, um die Aktivität von ADAM17 zu steigern (siehe Abbildung 6.2). Substrate und Interaktionspartner von ADAM17 wurden gebunden, jedoch nicht prozessiert. Im nächsten Schritt wurde die zweite wichtige Komponente der Mutante 16 genutzt: der PC-TAG. Mit dessen Hilfe konnte ADAM17 inklusive seiner gebundenen Substrate immunopräzipitiert werden. Es folgte die Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE und die Massenspektrometrische Analyse.

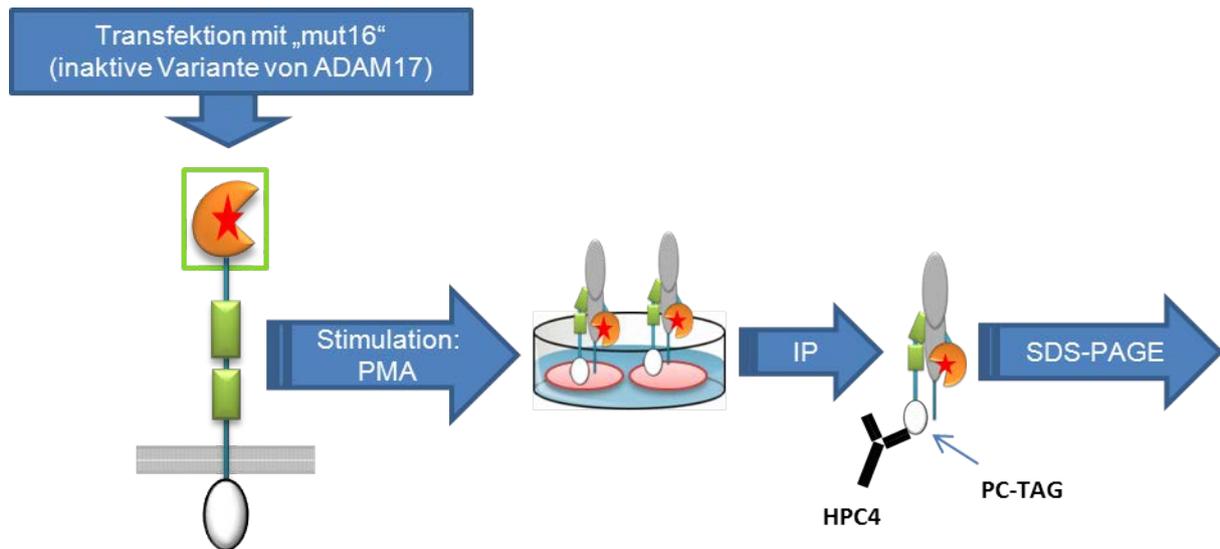


Abbildung 6.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Verwendung der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“ zur Identifizierung von ADAM17-Substraten. Zellen werden mit der Mutante 16 transfiziert und ADAM17 mit PMA aktiviert. Interaktionspartner und Substrate von ADAM17 werden von „mut16“ gebunden, jedoch nicht prozessiert. Über den ebenfalls in „mut16“ enthaltenen PC-TAG kann „mut16“ mit den gebundenen Substraten immunopräzipitiert werden. Es folgt die Proteinauftrennung über SDS-PAGE.

Teile der Abbildung wurden freundlicherweise von Stefan Düsterhöft zur Verfügung gestellt.

6.1.3 Kopplung des HPC4 an Sepharosebeads

1. NHS-aktivierte Sepharose *Beads 4 Fast Flow* (GE Healthcare, München)
mit 1 mM HCL waschen (3 x 1 ml)
2. mit PBS waschen (2 x 1 ml)
3. Antikörper in PBS zu *beads* geben (1 µg pro µl *beads*)
über Nacht bei 4 °C inkubieren
4. Blockierlösung über Nacht 4 °C (0.5 M Ethanolamin, 0.5 M NaCl, pH 8.3);
Lagerung in PBS + Azid (0,05 %)

Dieses Protokoll wurde freundlicherweise von Stefan Düsterhöft zur Verfügung gestellt.

6.1.4 Oberflächenexpression von ADAM17 auf PBMCs

PBMCs wurden aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und ihre ADAM17-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abbildung 6.3). Im Vergleich zur Isotypkontrolle (roter Graph) lässt sich keine erhöhte ADAM17-Oberflächerepression feststellen (blauer Graph). Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Dr. Ahmad Trad zur Verfügung gestellt.

