Limitierte Proteolyse endothelialer und epithelialer Oberflächenmoleküle durch die Metalloprotease ADAM17

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl. Biochem.
Jessica Prüßmeyer
aus Minden

Berichter: Professor Dr. rer. nat. Andreas Ludwig
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung *1*

1.1 Adhäsionsmoleküle und Leukozytenrekrutierung **1**

1.1.1 Zelladhäsion 1

1.1.2 Leukozytentransmigration 3

1.2 Junktionale Adhäsionsmoleküle **7**

1.2.1 JAM-A 7

1.3 Heparansulfat-Proteoglykane **9**

1.3.1 Syndekane 10

1.3.2 Syndekan-1 12

1.3.3 Syndekan-4 13

1.4 Regulation von Zelladhäsionsmolekülen **14**

1.5 Metalloproteasen **15**

1.5.1 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (ADAM) 16

1.5.2 Regulation des Shedding 20

2 Fragestellung *21*

3 Material und Methoden *23*

3.1 Material **23**

3.1.1 Geräte 23

3.1.2 Verbrauchsmaterialien 23

3.1.3 Chemikalien 24

3.1.4 Verwendete Kits 24

3.1.5 Enzyme 25

3.1.6 Puffer 25

3.1.7 Zellkulturmedien 28

3.1.8 Antikörper 29

3.1.9 Stimulantien und Inhibitoren 30

3.1.10 shRNA Sequenzen und siRNA Sequenzen 31

3.1.11 Oligonukleotide 32

3.1.12 Plasmide 32

3.1.13 Bakterienstämme 37

3.1.14 Zelllinien 37

3.2 Methoden 39

3.2.1 Zellbiologische Methoden 39

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden 44

3.2.3 Funktionelle Untersuchungen 48

3.2.4 Molekularbiologische Methoden 53

3.2.5 Statistische Auswertung 59

4 Ergebnisse 61

I. JAM-A 61

4.1 Konstitutive Freisetzung von löslichem JAM-A 61

4.2 Induzierbares *Shedding* von JAM-A 62

4.3 Metalloprotease vermitteltes *Shedding* von JAM-A 67

4.3.1 Konstitutives *Shedding* von JAM-A durch eine Metalloprotease 67

4.3.2 Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM17 vermittelt das induzierbare *Shedding* von JAM-A 69

4.3.3 Einfluss von rekombinanten ADAM17 auf die Proteolyse von JAM-A 71

4.3.4 Verstärkung der konstitutiven Spaltung von JAM-A durch Überexpression von ADAM17 71

4.3.5 Herunterregulierung von ADAM10 und ADAM17 durch siRNA-Oligonukleotide 73

4.3.6 Reduktion der konstitutiven Spaltung von JAM-A in ADAM10- und ADAM17-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten 77

4.3.7 Regulation von JAM-A in den Zell-Zell-Kontakten 79

4.4 Funktionelle Relevanz des durch *Shedding* entstandenen löslichem JAM-A 82

4.4.1 Einfluss von löslichem JAM-A auf die Endothelzellmigration 82

4.4.2 Antagonistische Effekte von sJAM-A auf die transendotheliale Migration von polymorphkernigen Leukozyten 84

4.4.3 Beteiligung von JAM-A an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion 88

4.4.4 Freisetzung von löslichem JAM-A in der Maus 91

4.4.5 Einfluss von sJAM-A auf die transendotheliale Migration von polymorphkernigen Leukozyten in der Maus 92

II. Syndekan-1 und Syndekan-4 95

4.5 Konstitutives *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4 durch eine Metalloprotease 95

4.5.1 Einfluss von rekombinantem ADAM17 auf die Proteolyse von Syndekan-1 und -4 99

4.5.2 Reduktion des konstitutiven *Shedding* durch Herunterregulation von ADAM17 100

4.6 Regulation der Syndekan-1- und Syndekan-4-Spaltung 102

4.6.1 Induktion der Spaltung von Syndekan-1 und Syndekan-4 durch proinflammatorische Mediatoren 104

4.6.2 Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM17 vermittelt das induzierbare *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4 106

4.7 Die regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) durch den γ-Sekretase-Komplex 110

4.8 Mögliche funktionelle Konsequenzen der Syndekan-Spaltung 115

4.8.1 Die Zellmigration in Syndekan-4-defizienten Zellen 115

4.8.2 Spaltung von Syndekan-1 und -4 *in vitro* und *in vivo* in der Lunge 117

III. Regulation der proteolytischen ADAM17-Aktivität 120

4.9 Zunahme der ADAM17-spezifischen proteolytischen Aktivität 120

4.9.1 Zunahme der ADAM17-spezifischen proteolytischen Aktivität während der JAM-A-Spaltung 123

4.9.2 Induktion der ADAM17-Aktivität im Lungengewebe 124

5 Diskussion 127

5.1 Die konstitutive Spaltung von JAM-A, Syndekan-1 und -4 wird durch die Metalloprotease ADAM17 vermittelt 128

5.2 Die induzierte Spaltung von JAM-A, Syndekan-1 und -4 wird durch ADAM17 vermittelt 129

5.3 Relevanz der Proteolyse von JAM-A, Syndekan-1 und -4 *in vivo* 133

5.4 Konsequenzen der ADAM17-vermittelten Syndekan-Spaltung 134

5.5 Einfluss der Syndekan-Spaltung auf die transendotheliale Migration von Leukozyten 138

5.6 Funktionelle Konsequenzen der JAM-A Spaltung 140

5.7 Potentielle Anwendung von ADAM10/17-Inhibitoren bei Entzündungen 143

6 Zusammenfassung 147

7 Literaturverzeichnis 151

8 Anhang 171

8.1 Abkürzungsverzeichnis 171

8.2 DNA-Sequenz von Syndekan-1_2Z-His 176

8.3 DNA-Sequenz von Syndekan-4_2Z-His 177

9 Abbildungsverzeichnis 178

10 Tabellenverzeichnis 182

11 Veröffentlichungen 183

Danksagung 185

Curriculum Vitae 186

Erklärung 188

1. Einleitung

1.1 Adhäsionsmoleküle und Leukozytenrekrutierung

1.1.1 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion ist entscheidend für den Aufbau und die Erhaltung eines vielzelligen Organismus und wird durch membranständige Oberflächenmoleküle vermittelt. Diese Zelladhäsionsmoleküle ermöglichen sowohl die Ausbildung von Geweben und Organen während der Embryogenese als auch die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur im adulten Organismus [Ruoslahti und Obrink, 1996]. Die membranständigen Oberflächenproteine stellen den Kontakt zwischen dem interzellulären Zytoskelett und den Oberflächenmolekülen angrenzender Zellen oder Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) her und vermitteln somit die Zelladhäsion. Viele der Zellkontakte unterliegen einer ständigen Dynamik, das heißt sie werden im Verlauf der Entwicklung und auch im adulten Organismus geknüpft und wieder gelöst.

Eine wichtige Aufgabe der Adhäsionsmoleküle stellt die Organisation des Epithels und des Endothels dar, sie vermitteln den festen Kontakt der Zellen untereinander sowie mit der extrazellulären Matrix. Das Epithel stellt ein hoch spezialisiertes Gewebe dar, welches aus einer oder mehreren Schichten von Epithelzellen aufgebaut ist. Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der verschiedenen Gewebe wird durch Blutgefäße gewährleistet. Ausgekleidet werden alle Gefäße mit einer einzelligen Schicht aus Endothelzellen.

Neben den morphoregulatorischen Prozessen sind im adulten Organismus Änderungen der Zelladhäsion für zahlreiche physiologische Vorgänge wie Zellwanderung, neuronale Informationsverarbeitung und Erneuerung des Gewebes essentiell. Des Weiteren ist die Zelladhäsion an pathologischen Prozessen wie Entzündungsprozessen und auch Tumorentstehung, -wachstum und -metastasierung beteiligt [Hynes und Lander, 1992]. Die Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen kann intrazellulär zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und ebenso zur Initiation von Signaltransduktionsvorgängen führen. Diese intrazellulären Vorgänge können ihrerseits zu einer veränderten Genexpression führen und so die Affinität und Spezifität von Oberflächenrezeptoren beeinflussen [Aplin *et al*., 1998; Buckley *et al*., 1998; Juliano *et al*., 2002]. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte schützen außerdem die Zellen vor Apoptose [Alahari *et al*., 2002] und können Zellproliferation und Differenzierung stimulieren [Buckley *et al*., 1998].

1.1.1.1 Interzelluläre Verbindungen

Aufgrund ihrer Funktion kann man Zellkontakte zwischen Endothel- oder Epithelzellen in verschiedene Gruppen unterteilen (Abb. 1-1) [verändert nach Alberts, *The Cell*, 2002]:

1. **Verschlusskontakte** (*tight junctions*, z.B. *zonula occludens)*, die undurchlässige Verbindungen darstellen, die den Molekülaustausch auf interzellulärem Weg verhindern.
2. **Adherens Junctions** (Gürteldesmosomen, z.B. *zonula adhaerens)* und
3. **Fleckendesmosomen** (Desmosomen, *macula adhaerens)***.** Diese beiden Haftverbindungen erlauben den interzellulären Zusammenhalt und tragen zur Formerhaltung epithelialer Zellen bei [Gumbiner, 1996]. Die Desmosomen verbinden eine Zelle und ihr Zytoskelett mit einer Nachbarzelle (Zell-Zell-Kontakt). Hemidesmosomen verbinden eine Zelle mit einer Basallamina (Zell-Matrix-Kontakt).
4. **Kommunikationskontakte** (*gap junctions).* Diese Verbindung erlaubt den Durchtritt von chemischen oder elektrischen Signalen zur Kommunikation zwischen benachbarten Zellen.

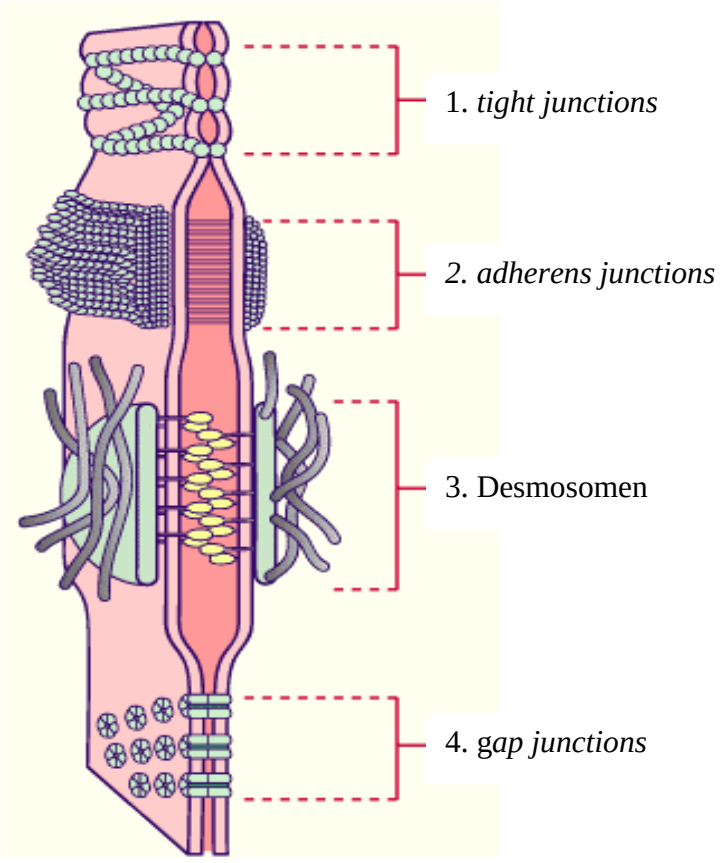


Abbildung 1.1: Interzelluläre Verbindungen [verändert nach Alberts, *The Cell,* 2002].

Bei den Zelladhäsionsmolekülen handelt es sich meist um transmembrane Glykoproteine, die über eine zytoplasmatische Domäne unterschiedlichster Länge verfügen. Einige Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. T-Cadherin, oder bestimmte Isoformen z.B. des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM besitzen keine zytoplasmatische Domäne und sind über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Rest in der Membran verankert [Ranscht und Dours-Zimmermann, 1991; Cunningham *et al*., 1987]. Extrazellulär auf der Zelloberfläche erkennen und interagieren die Zelladhäsionsmoleküle mit den Gegenrezeptoren auf benachbarten Zellen oder mit Proteinen der ECM [Gumbiner, 1996; Edelman, 1988].

Zelladhäsionmoleküle können aufgrund ihrer Primärstruktur vier Hauptgruppen einteilen [Hynes, 1999], zu den die Cadherine, Selektine, Integrine und die zellulären Adhäsionsmoleküle (CAM) der Familie der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gehören. Man grenzt die Zelladhäsionsmoleküle weiterhin auch aufgrund ihrer Adhäsionsmechanismen voneinander ab. So kann zwischen einer Kalzium-abhängigen und einer Kalzium-unabhängigen Zelladhäsion unterschieden werden [Takeichi, 1977]. Weiterhin unterscheidet man homotypische Interaktionen zwischen Molekülen des gleichen Typs und heterotypische Interaktionen zwischen unterschiedlichen Molekülen [Edelman, 1985].

Zahlreiche zelluläre Funktionen werden von mehreren Vertretern der vier Hauptfamilien vermittelt. So sind für die Aufrechterhaltung von Permeabilitätsbarrieren zwischen Endothelzellen oder Epithelzellen sowohl Cadherine als auch CAMs essentiell. Die gerichtete Migration von Leukozyten durch die Endothelzellschicht erfordert Selektine, Integrine und CAMs.

1.1.2 Leukozytentransmigration

Bei den Leukozyten nehmen die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) aufgrund ihres zahlenmäßig hohen Anteils mit ca. 60% eine bedeutende Stellung ein. Die kontrollierte Wanderung von Leukozyten durch den Organismus bildet die Grundlage für die zelluläre Immunabwehr. Im Verlauf von Entzündungsprozessen treten Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem durch das Endothel in das entzündete Gewebe über (Diapedese). Hier übernehmen sie Aufgaben im Verlauf des Entzündungsprozesses mit dem Ziel, die Ursache oder die Erreger der Entzündung zu beseitigen. Für die

Rekrutierung der Leukozyten an den Entzündungsherd ist eine Kaskade von hintereinander geschalteten molekularen Interaktionen zwischen den Leukozyten und Endothelzellen entscheidend. Dieser streng regulierte Prozess kann in vier Schritte der Leukozyten-Adhäsionskaskade unterteilt werden (Abb. 1-2).

Im ersten Schritt wird die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe durch die spezifische Adhärenz dieser Zellen an die Endothelzellen der Blutgefäßwand eingeleitet, wobei im ersten Schritt Selektine für die relativ schwache und reversible Bindung sorgen. Dies hat zur Folge, dass die Leukozyten einer raschen Abfolge von Adhäsion und Ablösen unterworfen sind, was zu einem „Rollen" der Leukozyten auf der Endotheloberfläche führt [Tedder *et al*., 1995; Vestweber *et al*., 1999]. Selektine sind hochglykosylierte, Kalzium-abhängige Adhäsionsmoleküle, die nach ihrer Lektin-ähnlichen Bindungsstelle benannt sind und mit muzinähnlichen Glykoproteinen interagieren. Auf Leukozyten findet man das Leukozyten (L)-Selektin, wohingegen von zytokinaktivierten Endothelzellen das Endothel (E)-Selektin gebildet wird. Plättchen (P)-Selektin kommt auf Thrombozyten und Endothelzellen vor [Kansas 1996; McEver 2002]. P-Selektin wird wenige Minuten nach Aktivierung des Endothels durch die Anaphylatoxine C3a und C5a, Leukotrien (LT) B4 oder Histamin auf dessen Oberfläche präsentiert, während das E-Selektin erst mehrere Stunden nach Aktivierung durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) oder die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN-γ auf der Oberfläche präsentiert wird. Diese Selektin-vermittelte Bindung führt zu einer Verlangsamung der Leukozyten und ermögliche den Kontakt mit Signalstoffen auf der Endotheloberfläche, wie z.B. den Chemokinen.

Diese Chemokine (*„**chemo**attractant cyto**kine**"*) spielen im weiteren Verlauf der Leukozytentransmigration eine wichtige Rolle. Die meisten Chemokine werden als lösliche Proteine synthetisiert. Einige Proteoglykane sind in der Lage diese Chemokine über eine Heparin-bindende Domäne auf der Oberfläche von Endothelzellen zu immobilisieren, und sie darüber den Leukozyten im Blut zu präsentieren [Tanaka *et al*., 1993]. Die Bindung von Chemokinen an ihre jeweiligen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf der Leukozytenoberfläche führt unter anderem zu einer Veränderung des Zytoskeletts und stimulieren die Expression von Integrinen [Springer 1994] auf der Leukozytenoberfläche, welche durch die Bindung an Proteine der IgSF die feste Adhäsion dieser Zellen an die Endotheloberfläche ermöglichen. Als Bindemoleküle für

Chemokine werden Syndekane verantwortlich gemacht, die in einem gesonderten Abschnitt vorgestellt werden. Chemokine vermitteln nicht nur die Interaktion von Leukozyten und Endothel, sie dienen außerdem als chemotaktische Mediatoren, welche die Leukozyten direkt an den Entzündungsherd leiten können. Dieser Prozess wird als Chemotaxis bezeichnet.

Integrine werden von fast allen Zellen des Körpers exprimiert und vermitteln als Zellmembranrezeptoren die Adhäsion zwischen Epithelzellen und der extrazellulären Matrix. Sie setzen sich als Heterodimere aus zwei nicht kovalent verbundenen transmembranen Glykoproteinen zusammen, einer α- und einer kleineren β-Untereinheit [Seftor *et al*., 1999; Humphries 2000]. Integrinrezeptoren erkennen kurze Peptidsequenzen von Matrixproteinen, wie zum Beispiel die in Fibronektin und Vitronektin vorkommende RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp). Eine α-Kette kann nur mit bestimmten β-Ketten assoziieren. Aufgrund dessen werden die Subfamilien nach den β-Ketten benannt. Bei der Entzündung und der damit verbundenen Leukozytenwanderung spielen vor allem vier Integrine eine entscheidenden Rolle: Das von Monozyten und Eosinophilen exprimierte β_1-Integrin *very late antigene* (VLA-4, α_4/β_1) und die ausschließlich von Leukozyten exprimierten β_2-Integrine *leukocyte function antigen* (LFA-1, α_L/β_2) und *macrophage antigen* (Mac-1, α_M/β_2) sowie p150,95 (α_X/β_2) [Dal Canton 1995; Springer 1994].

Die Immunglobulin-Superfamilie von transmembranen Zelladhäsionsmolekülen ist eine heterogene Gruppe. Charakteristisch für diese Familie ist die unterschiedliche Anzahl von Immunglobulin-Domänen. Die Adhäsion wird entweder als Hetero- oder Homo-Dimer vermittelt und ist, im Gegensatz zu der von Cadherinen und Integrinen vermittelten Adhäsion, unabhängig von Kationen. Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie sind *melanocytic cell adhesion molecule* (Mel-CAM/MUC18, CD146), *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1), *neruronal cell adhesion molecule* (NCAM), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *platelet endothelial cell adhesion molecules* (PECAM), sowie die junktionalen Adhäsionsmoleküle *junctional adhesion molecule* (JAM) [Aplin *et al*., 1998; Bogenrieder *et al*., 2003]. Die Moleküle dieser Familie sind Liganden der Integrine und sorgen für die stabile Adhäsion der Leukozyten an das Endothel.

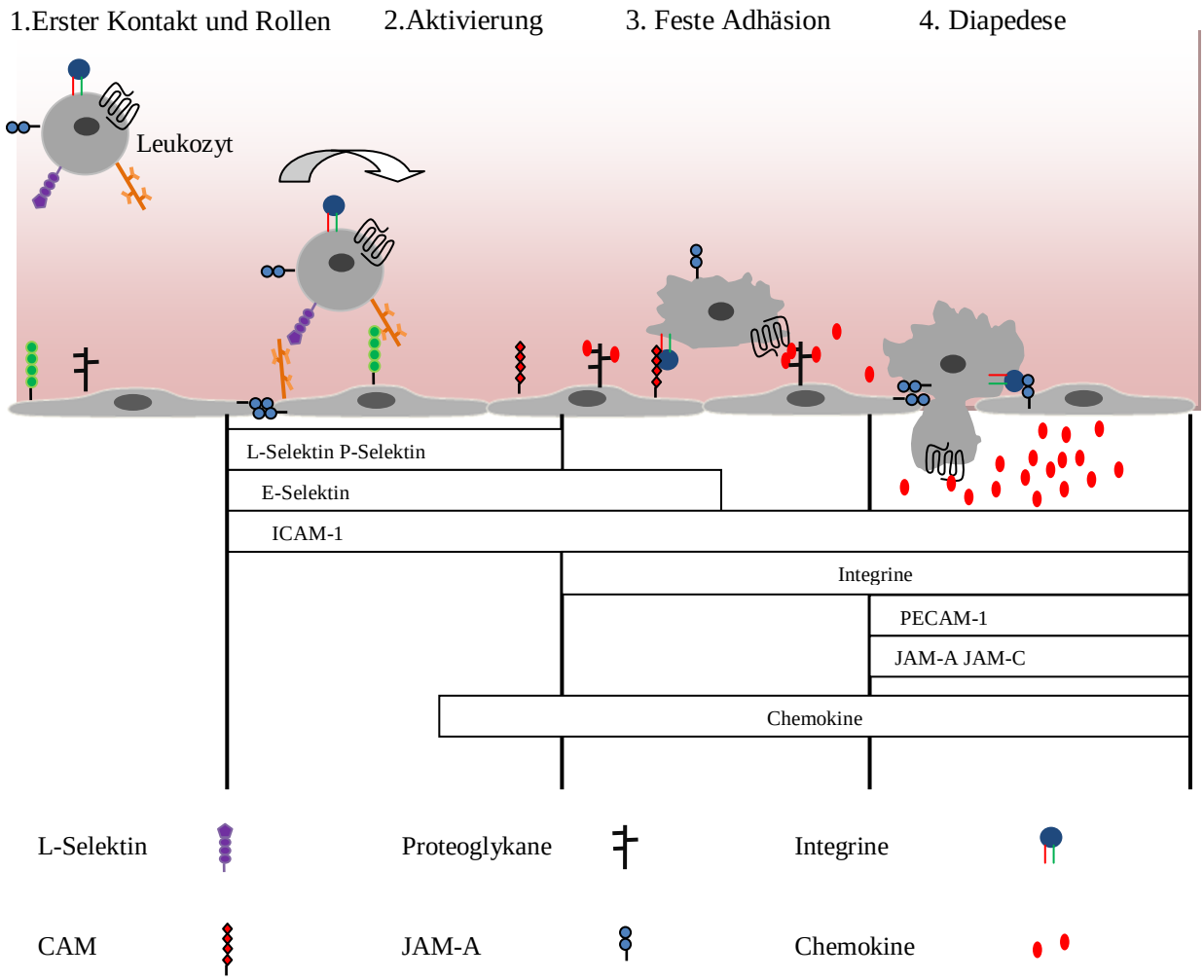


Abbildung 1-2: Modell zur Leukozytenrekrutierung. Der erste Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel wird durch Bindung von Selektinen an Sialyl-Lewis^{X}-Glykoproteine hergestellt (L-Selektin: Leukozyt-Selektin; E-Selektin: Endothel-Selektin; P-Selektin: *Platelet* (Blutplättchen)-Selektin). E-und P-Selektin werden bei Entzündungsreaktionen durch die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ heraufreguliert. Die durch Selektine vermittelte Bindung ist reversibel und wird fortlaufend gelöst und wieder hergestellt, mit der Folge einer rollenden, sich verlangsamenden Bewegung der weißen Blutzelle entlang der Gefäßinnenwand, auch *Rolling* genannt. Die feste Adhäsion des Leukozyten an das Endothel geschieht durch Bindung von Integrinen an Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, die *Cellular Adhesion Molecules* (CAMs). Die Voraussetzung für diese Interaktion ist eine Aktivierung der Integrine, welche über chemotaktische Mediatoren erfolgt. Chemotaxine, wie die Komplementfaktoren C3a und C5a sowie Chemokine, die auf Glykosaminoglykanen (z.B. Syndekanen) des Endothels präsentiert werden, aktivieren über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Integrine und induzieren gleichzeitig die Abspaltung schwächer bindender Selektine. Im letzten Schritt kommt es zur Transmigration des Leukozyten durch das Endothel (*Diapedese*).