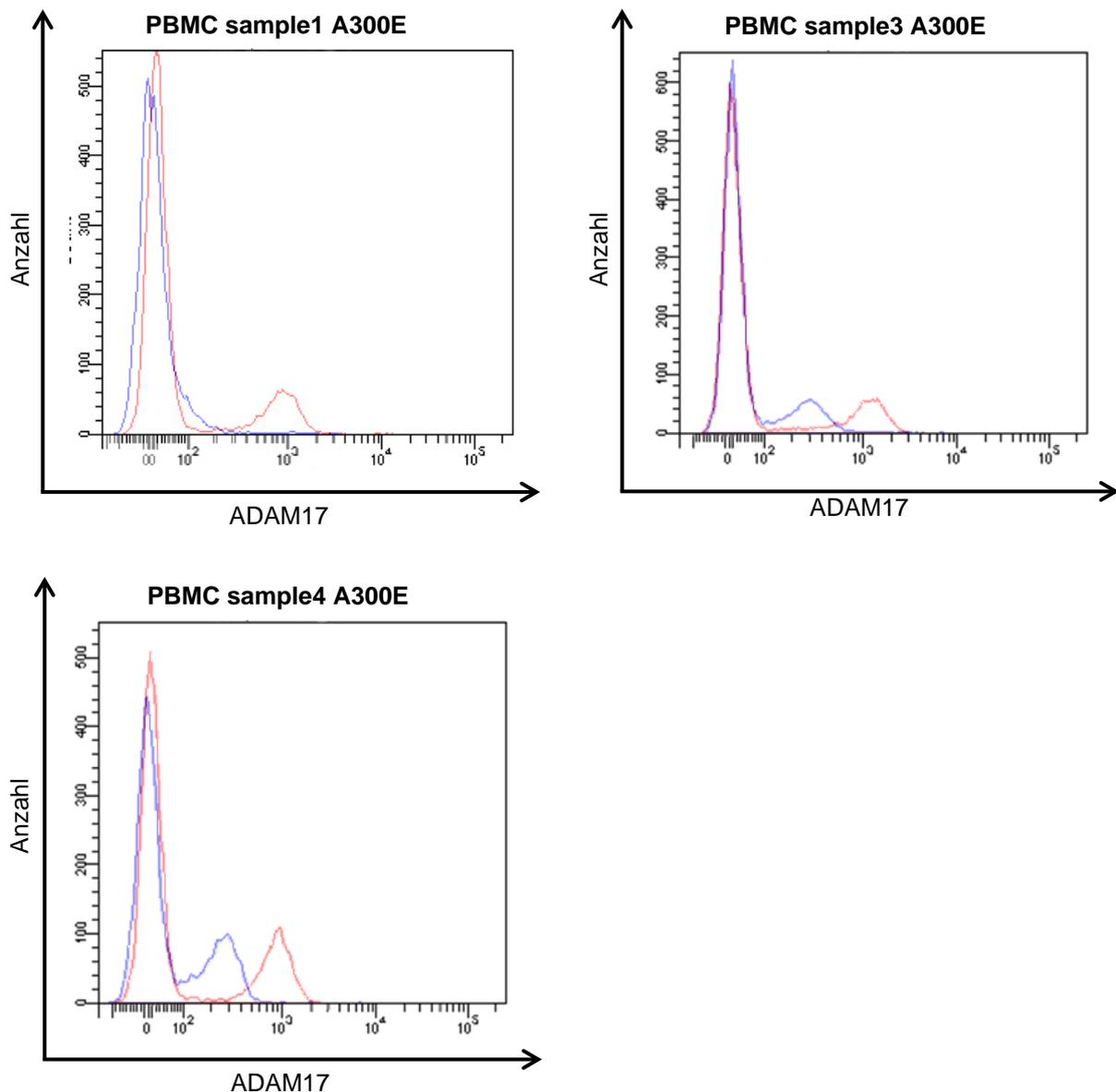


Abbildung 6.3: ADAM17-Oberflächenexpression auf PBMCs, detektiert mit dem Anti-Membranproximale-Domäne-ADAM17-Antikörper A300E.

PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut isoliert. Pro zu messendem Ansatz wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und mit 50 $\mu\text{g/ml}$ primärem Antikörper (A300E) bzw. entsprechender Menge der Isotypkontrolle (IgG1) versetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein Allophycocyanin konjugierter Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration 20 $\mu\text{g/ml}$). Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie.

6.1.5 Immunhistochemische Färbung von OH1-Zellen mit dem Anti-ADAM17-Antikörper A318

Eine initiale immunhistochemische Färbung von ADAM17 in OH-1-Zellen zeigt in einigen Zellen eine membrannähe Lokalisation von ADAM17, auch eine Lokalisation in Zellorganellen und mikrodomänenartigen Strukturen wäre möglich (Abbildung 6.4). Um Aussagen über die Spezifität dieser Färbung treffen zu können, müssten die entsprechenden Negativ-Kontrollen (Isotypkontrolle) durchgeführt werden. Diese Färbung wurde mit dem Anti-Disintegrin-Antikörper A318 durchgeführt. Eine Wiederholung der immunhistochemischen Färbung mit dem in verschiedenen Methoden etablierten Anti-Membran-proximale-Domäne-Antikörper A300E scheint vielversprechend. Die Immunocytochemische Färbung wurde freundlicherweise von Prof. Schumacher (UKE, Hamburg) durchgeführt.

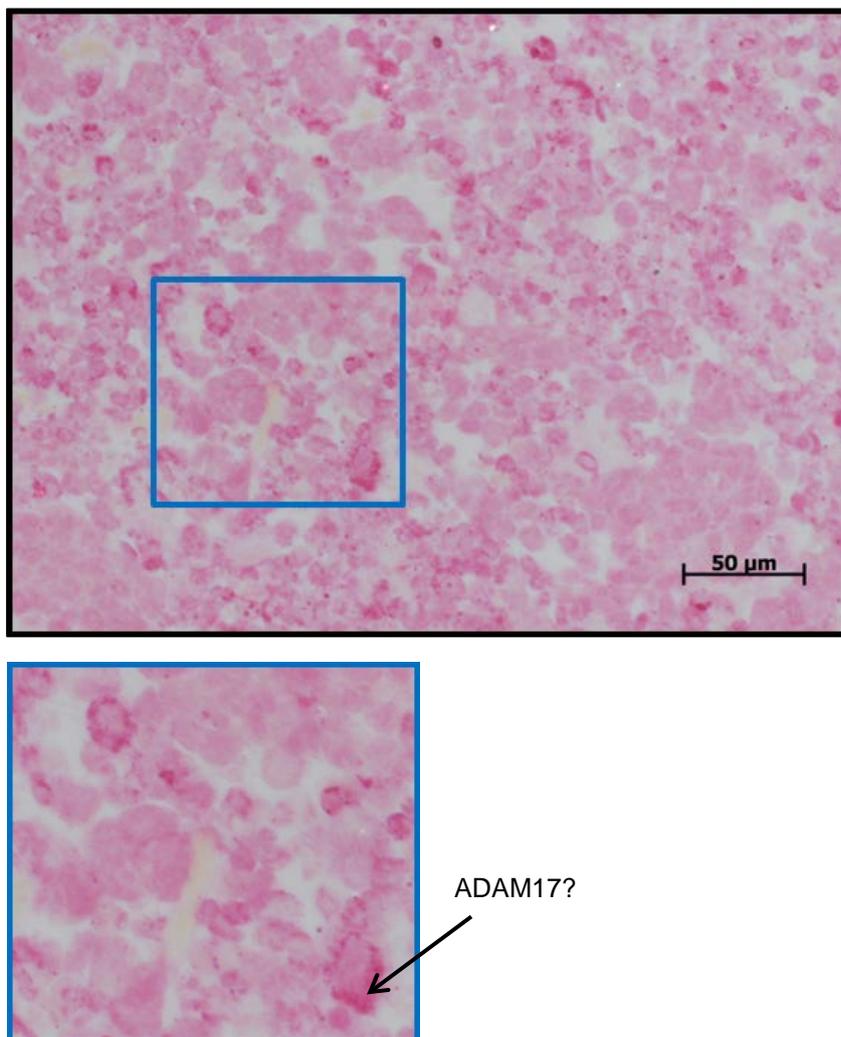


Abbildung 6.4: ADAM17-Lokalisation in OH-1-Zellen.

OH-1-Zellen wurden in Paraffin eingebettet und mit 10 µg/ml primärem Antikörper (A318) versetzt. Zur Detektion wurde ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper verwendet.

6.1.6 *Lipid Raft* und ADAM17-Lokalisation in Panc 89-Zellen

Panc 89-Zellen wurden mit dem *Lipid Raft*-Marker Flotillin bzw. dem Anti-ADAM17-Antikörper A300E markiert. Für die *Lipid Raft*-Färbung wurde als sekundärer Antikörper ein Alexa Fluor 594 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (rot), für die ADAM-17 Markierung wurde ein Alexa Fluor 466 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (grün) verwendet (siehe Abbildung 6.5).

ADAM17 scheint eine ähnliche z.T. membrannahe Lokalisation aufzuweisen wie der *Lipid Raft*-Marker Flotillin.

Eine Kolokalisationsanalyse wurde aufgrund der speziesspezifisch identischen Primärantikörper (beide Anti-Maus) nicht durchgeführt. Eine definitive Aussage über die Lokalisation von ADAM17 in *Lipid Rafts* kann mit dieser Einzelfärbung daher nicht getroffen werden.

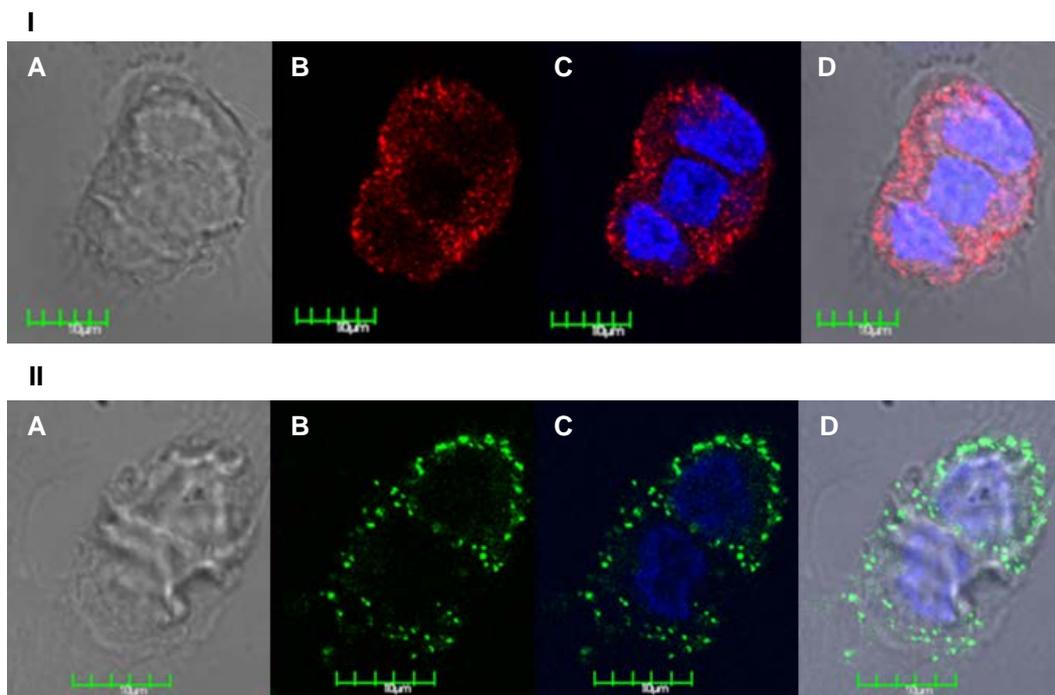


Abbildung 6.5: ADAM17- und *Lipid Raft*-Lokalisation in nicht permeabilisierten Krebszellen.

Panc 89-Zellen wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät, am Folgetag mit 5 µg/ml primärem Antikörper (A300E) bzw. Flotillin versetzt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein Alexa Fluor 594 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (rot), für die *Lipid Raft*-Färbung (I) bzw. der Alexa Fluor 466 gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (grün), für die ADAM17-Färbung (II). Im Anschluss wurde mit PFA fixiert. Grüner Balken entspricht 10 µm. Phasenkontrast (A), *Lipid Rafts* - rot (I) bzw. ADAM17 - grün (II) (B), *Lipid Rafts* (I) bzw. ADAM17 (II) und Nuklei blau (DAPI) (C), (D): Überlagerung: Phasenkontrast *Lipid Rafts* (I) bzw. ADAM17(II) und Nuklei.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A17	ADAM17
A300, A309, A318	Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper
A300E	Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper (früher: Anti-EGF-like-Domäne-ADAM17-Antikörper)
ACE2	<i>angiotensin2-converting enzyme</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADAM-TS	ADAMs mit Thrombospondin-Motiven
Akt	Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase benannt nach dem murinen <i>thyoma</i> viralen Onkogen, v-akt (Ak - Klassifizierung für die verwendete Mauslinie; t – <i>thyoma</i>)
Anti	gegen
APC	Allophycocyanin
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAPAN-1	Humane Zelllinie des pankreatischen Adenokarzinoms
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Colo 357	Humane Zelllinie des nicht endokrinen pankreatischen Krebses
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	<i>day</i>
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole, bindet doppelsträngige DNA; Verwendung: Zellkernfärbung, Immunocytochemie
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>