Im dritten Schritt können die nun stabil adhärierenden Leukozyten sich gezielt fortbewegen und schließlich aktiv durch die Endothelzellschicht hindurchwandern. Dabei führt die Interaktion mit den *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)- und

den *junctional adhesion molecule* (JAM)- Familien zur Diapedese, d.h. dem Durchwandern der Endothelzellschicht zwischen den Zellen [Nourshargh *et al*., 2006]. Die Aufgaben der junktionalen Adhäsionsmoleküle werden im Detail in Abschnitt 1.2 beschrieben. Das *vascular endothelium cadherin* (VE- Cadherin) [Gotsch *et al*., 1997] spielt ebenfalls eine Rolle in der Diapedese, da es über homophile Interaktionen die Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen vermittelt, welche im Laufe der Transmigration getrennt werden müssen.

1.2 Junktionale Adhäsionsmoleküle

Die integralen transmembranen Bestandteile der *tight junctions* umfassen drei Gruppen von Proteinen: die Occludine, die Familie der Claudine und die transmembranen junktionalen Adhäsionsmoleküle (*junctional adhesion molecule*, JAM). Letztere gehören zu der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Alle JAMs besitzen eine extrazelluläre Domäne mit zwei Immunoglobulin-Domänen (eine V_H- und eine C_2- Ig-Domäne), welche über einen Val-Leu-Val-Linker verbunden sind. Darauf folgen eine transmembrane Domäne und ein kurzer zytoplasmatischer Teil mit einem PDZ -Bindungsmotiv (Phe-Leu-Val) [Ebnet *et al*., 2000]. Die Abkürzung PDZ setzt sich aus den jeweils ersten Buchstaben der drei Proteine *post synaptic density Protein*, *Drosophila disc large tumor suppressor* und ZO-1 zusammen. JAMs werden auf Leukozyten, Plättchen sowie auf Endothel- und Epithelzellen exprimiert, wo sie in den Zell-Zell-Kontakten der *tight junctions* lokalisiert sind. JAMs können neben der homophilen JAM-JAM-Interaktion über die V_H Ig-Domäne auch mit den leukozytären β_2-Integrinen LFA-1 und Mac-1 und dem $\alpha_4\beta_1$-Integrin VLA-4 über ihre zweite C_2 Ig-Domäne assoziiert sein. Diese drei Integrine sind alle an der Leukozyten-Endothel-Interaktion beteiligt. Als erstes JAM-Protein wurde das JAM-A (CD321, JAM-1, F11-Rezeptor) als humaner F11-Rezeptor auf Plättchen identifiziert, es wird hauptsächlich in den *tight junctions* von Epithel- und Endothelzellen exprimiert [Kornecki *et al*., 1990; Martìn-Padura *et al*., 1998]. Weitere noch bekannten JAM-Moleküle sind JAM-B (JAM-2, VE-JAM, hJAM2 und mJAM3), JAM-C (JAM-3, hJAM3 und mJAM2), JAM-4 und JAM-like (JAML, AMICA1).

1.2.1 JAM-A

Humanes JAM-A wurde nicht nur auf Endothel- und Epithelzellen [Malergue *et al*., 1998; Williams *et al*., 1999; Martin-Padura *et al*., 1998], sondern auch auf Neutrophilen,

Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten detektiert [Liu *et al.*, 2000; Sobocka *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1999]. JAM-A wurde in Geweben wie der Leber, Niere, Pankreas, Herz, Gehirn, Lymphknoten, Lunge, Plazenta und Gefäßen nachgewiesen, wo es in der apikalen Region der interzellulären Verbindungen, den *tight junctions*, lokalisiert ist [Aurrand-Lions *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Martin-Padura *et al.*, 1998]. Die junktionale Lokalisation von JAM-A kann durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst werden, so führt z.B. eine kombinierte Behandlung mit TNF-α/IFN-γ zu einer Umverteilung von JAM-A aus den Zellkontakten an die apikale Zelloberfläche der Endothelzellen [Ozaki *et al.*, 1999].

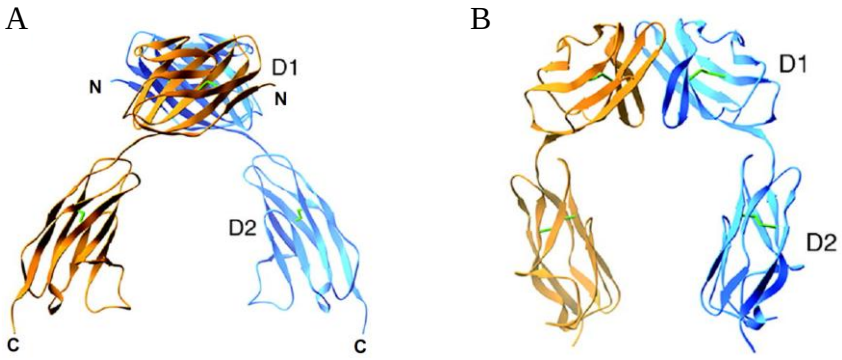


Abbildung 1-3: Struktur von humanem JAM-A. JAM-A Dimer: Die beiden JAM-A Monomere sind in blau und in orange dargestellt. Die Disulfidbrücken in den IgG-Domänen sind in grün abgebildet. Die Bildung des *cis*-Homodimers erfolgt über die beiden ersten IgG-Domänen (D1, VH). Es sind zwei Dimere (A und B), um 90° gedreht, dargestellt.

JAM-A ist in der Lage über ein Arg-Val-Glu (RVE)-Motiv in der V_H-Domäne (an Position 58-60) nicht-kovalent ein *cis*-Homodimer auf der Zelloberfläche zu bilden (Abb. 1-3). Dieses Homodimer kann an den Zell-Zell-Verbindungen in *trans* mit JAM-A Homodimeren auf benachbarten Zellen interagieren [Kostrewa *et al.*, 2001].

Diese homophile Interaktion von JAM-A beeinflusst unter anderem die Permeabilität von Endothel- und Epithelzellen, da die Zellverbindungen darüber stabilisiert werden und die Barriere-Funktion aufrechterhalten wird. Mehrere Publikationen sprechen für einen Einfluss von JAM-A bei der transendothelialen Migration. An Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass JAM-A am Gefäßaustritt von Monozyten und anderen immunkompetenten Zellen beteiligt ist [Martin-Padura *et al.*, 1998; Del Maschio *et al.*, 1999]. Weitere Untersuchungen mit JAM-A-defizienten Mäusen weisen außerdem darauf hin, dass JAM-A an der Regulation der Zellmotilität involviert ist [Bazzoni *et al.*, 2005].

JAM-A wurde auch als ein Ligand für das leukozytäre β_2-Integrin LFA-1 beschrieben und soll über diese heterophile Bindung zur Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Verlauf der Diapedese beitragen [Ostermann *et al*., 2002].

Der zytoplasmatische Teil von JAM-A ist durch eine Proteinkinase C (PKC)-Phosphorylierungsstelle und ein PDZ-Domänen-Bindungsmotiv Typ II (FLV) gekennzeichnet. Proteine mit PDZ-Domäne dienen meist als molekulare Brücken, die mit Hilfe mehrerer PDZ-Domänen Protein-Bindungspartner verbinden. Häufig gibt es mehrere PDZ-Domänen in einem Protein. PDZ-Domänen sind an der Signaltransduktion und der Bildung zytoplasmatischer Proteinkomplexe beteiligt [Kennedy, 1995; Ponting, 1997]. JAM-A ist mit verschiedenen *tight junction*-Proteinen, wie z.B. ZO-1 (*zonula occludens-1*), AF-6 (*ALL-1 fusion partner from chromosome 6*), MUPP1 (*multi PDZ domain protein 1*) und dem Zellpolarität-Protein PAR-3 (*partitioning defective protein-3*) über PDZ-Domänen assoziiert. Die Identifikation von intrazellulär mit JAM-A assoziierten PDZ-Proteinen deutet auf eine Beteiligung an der Ausbildung der *tight junction*-Strukturen sowie auf die Regulation der Zellpolarisation von Epithel- und Endothelzellen hin [Ebnet *et al*., 2001]. Die Integrität der interzellulären Verbindungen ist für die Barriere-Funktion und die Regulation der parazellulären Permeabilität wichtig [Liu *et al*., 2000; Takai und Nakanishi, 2003]. Weiterhin wurde JAM-A als ein Rezeptor für Retroviren beschrieben, durch dessen Blockierung mittels Antikörper die Retrovirusadhäsion und -infektion blockiert werden kann [Barton *et al*., 2001].

1.3 Heparansulfat-Proteoglykane

Proteoglykane (PG) sind in ihrer Struktur sehr variabel. Der Proteinkern dieser glykosylierten Makromoleküle ist mit ein oder mehreren Glykosaminoglykanketten (GAG-Ketten) kovalent assoziiert, wobei hier Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat unterschieden werden [Hardingham *et al*., 1992].
Die vielfältigen Glykosylierungsformen ermöglichen es den PG, eine große Bandbreite an Funktionen zu regulieren. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sind mit dem Polysaccharid Heparansulfat assoziiert und kommen vorwiegend in der extrazellulären Matrix vor. Sie existieren allerdings auch als Zelloberflächen-Proteoglykane [Park *et al*., 2000]. Diese Zelloberflächen-HSPG werden aufgrund ihrer Membranverankerung in zwei Familien unterteilt. Die Glypikane sind über einen Glykophoshatidylinositol-(GPI)-Anker

mit der Membran verbunden, wohingegen es sich bei den Syndekanen um Typ-I-Transmembranproteine handelt.
Es wurde beschrieben, dass verschiedene Glykosaminoglykane, unter anderem das Heparansulfat, an der Leukozyten Transmigration beteiligt sind [Taylor *et al*., 2006].

1.3.1 Syndekane

Die Familie der Syndekane umfasst in Säugern vier homologe Mitglieder, Syndekan-1, -2, -3 und -4, während *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* nur jeweils ein Syndekan besitzen.
Jeder Zelltyp exprimiert mindestens ein Syndekan, wobei Syndekan-1 das vorherrschende Syndekan der Epithelzellen und Syndekan-2 das der Fibroblasten ist. Die Syndekan-3-Expression ist fast ausschließlich auf neuronales Gewebe beschränkt. Syndekan-4 wird im Gegensatz dazu von einer Vielzahl verschiedener Zellen wie z.B. Neuronalzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Fettzellen und Fibroblasten exprimiert, wobei die Expressionlevel generell sehr niedrig sind [Kim *et al*., 1994]. Die Expression der Syndekane unterliegt besonders während der Embryonal- und Organentwicklung und während pathophysiologischer Vorgänge, wie z.B. Wundheilung, Nierenerkrankungen oder Tumorentwicklung, einer ausgeprägten Regulation.
Alle Syndekane sind transmembrane Heparansulfat-Proteoglykane, die aus einem Kern-Protein mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und einer relativ langen extrazellulären Domäne aufgebaut sind. An diesem sind eine oder mehrere Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten angeheftet. GAG-Ketten sind unverzweigte Polysaccharid-Ketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten [Carey, 1997], wobei einer der beiden Zuckerreste immer ein Aminozucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin) und der andere meist eine Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) ist. Je nach Zuckerart und Sulfatierung der Zuckerreste teilt man die Glykosaminoglykane in Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat ein. Die Glykosaminoglykan-Ketten der Syndekane-2 und -4 sind ausschließlich vom Heparansulfat-Typ, während Syndekan-1 und -3 neben Heparansulfat-Ketten auch Chondroitinsulfat-Ketten tragen können [Rapraeger *et al.*, 1985; Kokenyesi & Bernfield 1994].
Die extrazellulären Domänen der vier Syndekane weisen, bis auf die konservierten GAG-Anheftungsstellen, wenig Homologie auf. Im Gegensatz dazu sind die kurzen

transmembranen und zytoplasmatischen Domänen hochkonserviert. Die transmembrane Domäne besteht aus einer membrandurchspannenden, hydrophoben Helix, die die Oligomerisierung der Syndekane vermittelt. Syndekane besitzen die Eigenschaft, Dimere oder Oligomere zu bilden. Man nimmt an, dass die Oligomerisierung die Funktion der Syndekane entscheidend beeinflusst (Abb.1-4) [Zimmermann & David 1999].

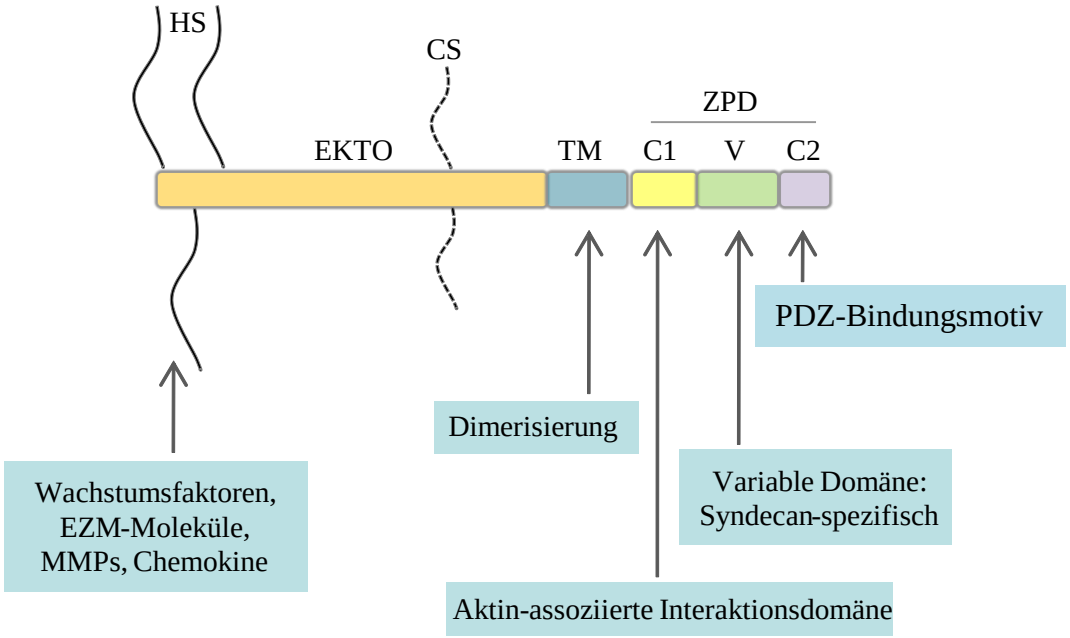


Abbildung 1-4: Schematische Kern-Domänen Struktur von Syndekan. Darstellung des Syndekan Kern-Proteins mit möglichen Interaktionspartnern (blau). Syndekane sind aus einer Ektodomäne (EKTO), transmembranen (TM) und zytoplasmatischen Domäne (ZPD) aufgebaut. Letztere besteht aus: C1 und C2, hoch konservierte Regionen, und V, variable Region. HS, Heparansulfat-Ketten. Außer für Syndekan-2 konnten bei den Syndekanen auch Chondroitinsulfatketten (CS) nachgewiesen werden. Syndekan-1 und -4 enthalten CS-Ketten in einer gewebespezifischen Form, deren Funktion bisher ungeklärt ist [Couchman, 2003].

Die zytoplasmatische Domäne der Syndekane ist unterteilt in zwei homologe Bereiche (C1 und C2), die einen Bereich mit variablen Sequenzen (V) flankieren. Vermutlich trägt neben der extrazellulären Domäne die variable Region zu den spezifischen Eigenschaften der Syndekane bei. Die Sequenz des 13 Aminosäuren langen Segments C1, das an die transmembrane Domäne anschließt, ist in allen Syndekanen nahezu identisch (Abb.1-5). Die Funktion dieser Region ist jedoch weitgehend unbekannt, scheint aber für eine Aktinzytoskelett-assoziierte Bindung notwendig zu sein [Couchman, 2003]. Ebenfalls in allen Syndekanen konserviert ist die Tetrapeptid-Sequenz EFYA (C2) am C-terminalen Ende des Kern-Proteins, die ein typisches Sequenzmotiv für die Bindung von PDZ-

Domänen darstellt, wie z.B. von Syndesmos und Synectin. Syndekan fungiert also als Brückenglied zwischen verschiedenen Proteinbindungspartnern (Abb. 1-5).

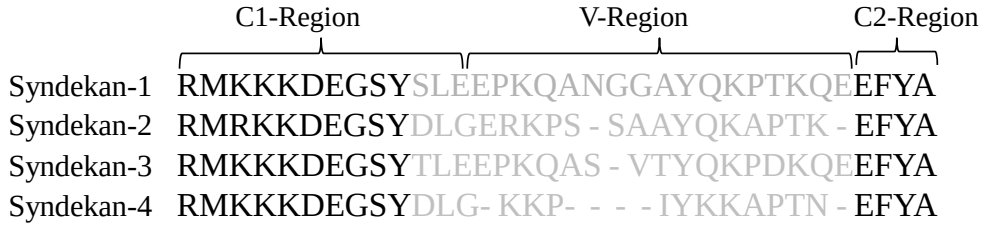


Abbildung 1-5: Zytoplasmatische Domäne von Syndekan. Die kurze zytoplasmatische Domäne besteht aus zwei hoch konservierten Regionen (C1 und C2) welche an Tyrosin-Kinase-Komplexe und an PDZ-Domänen binden können [Morgan *et al*., 2007].

Die Syndekane sind an einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse, wie z.B. der Adhäsion und der Wanderung von Zellen, der Zelldifferenzierung oder der Proliferation, beteiligt. Viele dieser Funktionen werden dabei von den Glykosaminoglykan-Ketten vermittelt. Durch sie sind die Syndekane in der Lage als Ko-Rezeptoren für verschiedene heparinbindende Wachstumsfaktoren, wie z.B. die FGF-Familie, HGF oder PDGF, zu fungieren und dadurch die Konzentration der Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche lokal zu erhöhen und ihre Wirkung zu modulieren [Park *et al.*, 2000]. Darüber hinaus können die Syndekane über ihre GAG-Ketten zahlreiche Matrixliganden, wie z.B. Fibronektin, Vitronektin, Laminine und fibrilläre Kollagene, binden.

1.3.2 Syndekan-1

Syndekan-1 kommt in verschiedenen Geweben vor, wird aber vor allem von epithelialem Gewebe exprimiert. Die Expression von Syndekan-1 verändert sich, sobald ein Syndekan-1 exprimierendes Gewebe nicht mehr stabil ist, z.B. während der embryonalen Entwicklung oder nach Verletzungen. Allerdings sind die Regulationsmechanismen, welche die Syndekan-Expression steuern, noch nicht geklärt.

Syndekan-1 werden mehrere Funktionen zugeordnet. Einerseits dient es als Rezeptor für die Extrazelluläre-Matrix, Bindung von Wachstumsfaktoren, Regulation der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Kontakte, Regulation von Migration und Proliferation, Differenzierung und Morphologie sowie Stabilisation im Zellverband [Saunders *et al*., 1989; Elenius *et al*., 1991; Bayer-Garner *et al*., 2002; Bayer-Garner *et al*., 2004]. Wird eine Verletzung der Epidermis hervorgerufen, so lässt sich eine erhöhte Syndekan-1-Expression in den

migrierenden und proliferierenden Endothelzellen der neugebildeten Blutgefäße im Granulationsgewebe der Wunde nachweisen. Ein kontrollierter physiologischer Verlust von Syndekan-1 ist erforderlich, um den Differenzierungsprozess zu stoppen, Zellkontakte zu lösen und morphologische Zellveränderungen zu steuern [Bayer-Garner *et al*., 2002].
Syndekan-1-defiziente Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Die Unterschiede von Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den Syndekan-1-defizienten Mäusen zeigen sich durch eine erhöhte Leukozytenadhäsion an Endothelzellen. Außerdem ist eine Zunahme der Angiogenese in der Retina von Syndekan-1-defiziente Mäusen beschrieben worden. Bei entzündlichen Prozessen führt ein Fehlen von Syndekan-1 zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und zu einer Zunahme der Leukozyten-Extravasation [Götte *et al*., 2002].

1.3.3 Syndekan-4

Zuerst wurde Syndekan-4 in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte als ein Antithrombin-bindendes Molekül beschrieben [Kojima *et al*., 1992]. Syndekan-4 wird nahezu in allen Geweben exprimiert, wobei die Expressionslevel unter physiologischen Bedingungen eher gering sind. Bei entsprechenden pathologischen Veränderungen, wie z.B. Wundheilung, Nierenfibrose, bakteriellen Infektionen oder beim Herzinfarkt, kommt es zu einem Anstieg der Syndekan-4-Expression in den unterschiedlichen Zielzellen [Kojima *et al*., 2001; Yung *et al*., 2001]. Im Gegensatz zu Syndekan-1, das speziell in Endothelzellen des Granulationsgewebes induziert wird, konnte Syndekan-4 sowohl in Endothelzellen als auch in Fibroblasten der gesamten Dermis an den Wundrändern und im Granulationsgewebe nachgewiesen werden. Die physiologischen Funktionen von Syndekan-4 sind noch nicht vollständig geklärt. Allerdings zeigt sich, dass Syndekan-4 an der Zell-Matrix Adhäsion, der Migration von Zellen sowie an Differenzierungs- und Proliferations-Prozessen beteiligt ist [Rioux *et al*., 2002].
Syndekan-4-defiziente Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Sie weisen ein normales Reproduktions- und Entwicklungsverhalten auf. Jedoch konnten bei der Wundheilung Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden, wobei Syndekan-4-defiziente Mäuse eine verzögerte Wundheilung sowie eine Beeinträchtigung der Angiogenese im Granulationsgewebe aufweisen [Echtermeyer *et al*., 2001]. Darüber hinaus ist eine erhöhte Anfälligkeit der Syndekan-4-defizienten Mäuse für einen septischen Schock beschrieben worden [Ishiguro *et al*., 2002].

Tabelle 1-1: Expression und Funktion von Syndekan-1 und -4 während Entzündungsprozessen [Parish, 2006].

	Expressionsmuster	Funktion der HS-Kette während Entzündungsprozessen
Syndekan-1, -4	Zelloberflächenmolekül: - Endothelzellen können Syndekan-1 und -4 exprimieren. - Die Expression auf Endothelzellen und Monozyten wird durch Zytokine hochreguliert. - Auf proliferierenden und/oder aktivierten T-Zellen findet eine Hochregulation der Syndekan-Expression statt. - Prä-B-Zellen und Plasmazellen exprimieren viel Syndekan-1. - Makrophagen exprimieren Syndekan-1 und -4. - Fest adhärierte Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile und Plättchen exprimieren geringe Mengen Syndekan-4.	- Ligand für L-Selektin - Zelloberflächen-Rezeptor für Chemokine - vermitteln die Chemokin-Transzytose und Präsentation - vermitteln Adhäsion an die Basallamina - modulieren die Aktivität von angiogenetischen Wachstumsfaktoren - Internalisierungs-Rezeptor für Heparanasen? - Signalmolekül

1.4 Regulation von Zelladhäsionsmolekülen

Für viele biologische Vorgänge (z.B. die Leukozytentransmigration) ist ein gesteuerter Auf- und Abbau von Zelladhäsionsmolekülen von entscheidender Bedeutung. Die Regulation der Adhäsionsfunktion kann auf verschiedene Arten erfolgen. Zum einen über Signaltransduktionswege, welche die Expression, Lokalisation und Funktion der Adhäsionsmoleküle beeinflussen, oder durch eine Modulation des Interaktionsmechanismus selbst, wie eine Änderung der Spezifität oder der Adhäsionsstärke [Gumbiner, 2000; Yap *et al.*, 1997]. Des Weiteren kann die extrazelluläre Domäne vieler integraler Membranproteine durch Abspaltung von der Zelloberfläche in eine lösliche Form überführt werden. Diese proteolytische Ektodomänenspaltung, auch *Shedding* genannt, stellt einen bedeutsamen Mechanismus für die Regulation der

Zelloberflächenproteine dar [Hooper *et al*., 1997]. Für einige Moleküle konnte gezeigt werden, dass das durch den Shedding-Prozess in der Zellmembran verbleibende Fragment einer weiteren proteolytischen Prozessierung innerhalb der Membran unterliegt. Dieser Prozess wird als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) oder *„RIPping“* bezeichnet und führt zur Freisetzung eines intrazellulären Spaltfragmentes [Marambaud *et al*., 2003]. Die am *Shedding* und *„RIPping“* beteiligten Proteasen werden häufig auch als Sekretasen bezeichnet. Für das *Shedding* werden in vielen Fällen Metalloproteasen verantwortlich gemacht.

1.5 Metalloproteasen

Anhand gemeinsamer Strukturmerkmale, Sequenzmotive und Faltungsmuster können etwa 30 Familien von Metalloproteasen unterschieden werden, die sich in fünf „Haupt“-Gruppen einordnen lassen [Rawlings und Barret, 1995]. Eine dieser Gruppen wird von den sogenannten Metzinkinen gebildet. Diese umfasst die Zink-(Zn^{2+})-abhängigen Metalloproteasen [Bode *et al*., 1993], zu denen zusammen mit den Astazinen, Serralysinen und Matrixinen (Matrixmetalloproteasen) auch die Adamlysine gehören [Hooper, 1994; Stocker *et al*., 1995] (Abb.1-6). Aufgrund von Strukturhomologien werden die Adamlysine in zwei Proteinfamilien unterteilt: zum einen in die ADAMs (***A Disintegrin And Metalloprotease***), zum anderen in die SVMPs (***S**nake **V**enom **M**etallo**p**rotease*). Die Schlangengift-Metalloproteasen sind im Gegensatz zu den ADAMs lösliche Proteine, da sie keine Transmembrane-Domäne und keinen zytoplasmatischen Teil besitzen (Abb.1-7) [Bjarnason und Fox, 1995].

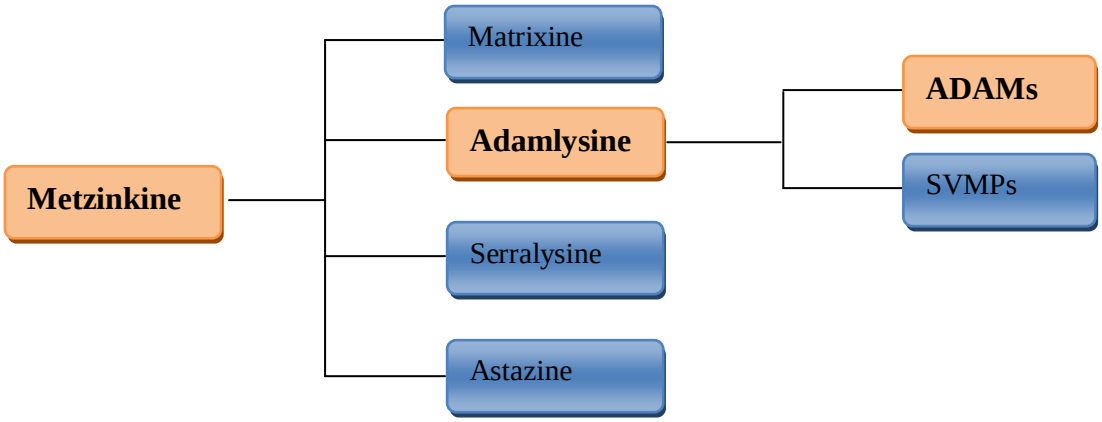


Abbildung 1-6: Proteinfamilie der Metzinkine. Familie der Zn^{2+}-abhängigen Metalloproteasen.

1.5.1 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (ADAM)

Die ADAMs wurden zum ersten Mal 1992 in Spermien des Meerschweinchens entdeckt, wo sie bei der Spermatogenese und der Fusion von Spermium und Eizelle eine Rolle spielen [Blobel *et al.*, 1992]. Sie sind im Organismus ubiquitär verteilt und kommen in vielen Säugern aber auch Nicht-Säugern, wie *Xenopus laevis* und *Drosophila melanogaster*, vor. In Bakterien und Pflanzen konnten bisher keine ADAMs nachgewiesen werden [Stone *et al*., 1999].

Die ADAMs bilden eine Gruppe von membranständigen Glykoproteinen, welche eine charakteristische Domänenstruktur besitzen, die zuvor bei einigen Schlangengift-Metalloproteasen (SVMPs) entdeckt wurde. Diese umfasst eine N-terminale Signalsequenz, welcher eine Prodomäne, eine Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, eine EGF (***E**pidermal **g**rowth **f**actor*)-ähnliche Domäne, eine Transmembran-Domäne und letztlich eine zytoplasmatische Domäne folgen [Seals und Courtneidge, 2003] (Abb. 1-7). Wie bei allen Metzinkinen weist die katalytische Domäne eine dreidimensionale Struktur auf, die auf einem fünfsträngigen β-Faltblatt und drei α-Helices beruht [Stöcker *et al.*, 1995].

Die Bezeichnung ADAM (***A D**isintegrin **A**nd **M**etalloprotease*) bezieht sich auf die zwei Hauptfunktionen dieser Familie. Die Metalloprotease-Domäne erfüllt die proteolytische Aufgabe, wohingegen die Disintegrin-Domäne für die Adhäsionseigenschaften verantwortlich ist.
Inzwischen konnten bereits über 30 cDNA-Sequenzen für Mitglieder der ADAM-Familie identifiziert werden, von denen anscheinend aber nur 17 eine funktionelle katalytische Domäne mit Zinkbindungsmotiv (H**E**XXHXXGXXH) aufweisen und daher wahrscheinlich eine proteolytische Funktion ausüben [Schlöndorff *et al*., 1999; Kim *et al*., 1998; Wolfsberg *et al*., 1995]. Die Zinkbindung erfolgt mit Hilfe der drei Histidinreste (unterstrichen), die das Zinkion im katalytischen Zentrum komplexieren. Die Carbonylgruppe des konservierten Glutamatrestes (fettgedruckt) katalysiert die Spaltung der Peptidbindung. C-terminal von dieser Konsensussequenz befindet sich ein sogenannter „*Met-Turn*“, ein konservierter Methionin-Rest in der Nähe des katalytischen Metallions, der bei der Ausbildung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrums beteiligt ist, indem er eine Rückfaltung des Peptidrückgrats ermöglicht und so die Zink-Liganden stabilisiert [Bode *et al*., 1993; Stöcker *et al*., 1995].

Für die katalytisch inaktiven ADAMs, die aufgrund des fehlenden Zinkbindungsmotivs keine Koordination mit dem Zinkion zulassen, kommt nur eine Funktion bei der Zellfusion, bei der intrazellulären Signalübertragung oder als Adhäsionsmolekül in Betracht.

Die zytoplasmatische Domäne enthält sowohl eine prolinreiche Sequenz (PKLPPPKPLP), die als SH3-Ligand dienen könnten, als auch eine PKC-Konsensussequenz [Pawson, 1995; Weskamp *et al.*, 1996].

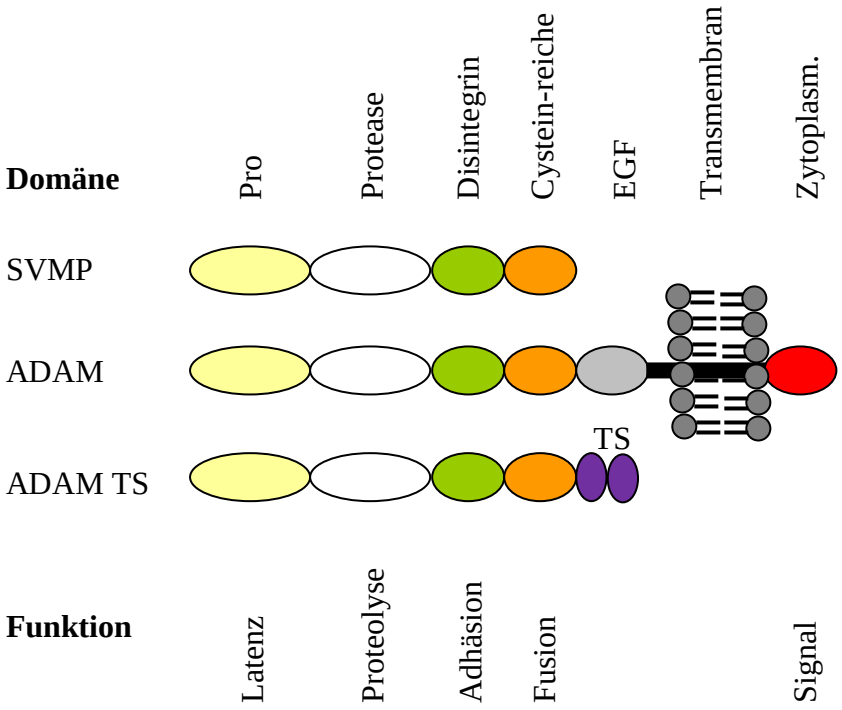


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAMs im Vergleich zu SVMPs und ADAM TS. Die Prodomäne hält die katalytische Domäne in einem latenten Zustand und wird bei der Aktivierung prozessiert.

Neben dem weitaus größeren Teil der membranständigen ADAMs sind auch lösliche ADAM Proteine bekannt. Die ADAM-TS (***A*** ***D****isintegrin* ***A****nd* ***M****etalloprotease with* ***T****hrombo****S****pondin motifs*) tragen anstelle der C-terminalen transmembranen und intrazellulären Domäne ein Thrombospondin Typ I-Motiv (Abb. 1-7). Sie werden sezerniert und binden aufgrund des TS-Motivs an Moleküle der extrazellulären Matrix [Kuno *et al.*, 1998]. Neben den verschiedenen proteolytisch aktiven ADAMs ist auch bei Mitgliedern der löslichen ADAM-TS Familie eine proteolytische Aktivität nachgewiesen worden.

Neben den Cadherinen, Selektinen, Integrinen und Immunglobulinen gehören auch die ADAMs zu den membrangebundenen Zelladhäsionsmolekülen [Blobel, 1997]. Die Bezeichnung „Disintegrin“ stammt von den ursprünglich aus Schlangengift isolierten gleichnamigen Proteinen und bezieht sich auf deren Eigenschaft, die durch Integrine vermittelte Bindung von Blutplättchen an Fibrin zu inhibieren [Gould *et al*., 1990; Schlondorff und Blobel, 1999]. Man nimmt daher an, dass die Disintegrin-Domäne aus ADAM-Proteinen ebenfalls mit Integrinen oder anderen Zelloberflächenrezeptoren wechselwirken können. Die Integrin-Bindungssequenz Arg-Gly-Asp (RGD) der Schlangengift-Disintegrine befindet sich am Anfang der Disintegrin-Domäne [Krätschmar *et al*., 1996]. Jedoch besitzt nur ADAM15 diese RGD-Sequenz, stattdessen sind andere Bindungssequenzen vorhanden, die anstelle des Aspartat ein Glutamat besitzen. Daher wird angenommen, dass der negativ geladene Rest für die Funktion als Integrin-Ligand verantwortlich ist [Wolfsberg *et al.*, 1995].

1.5.1.1 ADAM10

Die Metalloprotease ADAM10 (MADAM/Maus, SUP17/*C. elegans*, KUZ/kuzbanian *Drosophila*) wurde 1989 aus Rinderhirn als MBP (***M****yelin* ***B****asic* ***P****rotein*)-degradierendes Enzym isoliert [Chantry *et al*., 1989]. Durch Spaltungsversuche mit dem aus Rinderhirn gereinigten Enzym konnte schließlich die spezifische α-Sekretaseaktivität von ADAM10 *in vitro* nachgewiesen werden [Lammich *et al.*, 1999].

ADAM10 liegt zunächst als unreife Form vor und wird in vielen Geweben wie z.B. Lunge, Herz, Niere, Leber und Gehirn exprimiert [Wolfsberg *et al*., 1995; Howard *et al*., 1996; Yavari *et al*., 1998; Karkkainen *et al*., 2000]. Die Regulation der proteolytischen Aktivität erfolgt möglicherweise durch ein „*Cystein-switch-Motiv*“ innerhalb der Prodomäne, bestehend aus einem konservierten Cystein-Rest, über dessen freie Thiolgruppe das im katalytischen Zentrum komplexierte Zink-(II)-Ion koordiniert wird [Schlondorff und Blobel, 1999]. Die Protease wird so in einem inaktiven Zustand gehalten. Erst nach der Abspaltung des N-terminalen Proproteins durch die Proprotein-Konvertase 7 oder Furin an einer Furinproteasespaltungsstelle wird aus der 98 kDa großen unreifen Form die 62-64 kDa große katalytisch aktive Form von ADAM10. Dieser Vorgang findet im trans-Golgi-Netzwerk statt. Daneben scheint die Prodomäne auch für den Transport zur Zelloberfläche und die korrekte Faltung der ADAM-Proteine wichtig zu sein [Milla *et al*., 1999; Anders *et al*., 2001].

ADAM10-defiziente Mäuse sterben am Embryonaltag 9,5 und weisen Entwicklungsstörungen auf. Neben einem vergrößerten Herzbeutel findet man in diesen Tieren Entwicklungsstörungen im Gehirn, des Neuralrohres und der Somiten [Hartmann *et al*., 2002].

Eine besondere Bedeutung kommt der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) von der Zelloberfläche zu. Dabei entsteht unter pathologischen Bedingungen das Amyloid-beta (AP-β) Fragment, welches an der Alzheimer-Erkrankung beteiligt ist [Nunan und Small, 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass ADAM10 auch verschiedene Typen von Cadherinen auf der Zelloberfläche spaltet und an der Spaltung des Notch-1 Rezeptors, des zellulären Prion-Proteins (PrP), des Interleukin-6-Rezeptors (IL-6-R) und des Chemokins Fraktalkin beteiligt ist [Hundhausen *et al*., 2007].

1.5.1.2 ADAM17

ADAM17 ist die erste mit *Shedding* in Verbindung gebrachte ADAM-Protease [Black *et al*., 1997; Moss *et al*., 1997]. Diese ist maßgeblich an der proteolytischen Spaltung von Tumor Nekrose Faktor (TNF)-α, welcher als Antwort auf Infektionen oder Gewebeverletzungen freigesetzt wird, beteiligt und wird dementsprechend auch als *tumor necrosis factor-converting enzyme* (TACE) bezeichnet. ADAM17 spaltet dabei eine Peptidbindung in der extrazellulären Domäne der membranständigen Vorläuferform von TNF-α, was zur Freisetzung der löslichen Form des Zytokins führt [Black *et al*., 1997].

Die ADAM17-defizienten Mäuse ($tace^{\Delta Zn/\Delta Zn}$) sterben in einem Zeitraum von Embryonaltag 17,5 bis kurz nach der Geburt. Bei diesen Tieren zeigte sich, dass ADAM17 für die korrekte Epithelbildung während der Embryogenese notwendig ist. ADAM17-defiziente Mäuse weisen Haar- und Hautdefekte auf und zeigen weiterhin Entwicklungsstörungen im Bereich der Lunge und des Herzens. Die epithelialen Defekte, die bei den $tace^{\Delta Zn/\Delta Zn}$ –Embryonen zu beobachten sind, weisen einen ähnlichen Phänotyp wie *transforming growth factor-alpha* (TGF-α) und EGF-Rezeptor-defiziente Mäuse auf [Peschon *et al*., 1998]. Des Weiteren ist ADAM17 an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt.

Durch die Untersuchung von ADAM17-defizienten Mäusen, bei denen eine Deletion in der katalytischen Domäne vorlag, konnte gezeigt werden, dass ADAM17 auch für das *Shedding* von weiteren Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin, des Wachstumsfaktor TGF-α [Peschon *et al*., 1998], TNF-Rezeptoren Typ I und Typ II, IL-6-Rezeptor [Althoff *et al*.,

2000] und HER4/erB4-Rezeptor [Rio *et al*., 2000] verantwortlich ist. ADAM17 soll neben ADAM10 auch zur Spaltung von Notch-1 [Brou *et al*., 2000], APP und PrP beitragen [Buxbaum *et al*., 1998; Vincent *et al*., 2001].

1.5.2 Regulation des Shedding

Ein verstärktes *Shedding* von Oberflächenmolekülen führt zur Abnahme ihrer Oberflächenexpression und zu einem erhöhten Vorkommen der löslichen Varianten. Trotz der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz verschiedener Substrate der ADAM-vermittelten Proteolyse ist über die Regulation des *Shedding*-Prozesses erst wenig bekannt. Zunächst scheinen ADAM10 und ADAM17 konstitutiv auf zahlreichen Zelltypen exprimiert zu sein. Auch die Prozessierung der ADAM-Protease-Proform im trans-Golgi durch Proprotein-Konvertasen (z.B. Furin) ist ein konstitutiver Prozess. Vieles spricht aber dafür, dass neben dieser Überführung in die proteolytisch aktive Form noch andere Regulationsmechanismen existieren. So führt die Zellaktivierung mit dem Phorbolester PMA oder dem Kalziumionophor Ionomycin zur schnellen Aktivierung vieler *Shedding*-Prozesse. In vielen Fällen werden ADAM17-vermittelte Spaltungsvorgänge wie z.B. das TNF-α oder L-Selektin *Shedding* durch PMA induziert, während ADAM10 vermittelte Prozesse, wie z.B. das VE-Cadherin und APP *Shedding* durch Ionomycin verstärkt werden. Die Aktivierbarkeit des *Shedding* scheint neben dem Substrat und der beteiligten Protease auch vom Zelltyp abzuhängen. Es gibt Hinweise darauf, dass Signalmoleküle wie die Proteinkinase C, Kalzium/Calmodulin-Kinasen und Rezeptortyrosinkinasen an der Aktivierung der Proteasen beteiligt sind.

2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die proteolytische Spaltung von Oberflächenmolekülen auf Endothel- und Epithelzellen untersucht werden. Insbesondere sollte dabei das Vorkommen und die Entstehung von löslichem JAM-A und Syndekanen näher analysiert werden.

Während lösliche Syndekane bereits beschrieben, und als ein potentielles Substrat für ADAMs in Betracht gezogen werden konnten, war die Bildung von löslichem JAM-A bisher unbekannt. Um den Einfluss von ADAMs an der JAM-A- und Syndekan-Proteolyse zu untersuchen, sollten die Proteasen z.B. mittels shRNA herunterreguliert oder durch spezifische Hemmung über Metalloprotease-Inhibitoren untersucht werden. Des Weiteren wurden ADAM10- und ADAM17-defiziente Zellen für die Untersuchungen genutzt.

Neben der Identifizierung der verantwortlichen Protease, sollte auch die Regulation der Spaltung von JAM-A und Syndekanen in verschieden Stimulationsexperimenten analysiert und darüber hinaus die Frage geklärt werden, ob und wie Entzündungsprozesse das *Shedding* regulieren.

Sowie JAM-A als auch Syndekane sind an entzündlichen Prozessen beteiligt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die funktionelle Relevanz der extrazellulären freigesetzten Spaltprodukte z.B. für die Leukozytenrekrutierung zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit wurde in drei Abschnitte unterteilt:

1. Im ersten Teil wurde lösliches JAM-A nachgewiesen und die verantwortliche Protease identifiziert. Darüber hinaus wurde die funktionelle Relevanz des löslichen Spaltfragmens *in vitro* und *in vivo* untersucht.

2. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte die für das Syndekan-*Shedding* verantwortliche Metalloprotease ermittelt werden. *In vitro* und *in vivo* Analysen zeigten die Regulation der Proteolyse in der Lunge.

3. Im letzten Teil wurde die Regulation von ADAM17 *in vitro* auf Endothel- und Epithelzellen sowie am Beispiel von JAM-A und Syndekanen *in vivo*, durch proinflammatorische Zytokine untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

AMAXA Nucleofactor	Lonza, Köln, D
Chemilumineszenzkamera	LAS-3000, Fujifilm, Carrollton, USA
Dot Blot Apparatur	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Durchflusszytometer:	
GuavaEasyCyte mini	Guava Technologies, Inc, Hayword, USA
BD FACSCalibur	BD Biosciencess, Heidelberg, D
BD FACSCanto	BD Biosciencess, Heidelberg, D
NanoDrop-ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
LightCycler 480 Systems	Roche, Prenzberg, D
Mikroskope:	
Inverses Kontrastmikroskop Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Inverses Forschungsmikroskop Leica DM IRB SLR	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Leica DFC 310 FX Kamera	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
96-*well*-Mikrotiterplattenleser	Sunrise, Tecan, Crailsheim, D
Polyacrylamidgelelektrophoresekammer	BIO-RAD, Hercules, USA
Semi-dry-Blot-Apparatur:	
Transblot® SD	BIO-RAD, München, D
PCR-Cycler	Biometra Analytik GmbH, Göttingen, D
XCelligence System	Roche, Prenzberg, D
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415R,	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5810R,	
Avanti J-25	Beckman Coulter GmbH, Palo Alto, CA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle für die Zellkultivierung benötigten Plastik Materialien wurden über die Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

Deckgläser (13 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Einmalkanülen Microlance	Becton Dickinson, Madrid, E
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Madrid, E
Neubauerzählkammer (Hemacytometer)	Brand, Wertheim, D
Objektträger (geschnitten, Mattrand)	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Präparationsbesteck	FST, Heidelberg, D
PVDF-Membranen:	
Hybond-P	Amersham, Freiburg, D
Hybond-N+	
Transwellfilter Polycarbonat Membran 5 µm	Corning Inc. Costar, Schiphol-Rijk, NL
Flusskammer µ-Slide VI	Ibidi, Martinsried, D
MaxiSorp ELISA-Platten	Nunc, Langenselbold, D
Vivaspin 500	Satorius AG, Göttingen, D

3.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) und Roth (Karlsruhe, D) bezogen.

Calcein-AM	Biotium Inc., Hayward, CA
FcR Blocking Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
sJAM-A.Fc	R&D Systems, Minneapolis, MN

3.1.4 Verwendete Kits

Amaxa Transfektionskits:	
Nucleofector Kit V	Lonza Cologne AG, Köln, D
MEF Nucleofector Kit 2	Lonza Cologne AG, Köln, D
HUVEC Nucleofector Kit	Lonza Cologne AG, Köln, D
α-Secretase-Activity Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN
Bradford-Reagenz	BioRad, München, D
cDNA-Synthese Kit	
RevertAid^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
ELISA-Kits:	
Maus Albumin	Bethyl Laboratories, Hamburg, D
Maus JAM-A	R&D Systems, Minneapolis, MN

Gelextraktionskit:	
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren, D
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
LightCycler480 DNA SYBR Green I Master	Roche, Prenzberg, D
Plasmid-Miniprep:	
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel, Düren, D
Plasmid-Maxiprep:	
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, D
RNeasyMini Kit	Quiagen, Hilden, D
Western-Blotting-Detektionskit:	
ECL Plus/Advanced Western Blotting Detection System	Amersham, Little Chalfont, UK

3.1.5 Enzyme

Pfu-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Restriktionsenzyme:	
*Not*I	Fermentas, St. Leon-Rot, D
*Kpn*I	Fermentas, St. Leon-Rot, D
N-Glycosidase F	Roche, Prenzberg, D
Kollagenase II	Sigma-Aldrich, St Louis, MO

3.1.6 Puffer

ADAM17-Puffer:	5 mM Tris, pH 9 2,5 µM $ZnCl_2$ 0,005% Brij 35
DABCO-Stammlösung:	200 mg/ml Diazobicyclooctan in PBS → Aufbewahrung bei –20°C
Deglykosylierungspuffer:	25 mM EDTA 1% Triton X-100 0,1% SDS 1% Mercaptoethanol

Einbettungsmedium:	1 ml Mowiol 100 µl DABCO 1 µl DAPI
Erythrozyten-Lyse-Lösung:	4,145 g NH_4Cl 0,5 g $KHCO_3$ 0,02 g EDTA → ad 500 ml H_2O bidest., pH 7,2
Flow adhesion-Puffer:	10% HBSS 1% HEPES 1% BSA → in H_2O bidest
Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl pH 7,5 200 mM Glycin 3,5 mM SDS
LB-Medium:	10 g Bakto-Trypton 5 g Bakto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl → in 950 ml H_2O bidest. lösen, pH 7,0 einstellen, ad 1000 ml H_2O bidest.
LB-Agar:	10 g Bakto-Trypton 5 g Bakto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl 15g Bakto-Agar → in 950 ml H_2O dest. lösen, pH 7,0 einstellen, ad 1000 ml H_2O dest.
Lysispuffer:	5 mM Tris 1 mM EGTA 250 mM Saccharose 1% Triton X-100, 1x Complete

Mowiol:	10 g Mowiol 488 in 40 ml PBS 24 h bei RT rühren 20 ml 100%iges Glycerol zugeben, 24 h bei RT rühren, pH-Kontrolle (6-7) 15 min bei 12.000 rpm zentrifugieren → Lagerung bei –20°C, nur 1-2x Auftauen
PBS:	150 mM NaCl 120 mM KCl 10 nM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 → pH 7.4
Sammelgelpuffer:	30,28 g TRIS/HCl 2 g SDS → ad 500 ml H_2O bidest, pH 6,8
SDS-Probenpuffer:	20% Glycin 4,5% SDS 125 mM Tris/HCl pH 6,8 1 Spatelspitze Bromphenolblau reduzierend: 5% Mercaptoethanol
SOC-Medium:	0,5 g Hefeextrakt 1 g Pepton 1 g NaCl 20 Glukose → ad 100 ml H_2O dest.
Strippingpuffer:	20 ml 10%iges SDS in H_2O 6,25 ml 1M TRIS/HCl, pH 6,8 0,83 ml β-Mercaptoethanol 73 ml H_2O dest. → Aufbewahrung bei 4°C

Syndekanpuffer:	0,15 M NaCl 50 mM $Na(CH_3COO)$ 0,1% Triton X-100 →pH 4,5
50xTAE:	242 g TRIS 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 → ad 1000 ml H_2O dest.
10xTBS:	20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA → pH 7,4
TBST:	500 µl Tween-20 ad 1000 ml 1x TBS
Transferpuffer:	192 mM Glycin 25 mM Tris/HCl 10% (v/v) Methanol → pH 8,5, pH-Wert nicht einstellen
Trenngelpuffer:	90,85 g TRIS/HCl 2 g SDS → ad 500 ml H_2O bidest, pH 8,8
Trypsin-EDTA:	400 µl 0,25% Trypsin in 0,03% EDTA in PBS

3.1.7 Zellkulturmedien

Dulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium (DMEM) High Glucose (4.5 g/ml)	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Roswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute (RPMI)	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Endothelial Cell **G**rowth **M**edium (EGM)	PromoCell, Heidelberg, D
Medium **199** With Earl`s salts (M199)	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Small Airway Epihelial Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg, D

3.1.8 Antikörper

Die Tabellen 3-1 und 3-2 enthalten eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, sowie sekundäre enzym- oder fluoreszein-konjugierte Antikörper und deren Verdünnungen, in denen sie in der Immunfluoreszenz (IF), *Western-Blot* (WB) und Durchflusszytometrie (FACS) eingesetzt wurden.