dH ₂ O	<i>distilled water</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	<i>dextran sulphate sodium</i>
E20-6, E20-25, E20-26	Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper (früher: Anti-EGF-like-Domäne-ADAM17-Antikörper)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal-growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EGFR	<i>Epidermal-growth factor receptor</i>
EGFR-L	<i>Epidermal-growth factor receptor-ligand</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> , Chelatbildner
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ErbB	Familie von Rezeptortyrosinkinasen welche ursprünglich nach ihrer Ähnlichkeit zum „Erythroblastom viralen Genprodukt“, benannt wurden
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
et al.	und andere
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
gp130	<i>glykoprotein 130</i>
GPCR	<i>g protein-coupled receptor</i>
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
Grb2	<i>growth-factor-receptor-bound-2</i>
h	<i>hora</i>
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HB-EGF-C	C-terminales Fragment des <i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HD-Domäne	Heterodimerisierungs-Domäne

HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IgG1	Immunoglobulin G1
IL1-RII	Interleukin1-RezeptorII
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im Lebendigen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LPS	Lipopolyssacharid
M	molar (mol/l)
m	Masse
m/v	<i>mass/volume</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
M-CSF-Rezeptor	<i>macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
MDA-MB-231	humane Brustkrebszelllinie
MDA-MB-435	humane Brustkrebszelllinie
MEK	<i>MAP Kinase Kinase</i>
Met	Methionin
MG-132	Proteasominhibitor
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mol	Einheitszeichen für das Mol; SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MOPC-21	Immunoglobulin unbekannter Spezifität; Isotyp Kontrolle für Maus-IgG1, κ
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MT-MMPs	<i>membrane-type MMPs</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
„mut16“	Mutante 16
NCI-H292	humane Krebszelllinie des nicht-kleinzellige Lungenkrebses (<i>non-small-cell lung cancer, NSCLC</i>)
NCI-H292-shA17	humane Krebszelllinie des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses (<i>non-small-cell lung cancer</i>) stabil transfiziert mit shRNA (<i>short hairpin RNA</i>) gegen ADAM17 (Baumgart et al., 2010)
N ^{ECD}	Notch Extrazelluläre Domäne
N ^{EXT}	<i>Notch extracellular truncated</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B- cells</i>
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
N ^{ICD} / NICD	Notch1 intrazelluläre Domäne
nm	Nanometer
NSCLC	<i>Non-small-cell lung cancer cells</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
N TM	transmembrane Untereinheit des Notch-Rezeptors
Panc 89	humane Zelllinie des duktales Pankreaskarzinom
Panc TuII	humane Zelllinie des duktales Pankreaskarzinom
Panc-1	humane Zelllinie des Pankreaskarzinoms
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC-TAG	Protein-C-TAG
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K / PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP	<i>phosphoinositides</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
proHB-EGF	Proform des <i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
Ras	' <i>Rat sarcoma</i> ' Proteinklasse kleiner GTPasen
RIP	<i>Regulated intramembrane Proteolysis</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
S2-cleavage	Notch1-Rezeptor-Prozessierung durch eine α -Sekretase an der „ <i>site 2</i> “
SARS-CoV-Rezeptor	<i>severe-acute respiratory syndrom-coronavirus</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunde
SFB877	Sonderforschungsbereich 877
SH2-Domäne	<i>Src-homology 2</i> (von der Proteinkinase c-Src abgeleitet)
SH3-Domäne	<i>Src-homology 3</i> (von der Proteinkinase c-Src abgeleitet)
SHC	<i>Src-homology-2-containing</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
siRNA A17	<i>small interfering RNA</i> gegen ADAM17
SoS	<i>son of sevenless</i>
sSARS-CoV	<i>löslicher severe-acute respiratory syndrom-coronavirus</i>
SVMPs	<i>Snake Venum</i> Metalloproteasen
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TAPI-2	<i>N-(R)-(2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl)-4-methylpentanoyl-L-t-butyl-glycine-L-alanine 2-aminoethyl amide</i> (Metalloproteasen-Inhibitor)
TBS	<i>tris buffered saline</i>

TBS-T	<i>tris buffered saline - tween</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TGF- β 1	<i>transforming growth factor beta1</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
UKE	Universtitätsklinikum Hamburg
UKSH	Universtitätsklinikum Schleswig-Holstein
v.a.	vor allem
v/v	<i>volume/volume</i>
v/w	<i>volume/weight</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
x	mal
Z2 Unit	<i>Proteomics Platform des SFB 877</i>

6.3 Abbildungsverzeichnis

1.1:	Vereinfachte schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM, SVMP, ADAM-TS, MT-MMP und MMP.	01
1.2:	Vereinfachte schematische Darstellung der ADAM17-Domänen.	03
1.3:	Vereinfachte schematische Darstellung der EGF-Rezeptor-Aktivierung nach Ektodomänen- <i>Shedding</i> durch ADAM17.	06
1.4:	a) Vereinfachte schematische Darstellung der herabgesetzten M-CSF-Rezeptor-Aktivierung nach Ektodomänen- <i>Shedding</i> durch ADAM17.	07
	b) Vereinfachte schematische Darstellung der herabgesetzten SARS-CoV-Rezeptor-Aktivierung durch Konkurrenz des löslichen Rezeptors mit dem membranständigen Rezeptor nach Ektodomänen- <i>Shedding</i> durch ADAM17.	07
1.5:	Vereinfachte schematische Darstellung des „ <i>Transsignaling</i> “ nach Ektodomänen- <i>Shedding</i> des IL-6-Rezeptors durch ADAM17.	08
1.6:	Vereinfachte schematische Darstellung des „ <i>Backwardsignaling</i> “ nach Ektodomänen- <i>Shedding</i>	09
1.7.:	ADAM17 als gleichgewichtsbeeinflussender Faktor zwischen Entzündungsgeschehen und Regeneration.	12
1.8:	Vereinfachte schematische Darstellung der Domänen des EGF-Rezeptors.	15
1.9:	Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-Signalkaskade sowie mögliche tumorerzeugende Dysregulationen und Mutationen.	17
1.10:	Vereinfachte schematische Darstellung des Notch1-Rezeptors.	19
1.11:	Vereinfachte schematische Darstellung der Notch1-Aktivierung durch „ <i>RIPping</i> “.	20
1.12:	Vereinfachte schematische Darstellung der Regulierungsmechanismen der EGF-Rezeptor-Expression und Aktivierung durch ADAM17.	22
1.13:	Vereinfachte schematische Darstellung der gezielten onkologischen Therapie mit monoklonalen Antikörpern und chemischen Inhibitoren sowie ihre zellulären Angriffspunkte.	25
3.1:	ADAM17-Expression in humanen Krebszelllinien.	47
3.2:	ADAM17-Expression in humanen Krebszelllinien, transfiziert mit siRNA gegen ADAM17.	48
3.3:	ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszelllinien, detektiert mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A300.	49

3.4:	ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszelllinien, detektiert mit dem Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörper A318.	50
3.5:	ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszellen, detektiert mit dem Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper A300E.	51
3.6:	ADAM17-Lokalisation in permeabilisierten Krebszellen.	53
3.7:	ADAM17-Lokalisation in nicht permeabilisierten Krebszellen.	54
3.8:	ADAM17-Kolokalisation mit der Zellmembran in nicht permeabilisierten Panc 89-Zellen.	56
3.9:	ADAM17-Lokalisation in Zellausläufern nicht permeabilisierter Panc 89-Zellen.	57
3.10:	Einfluss von ADAM17 auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen und Panc TuII-Zellen.	59
3.11:	Einfluss von ADAM17 auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen – Transfektionsoptimierung.	60
3.12:	Einfluss von ADAM17 auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen.	62
3.13:	Identifizierung der intrazelluläre Notch1-Domäne (NICD) – Bande.	63
3.14:	Einfluss von ADAM17 auf die Notch1-Expression in Panc 89-Zellen.	64
3.15:	Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors in Panc 89-Zellen.	65
3.16:	Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors auf die EGFR-Expression in Panc 89-Zellen.	66
3.17:	Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit spezifischem ADAM17-Inhibitor.	67
3.18:	Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung spezifischem ADAM17-Inhibitor.	67
3.19:	Identifikation physiologischer ADAM17-Substrate in Panc 89-Zellen.	69
3.20:	Proliferation humaner Krebszellen nach Transfektion mit siRNA gegen ADAM17.	71
3.21:	Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit gereinigten Anti-Disintegrin-Domäne-ADAM17-Antikörpern.	72
3.22:	Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit Antikörperüberständen der Anti-Membran-proximale-ADAM17-Antikörpern – 1. Testdurchgang.	73
3.23:	Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit Antikörperüberständen der Anti-Membran-proximale-ADAM17-Antikörpern – 2. Testdurchgang.	74

3.24: Proliferation von Colo 357-Zellen nach Behandlung mit Antikörperüberständen der Anti-Membran-proximale-ADAM17-Antikörpern – 3. Testdurchgang.	75
3.25: Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit gereinigten Anti-ADAM17-Antikörpern gegen die katalytische Domäne und die Membran-proximale-Domäne.	76
3.26: ADAM17-Oberflächenexpression in humanen Krebszelllinien, detektiert mit dem Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper E20-6.	77
3.27: Migration von Panc 89-Zellen nach Behandlung mit gereinigten Antikörpern Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörpern E20-6 und A300E. .	78
4.1: Vereinfachte schematische Darstellung der ADAM17 Domänen, Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper und methodische Anwendungsgebiete.	80
4.2: Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-Expression über eine ADAM17-assoziierte Notch1-Rezeptor-Aktivierung in Pankreas-Karzinomzellen.	85
4.3: Vereinfachte schematische Darstellung der ADAM17-Domänen, den Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper sowie möglicher therapeutischer Effekte.	89
6.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur des aktiven Zentrums der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“.	94
6.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Verwendung der inaktiven ADAM17-Variante „mut16“ zur Identifizierung von ADAM17-Substraten.	95
6.3: ADAM17-Oberflächenexpression auf PBMCs, detektiert mit dem Anti-Membran-proximale-Domäne-ADAM17-Antikörper A300E.	96
6.4: ADAM17-Lokalisation in OH-1-Zellen.	97
6.5: ADAM17- und <i>Lipid Raft</i> -Lokalisation in nicht permeabilisierten Krebszellen.....	98

6.4 Tabellenverzeichnis

1.1: Zusammensetzung der Gele für die diskontinuierliche SDS-PAGE	33
---	----

6.5 Literaturverzeichnis

Aly HA (2012) Cancer therapy and vaccination. *J Immunol Methods* **382**: 1-23

Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* **161**: 1133-1141

Baumgart A, Seidl S, Vlachou P, Michel L, Mitova N, Schatz N, Specht K, Koch I, Schuster T, Grundler R, Kremer M, Fend F, Siveke JT, Peschel C, Duyster J, Dechow T (2010) ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **70**: 5368-5378

Bax DV, Messent AJ, Tart J, van Hoang M, Kott J, Maciewicz RA, Humphries MJ (2004) Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem* **279**: 22377-22386

Bernier J (2006) Cetuximab in the treatment of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**: 1539-1552

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**: 729-733

Blobel CP (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 32-43

Cantalupo G, Alifano P, Roberti V, Bruni CB, Bucci C (2001) Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J* **20**: 683-693

Chalaris A, Adam N, Sina C, Rosenstiel P, Lehmann-Koch J, Schirmacher P, Hartmann D, Cichy J, Gavrilova O, Schreiber S, Jostock T, Matthews V, Hasler R, Becker C, Neurath MF, Reiss K, Saftig P, Scheller J, Rose-John S (2010a) Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* **207**: 1617-1624

Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J (2011) The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* **90**: 484-494

Chalaris A, Gewiese J, Paliga K, Fleig L, Schneede A, Krieger K, Rose-John S, Scheller J (2010b) ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 234-245

Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J (2007) Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* **110**: 1748-1755

Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 505-516

Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* **29**: 258-289

Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A (2008) Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* **68**: 1443-1450

Franovic A, Robert I, Smith K, Kurban G, Pause A, Gunaratnam L, Lee S (2006) Multiple acquired renal carcinoma tumor capabilities abolished upon silencing of ADAM17. *Cancer Res* **66**: 8083-8090

Garbers C (2011), Der Interleukin-6 Rezeptor: Spezies-spezifische Unterschiede der proteolytischen Freisetzung durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 zwischen Maus und Mensch. Dissertation, Christian-Albrechts Universität zu Kiel

Gooz M (2010) ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**: 146-169

Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M (2012) A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by alpha5beta1 integrin in kidney mesangial cells. *PLoS One* **7**: e33350

Griffiths GL, Mattes MJ, Stein R, Govindan SV, Horak ID, Hansen HJ, Goldenberg DM (2003) Cure of SCID mice bearing human B-lymphoma xenografts by an anti-CD74 antibody-anthracycline drug conjugate. *Clin Cancer Res* **9**: 6567-6571

Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR (2011) Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* **1815**: 197-213

Herbst RS (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**: 21-26

Herdegen, T (2008): Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

Hooper NM, Karran EH, Turner AJ (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J* **321** (Pt 2): 265-279

Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, Blobel CP (2007) Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol* **179**: 2686-2689

Huveneers S, Truong H, Danen HJ (2007a) Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol* **83**: 743-751

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**: 291-304

Kenny PA (2007) Tackling EGFR signaling with TACE antagonists: a rational target for metalloprotease inhibitors in cancer. *Expert Opin Ther Targets* **11**: 1287-1298

Kenny PA, Bissell MJ (2007) Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest* **117**: 337-345

Kyula JN, Van Schaeybroeck S, Doherty J, Fenning CS, Longley DB, Johnston PG (2010) Chemotherapy-induced activation of ADAM-17: a novel mechanism of drug resistance in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 3378-3389

Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ (2005) Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* **280**: 30113-30119

Li X, Perez L, Pan Z, Fan H (2007) The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res* **17**: 985-998

Lorenzen I, Lokau J, Dusterhoft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grotzinger J (2012) The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* **586**: 1093-1100

Lorenzen I, Trad A, Grotzinger J (2011) Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* **415**: 330-336

Lu Y, Jiang F, Zheng X, Katakowski M, Buller B, To SS, Chopp M (2011) TGF-beta1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17. *Oncol Rep* **25**: 1329-1335

McGowan PM, Ryan BM, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ (2007) ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res* **13**: 2335-2343

Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Carter HL, Miller AB, Su JL, Lambert MH, Willard DH, Sheeley DM, Kost TA, Burkhart W, Moyer M, Blackburn RK, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR, Becherer JD (1999) Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* **274**: 30563-30570

Moss ML, Jin SL, Becherer JD, Bickett DM, Burkhart W, Chen WJ, Hassler D, Leesnitzer MT, McGeehan G, Milla M, Moyer M, Rocque W, Seaton T, Schoenen F, Warner J, Willard D (1997) Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol* **72**: 127-129

Murphy G (2009) Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 138-145

Nanba D, Mammoto A, Hashimoto K, Higashiyama S (2003) Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol* **163**: 489-502

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262

Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Topley N, Williams AS, Jones SA (2003) Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* **171**: 3202-3209

Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ (2007) Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med* **58**: 221-237

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**: 1281-1284

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**: 884-888

Richards FM, Tape CJ, Jodrell DI, Murphy G (2012) Anti-tumour effects of a specific anti-ADAM17 antibody in an ovarian cancer model in vivo. *PLoS One* **7**: e40597

Ringel J, Jesnowski R, Moniaux N, Luttes J, Choudhury A, Batra SK, Kloppel G, Lohr M (2006) Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* **66**: 9045-9053

Rose-John S, Neurath MF (2004) IL-6 trans-signaling: the heat is on. *Immunity* **20**: 2-4

Rovida E, Paccagnini A, Del Rosso M, Peschon J, Dello Sbarba P (2001) TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* **166**: 1583-1589

Saftig P, Reiss K (2011) The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol* **90**: 527-535

Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* **164**: 769-779

Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S (2011a) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* **32**: 380-387

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011b) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 878-888

Schlondorff J, Becherer JD, Blobel CP (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* **347 Pt 1**: 131-138

Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G (2005) ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* **118**: 2371-2380

Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* **4**: 823-840

Takeda S (2009) Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 146-152

Tape CJ, Willems SH, Dombernowsky SL, Stanley PL, Fogarasi M, Ouwehand W, McCafferty J, Murphy G (2011) Cross-domain inhibition of TACE ectodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5578-5583

Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G, Peiretti F (2006) The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res* **312**: 3969-3980

Tien Kuo M (2000) Roles of Multidrug Resistance Genes in Breast Cancer Chemoresistance. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5989>]

Trad A, Hansen HP, Shomali M, Peipp M, Klausz K, Hedemann N, Yamamoto K, Mauermann A, Desel C, Lorenzen I, Lemke H, Rose-John S, Grotzinger J (2012) ADAM17-overexpressing breast cancer cells selectively targeted by antibody-toxin conjugates. *Cancer Immunol Immunother*

Trad A, Hedemann N, Shomali M, Pawlak V, Grotzinger J, Lorenzen I (2011) Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. *J Immunol Methods* **371**: 91-96

Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, Oshel P, Bock CB, Miller AS, Albrecht RM, Kubes P, Steeber DA, Tedder TF (2003) Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* **19**: 713-724

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011) Pancreatic cancer. *Lancet* **378**: 607-620