Tabelle 3-1: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Firma	Isotyp	Spezifität	IF-Verd.	WB-Verd.	FACS
ADAM10 (AB19026)	Chemicon	Kaninchen (polyklonal)	Mensch, Maus, Ratte (C-terminal)	-	1:1000	-
ADAM17 (TACE)	Chemicon	Kaninchen (polyklonal)	Maus, Mensch, Ratte (C-terminal)	-	1:1000	-
ADAM10 (163003)	R&D Systems	Maus (IgG_{2B})	Mensch (N-terminal)	-	-	1:100
ADAM17 (111633)	R&D Systems	Maus (IgG_1)	Mensch (N-terminal)	-	-	1:100
β-Aktin	Abcam	Kaninchen (polyklonal)	Maus, Mensch, Ratte	-	1:500	-
JAM-A (Klon 43)	BD Biosciences	Maus (IgG_1)	Mensch (N-terminal)	-	1:1000	1 :100
JAM-A (C-15)	Santa Cruz	Ziege (polyklonal)	Mensch, Ratte, Maus (C-terminal)	-	1 :500	-
JAM-A (M.Ab.F11)	HyCult	Maus (IgG_1)	Mensch (N-terminal)	1:50	-	-
Syndekan-1 (DL-101)	Santa Cruz	Maus (IgG_1)	Mensch (N-terminal)	-	1:300	1:30
Syndekan-1 (281-2)	BD Biosciences	Ratte (IgG_{2A})	Maus (N-terminal)	-	1:500	-
Syndekan-4 (5G9)	Santa Cruz	Maus (IgG_{2B})	Mensch (N-terminal)	-	1:300	1:30
Syndekan-4 (N-19)	Santa Cruz	Ziege (polyklonal)	Maus, Ratte, Mensch (N-terminal)	-	1:500	-

Tabelle 3-2: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Kopplung	IF-Verd.	WB-Verd.	Firma
Ziege α Kaninchen	Alexa Fluor 555	1:300	-	Molecular Probes, Oregon, USA
Ziege α Maus	Alexa Fluor 488	1:300	-	Molecular Probes, Oregon, USA
Ziege α Maus	PE	1:200	-	Jackson Immuno Research
Ziege α Kaninchen	HRP	-	1:10000	Jackson Immuno Research
Ziege α Maus	HRP	-	1:10000	Jackson Immuno Research
Ziege α Ratte	HRP	-	1:10000	Jackson Immuno Research
Kaninchen α Ziege	HRP	-	1:10000	Jackson Immuno Research

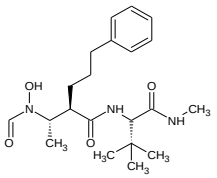
3.1.9 Stimulantien und Inhibitoren

Tabelle 3-3: Für Zellkulturexperimente verwendete Stimulantien und Inhibitoren, ihre Konzentrationen, Behandlungsdauer und Bezugsquelle

Reagenz	Konzentration	Dauer der Behandlung	Bezugsquelle
TAPI	20 µM	24 h	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D
PMA	200 ng/ml	2 h	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D
GI254023X	10 µM	24 h	GlaxoSmithKline, Stevenage, UK
GW280264X	10 µM	24 h	GlaxoSmithKline, Stevenage, UK
Ionomycin	10 µM	30-45 min	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D
TRAP-6	5 µM	5-120 min	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D
TNF-α	10 ng/ml	24 h	R&D Systems, Wiesbaden, D
TMI-1	10 µM	24 h	Wyeth Research, Cambridge, USA
TMI-2	10 µM	24 h	Wyeth Research, Cambridge, USA
rek. ADAM17	5 ng/ml	3 h	R&D Systems, Wiesbaden, D
IFN-γ	10 ng/ml	24 h	R&D Systems, Wiesbaden, D
γ-Sekretase Inhibitor (DAPT)	10 µM	24 h	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D

Bei den Substanzen GW280264X und GI254023X handelt es sich um auf Hydoxamat basierende Metalloprotease-Inhibitoren. Sie wurden bei GlaxoSmithKline (GSK, Stevenage, UK) synthetisiert. GW280264X ist in der Lage die proteolytische Aktivität von ADAM17 und ADAM10 zu inhibieren. GI254023X hingegen hemmt ausschließlich ADAM10 [Abel et al., 2004; Hundhausen et al., 2003; Ludwig et al., 2005; Musso et al., 2001; Rabinowitz et al., 2001] :

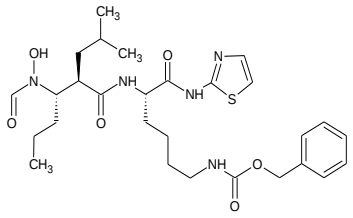
- GI254023X ((2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-(3-phenyl-1-propyl) Butansäure [(1S)-2,2-dimethyl-1-methylcarbamoyl-1-propyl] amid)



ADAM10-Inhibitor: IC_{50} (ADAM17) = 541 nM

IC_{50} (ADAM10) = 5,3 nM

- GW280264X ((2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-(2-methyl-1-propyl) Hexansäure [(1S)-5-benzyloxycarbamoylamino-1-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl-1-pentyl] amid)



ADAM10/17-Inhibitor: IC_{50} (ADAM17) = 8,0 nM

IC_{50} (ADAM10) = 11,5 nM

3.1.10 shRNA Sequenzen und siRNA Sequenzen

Tabelle 3-4:Verwendete shRNA Zielsequenzen

Bezeichnung	Zielsequenz
sh_Syndekan-4	GTTGTCCATCCCTTGGTGC
sh_ADAM10	GACATTTCAACCTACGAAT
sh_ADAM17	AGGAAAGCCCTGTACAGTA
sh_Kontrolle	CCGTCACATCAATTGCCGT

Die *short hairpin* RNAs (shRNAs; Tabelle 3-4) wurde mit den Restriktionsschnittstellen *Mlu*I und *Cla*I in den lentiviralen Expressionsvektor pLVTHM eingebracht. Alle shRNA Sequenzen wurden dabei durch eine Platzhaltersequenz (TTCAAGAGA) von ihrer reversen komplementären Sequenz getrennt.

Tabelle 3-5:Verwendete siRNA Sequenzen (Stealth RNAi, Invitrogen)

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
si_ADAM10	UACACCAGUCAUCUGGUAUUUCCUC
si_ADAM17	UACUGUACAGGGCUUUCCUUUCCUC

Tabelle 5-5 enthält die Sequenzen der verwendeten siRNA Zielsequenzen. Als Negativ-Kontrolle diente eine unspezifische *stealth* RNAi von Invitrogen mit einem niedrigen GC Gehalt.

3.1.11 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer für Sequenzierungen und Polymerasekettenreaktionen (PCRs) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert (Tabelle 3-6). Sie wurden mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Tabelle 3-6: Verwendete Primer

Bezeichnung	Länge (bp)	Sequenz 5'→3'
qPCR_ Syndekan 1_for	20	GGCTGTAGTCCTGCCAGAAG
qPCR_ Syndekan 1_rev	20	TCTGTGTGGGGAGTGTGAAG
qPCR_ Syndekan 4_for	20	TCGATCCGAGAGACTGAGGT
qPCR_ Syndekan 4_rev	20	CCAGATCTCCAGAGCCAGAC
qPCR_ADAM10_for	19	TCCACAGCCCATTCAGCAA
qPCR_ADAM10_rev	21	GCGTCTCATGTGTCCCATTTG
qPCR_ADAM17_for	20	GAAGTGCCAGGAGGCGATTA
qPCR_ADAM17_rev	21	CGGGCACTCACTGCTATTACC
qPCR_GAPDH_for	19	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA
qPCR_GAPDH_rev	22	CAGAACATCATCCCTGCCTCTA
qPCR_JAM-A_for	20	TCGAGAGGAAACTGTTGTGC
qPCR_JAM-A_rev	20	ACCAGTTGGCAAGAAGGTCA
Syndekan _1_*Kpn*_for	23	GGT ACC GGC AGC ATG AGG CGC GC
Syndekan _1_*Not*_rev	25	GCG GCC GCC GGC ATA GAA TTC CTC C
Syndekan _4_*Kpn*_for	22	GGT ACC GGT GCC ATG GCC CCC G
Syndekan_4_*Not*_rev	25	GCG GCC GCC CGC GTA GAA CTC ATT G

3.1.12 Plasmide

Die Lagerung von Plasmiden erfolgte in autoklaviertem bidest. H_2O. Für kürzere Zeiträume wurden die Vektoren bei 4°C gelagert. Langfristig wurden sie bei –20°C aufbewahrt.

3.1.12.1 pcDNA3.1+, pcDNA3.1+_2Z-His, Syndekan1_2Z-His_pcDNA3.1(+) und Syndekan4_2Z-His_pcDNA3.1(+)

Zusätzlich zur Klonierung wurden die Plasmide zur Expression in Säugetierzellen verwendet, was durch einen starken Promotor wie den CMV (Cytomegalie Virus)-Promotor ermöglicht wurde. Eine Ampicillinresistenz in den Plasmiden erlaubte die

Amplifikation und Selektion der Vektoren in Bakterien. Alle hier aufgeführten rekombinanten Plasmide wurden vor der Verwendung vollständig sequenziert.

pcDNA3.1+

Der Vektor pcDNA3.1(+)/Zeo (Abb. 3-1) stammt von Invitrogen (Karlsruhe, D).

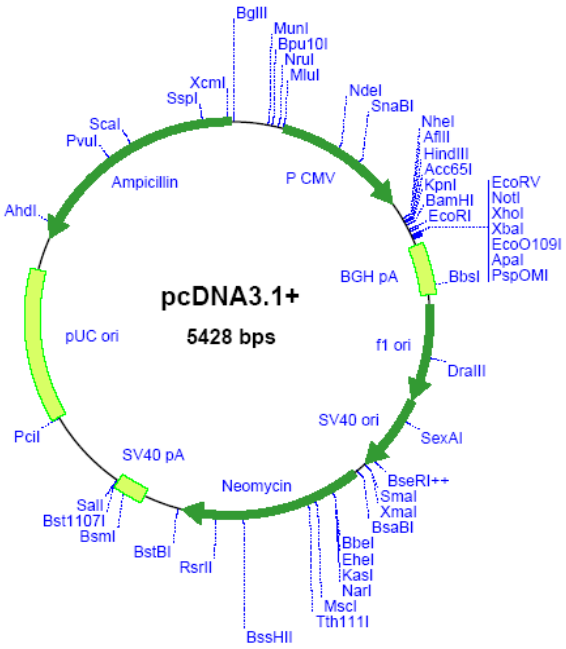


Abbildung 3-1: Vektorkarte pcDNA3.1(+) Vektor (Invitrogen)

pcDNA3.1+_2Z-His

Das Plasmid pcDNA3.1(+)/Zeo mit der cDNA 2Z-His wurde mit *Not*I und *Xho*I in den Vektor inseriert (Abb3-2).

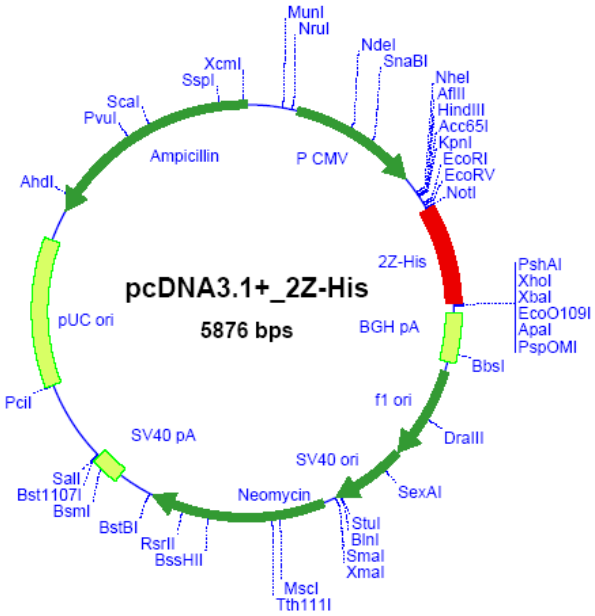


Abbildung 3-2: Vektorkarte pcDNA3.1(+)_2Z-His

Syndekan1_2Z-His_pcDNA3.1(+) /Syndekan4_2Z-His_pcDNA3.1(+)

Für die Klonierung dieses Konstrukts wurde pcDNA3.1+_2Z-His zunächst mit *Kpn*I und *Not*I geschnitten. Die gesamte cDNA von humanem Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 ohne die Stopp-Codon-Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen in den pcDNA3.1-2Z-His-Vektor umkloniert (Abb. 3-3).

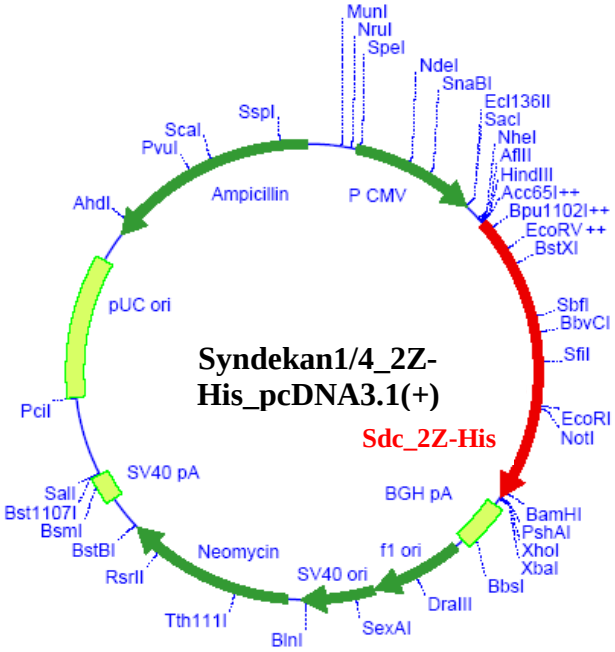


Abbildung 3-3: Vektorkarte pcDNA3.1(+)_Syndekan-1_2Z-His bzw. pcDNA3.1(+)_Syndekan-4_2Z-His

3.1.12.2 pLVTHM, psPAX2 und pMD2.G

Diese Vektoren wurden zur Virusgenerierung für den Lentiviralen *knock down* genutzt. Während pLVTHM (Abb. 3-4) die DNA des Ziel-Proteins trägt, enthält psPAX2 (Abb. 3-5) die Information für die Verpackung der Viren und pMD2.G (Abb-3-6) die Information für das Oberflächenprotein vsv-G, das die Infektion von Säugerzellen verschiedener Spezies ermöglicht (Pantropismus).

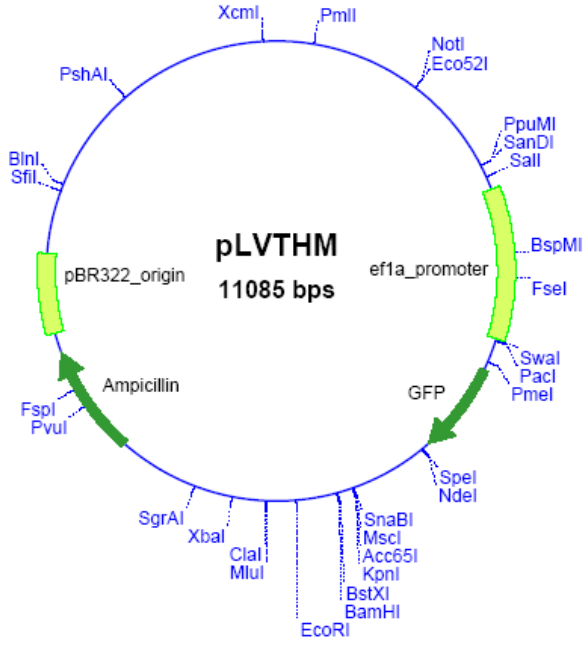


Abbildung 3-4: Vektorkarte pLVTHM (Tronolab, Lausanne, CH)

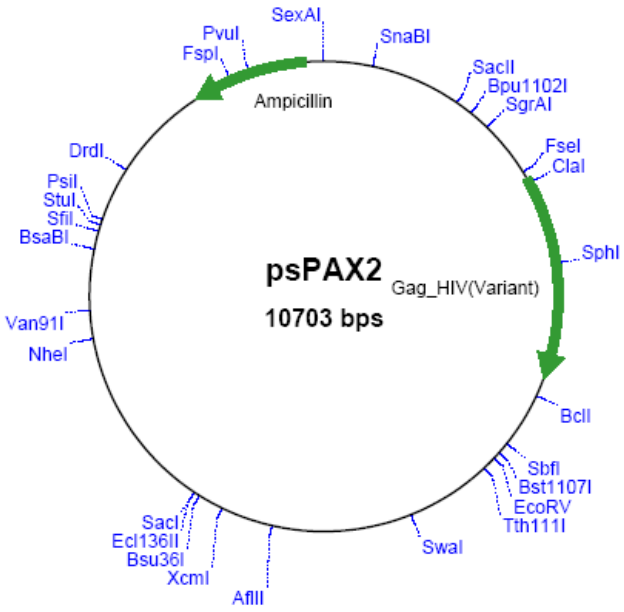


Abbildung 3-5: Vektorkarte psPAX2 (Tronolab, Lausanne, CH)

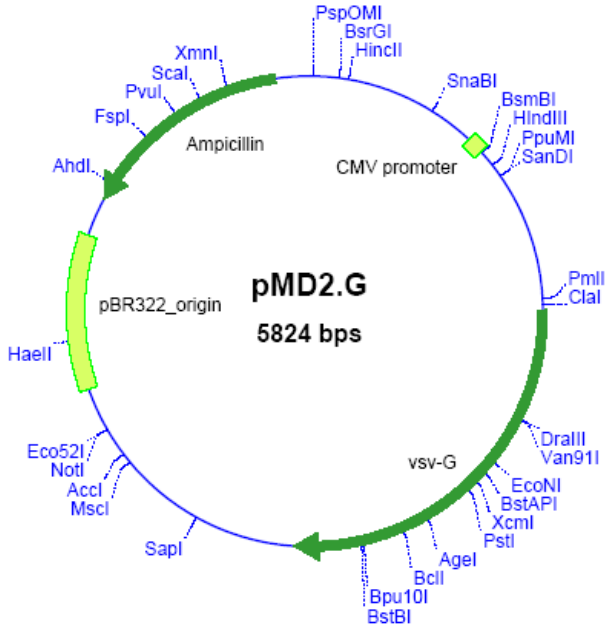


Abbildung 3-6: Vektorkarte pMD2.G (Tronolab, Lausanne, CH)

pLVTHM_sh_RNA

Die shRNA Sequenzen wurden mittels der Restriktionsendonukleasen *Mlu*I und *Cla*I in den Vektor pLVTHM eingebracht (Abb. 3-7).

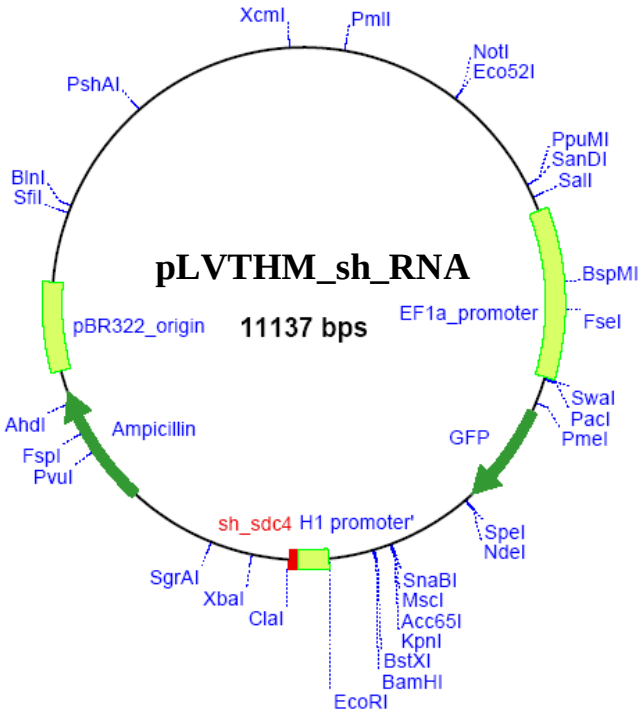


Abbildung 3-7: Vektorkarte pLVTHM_sh_RNA

3.1.13 Bakterienstämme

Für Klonierungen wurden die *E. coli*-Stämme DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, D) sowie TOP10 (Invitrogen, Karlsuhe, D) verwendet, bei denen es sich um Abkömmlinge der Sicherheitsstämme K1 und K12 handelt.

DH5α-Genotyp: supE44 ΔlacU 169(Φ80lacZ ΔM15) hsd R17 recA1 endA1 gyr196 thi-1 relA1.

TOP10 F´[lacI^{q}Tn10 (tetr)] mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str) endA1 nupG

3.1.14 Zelllinien

HEK293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cell line 293*, HEK293) wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin (10000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert (# ACC 305, DSMZ, Braunschweig, D).

HEK293T-Zellen

293T-Zellen sind ein hoch transfizierbares Derivat der HEK293-Zellen und tragen ein Plasmid, das eine temperatursensitive Mutante des großen T-Antigens enthält. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin (10000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert (# ACC 635, DSMZ, Braunschweig, D).

ECV304-Zellen

Humane Blasenkarzinom Epithelzellen (ECV304) wurden in M199 mit 10% FCS und 1% Penicillin (10000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert (# ACC 310, DSMZ, Braunschweig, D).

A549-Zellen

Humane Lungenkarzinom Epithelzellen (A549) wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin (10000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert (# ACC 107, DSMZ, Braunschweig, D).

Murine Embryonale Fibroblasten (MEFs)

Zur Herstellung von MEFs wurden einer trächtigen Maus die Embryonen entnommen. Die zerkleinerten Embryonen wurden in DMEM mit 50% FCS und 1% Penicillin (10000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) kultiviert bis die Fibroblasten die anderen Zelltypen

überwachsen hatten. Daraufhin wurde der Gehalt an FCS auf 10% gesenkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene MEF-Genotypen verwendet [Hartmann *et al*., 2002; Vincent *et al*., 2001]:

- Wildtypzelllinien
- ADAM10-defiziente Zelllinien ($ADAM10^{-/-}$)
- ADAM17-defiziente Zelllinien ($ADAM17^{-/-}$)

Humane Endothelzellen (HUVEC)

Bei HUVEC ***H****uman* ***U****mbilical* ***V****ein* ***E****ndothelial* ***C****ells* (HUVEC) handelt es sich um primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur. In dieser Arbeit wurden die HUVEC-Zellen aus der Nabelschnur isoliert und zwischen den Passagen 2-4 verwendet. Sie wurden in EGM-Medium bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

HSAEpC

Bei *Normal Human Small Airway Epithelial Cells* (HSAEpC) handelt es sich um primäre alveoläre Epithelzellen der Firma PromoCell (Heidelberg, D). Sie wurden in *Small Airway Epihelial Cell Growth Medium* bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation von HUVEC-Zellen nach der Methode von Jaffe *et al*. (1973)

Humane Nabelschnurendothelzellen aus der Vene wurden aus frischen Nabelschnüren präpariert. Die Verarbeitung erfolgte innerhalb von 5 h *post partum*. Bis dahin wurden die Nabelschnüre in PBS bei 4°C aufbewahrt. Die Nabelschnurvene wurde mit Hilfe einer Knopfkanüle mit PBS gespült, um sie von Blutzellen zu befreien. Anschließend wurde die Vene mit einer 0,1%igen Kollagenase-Lösung in PBS befüllt, an beiden Enden mit einer Klemme verschlossen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Kollagenase löst die Endothelzellen enzymatisch. Die mobilisierten Zellen wurden mit 2x20 ml PBS aus der Nabelschnur ausgeschwemmt und abzentrifugiert (15 min bei 300 x g). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in EGM-Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Um den Endothelzellen das Adhärieren an die Kunststoffoberfläche der Zellkulturflasche zu erleichtern, wurden diese mit einer Kollagenlösung G (40 µg/ml) in PBS für 30 min bei 37°C beschichtet. Wenn primäre Endothelzellen *in vitro* die Kulturfläche vollständig eingenommen haben, proliferieren die Zellen nicht mehr. Daher ist es notwendig, die Zellen im subkonfluenten Stadium zu passagieren.