Wewer UM, Morgelin M, Holck P, Jacobsen J, Lydolph MC, Johnsen AH, Kveiborg M, Albrechtsen R (2006) ADAM12 is a four-leafed clover: the excised prodomain remains bound to the mature enzyme. *J Biol Chem* **281**: 9418-9422

Yamamoto K, Trad A, Baumgart A, Huske L, Lorenzen I, Chalaris A, Grotzinger J, Dechow T, Scheller J, Rose-John S (2012) A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell-mediated lysis of prostate cancer cells. *Biochem J* **445**: 135-144

Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ (2010) Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **80**: 690-701

Zahorowska B, Crowe PJ, Yang JL (2009) Combined therapies for cancer: a review of EGFR-targeted monotherapy and combination treatment with other drugs. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**: 1137-1148

Zhang TC, Zhu WG, Huang MD, Fan RH, Chen XF (2012) Prognostic value of ADAM17 in human gastric cancer. *Med Oncol* **29**: 2684-2690

Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Zhang ZG, Lu QE, Chopp M (2009) ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation. *Cancer Biol Ther* **8**: 1045-1054

Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A (1999) The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* **20**: 408-412

6.6 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Originalbeiträge:

Trad A, **Hedemann** N, Shomali M, Pawlak V, Grötzinger J, Lorenzen I.

(2011): Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. J Immunol Methods. 2011 Aug 31;371(1-2):91-6. Epub 2011 Jun 24

Trad A, Hansen HP, Shomali M, Peipp M, Klausz K, **Hedemann** N, Yamamoto K, Mauermann A, Desel C, Lorenzen I, Lemke H, Rose-John S, Grötzinger J. (2012): ADAM17-overexpressing breast cancer cells selectively targeted by antibody-toxin conjugates. Cancer Immunol Immunother. 2012 Sep 1. [Epub ahead of print]

Poster:

Hedemann N., Trad A., Desel C., Grötzinger J., (2011): ADAM17 a Potential Marker for Cancer Cells? 7th Annual PEGS, Boston, MA, USA

Hedemann N., Trad A., Desel C., Grötzinger J., (2011): ADAM17 a Potential Marker for Cancer Cells? International IRTG Symposium "Proteases and Pathophysiology", Kiel

6.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nina Hedemann
Geburtsdatum	14.03.1984
Geburtsort	Lüneburg

Schullaufbahn

1990 - 1994	Grundschule Westergellersen
1994 - 1996	Orientierungsstufe Oedeme, Lüneburg
1996 - 2003	Gymnasium Oedeme, Lüneburg
23.06.2003	Allgemeine Hochschulreife (Gymnasium Oedeme, Lüneburg)

Akademische Laufbahn

10/2004-07/2010	Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
06.07.2010	Examen
12.08.2010	Approbation
1.10.2010-30.09.2011	Stipendiat im Rahmen der IRTG (SFB877)
10/2010-11/2012	Anfertigung der Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. Grötzinger am Institut der Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Titel DIE METALLOPROTEASE ADAM17 - POTENTIELLER TUMORMARKER UND SCHLÜSSELREGULATOR IN DER <i>EPIDERMAL-GROWTH FACTOR RECEPTOR</i>-EXPRESSION VON PANKREASKARZINOMZELLEN

6.8 Danksagung

Für die Möglichkeit dieses spannende Promotionsthema zu bearbeiten und für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Grötzinger bedanken. Sein Vertrauen hinsichtlich der experimentellen Durchführung, seine konstruktive Kritik und Diskussion, die Vermittlung der richtigen Kontakte sowie der hilfsbereite und kollegiale Umgang haben zu einer sehr positiven und vor allem konstruktiven Arbeitsatmosphäre geführt. Für die immer schnelle und direkte Klärung fachlicher sowie zukunftsorientierter Fragestellung und die sehr zügige Korrektur der vorliegenden Arbeit möchte ich mich besonders bedanken.

Ganz herzlich möchte ich der DFG für die Finanzierung dieser Doktorarbeit sowie der Bewilligung des SFB877 danken. Dieser Sonderforschungsbereich gab auch mir als medizinischem Doktoranden die Möglichkeit mich über einen längeren Zeitraum intensiv mit interessanten wissenschaftlichen Fragestellungen auseinandersetzen sowie einen guten Ein- und Überblick in und über Forschungsthematiken der teilnehmenden Institute und Arbeitsgruppen zu erlangen. Besonders das Programm der integrierten Graduiertenbetreuung (*Integrated Research Training Group - IRTG*) war neben der Laborarbeit eine sehr gute Möglichkeit methodische Kenntnisse zu intensivieren und diese in laufende Projekte einzubringen, zusätzliche Qualifikationen, wie Präsentationstechnik und Statistik, zu erlangen sowie an der Organisation von Veranstaltungen wie dem internationalen IRTG-Symposium teilzunehmen.

Mein vorangestellter Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John, dem Sprecher des SFB877 und Geschäftsführendem Direktor des Biochemischen Instituts. Auch möchte ich mich bei ihm für die freundliche Aufnahme im Institut sowie die kontinuierliche Beratung schon während des Studiums bedanken.

Für die Übernahme der Zweitbetreuung im Rahmen des IRTG-*Mentoring*-Programms danke ich Dr. Athena Chalaris und als weiterem Betreuer Prof. Dr. Jürgen Scheller.

Dem Korreferenten bzw. der Korreferentin danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank gebührt an dieser Stelle Dr. Ahmad Trad, der mir mit seiner offenen und hilfsbereiten Art als Betreuer bei dieser Arbeit zur Seite stand. Besonders seine zuversichtliche Einstellung, immer neue und innovative Ideen sowie seine fachliche Kompetenz haben zu einer inspirierenden Arbeitsatmosphäre geführt. Auch das entgegenbrachte Vertrauen hinsichtlich der stetigen Diskussion laufender Projekte und künftiger Vorhaben führte oft zu interessanten und lehrreichen Gesprächen. Für die gute Zusammenarbeit, die durchweg zeitnahe Klärung von Problemstellungen sowie das konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich.