3.2.1.2 Präparation von humanen polymorphkernigen Leukozyten aus venösem Blut

Neutrophile wurden aus peripherem Blut gesunder Einzelspender durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Bei gesunden Spendern wurde 45 ml Vollblut abgenommen, wobei zur Verhinderung der Blutgerinnung 5 ml Citratpuffer vorgelegt wurde. Das Blut wurde mit dem 2-fachen Volumen PBS verdünnt. Das so verdünnte Blut wurde auf einen Ficoll Gradienten geschichtet und bei 300 x g 40 min ohne Bremse zentrifugiert. Die obere Phasengrenze enthielt mononukleäre Zellen, die untere Phase die sich auf der Oberfläche des Erythrozytenpellets befindet, enthält die polymorphkernigen Leukozyten, welche mit einer Pipette entnommen wurden und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden bei 300 x g für 10 min pelletiert, in warmen Erythrozyten-Lysispuffer resuspendiert und zur Lyse von Erythrozyten 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und erneut bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das

Zellpellet wurde für die Versuche in DMEM mit 0,2% BSA resuspendiert und die Zellzahl auf $2x10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.2.1.3 Zellkultur

Die HUVEC- und HSAEpC-Zellen wurden in Zellkulturflaschen, alle weiteren verwendeten Zelllinien auf 10 cm-Zellkulturschalen in einem Begasungsbrutschrank mit 5% CO_2 und gesättigter Wasserdampfatmosphäre bei 37°C kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch eine drei- bis vierminütige Inkubation mit Trypsin-EDTA im Brutschrank abgelöst. Diese Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von ca. 5 ml Medium mit 10% FCS abgestoppt und die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Je nach Wachstumseigenschaften der Zellen fand eine 2- bis 20-fache Verdünnung bei erneutem Aussäen der Zellen statt.

Kryokonservierung von Zellen

Für die Lagerung von Zellen wurden diese auf eine 10 cm-Zellkulturschale bis zu etwa 80%iger Konfluenz kultiviert und wie bei der normalen Passagierung trypsiniert und anschließend für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM/10% FCS resuspendiert und 2 ml eiskaltes Einfriermedium (20% DMSO in DMEM/10% FCS) hinzugegeben. Die Mischung wurde nach dem Resuspendieren zu je 1 ml auf 1,5 ml Schraubdeckelgefäße aufgeteilt. Zum langsamen Abkühlen der Zellen wurden diese über Nacht bei –80°C aufbewahrt, bevor sie am folgenden Tag in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt wurden.

Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und zügig im 37°C-Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension geschmolzen war und in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und mit 5 ml frischem Medium in eine Zellkulturflasche (T25) überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen.

Lebendzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Zur Feststellung der Lebendzellzahl wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an

0,4% Trypanblaulösung versetzt. Lebende Zellen färbten sich nicht blau, weil sie hineindiffundiertes Trypanblau aktiv aus der Zelle transportieren.

3.2.1.4 Transfektion

Transiente Transfektion mittels Lipofektion

Die Vektoren wurden mit Hilfe der Liposomen-vermittelten Transfektion in die Säugerzellen eingebracht. Diese Methode beruht auf der Endozytose von DNA, welche mit kationischen Lipiden komplexiert ist. Hierfür wurde Lipofectamin verwendet. Die Zellen wurden in einer Dichte von $3x10^4$ Zellen/cm^2 auf 6-*well*-Platten ausgesät. Der Transfektionsansatz für das Lipofectamin setzte sich pro *well* aus 1 µg DNA und 3 µl Lipofectamin in 100 µl serumfreien DMEM zusammen. Bei der weiteren Durchführung der Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation wurden die Zellen für einen Bruchteil einer Sekunde einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. So werden in der Zellmembran Poren erzeugt, durch welche die DNA in die Zelle gelangen kann. Die Elektroporation wurde für ECV-Zellen mit dem Nucleofector Kit V (Programm A-023), für die HUVEC-Zellen mit dem HUVEC Nucleofector Kit (Programm U-001) und für die MEF-Zellen mit dem MEF Nucleofector Kit 2 (Programm A-023) von AMAXA nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für den Transfektionsansatz wurden $2x10^6$ Zellen und 2 µg DNA eingesetzt.

Stabile Transduktion mittels Lentiviren

Für die Virusproduktion wurden HEK293T-Zellen verwendet und die notwendigen Plasmide mittels Liposomen-vermittelten Transfektion in die Zellen eingebracht. 24 h vor der Transfektion wurden $1,5x10^6$ HEK293T-Zellen in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät. Für die Transfektion wurde 5 µg DNA eingesetzt. Diese setzte sich aus 2,5 µg pLVTHM, 1,618 µg psPAX2 und 0,882 µg pMD2.G zusammen. Die DNA wurde in 250 µl 150 mM Natriumchlorid-Puffer vorgelegt. Als Transfektionsreagenz wurde 10 µl jetPEI™ in 250 µl 150 mM Natriumchlorid-Puffer vorgelegt, zum DNA-Gemisch gegeben und 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung tropfenweise auf die HEK293T-Zellen gegeben und für 3 bis 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 5 ml Medium auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag geerntet, erneut

10 ml Medium auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auch dieser Überstand wurde abgenommen, 15 ml Medium auf die Zellen gegeben und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde geerntet und mit den anderen der beiden Vortage vereinigt. Der Gesamtüberstand wurde für 5 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und steril filtriert. Der auf diese Weise gewonnene Virusüberstand wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Transduktion wurden die entsprechenden Zellen in einer Dichte von $3x10^4$ Zellen/cm^2 auf 6-*well*-Platten ausgesät und an zwei aufeinander folgenden Tagen mit 1 ml des Virusüberstands behandelt.

3.2.1.5 *Shedding Assay*

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 6-*well*-Platten bis zu 90% Konfluenz kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit auf 37°C vorgewärmten PBS wurde pro *well* 1 ml serumfreies Medium zugegeben. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Stimulantien und Inhibitoren für 30 min bis 24 h behandelt oder unstimuliert belassen (siehe Abschnitt 3.1.9, Tabelle 3-3). Bei dem Einsatz der Metalloprotease-Inhibitoren (GI254023X, GW2802464X, TAPI-1,) wurden die Zellen mit dem Inhibitor über Nacht vorinkubiert, um eine möglichst effektive Blockade der Metalloprotease-Aktivität zu erreichen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellüberstände abgenommen und zur Entfernung von Zelldebris für 20 min bei 13000 x g zentrifugiert. Für eine Detektion von JAM-A im *Western-blot* wurden die Überstände über Ultrazentrifugations-Einheiten (VivaSpin, 5000 MWCO, 13000 x g, ca. 45 min) um das ca. 10-fache einkonzentriert. Für die Analyse von Syndekan wurden die Zellüberstände in Syndekan-Puffer auf ca. 1,3 ml verdünnt. Die Zellen wurden durch Abkratzen auf Eis mit 0,5 ml kaltem PBS abgelöst, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei 4°C und 13000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe in 50-200 µl Lysispuffer (Abschnitt 3.1.6) mit Complete-Proteaseinhibitor resuspendiert. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis wurde das Zelllysat 5 min bei 4°C mit 13000 x g zum Abtrennen der TritonX-100-unlöslichen Bestandteile zentrifugiert. Die Zelllysate wurden wie die Überstände bis zur Analyse in der Gelelektrophorese oder im ELISA bei -20°C gelagert.

3.2.1.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine in der Zelle lokalisiert werden. Alle beschriebenen Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden auf runden Deckgläsern (10 mm Durchmesser) in 24-*well*-Platten in einer Dichte von $2x10^4$ bis $2x10^5$ Zellen pro *well* ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde gewechselt und je nach Versuch mit den jeweiligen Substanzen versetzt. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern, wie im Folgenden beschrieben, markiert.

Fixierung

Vor der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch 4%ige Paraformaldehydlösung in PBS 20 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen nochmals zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit Antikörpern markiert wurden.

Blockierung

Als Blockierungslösung sowie zur Verdünnung der Antikörper diente eine 3%ige BSA-Lösung in PBS. Die Blockierung erfolgte für 15 min, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern.

Immundetektion

Die Primär- und der Sekundärantikörper wurden nach Tabelle 3-1 und 3-2 mit 3%iger BSA-Blockierlösung verdünnt. Die Inkubationszeit für beide Antikörper betrug 1 h, dabei wurden 30 µl der Antikörper-Lösung auf ein Stück Parafilm pipettiert und die Deckgläser mit der Zellseite zur Lösung auf den Parafilm gelegt. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper fand unter Lichtausschluss statt, um ein Ausbleichen des lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern. Zwischen dem Primär- und Sekundärantikörper, sowie nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper, wurden die Deckgläser viermal mit PBS gewaschen.

Zum Einbetten der Deckgläser wurde ein Gemisch aus Mowiol, DABCO und DAPI verwendet. Die auf den Objektträgern fixierten Deckgläser wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.2.1.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS steht für ***F****luorescence* ***A****ctivated* ***C****ell* ***S****orting*) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären

Proteinen. Hierzu werden Zellen in Suspension in einem Flüssigkeitsstrahl einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Das Licht, das die Zelle hierbei streut, wird über einen Photomultiplier detektiert. Dabei gilt das Vorwärtsstreulicht, der sogenannte *Forward Scatter* (FSC), als ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und ist abhängig vom Zellvolumen, wohingegen das Seitwärtsstreulicht, der *Sideward Scatter* (SSC), ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel ist und Auskunft über Größe und Granularität der Zelle gibt. Grundlage für die quantitative Analyse ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird.

Die zu analysierenden Zellen wurden mittels vorgewärmter Accutase abgelöst, in eiskaltem PBS mit 0,2% BSA aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 300 x g, 4°C) wurde das Zellpellet in 50 µl des Primärantikörpers (siehe Tabelle 3.1) resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 µl PBS mit 0,2% BSA zugegeben und erneut zentrifugiert (5min, 300 x g, 4°C), um ungebundene Überreste des Primärantikörpers zu entfernen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde in 50 µl des Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 3.2) resuspendiert und für 60 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 500 µl PBS mit 0,2% BSA gewaschen, schließlich in 100 µl 2% PFA fixiert und zur Erhöhung des Volumens mit 300 µl PBS mit 0,2% BSA versetzt. Die Proben wurden direkt im Anschluss am Durchflusszytometer untersucht und mit der WinMDI 2.9 Software (Joe Trotter) ausgewertet.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 *Western-blot*-Analyse

Das Prinzip der *Western-blot*-Analyse

Bei der *Western-blot*-Analyse unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine zunächst durch Inkubation mit SDS-Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Durch das Detergenz SDS erhalten alle Proteine eine stark negative Ladung und ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis. Aufgrund dessen erfolgte die anschließende elektrophoretische Auftrennung durch ein Polyacrylamid-Gel nach der Größe, weil Faktoren wie Quartärstrukturen und isoelektrische Punkte der Proteine durch die Vorbehandlung ausgeschlossen werden kann. Nach der Auftrennung werden die Proteine durch ein

senkrecht zur Laufrichtung des Gels angelegtes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Auf dieser Membran können sie immunologisch durch Antikörper nachgewiesen werden.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte mit dem Protein-Assay der Firma BioRad nach dem Standardprotokoll. Bei dieser Methode wurden 96-*well*-Platten verwendet und die Extinktion der gefärbten Proteinlösung mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 595 nm bestimmt. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm nach Bindung des Proteins an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau, wobei die Zunahme der Absorption proportional zur Proteinkonzentration ist. Als Standardprotein wurde eine BSA-Lösung definierter Konzentration (0-3 µg/ml) eingesetzt. Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen und der Mittelwert für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet. Die Proben wurden für die *Western-Blot-Analyse* entsprechend aliquotiert, so dass in allen Proben die gleiche Protein-Konzentration vorlag. Je nach Art des Experiments wurden die Proteine in reduzierendem oder nicht-reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Lysat 5 min bei 95°C denaturiert und kurz bei 13000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach wurden die Lysate auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAGE) erfolgte im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970) in der Mini-PROTEAN®-Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad (München). Es wurden 10-12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet und die Proteine bei konstanter elektrischer Spannung aufgetrennt.

	Sammelgel (5%)	Trenngel 10%	Trenngel 12%
Tris-Puffer	1,25 ml	2,5 ml	2,5 ml
Rothiphorese® Gel 30 (37,5:1)	0,85 ml	3,3 ml	4,2 ml
SDS	0,1%	0,1%	0,1%
APS	30 µl	60 µl	60 µl
TEMED	15 µl	30 µl	30 µl
MilliQ H_2O	ad 5 ml	ad 10 ml	ad 10 ml

Die angegebene Menge bezieht sich auf die Herstellung von zwei Polyacrylamidgelen. Für das Sammelgel wurde 1 M Tris-Puffer (pH 6,8) und für das Trenngel 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8) verwendet. Auf jedes Gel wurde 5 µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, D) Molekulargewichtsmarkers in eine Spur aufgetragen. Für den Nachweis der Proteine wurden je nach Zelllinie 25-55 µg pro Spur aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 h bei 120 V.

Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine nach dem *semi-dry*-Verfahren mit dem TransBlot®-System auf eine proteinbindende PVDF-Membran transferiert. Dafür wurden die Filterpapiere vorher in Transferpuffer (Abschnitt 3.1.6) getränkt, die PVDF-Membran jeweils einige Minuten in 100%igem Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 20 V für 80 min. Die Vollständigkeit der Proteinübertragung wurde durch Färben der Membran mit Ponceau S kontrolliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Anschließend wurde der Farbstoff mit PBST-Puffer wieder entfernt.

Immundetektion der transferierten Proteine

Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in PBST-Puffer mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern mit der in Tabelle 3-1 angegebenen Verdünnung in PBST-Puffer mit 5% Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem Waschen in PBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 3-2) für 1 h in PBST-Puffer bei Raumtemperatur an. Die so markierten Proteine wurden nach 3-maligem Waschen in PBST-Puffer durch eine Meerrettichperoxidase katalysierte Chemilumineszenzreaktion detektiert. Hierfür wurde das ECL *„Advanced Western-Blot Detection“* System verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte im LAS-3000 Scanner (FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, D).

Strippen vom *Western-blot*

Um gebundene Antikörper von der Membran zu lösen, wurde der *Western-blot* mit einem detergenzhaltigen Strippingpuffer (Abschnitt 3.1.6) für 30 bis 40 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBST und erneutem Blockieren über Nacht konnte der Blot erneut über Antikörper gefärbt werden.

3.2.2.2 *Dot-blot*

Der *dot-blot* ähnelt einem *Western-blot*, nur wird hier auf eine vorherige Elektrophorese verzichtet. Eine positiv geladene Nylonmembran wurde in die *dot-blot* Apparatur gespannt und diese dann an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Für die Untersuchung wurden jeweils 200-500 µl Überstand pro Probe geblottet. Die Membran wurde daraufhin aus der Apparatur gelöst und in Syndekan-Puffer (Abschnitt 3.1.6) gewaschen, bevor sie für 1 h in PBS mit 0,1% Tween, 3% Magermilchpulver und 2% BSA abgesättigt wurde.
Nach dem Blocken wurde die Membran mit der Primärantikörperlösung (siehe Tabelle 3.1) in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt.
Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min in PBS mit 0,1% Tween folgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 3.2). Danach wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min in PBS mit 0,1% Tween gewaschen. Die auf diese Weise markierten Proteine wurden wie für den *Western-blot* beschrieben detektiert.

3.2.2.3 *Muriner JAM-A Sandwich Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA)

Für den Proteinnachweis von murinem JAM-A wurde ein Sandwich-ELISA mit zwei verschiedenen, gegen JAM-A gerichteten Antiseren der Firma R&D verwendet. Eine 96-*well*-ELISA-Platte wurde über Nacht mit 0,8 µg/ml des monoklonalen *capture* Antikörpers gegen murines JAM-A beschichtet. Zum Blockieren der Plastikoberfläche, an die kein Antikörper gebunden hat, wurde eine 2%ige BSA-Lösung in PBS verwendet und die Platte für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des zu untersuchenden Maus-Serums und zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das an den *capture* Antikörper gebundene JAM-A mit einem zweiten Biotin-gekoppelten monoklonalen Detektionsantikörper (100 ng/ml) gegen JAM-A markiert. Dieser wurde im nächsten Schritt von einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (POD) gebunden. Durch Zugabe eines POD-Substrates wurde die Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität mit der JAM-A-Konzentration in den Proben korreliert. Die Reaktion wurde nach ca. 20 min durch Zugabe einer 1,8 M Schwefelsäure-Lösung abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer gemessen.

3.2.2.4 Deglykosylierung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 6-*well*-Platten bis zu ca. 90% Konfluenz kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit auf 37°C vorgewärmtem, sterilem PBS wurde pro *well* 1 ml serumfreies Medium zugegeben und die Zellen für 16 h kultiviert. Die Zellüberstände wurden abgenommen und zur Entfernung von Zelldebris zentrifugiert. Anschließend fand eine Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugations-Einheiten (VivaSpin, 5000 MWCO, 13000 x g, ca. 45 min) um das ca. 50-fache statt. Die so erhaltenen Proben wurden in der 5-fachen Menge Deglykosylierungs-Puffer (Abschnitt 3.1.6) verdünnt. Die Zellen wurden durch Abkratzen auf Eis mit 0,5 ml kaltem PBS abgelöst, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Deglykosylierungs-Puffer resuspendiert. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis wurde das Zelllysat 5 min bei 4°C mit 13000 x g gewonnen. Die Überstände und Zelllysate wurden dann mit 2 U/ml N-Glykosidase F versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse über den Nachweis von JAM-A im *Western-blot*.

3.2.3 Funktionelle Untersuchungen

3.2.3.1 Adhäsionsassay

Calceinfärbung

Die zu markierenden Zellen wurden in einer Konzentration von $2x10^6$ ml^{-1} in PBS mit 0,2% BSA aufgenommen. Pro Milliliter Zellsuspension wurden 2 µg Calcein-Acetoxymethylester zugegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C im Wasserbad im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (300 x g für 5 min) und für den Adhäsionsassay in DMEM aufgenommen.

Statischer Adhäsionsassay

Die zu untersuchenden Zellen (ECV304 oder HUVEC) wurden in 24-*well*-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. HUVEC-Zellen wurden vor dem Experiment für 24 h mit 10 ng/ml TNF-α/IFN-γ inkubiert, um die Expression proinflammatorischer Proteine zu stimulieren. Nach einmaligem Waschen mit auf 37°C vorgewärmtem, sterilem PBS wurden pro *well* $5x10^5$ Calcein-AM-markierte Neutrophile in 250 µl DMEM mit 2% BSA zugegeben und für 3 min bei 100 x g auf den Endothelzell-Monolayer zentrifugiert. Das Fluoreszenzsignal

wurde im Fluoreszenz-Platten-Reader vor und nach jedem Waschschritt mit 300 µl PBS bei einer Extinktionswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm bestimmt.

Adhäsion unter Flussbedingungen

Für die Bestimmung der Adhäsion unter Flussbedingungen wurden ECV304- oder HUVEC-Zellen in Flusskammern bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Vor dem Experiment wurden die HUVEC-Zellen mit eine Kombination von 10 ng/ml TNF-α/IFN-γ für 24 h inkubiert. Die Calcein-AM-markierten Leukozyten wurden in *flow adhesion*-Puffer (Abschnitt 3.1.6) auf $5x10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die Neutrophilen wurden mit sJAM-A.Fc (10 µg/ml) für 30 min vorinkubiert oder unbehandelt belassen. Die Flusskammer wurde an eine Spritzenpumpe angeschlossen und die HUVEC-Zellen für 3 min mit *flow adhesion*-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Leukozyten mit eine Flussrate von 2 dyne/min über die Zellen geleitet.

3.2.3.2 Transendotheliale Migration von Neutrophilen

Die Durchführung der Transmigrationsexperimente in vitro erfolgte mit Hilfe eines sogenannten Transwell-Systems. HUVEC-Zellen wurden auf Transwellfiltern mit einer Porengröße von 5 µm und einer Filterfläche von 0,33 cm^2 in einer 24-*well*-Platte ausgesät und bis zur 100%igen Konfluenz in Kultur gehalten. Die Transwellfilter wurden zuvor mit einer Kollagenlösung G (40 µg/ml) in PBS für 30 min bei 37°C beschichtet. Auf die beschichteten Transwellfilter wurden $1x10^4$ Zellen in 100 µl Medium ausgesät. Zur Kultivierung der Zellen wurde 500 µl EGM-Medium in die untere Kammer gegeben und die Zellen unter Standardbedingungen für 48 h kultiviert. Nach den ersten 24 h der Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Transwellfilter in eine neu 24-*well*-Platte transferiert wurden.

Im Anschluss wurden 500 µl/w*ell* DMEM mit 0,2% BSA mit oder ohne IL-8 (10 µg/ml) in einer leeren 24-*well*-Platte vorgelegt. Die Transwellfilter mit den HUVEC-Zelllayern wurden luftblasenfrei in die *well*s gesetzt und mit 100 µl Leukozyten-Zellsuspension ($2x10^6$ Zellen/ml) befüllt. Nach Ablauf einer Inkubation von 30 bis 45 min im Brutschrank wurde die Migrationsrate mikroskopisch abgeschätzt. Zum Beenden der Transmigration wurden die Transwellfilter mit den HUVEC-Zellen und den noch enthaltenden, nicht gewanderten Neutrophilen herausgenommen und dabei die Unterseite der Filter leicht am Rand abgestreift. Die migrierten Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt.

Permeabilitätsassay mit FITC-Dextran

Die Permeabilität von Zell-Zell-Kontakten wurde über die Diffusion des FITC-gekoppelten Dextran mit einem Molekulargewicht von 40 kDa durch einen konfluenten Monolayer bestimmt. Dazu wurden HUVEC-Zellen auf Transwellfiltern (5 µm) ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde vorsichtig von den Filtern abgenommen und 100 µl PBS mit 0,2% BSA mit 10 µl FITC-gekoppelte Dextran-Lösung (10 mg/ml) auf die Filter pipettiert. Dann wurde 500 µl PBS mit 0,2% BSA in die leeren 24-*well*-Platten gegeben und die Filter luftblasenfrei umgesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Filter aus der Vertiefung genommen und dabei leicht am Rand abgestreift. Das Medium aus dem unteren Kompartiment wurde resuspendiert und mit PBS 1:1 verdünnt. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gegen PBS gemessen. Als Referenzlösung diente 100 µl FITC-gekoppelte Dextran-Lösung (1 mg/ml) in 500 µl PBS, deren Extinktion die maximal mögliche Diffusion wiedergab.

3.2.3.3 *In Vitro* Wundheilungsassay (*scratch-assay*)

Um die migratorischen Fähigkeiten von Zellen zu untersuchen, wurde ein sogenannter *scratch-assay* durchgeführt. Dieser Assay stellt eine etablierte *in vitro* Methode dar, um die Zellmigration während der Wundheilung zu testen.

$2{,}5 \times 10^5$ Zellen wurden in eine Vertiefung einer 6-*well*-Platte ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. In den Zellrasen wurde mit einer 100 µl Pipettenspitze drei Kratzer pro *well* gezogen, die den Wundbereich bilden. Zum Entfernen der abgekratzten Zellen wurde mit PBS gewaschen und 2 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Die Einwanderung der Zellen in diesen zellfreien Bereich wurde nach 0, 8, 16 und 24 h mikroskopisch und durch Aufnahmen von Digitalbildern dokumentiert.

3.2.3.4 Proliferations-Assay

Die Proliferationskapazität der verschieden transfizierten A549-Zellen (shRNA-Kontrolle, Syndekan-4-shRNA) wurde mit Hilfe des XCelligence System der Firma Roche bestimmt. In einer 96-*well*-Platte wurden die Zellen in einer Dichte von 1000, 2500 und 5000 Zellen/*well* jeweils als Triplets ausgesät und für einige Stunden mit 10% FCS anhaften gelassen. Anschließend wurde das Medium gegen Medium ohne FCS ausgetauscht und die Zellen darin für ca. 12 h belassen. Die Zellen wurden dann in

Medium mit 10% FCS für 24 bis 72 h inkubiert. Während der gesamten Zeit wurde die Proliferation über die RTCA Software 1.1 (Roche, Mannheim, D) verfolgt.