Einen weiteren Dank möchte ich Dr. Inken Lorenzen aussprechen. Sie stand immer mit viel Fachwissen und konstruktiver Kritik zur Seite und nahm sich neben der umfangreichen Betreuung eigener Projekte immer wieder die Zeit, sich auch mit Fragestellungen dieser Arbeit zu befassen und gute Lösungsansätze beizutragen. Besonders für die Hilfe bei der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse und das intensive und konstruktive Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bedanken.

Für die Anfertigung der mikroskopischen Bilder sowie für die Organisation der IRTG und des SFB877 sowie für ihre Beratungstätigkeiten und Hilfsbereitschaft möchte ich Dr. Christine Desel ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem:

Prof. Dr. Andreas Tholey und Dr. Bart van den Berg (Institut für Experimentelle Medizin; Z2-Unit SFB877) für die massenspektrometrische Analyse.

Prof. Dr. Holger Kalthoff und Dr. Anja Baumgart für die Bereitstellung der humanen Krebszelllinien.

Prof. Dr. Udo Schumacher für die immunhistochemischen Färbungen.

Dr. Hinrich Hansen für die konstruktive Beratung.

Dr. Dirk Schmidt-Arras für die Beratung und Analyse der mikroskopischen Aufnahmen und die konstruktive Kritik.

Dr. Lisa Simms, Dr. Kevin Spring und Dr. Nigel Waterhouse sowie Prof. Dr. Hilmar Lemke für die Begeisterung an der Wissenschaft, die Praktika und die Kontaktvermittlung.

Dr. Athena Chalaris, Dr. Johannes Prox, Jeanette Schwarz und Stefanie Schmidt für Materialien und Informationen in Bezug auf die Notch1-Aktivierung.

Dr. Michael Pachta für immer zügige Klärung von Fragestellungen im IT-Bereich und Detlef Schmiedlein für Reparaturarbeiten jeglicher Art.

und Michelle Horn für ihre frische, muntere Art sowie ihre Begeisterungsfähigkeit und motivierte Mitarbeit.

Ein spezieller Dank gilt auch Petra Voß, die durch ihre unkomplizierte, freundliche Art und zügige Bearbeitung jeglicher Anliegen einen großen Beitrag zur positiven Atmosphäre im Institut beiträgt.

Ganz besonders möchte mich bei der gesamten „AG-GRÖ“ bedanken, sowie den vielen netten und hilfsbereiten Doktoranden und Mitarbeitern des Biochemischen Instituts und der *IRTG*. Es war eine sehr schöne Zeit mit Euch.

Für das gemeinsame Mittagessen und viele interessante fachliche und private Unterhaltungen: Dr. Björn Spudy, Dr. Christoph Garbers, Jana Nowinski, Stefan Düsterhöft, Mirja Oldefest, Juliane Lokau, Tim Kerkow, Katharina Höbel und Anna Zaslowski.

Inbesondere gilt mein Dank Stefan Düsterhöft für die kontinuierliche, hilfsbereite und v.a. kompetente, fachliche Beratung, die Unterstützung bei der Colloidalen-Coomassie Färbung und der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse, sowie ihm, Juliane Lokau und Mirja Oldefest für eine Teilkorrektur der vorliegenden Arbeit.

Katharina Höbel danke ich für das abschließende Korrekturlesen dieser Arbeit und Jana Nowinski für die Formatierungsberatung.

Dr. Björn Spudy danke ich für die Unterstützung bei der Antikörperreinigung und Dr. Christoph Garbers für die Literaturempfehlungen.

Marija Stevanovic möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere für das intensive Westernblot-*troubleshooting*, danken.

Weiterer Dank gilt: Henriette Oberdörster, Guranda Chitadze, Benjamin Schönbeck, Dr. Marcus Lettau, Gerina Vollmers, Thomas Jakoby und Frithjof Lohmann.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Anna Zaslowski danken, die diese Arbeit als erste Korrektur-Instanz äußerst genau gelesen und viele konstruktive Vorschläge beigetragen hat. Vielen, vielen Dank dafür! Des Weiteren möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft sowie ihre außerordentliche soziale Kompetenz und ihr Problemlösungsvermögen auf allen Ebenen sowohl menschlicher als auch arbeits- und forschungsbezogener Art bedanken!

Weiterhin danke ich meiner WG, insbesondere Hendrike und Leonie die diese Arbeit, trotz Fachfremdheit;), mit Korrektur gelesen hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei denjenigen bedanken, denen ich diese interessante, lehrreiche und v.a. abwechslungsreiche und schöne Zeit zu verdanken habe und ohne die diese Arbeit in dem hier vorliegenden Ausmaß nicht zustande gekommen wäre:

meiner Familie!

Insbesondere meinen Eltern Ute Hedemann-Skambraks und Rainer Hedemann und meinen Großeltern Helga und Heinz Skambraks sowie Inge und Johann Hedemann, möchte ich ganz herzlich danken, nicht nur weil sie mich kontinuierlich sowohl in den Jahren vor, als auch während und nicht zuletzt nach Abschluss meines Studiums finanziell unterstützt haben, sondern auch und vor allem dafür, dass sie immer mit viel Interesse, Liebe, Freude und Organisationskunst an meinem Leben teilgenommen und mich in meinen Ideen und Interessen kontinuierlich unterstützt und gefördert haben.

Vielen Dank dafür!!!

Auch danke ich an dieser Stelle meinen Brüdern Jens und Karsten sowie Martina, Steffi und meinen Nichten und Neffen: Janna, Jonas, Philipp, Jan, Johanna und Paul.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freundeskreis bedanken und bei Philipp, der über den gesamten Zeitraum geduldig meine Zeitknappheit ertragen hat und mir viel Rückhalt gab.

6.9 Erklärung

Hiermit versichere ich, Nina Hedemann, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 12.11.2012