3.2.3.5 Behandlung der explantierten Mausaorta mit Zytokinen

15 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse (n=3 pro Gruppe) wurden mit Ketamin/Xylazin (27 mg/kg und 430 mg/kg) narkotisiert und durch transzervikale Dislokation euthanasiert. Die Aorten wurden aus der Maus präpariert und in PBS unter dem Binokular von dem umgebenden Fettgewebe befreit. Die gesäuberte Aorta (ca. 20 µg) wurde für 16 h mit murinem TNF-α und IFN-γ (je 10 ng/ml) in 1 ml DMEM in An- und Abwesenheit des Metalloprotease-Inhibitors GW280264X (10 µM) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Der Gehalt an JAM-A im Überstand wurde mittels eines murinen JAM.A-ELISA bestimmt. Die Aorten wurden lysiert und die ADAM10/17 Aktivität mit Hilfe des *α-Secretase-Activity* Kits analysiert. Dabei wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren.

3.2.3.6 Systemische Behandlung der Mäuse mit Zytokinen

Männliche C57BL/6 Mäuse (22 Wochen alt, n=3 pro Gruppe) wurden intravenös mit einer Kombination aus murinem TNF-α (50 ng/g) und murinem IFN-γ (40 ng/g) in 150 µl steriler 0,9% NaCl Lösung oder als Kontrolle mit der 0,9% NaCl Lösung behandelt. Die intravenöse Injektion erfolgte bei den Mäusen in die Schwanzvene. Nach 2,5 h wurden die Tiere narkotisiert (27 mg/kg Ketamin und 430 mg/kg Xylazin) und das Blut aus dem Herz abgenommen. Dafür wurde die Kanüle in der Medianlinie unmittelbar hinter dem Brustbein eingeführt. Um das Serum zu erhalten, folgte eine Zentrifugation über 1 h bei 500 x g. Die JAM-A-Konzentration im Serum wurde über den murinen JAM-A-ELISA bestimmt.

3.2.3.7 Nasale Applikation von Flüssigkeiten

Um den lokalen Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren in der Lunge zu untersuchen, wurden die Mäuse (C57BL/6, Weibchen, 20-25 g, 9-10 Wochen alt, n=3 pro Gruppe) über die Nase mit einer physiologischen Kochsalzlösung, in der die Inhibitoren gelöst waren, behandelt. Zur Minimierung des Hustenreflexes wurden die Mäuse intraperitoneal mit Ketamin/Xylazin (27 mg/kg und 430 mg/kg) anästhesiert. Mit einer Pipette wurden je 25 µl Flüssigkeit alternierend auf die Nasenlöcher der Maus gegeben. Die Flüssigkeit

wurde vollständig in die Lunge aspiriert. Nach 4 h wurden die Mäuse mittels einer Überdosis Narkosemittel euthanasiert und eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt.

3.2.3.8 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage stellt eine verbreitete Methode zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus den Bronchiolen und den terminalen Alveolen von Mäusen dar, durch die mittels Spülung der Lunge Zellen und lösliche Bestandteile aus dem Respirationstrakt zugänglich gemacht werden. Die Mäuse (siehe Abschnitt 3.2.3.7) wurden durch eine Überdosis Ketamin/Xylazin euthanasiert. Um eine sichere und kontrollierte Durchführung der BAL zu ermöglichen, wurde die Lunge freigelegt und die Trachea dargestellt. Eine Kanüle wurde bis vor die Bifurkation in die geöffnete Trachea eingeführt und 1 ml PBS langsam in die Lunge injiziert. Nach drei- bis viermaligem langsamen Aspirieren wurde die Lösung möglichst vollständig entnommen und auf Eis aufbewahrt. Die auf diese Art gewonnene BAL-Lösung wurde zentrifugiert (13000 x g, 30 min, 4°C) um die Zellen zu entfernen. Die zellfreie BAL-Lösung wurde bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Nach der Lavage wurden die Lungen entnommen und für spätere Untersuchungen schnell mit flüssigem Stickstoff gekühlt und bei -80°C gelagert.

3.2.3.9 Air pouch

Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. O. Söhnlein am Karolinska Institut, Schweden, durchgeführt [Koenen *et al*., 2009; Soehnlein *et al*., 2008].

3.2.3.10 Isoliert perfundierte Lunge

Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. C. Martin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, UK Aachen, durchgeführt [Pruessmeyer et al., 2010; Held und Uhlig, 2000].

3.2.3.11 ADAM17-Aktivitäts-Assay

Für die Bestimmung der ADAM10/17-Aktivität wurden die Lysate von kultivierten Zellen (10^5 Zellen), Lungengewebe (ca. 30 µg) oder von Mausaorten (ca. 20 µg) mit Hilfe das *α-Secretase-Activity* Kits von R&D Systems analysiert. Hierbei wurde nach den Angaben

des Herstellers verfahren. Zur Quantifizierung der Enzymaktivität wurde eine serielle Standardverdünnung der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 genutzt.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Bakterienkultur

Um DNA-Fragmente oder ganze Gene in großem Maßstab zu amplifizieren, macht man sich die Eigenschaften mancher Bakterienarten zunutze, extrazelluläre DNA aufzunehmen (Transformation) und DNA in Form extrachromosomaler, zirkulärer Plasmide zu propagieren. Führt man das gewünschte Gen(fragment) in einen Plasmidvektor ein, der einen durch das Bakterium erkennbaren Replikationsursprung (*ori*) enthält, so kann dieser in das Bakterium transformiert und von diesem propagiert werden. Kodiert ein Abschnitt des Plasmidvektors noch zusätzlich für eine Antibiotikaresistenz, so können erfolgreich transformierte Bakterien in einem Wachstumsmedium selektiert werden. Eine Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin. Bakterien wurden auf Agarplatten bei 37°C im Wärmeschrank oder als Flüssigkultur im Schüttelinkubator bei 37°C und 150 rpm angezogen. Zur langfristigen Lagerung bei -80°C wurden die Bakterien einer frischen Flüssigkultur in Einfriermedium (25% Glycerol in LB-Medium) resuspendiert und schockgefroren.

3.2.4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien (Hitzeschock)

Für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien der Stämme *Escherichia coli* TOP 10 mit Plasmid-DNA wurden diese auf Eis aufgetaut und für 1 h mit 1 bis 10 ng Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Es schloss sich der Hitzeschock für 40 sek bei 42°C im Thermoblock an. Die folgenden 5 min auf Eis dienten der Aufnahme des Vektorplasmides. Um den Zellen den Aufbau der Antibiotikaresistenz (Expression des Resistenz-Gens auf dem Vektor) zu ermöglichen, erfolgte eine Inkubationszeit von einer Stunde in 250 µl antibiotikafreiem SOC-Medium bei 37°C. Im Anschluss wurden 100 µl der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten, welche mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt wurden, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Kultivierung einzelner Bakterienklone wurden diese von der entsprechenden Agarplatte gepickt und für eine Minipräparation in 5 ml bzw. für eine Maxipräparation in 300 ml mit Ampicillin versetztem LB-Medium bei 37°C über Nacht aerob kultiviert. Die

transformierten Bakterien mit dem entsprechenden *Insert* wurden zur dauerhaften Lagerung mit 25% Glycerol bei -80°C in Kryoröhrchen aufbewahrt.

3.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation, Maxipräparation)

Für die Minipräparation der entsprechenden Plasmid-DNA wurde die 5 ml Bakterienkultur mit dem Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel, Düren,D) aufgereinigt und die Plasmid-DNA in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.
Aus 300 ml der Übernachtkultur wurde mit dem Plasmid Maxiprep Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) die Plasmid-DNA aufgereinigt und in 300 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2.4.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem charakteristischen Absorptionsmaximum der DNA, photometrisch bestimmt. Um eine Verunreinigung durch Proteine festzustellen, erfolgte außerdem eine Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Reine DNA hat ein Verhältnis $E_{260/280}$ von 1,7 bis 1,9. Für die Berechnung der DNA wurde zugrunde gelegt, dass ~50 µg doppelsträngiger DNA/ml eine Absorption von 1 aufweisen. Die Konzentration berechnet sich wie folgt:
E_{260} x (50 µg/1000 µl) = µg DNA/µl

3.2.4.5 Klonierung von hSyndekan1_2Z-His und hSyndekan4_2Z-His

Um DNA-Fragmente miteinander zu verknüpfen und in einen Vektor einzuführen, müssen kompatible Enden erzeugt, bzw. Plasmide linearisiert werden. Für die Klonierungen wurden entweder PCR-Fragmente mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen oder vorhandene Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in Vektorkonstrukten genutzt.
Zur Herstellung der cDNA-Konstrukte wurde eine präparative PCR mit einer DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-DNA-Polymerase) durchgeführt. Die Konstrukte hSyndekan1_2Z-His und hSyndekan4_2Z-His sind Fusionsproteine aus den vollständigen

Formen der transmembranen Proteine ohne Stopp-Codon, zwei C-terminal identischen Wiederholungen der IgG-bindenden Domäne des Protein A (Z-Domäne) aus *Staphylococcus aureus* und einer 6X His-Markierung [Eggert *et al.*, 2004; Weidemann *et al.*, 2002]. Die Markierung erlaubt eine Detektion der Proteine mit einem beliebigen Antiserum, welches über den Fc-Teil der Antikörper an die Z-Domäne bindet. Außerdem werden die C-terminalem Fragmente, welche nach der proteolytischen Prozessierung der Syndekane entstehen, im *Western-blot* sichtbar gemacht werden. Um die Konstrukte herzustellen, wurden die cDNAs von humanem Syndekan-1 und -4 mit einer präparativen PCR amplifiziert. Über die PCR wurden zwei Restriktionsschnittstellen (*Kpn*I und *Not*I) an die Produkte angefügt und das Stopp-Codon entfernt. Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und in den Expressionsvektor 2Z-His-pcDNA 3.1 (+) kloniert. Die einzelnen Schritte sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

DNA-Amplifikation über die Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können klar definierte DNA Bereiche *in vitro* amplifiziert werden. Hierbei wird der Sequenzabschnitt durch kurze Oligonukleotide, den sogenannten *primer*, abgegrenzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für die Herstellung eines 2Z-His-Tag an Syndekan-1 und -4 angewendet. Aufgrund ihrer 3´-5´-Exonukleaseaktivität wurde für PCR-Produkte, die in Klonierungsreaktionen weiter Verwendung fanden, die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet (Tabelle 3-7). Außerdem wurde die PCR-Reaktion zur Charakterisierung von Bakterienkolonien bzw. positiven Klonen nach einer Transformation verwendet, wofür die *Taq*-Polymerase verwendet wurde.

Die PCR basiert auf drei Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (*Template*) in Einzelstränge
2. Bindung von Oligonukleotidprimern an beide Einzelstränge (*Annealing*)
3. Synthese der DNA durch die Polymerase ausgehend von den gebundenen Primern (*Extension*)

Tabelle 3-7: Standardzusammensetzung für die PCR-Ansätze

Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
10x PCR-Puffer mit $MgCl_2$	5 µl
dNTPs (5 mM)	1 µl
Taq-Polymerase (2,5 u/µl) bzw. *Pfu*-Polymerase (2,5 u/µl)	0,5 µl
H_2O	32,5 µl
Plasmid (20-30 ng/µl)	≈1 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Tabelle 3-8: Standard PCR-Temperaturprogramm. Die Dauer der Elongationsphase richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA. Dabei wird davon ausgegangen, dass die *Pfu*-Polymerase ca. 0,5 kb/min amplifiziert und die *Taq*-Polymerase 1 kb/min.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	94°C	5 min	1x
2	94°C	30 sek	35x
3	56°C	30 sek	
4	72°C	2,5 min	
5	72°C	5 min	1x
6	10°C	∞	

Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit 1-2%igen Agarosegelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer als Laufmittel. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose unter Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und mit 1%iger Ethidiumbromid-Lösung in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml versetzt. Die Auftrennung wurde für ca. 30 min bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Im Fall, dass die Fragmente nicht weiterverwendet werden sollten, wurden die Gele mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Gel Jet Imager (INTAS, Brüssel, B) fotografiert und die Fotos ausgewertet.

Sollte mit der DNA weitergearbeitet werden, wurde das entsprechende Fragment zum Schutz vor Mutationen aus dem Gel entfernt, bevor das restliche Gel zur Auswertung fotografiert wurde. Nach der Agarosegelelektrophorese erfolgte die Extraktion der Fragmente mit Hilfe des Gelextraktionskits.

Restriktionsverdau der PCR-Fragmente

Zum Klonieren eines DNA-Fragments nach einer PCR mit Oligonukleotiden, die über eine Restriktionsschnittstelle verfügen und um das DNA-Fragment in einen Vektor umzuklonieren, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren kurze, definierte Nukleotidsequenzen der DNA. Die Restriktionsverdaus wurden unter den vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Über die PCR wurden zwei Restriktionsschnittstellen (*Kpn*I und *Not*I) an die Syndekan PCR-Produkte angefügt. Mit dem entsprechenden Puffer wurden die Plasmid-DNA (2Z-His-pcDNA 3.1 (+)) und die PCR-Produkte für 2 h bei 37°C mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Kpn*I und *Not*I inkubiert und anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert.

Ligation

Im Anschluss an die Restriktion erfolgte die Ligation der PCR-Fragment und Vektor im molaren Verhältnis von 5:1 mit der T4 DNA Ligase. Dabei wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren und der Ansatz bei 17°C über Nacht inkubiert.

3.2.4.6 Klonierung der shRNA Vektoren

Die Klonierung der shRNA Vektoren für ADAM10 und ADAM17 wurden von Herrn Martin Hess durchgeführt [Pruessmeyer *et al.*, 2009]. Die shRNA Konstrukte für Syndekan-4 wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Sven Schmidt hergestellt.

3.2.4.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe und reverse Transkription

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy Kit (Quiagen, Hilden, D) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Eluiert wurde die Gesamt-RNA mit 30 µl DEPC-Wasser. Für eine Amplifikation mittels PCR ist es notwendig, RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Hierzu wurden 1 µg RNA eingesetzt und

das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St Leon-Rot, D) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.2.4.8 Quantitative Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der Expression bestimmter Gene wurde die Gesamt-RNA (cDNA) aus den zu untersuchenden, entsprechend vorbehandelten Zellen und Geweben isoliert. Für jede Probe wurde als Kontrolle nicht revers transkribierte RNA analysiert, um Verunreinigungen durch genomische DNA während der RNA-Isolation auszuschließen. Die cDNA wurde auf JAM-A, Syndekan-1, Syndekan-4, ADAM10 und ADAM17 Expression untersucht. Als Kontrolle diente die Analyse der Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die RT-PCR wurde in 96-*well*-Platten in 3-fach-Werten durchgeführt. Es wurden 1 µl cDNA, 10 µl LightCycler SYBR Green I MasterMix (Roche), 0,5 µM *forward* und *reverse* Primer in einem Gesamtvolumen von 20 µl analysiert. Für die mRNA-Quantifizierung wurden die C_T-Werte ermittelt, der sich aus der Differenz von $C_{T\,Gen}$-$C_{T\,GAPDH}$ berechnet.

Tabelle 3-9: PCR Programm für die qPCR am LightCycler480 (Roche)

Programm	Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Vorinkubation	1	94°C	10 min	1x
Amplifizierung	2	95°C	10 sek	40x
	3	55°C	30 sek	
	4	72°C	15 sek	
Schmelzkurve	5	95°C	5 sec	1x
	6	65°C	1 min	
	7	65°C - 97°C	0,1°C/sec	

3.2.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und einem Bonferroni Post-Hoc-Test statistisch analysiert. Zwei Populationen von Daten wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag (p-Wert < 0,05). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern (*) oder einer Raute (#) gekennzeichnet. Bei allen Versuchen wurde die Standardabweichung (SD) bestimmt. Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad inc, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

I. JAM-A

4.1 Konstitutive Freisetzung von löslichem JAM-A

Das transmembrane Adhäsionsmolekül JAM-A wird auf Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob neben dem membran-assoziierten JAM-A auch eine lösliche Variante von JAM-A existiert. Hierzu wurden Zellen der Linie HEK293 und primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC), die wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben isoliert und in Kultur genommen wurden, verwendet und sowohl Zelllysate als auch konditioniertes Medium mittels SDS-PAGE und anschließendem *Western-blot* auf das Vorkommen von JAM-A untersucht.

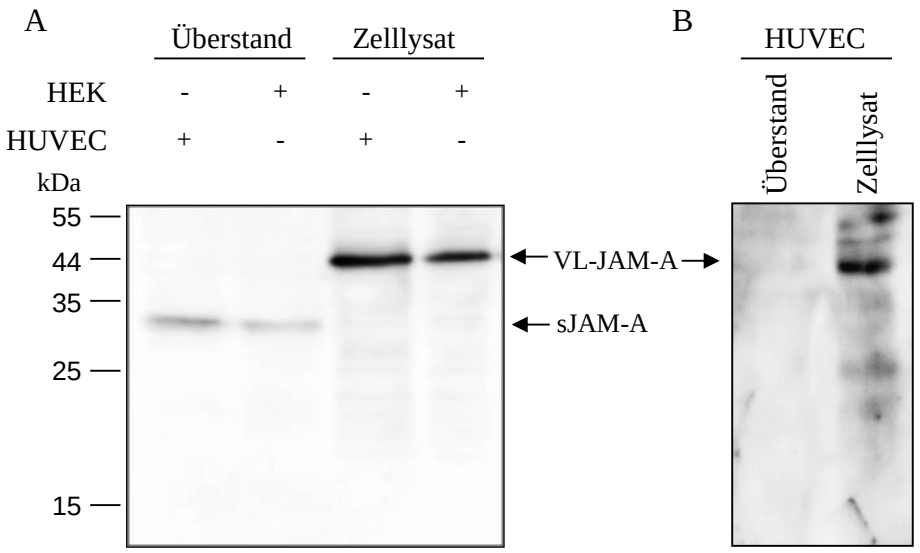


Abbildung 4-1: Nachweis von JAM-A in primären humanen Endothelzellen und HEK293-Zellen. Konfluente HUVEC- und HEK293-Zellen wurden für 8 h in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Die Zelllysate und die einkonzentrierten Überstände wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blot* mit einem monoklonalen Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Ig-Domäne des JAM-A **(A)** oder mit einem Antikörper gegen die C-terminale intrazelluläre JAM-A Domäne **(B)** untersucht.

In den Zelllysaten von HUVEC- und HEK293-Zellen konnte das membrangebundenen Voll-Längenprotein (VL)-JAM-A bei ca. 42 kDa mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre N-terminale Ig-Domäne des JAM-A nachgewiesen werden. Im Zellkulturüberstand wurde dagegen von diesem Antikörper eine kleinere lösliche Variante

bei ca. 30 kDa (sJAM-A) detektiert (Abb. 4-1 A). Mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre C-terminale Domäne konnte lediglich das VL-JAM-A im Zelllysat jedoch nicht das lösliche JAM-A im Medium nachgewiesen werden (Abb. 4-1 B). Diese Ergebnisse deuten auf ein verkürztes lösliches N-terminales JAM-A-Fragment im Überstand hin.

JAM-A besitzt potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Aminosäurepositionen Asn185 und Asn191 in der zweiten extrazellulären Ig-Domäne. Um ausschließen zu können, dass es sich bei den beiden JAM-A Varianten im *Western-blot* um unterschiedlich glykosylierte Formen handelt, wurde ein Verdau mit N-Glykosidase-F durchgeführt. Die anschließende Analyse mittels *Western-blot* ergab, dass die Enzymbehandlung sowohl beim VL-JAM-A als auch beim sJAM-A die Proteingröße um ca. 5 kDa reduzierte (Abb. 4-2). Demnach handelt es sich bei den unterschiedlich großen JAM-A Formen im Zelllysat und im Medium nicht um Varianten mit unterschiedlichem Ausmaß an Glykosylierung, sondern vielmehr um Varianten mit unterschiedlichem Proteinanteil.

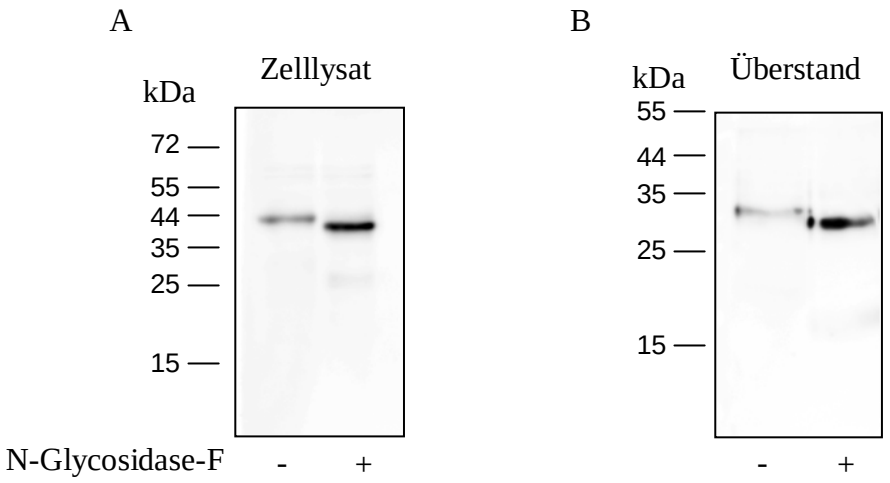


Abbildung 4-2: Deglykosylierung von JAM-A in HUVEC-Zellen. Zelllysat und serumfreier Zellkulturüberstand von HUVEC-Zellen wurde für 2 h bei 37°C mit 2 U/ml N-Glycosidase-F behandelt. Anschließend wurden das VL-JAM-A im Zelllysat **(A)** und sJAM-A im Zellkulturüberstand **(B)** im *Western-blot* unter reduzierenden Bedingungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre JAM-A Domäne nachgewiesen.

4.2 Induzierbares *Shedding* von JAM-A

Die beschriebenen Experimente haben ergeben, dass eine lösliche Form von JAM-A in den Kulturüberstand abgegeben wird. Der Proteinanteil der löslichen Form von JAM-A ist

gegenüber der transmembranen Form deutlich vermindert. Daher wurde vermutet, dass lösliches JAM-A durch limitierte Proteolyse von transmembranem JAM-A auf der Zelloberfläche entsteht. Diese proteolytische Abspaltung der Ektodomäne wird auch als *Shedding* bezeichnet.

Mit den im Folgenden beschriebenen Experimenten sollte der Mechanismus, der zur Entstehung von löslichem JAM-A führt, näher untersucht werden. Obwohl die Spaltungssequenzen transmembraner Moleküle nicht konserviert sind, gibt es inzwischen Hinweise, dass die Abspaltung der Ektodomäne auf gemeinsamen Wirkmechanismen beruht. Hierbei ist der Phorbolester Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC), ein häufig verwendeter *Shedding*-Induktor.
Da viele Membranproteine sowohl konstitutiv als auch infolge einer Aktivierung proteolytisch geschnitten werden, wurde der Einfluss von verschiedenen Stimuli auf die JAM-A-Prozessierung überprüft. Dafür wurden HUVEC- und HEK293-Zellen für einen definierten Zeitraum in An- und Abwesenheit von verschiedenen Stimulantien inkubiert und die Auswirkungen auf den Gehalt an löslichem JAM-A im *Western-blot* untersucht.
Die Zellen wurden in einem ersten Versuch über 2 h mit PMA behandelt. Dabei zeigte sich gegenüber der DMSO-Kontrolle eine Zunahme des 30 kDa großen löslichen N-terminalen Fragmentes im Zellkulturüberstand (Abb.4-3). Um die Menge des in den Kulturüberstand abgegebenen JAM-A abzuschätzen, wurde eine Standardverdünnung von rekombinantem sJAM-A im *Western-blot* aufgetragen. Die PMA-Stimulation führte zu einer Verdreifachung von ca. 5 ng/ml auf 15 ng/ml sJAM-A im Überstand der HUVEC-Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 4-3).

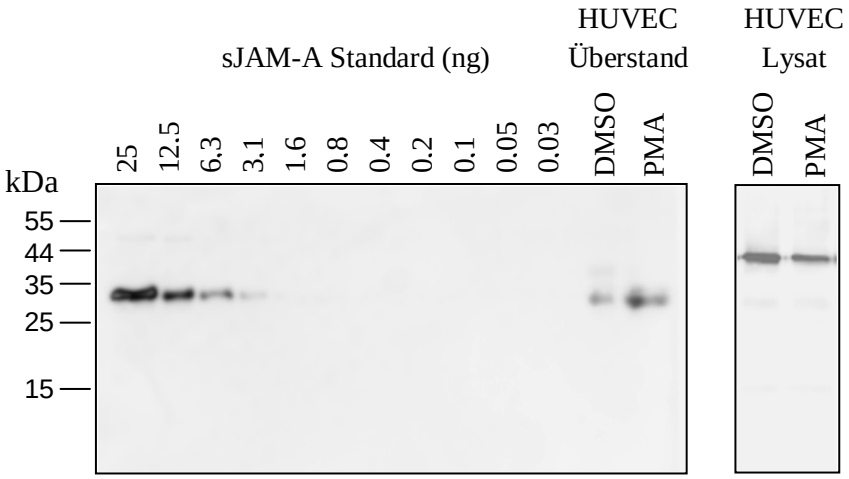


Abbildung 4-3: Freisetzung von JAM-A in primären humanen Endothelzellen. HUVEC-Zellen wurden für 2 h mit PMA (200 ng/ml) oder als Kontrolle mit DMSO in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert. Anschließend wurden die einkonzentrierten Zellkulturüberstände unter reduzierenden Bedingungen im *Western-blot* auf die Menge an löslichem JAM-A untersucht. Als Standard wurde eine serielle Verdünnung von rekombinantem monovalenten sJAM-A aufgetragen. Die Zelllysate wurden im *Western-blot* auf die Expression von VL-JAM-A untersucht.

Diese PMA-induzierte Freisetzung von sJAM-A in den Zellkulturüberstand korrelierte mit einer Abnahme der VL-JAM-A sowohl im Zelllysat (Abb. 4-3) als auch auf der Zelloberfläche (Abb. 4-4). Mittels durchflußzytometrischer Untersuchungen war es möglich, die Expression des membranständigen JAM-A auf der Zelloberfläche zu erfassen und die Veränderungen nach Stimulation mit PMA zu detektieren (Abb. 4-4). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte sich eine deutliche Reduktion des VL-JAM-A auf der Zelloberfläche nach der PMA-Behandlung.

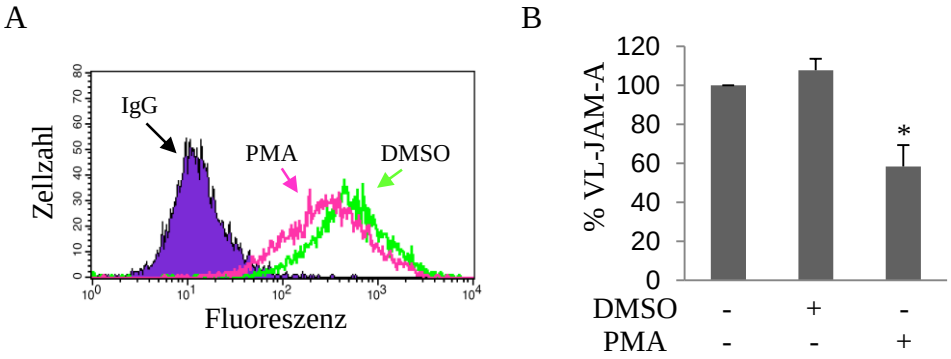


Abbildung 4-4: Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC-Zellen. Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von JAM-A wurden HUVEC-Zellen nach 2-stündiger PMA-Stimulation (200 ng/ml) geerntet. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Maus-anti-Human-JAM-A oder einer Isotypkontrolle inkubiert und nach der Markierung mit einem sekundären PE-konjugierten Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Der Nachweis mit dem anti-JAM-A Antikörper zeigte ein deutliches Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Isotypkontrolle. **(B)** Die quantitative Auswertung der geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität von drei unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung ergab eine signifikante Reduzierung (*) des Fluoreszenzsignals nach PMA Inkubation.

Hierdurch konnte die oben beschriebene *Western-blot-Analyse* der Zelllysate auf VL-JAM-A bestätigt werden.

Ionomycin vermittelt als Ionophor einen kurzfristigen Kalziumioneneinstrom in die Zelle und wird häufig zur Zellaktivierung verwendet. Die Behandlung mit diesem Reagenz zeigte jedoch keinen induzierenden Effekt auf das *Shedding* von JAM-A auf HUVEC- und HEK293-Zellen. Die quantitative Analyse der *Western-blot*-Signale mittels Densitometrie ergab, dass die PMA-Behandlung zu einer Verdoppelung der sJAM-A Konzentration im Zellkulturüberstand führte, während die Behandlung mit Ionomycin keinen Effekt zeigte (Abb. 4-5).

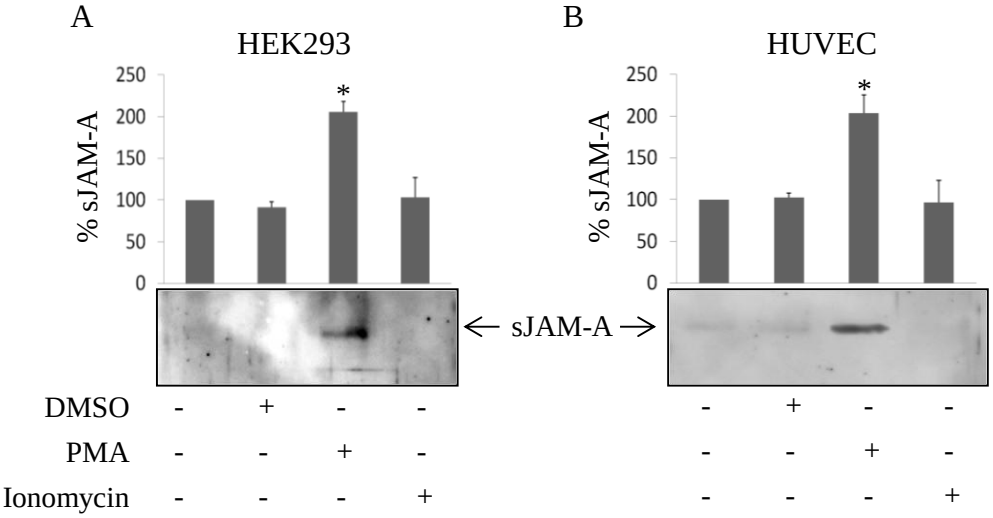


Abbildung 4-5: Freisetzung von löslichem JAM-A. (A) HEK293- und **(B)** HUVEC-Zellen wurden für 2 h mit PMA (200 ng/ml), 30 min mit Ionomycin (10 µM) oder als Kontrolle mit DMSO in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert. Anschließend wurden die einkonzentrierten Zellkulturüberstände unter reduzierenden Bedingungen im *Western-blot* auf die Menge an löslichem JAM-A untersucht. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer *Western-blot*. Die densitometrische Auswertung und die Standardabweichung beziehen sich auf vier unabhängige Versuche. *, $p<0,05$ gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Die Stimulation der Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ oder *Platelet activating factor* (PAF) führte ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme des löslichen JAM-A. Dieser Effekt war im Vergleich zum PMA-induzierten *Shedding* erst über einen längeren Zeitraum von 16 h deutlich zu erkennen (Abb. 4-6 A). Auch in diesem Fall korrelierte die Zunahme des sJAM-A im Zellkulturüberstand mit einer Abnahme des VL-JAM-A auf der Zelloberfläche (Abb. 4-6 B, C). Letztere Befunde deuten an, dass auch die Stimulation mit TNF-α/IFN-γ oder PAF den *Shedding*-Prozess verstärkt.

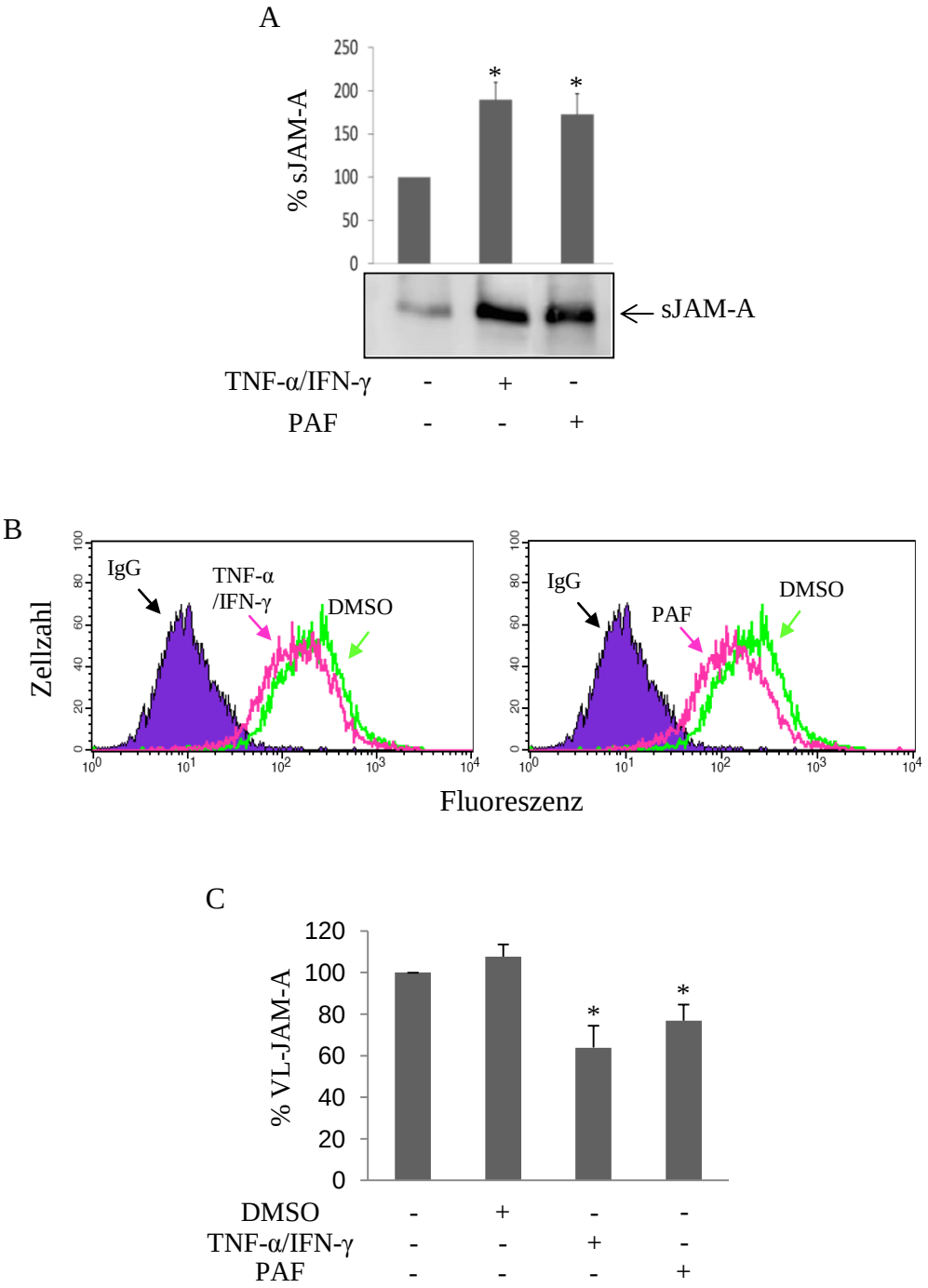


Abbildung 4-6: Das induzierte *Shedding* von JAM-A. HUVEC-Zellen wurden mit TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml), PAF (50 nM) oder als Kontrolle mit DMSO für 16 h in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert. **(A)** Anschließend wurden die einkonzentrierten Zellkulturüberstände auf die Menge an löslichem JAM-A untersucht. Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. **(B)** Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von JAM-A wurden die HUVEC-Zellen nach der Stimulation durchflusszytometrisch analysiert. **(C)** Die quantitative Auswertung der GeoMean Werte erfolgte von drei unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Die auf den Stimulationseffekt zurückzuführende Zunahme von sJAM-A wird, im Gegensatz zur konstitutiven Proteolyse der unstimulierten Zellen, als induziertes *Shedding* bezeichnet.

4.3 Metalloprotease vermitteltes *Shedding* von JAM-A

4.3.1 Konstitutives *Shedding* von JAM-A durch eine Metalloprotease

Es ist bekannt, dass viele membranständige Adhäsionsmoleküle wie z.B. VE-Cadherin durch Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen (ADAMs) prozessiert werden [Schulz *et al.*, 2008]. Um die Hypothese zu bestätigen, dass JAM-A durch eine Metalloprotease gespalten wird und um die Art der Metalloprotease weiter einzugrenzen, wurden Spaltungsversuche mit verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren durchgeführt. Um die Identität der am *Shedding* beteiligten Proteasen näher einzugrenzen, wurden dabei zwei ADAM-spezifische Inhibitoren eingesetzt: GI254023X, welches bevorzugt ADAM10 inhibiert, und GW280264X, welches ADAM10 und ADAM17 inhibiert [Ludwig *et al.*, 2005]. Diese bei GlaxoSmithKline (GSK) entwickelten Inhibitoren wirken durch eine Hydroxamat-Gruppe, welche an das Zinkion der katalytischen Domäne der Metalloproteasen bindet und so deren Aktivität hemmt.

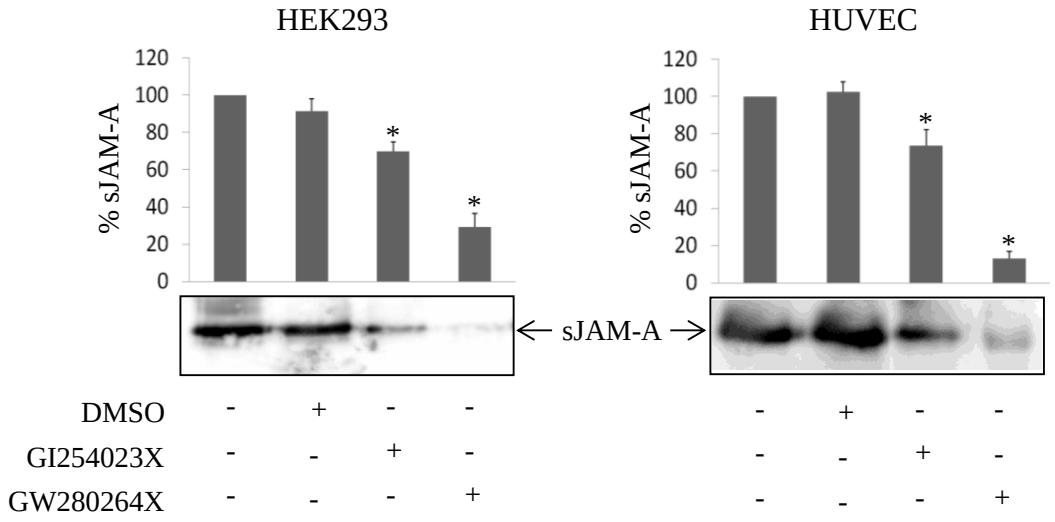


Abbildung 4-7: Das konstitutive *Shedding* von JAM-A wird durch Metalloprotease-Inhibitoren reduziert. HUVEC- und HEK293-Zellen wurden mit GI254023X (10 µM), GW280264X (10 µM) oder als Kontrolle mit DMSO für 16 h in serumfreien DMEM-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände einkonzentriert und im *Western-blot* unter reduzierenden Bedingungen auf den Gehalt an löslichem JAM-A untersucht. Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Es zeigte sich, dass die Vorbehandlung der HUVEC- und HEK293-Zellen mit den verwendeten ADAM-Inhibitoren in beiden Fällen zu einer Reduktion des löslichen JAM-A im Zellkulturüberstand bewirkte (Abb. 4-7).

Diese Ergebnisse sollten durch eine Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC- und HEK293-Zellen bestätigt werden. Wie in Abbildung 4-8 zu erkennen ist, führte die Behandlung der Zellen mit GW280264X zu einer Zunahme des transmembranen VL-JAM-A auf der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Metalloprotease ADAM17 maßgeblich an dem konstitutiven *Shedding* von JAM-A beteiligt ist, jedoch auch ADAM10 einen gewissen Einfluss auf die Spaltung von JAM-A besitzt.

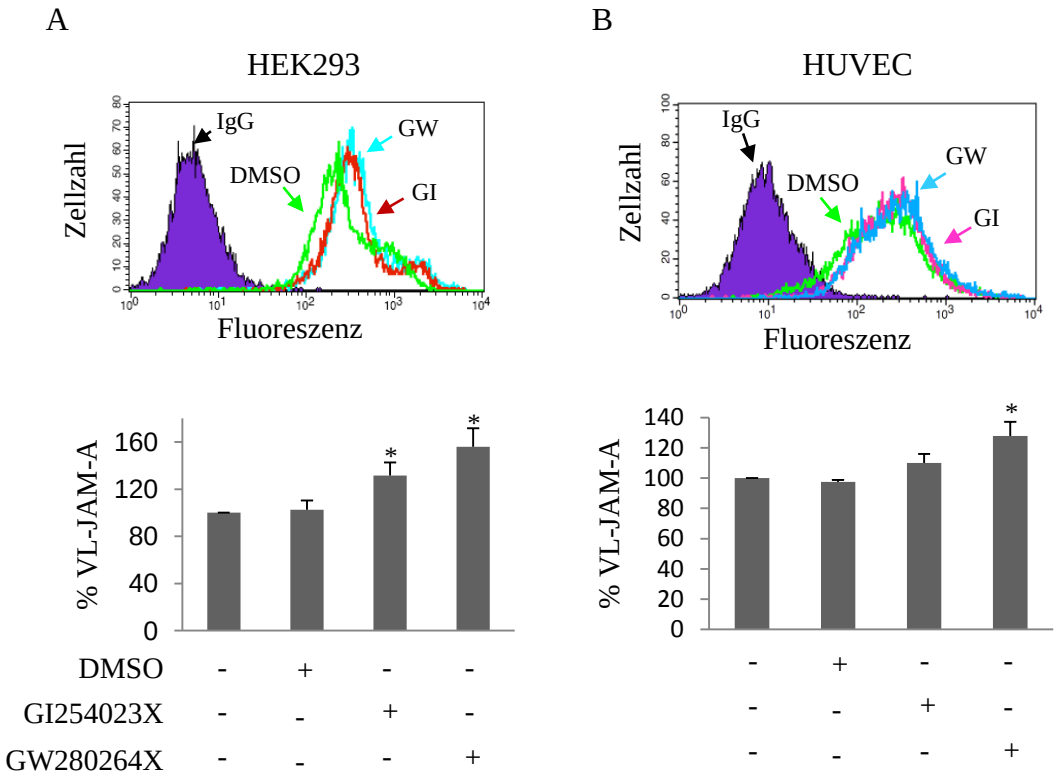


Abbildung 4-8: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren auf die Oberflächenexpression von JAM-A. Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von JAM-A wurden HUVEC- und HEK293-Zellen nach 16 h GI254023X (10 µM), GW280264X (10 µM) bzw. DMSO Stimulation geerntet und durchflusszytometrisch untersucht. Der Nachweis mit dem anti-JAM-A Antikörper zeigte ein deutliches Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Isotypkontrolle. Die quantitative Auswertung der GeoMean Werte wurde von drei unabhängigen durchflusszytometrischen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der DMSO Kontrolle.

4.3.2 Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM17 vermittelt das induzierbare *Shedding* von JAM-A

Um zu untersuchen, ob die ADAM-Metalloproteasen auch am induzierten *Shedding* beteiligt sind, wurde die Stimulation der Zellen in Gegenwart der Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X durchgeführt. Die Analyse der Zellkulturüberstände im *Western-blot* ergab, dass GW280264X nicht nur, wie oben beschrieben, das konstitutive *Shedding* inhibiert, sondern auch den stimulierenden Effekt von PMA aufhebt. Eine schwächere Inhibition des induzierten *Shedding* wurde mit GI254023X erzielt (Abb. 4-9).

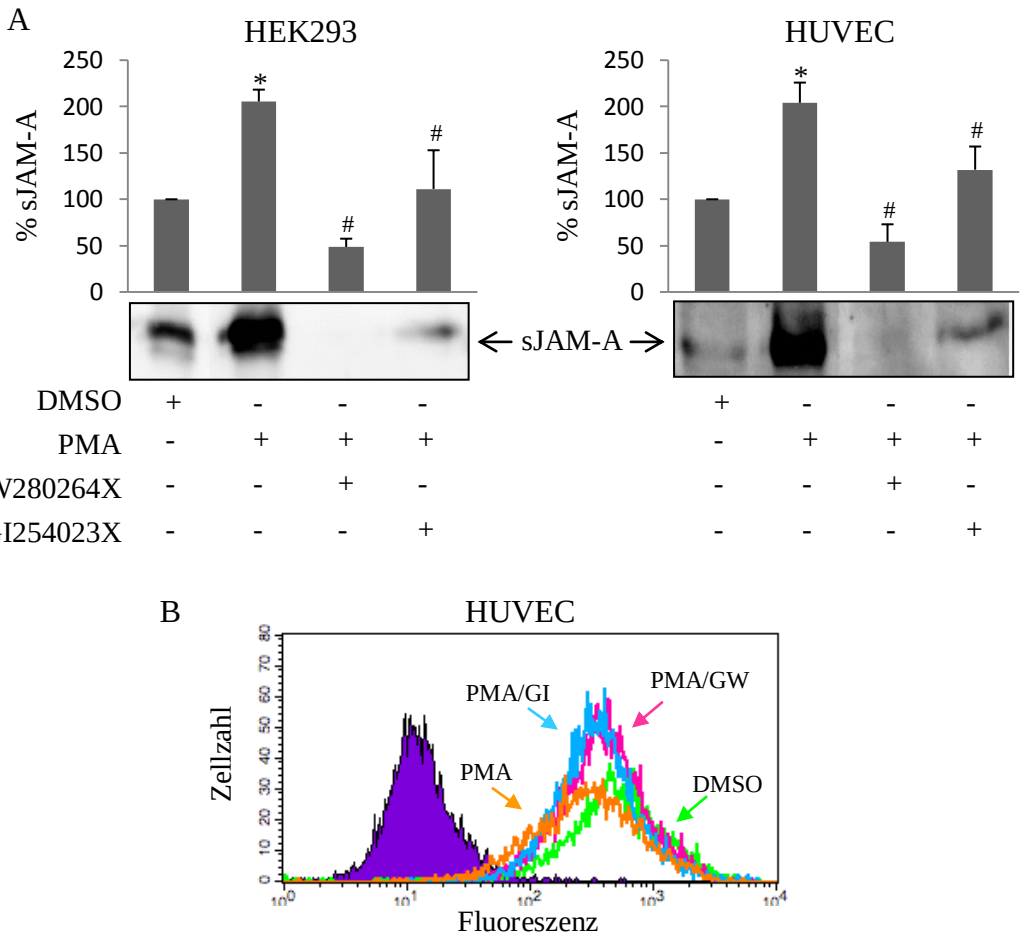


Abbildung 4-9: Das PMA-induzierte *Shedding* von JAM-A wird durch den ADAM17 Metalloprotease-Inhibitor reduziert. HEK293- und HUVEC-Zellen wurden über Nacht mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X (10 µM) bzw. mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X (10 µM) vorinkubiert oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen in frischem serumfeien Medium mit PMA (200 ng/ml) für 2 h in An- und Abwesenheit der Inhibitoren inkubiert. **(A)** Der Gehalt an sJAM-A wurde im *Western-blot* analysiert. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. #, $p<0,05$ gegenüber den PMA stimulierten Zellen. Zusätzlich wurde ein repräsentativer *Western-blot* abgebildet. **(B)** Zur Analyse der Oberflächenexpression des VL-JAM-A wurden die HUVEC-Zellen geerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

Der Einfluss der Inhibitoren auf das PMA-induzierte *Shedding* wurde mit Hilfe Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC-Zellen bestätigt. Ohne den Einsatz von Inhibitoren führte eine zweistündige Stimulation der Zellen mit PMA zu einer Reduktion der JAM-A-Expression auf der Zelloberfläche. Dieser Effekt konnte durch die Anwesenheit des kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitors abgeschwächt werden. Mit dem selektiven ADAM10-Inhibitor konnte dagegen nur ein geringer Effekt erzielt werden (Abb. 4-9, B).

Um die Frage zu beantworten, ob JAM-A auf HUVEC-Zellen unter physiologischen Bedingungen ähnlich reguliert wird, wurde das *Shedding* durch Kostimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ oder PAF über 24 h induziert und der Gehalt an sJAM-A im Kulturüberstand mittels *Western-blot* analysiert (Abb. 4-10). In den jeweiligen Versuchsansätzen wurden die Metalloprotease-Inhibitoren appliziert, um bei einer verstärkten Spaltung Rückschlüsse auf die verantwortliche Protease ziehen zu können. Dabei ergab sich, dass durch den ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X die induzierte Produktion von löslichem JAM-A durch die proinflammatorischen Zytokine und PAF, blockiert wurde.

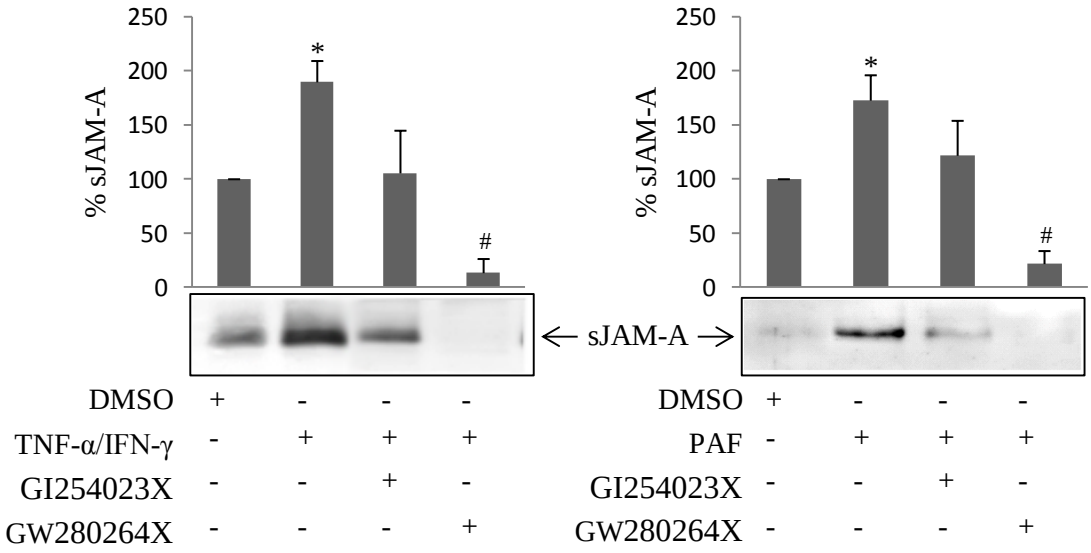


Abbildung 4-10: Das induzierte *Shedding* von JAM-A wird durch den ADAM17 Metalloprotease-Inhibitor reduziert. HUVEC-Zellen wurden mit TNF-α/IFN-γ (10 g/ml), PAF (50 nM) oder DMSO über Nacht (18 h) in An- und Abwesenheit des ADAM10-Inhibitors GI254023X (10 μM) oder des ADAM10/17-Inhibitors GW280264X (10 μM) inkubiert. Die einkonzentrierten Zelllysate wurden unter reduzierenden Bedingungen im *Western-blot* auf den Gehalt an löslichem JAM-A analysiert. Bei der densitometrischen Auswertung entspricht jeder Balken dem Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. #, $p<0,05$ gegenüber den stimulierten Zellen. Zusätzlich ist ein repräsentativer *Western-blot* dargestellt.

Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass ADAM17 sowohl für das konstitutive als auch für das induzierte *Shedding* von JAM-A verantwortlich ist.

4.3.3 Einfluss von rekombinanten ADAM17 auf die Proteolyse von JAM-A

Die vorhergehenden Versuche weisen auf eine Beteiligung der Disintegrin-ähnlichen Metalloprotease ADAM17 an der proteolytischen Prozessierung von JAM-A hin. In dem folgenden Experiment sollte geprüft werden, ob ADAM17 prinzipiell in der Lage ist JAM-A zu spalten. Hierzu wurde die rekombinant hergestellte katalytische Domäne von ADAM17 verwendet. Es zeigte sich, dass es nach der Behandlung von HEK293-Zellen mit der katalytischen Domäne von ADAM17 zu einer vermehrten Abgabe von löslichem JAM-A in den Kulturüberstand kam.

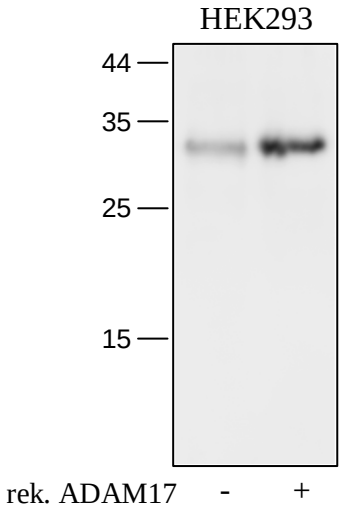


Abbildung 4-11: Rekombinantes ADAM17 führt zu einer erhöhten Proteolyse von JAM-A. HEK293-Zellen wurden für 3 h mit der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 bei 37°C in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert. Anschließend wurden die einkonzentrierten Zellüberstände im *Western-blot* auf den Gehalt an sJAM-A analysiert.

4.3.4 Verstärkung der konstitutiven Spaltung von JAM-A durch Überexpression von ADAM17

Durch die Überexpression von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen sollte nun der direkte Effekt einer verstärkten Expression der Proteasen auf das *Shedding* von JAM-A untersucht werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit einem Expressionsvektor für ADAM10, ADAM17 oder zur Kontrolle mit dem Leervektor transfiziert und die

Konzentrationen des löslichen JAM-A im serumfreien Zellüberstand mittels *Western-blot* bestimmt.

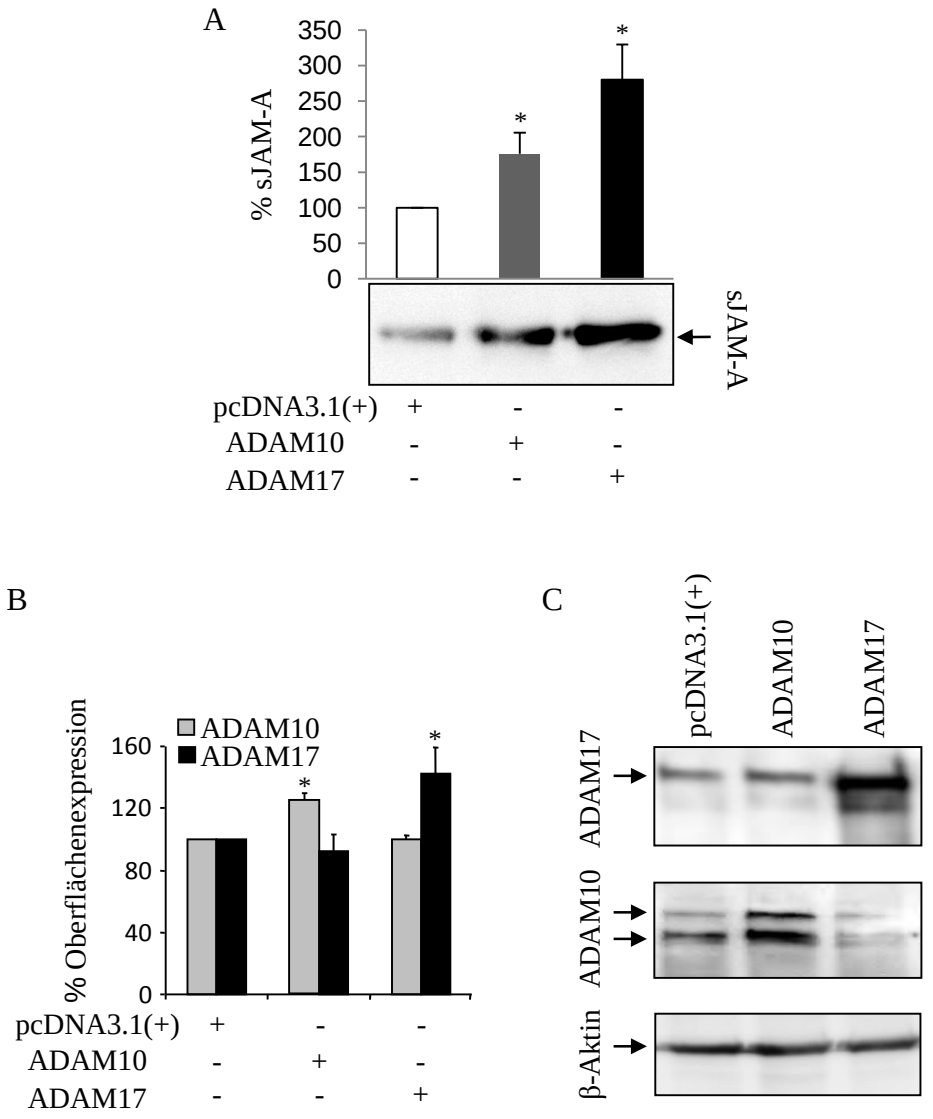


Abbildung 4-12: Überexpression von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für ADAM10, ADAM17 oder dem pcDNA3.1(+) Leervektor transfiziert. In Abbildung **(A)** wurden die einkonzentrierten Zellkulturüberstände auf die Freisetzung von sJAM-A analysiert. Die densitometrische Auswertung wurde für vier unabhängige Experimente durchgeführt, von denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden. In Abbildung **(B)** wurde die Überexpression von ADAM10 und ADAM17 mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf der Zelloberfläche kontrolliert. In Abbildung **(C)** wurde die Überexpression von ADAM10 und ADAM17 im *Western-blot* untersucht. Der Nachweis von β-Aktin diente hier als Kontrolle gleicher Auftragsmengen. *, $p<0,05$ gegenüber der pcDNA3.1(+)-transfizierten Kontrolle.

Diese Analyse ergab, einhergehend mit einer erhöhten ADAM17-Expression, eine Verdreifachung des löslichen JAM-A-Spaltfragmentes (Abb. 4-12 A). Die Überexpression

wurde durchflusszytometrisch (Abb. 4-12 B) und mittels *Western-blot-Analyse* (Abb. 4-12 C) kontrolliert. Für ADAM10 und ADAM17 wurde im *Western-blot* eine Doppelbande detektiert. Dabei handelt es sich jeweils um das Proenzym und die kleinere prozessierte „reife“ Form ohne Prodomäne.

4.3.5 Herunterregulierung von ADAM10 und ADAM17 durch siRNA-Oligonukleotide

In den beschriebenen Spaltungsexperimenten mit Metalloprotease-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass JAM-A proteolytisch von der Zellmembran geschnitten wird. Weiterhin konnte eine effektive Inhibition mit dem kombinierten ADAM10/17-Inhibitor GW280264X erreicht werden. Um die Beteiligung von ADAM17 an der Ektodomänenspaltung von JAM-A zu bestätigen, wurde ein RNA-Interferenz-Experiment durchgeführt.

Zuerst sollte hierbei getestet werden, ob die siRNA-Oligonukleotide in der Lage sind einen *knock down* in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) und HEK293-Zellen zu erzielen. Dafür wurden die Zellen mit den entsprechenden siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und die Zellkulturüberstände und Lysate gewonnen.

Die Zelllysate wurden zunächst im *Western-blot* auf die Expression von ADAM10 bzw. ADAM17 untersucht (Abb.4-13). Es stellte sich heraus, dass nach 72 Stunden die ADAM10 bzw. ADAM17 Expression durch die jeweils spezifische siRNA vermindert werden konnte. Interessanterweise führte die Behandlung mit ADAM17-siRNA-Oligonukleotiden nicht nur zur Herabregulation von ADAM17, sondern zusätzlich zu einer leicht verstärkten Expression von ADAM10 in den HEK293-Zellen. Umgekehrt hatte die Transfektion mit der ADAM10-siRNA zur Folge, dass ADAM17 verstärkt exprimiert wurde (Abb. 4-13 A).

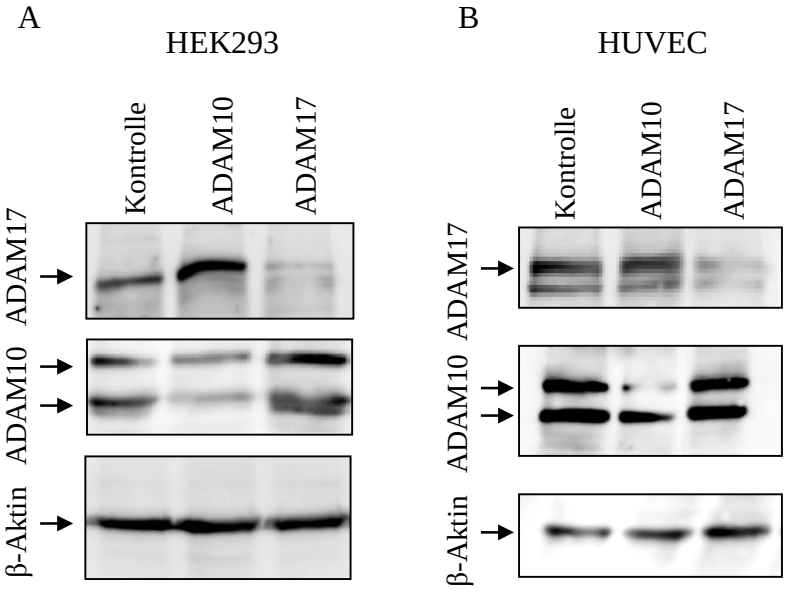


Abbildung 4-13: *Knock down* von ADAM10 und ADAM17 in HUVEC- und HEK293-Zellen. HUVEC- und HEK293-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden für ADAM10, ADAM17 oder Kontroll-siRNA transfiziert. Für die Transfektion wurden pro *Well* 40 pM siRNA eingesetzt. Der Nachweis der ADAM10 und ADAM17 Reduktion in den Zelllysaten von **(A)** HEK293-Zellen und **(B)** HUVEC-Zellen erfolgte im *Western-blot*. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin.

Um die verringerte Expression der Proteasen auf der Zelloberfläche von HUVEC- und HEK293-Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen zusätzlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Auch hier konnte eine Reduktion der ADAM10- bzw. ADAM17-Oberflächenexpression nach der Behandlung mit siRNA-Oligonukleotiden detektiert werden(Abb. 4-14).

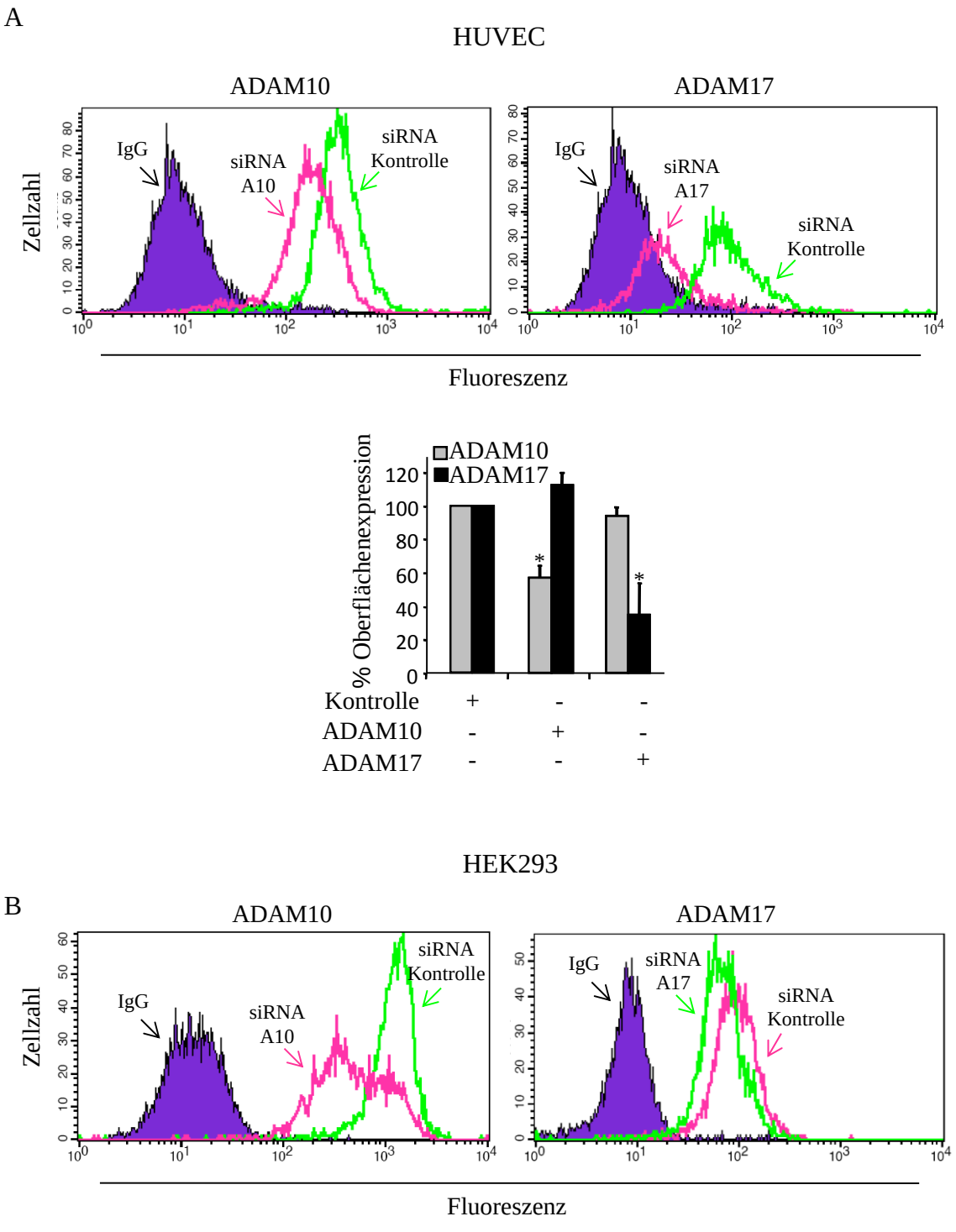


Abbildung 4-14: *Knock down* von ADAM10 und ADAM17 in HUVEC- und HEK293-Zellen. Die Herunterregulation der ADAM10 und ADAM17 Expression auf der Zelloberfläche mittels siRNA in **(A)** HUVEC-Zellen wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Histogramm der ADAM10 bzw. ADAM17 Oberflächenexpression. Die quantitative Auswertung der GeoMean Werte wurde von drei unabhängigen durchflusszytometrischen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der siRNA-Kontrolle. **(B)** Die Herunterregulation von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen wurde durchflusszytometrisch kontrolliert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Diagramm von vier unabhängigen Experimenten.

Die Zellkulturüberstände der mit siRNA-behandelten Zellen wurden mittels *Western-blot* auf den Gehalt an sJAM-A untersucht. In dem JAM-A *Western-blot* konnte bei ca. 30 kDa das lösliche JAM-A im Zellkulturüberstand von HEK293- bzw. HUVEC-Zellen detektiert werden (Abb. 4-15 A, B). Nach der Transfektion mit ADAM17-siRNA zeigte sich eine deutliche Verminderung der JAM-A-Freisetzung im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

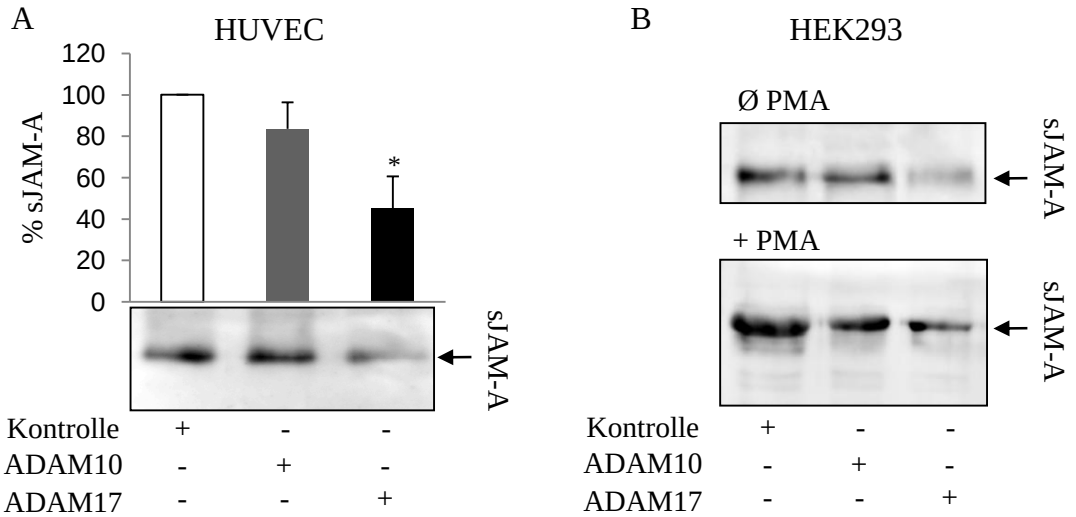


Abbildung 4-15: Freisetzung von sJAM-A nach dem k*nock down* von ADAM10 und ADAM17. Die einkonzentrierten Zellkulturüberständen von siRNA-transfizierten **(A)** HUVEC-Zellen und **(B)** unbehandelten sowie PMA (2 h, 200 ng/ml) stimulierten HEK293-Zellen wurden im *Western-blot* auf eine verminderte JAM-A Prozessierung analysiert. Ein repräsentativer *Western-blot* der Zellkulturüberstände ist abgebildet. In der densitometrischen Auswertung entspricht jeder Balken dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der siRNA Kontrolle.

In HEK293-Zellen konnte neben dem konstitutiven auch das PMA-induzierte JAM-A *Shedding* durch den *knock down* von ADAM17 deutlich reduziert werden (Abb. 4-15 B). Die Herabregulation von ADAM10 hatte dagegen nur einen geringen Effekt auf die Freisetzung von sJAM-A. Ein doppelter *gene knock down* von ADAM10 und ADAM17 zeigte den größten inhibitorischen Effekt sowohl in HEK293-Zellen als auch in HUVEC-Zellen (Abb. 4-16).

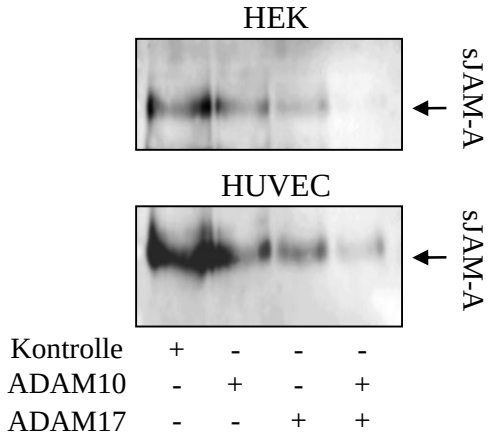


Abbildung 4-16: *Knock down* von ADAM10 und ADAM17 in HUVEC- und HEK293-Zellen. Die einkonzentrierten Zellkulturüberstände der siRNA transfizierten HEK293- und HUVEC-Zellen wurden auf den Gehalt an löslichem JAM-A analysiert. Es ist je ein repräsentativer *Western-blot* der Zellkulturüberstände abgebildet.

Diese Daten zeigen, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 zur Spaltung von JAM-A beitragen, wobei ADAM17 die hauptverantwortliche Protease für die proteolytische Prozessierung von JAM-A ist.

4.3.6 Reduktion der konstitutiven Spaltung von JAM-A in ADAM10- und ADAM17-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten

In einem weiteren Versuch sollte die Rolle von ADAM17 für die konstitutive Spaltung von JAM-A in einem ADAM-defizienten System analysiert werden. Dafür wurden embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) von Wildtyp-Mäusen und von gentechnisch hergestellten ADAM10- und ADAM17-defizienten Mäusen auf ihr JAM-A *Shedding* Verhalten analysiert [Hartmann *et al*., 2002; Vincent *et al*., 2001].

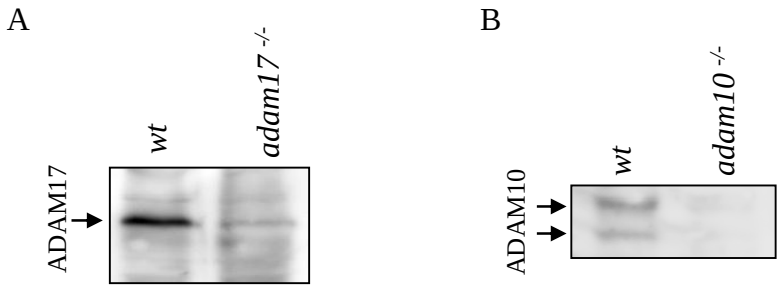


Abbildung 4-17: Nachweis der ADAM10- und ADAM17-Expression in ADAM-defizienten Maus-Fibroblasten. Die Zelllysate von ADAM 10-defizienten, ADAM17-defizienten und Wildtyp-MEF-Zellen wurden im *Western-blot* auf ihre **(A)** ADAM17- und **(B)** ADAM10-Expression untersucht.

In den ADAM-defizienten MEF-Zellen konnte kein ADAM10 bzw. ADAM17 im *Western-blot* nachgewiesen werden (Abb. 4-17 A, B).

Für diesen Versuch wurden die Fibroblasten mit humanem JAM-A transfiziert, und die Zelllysate bzw. Zellkulturüberstände auf den Gehalt an sJAM-A im *Western-blot* analysiert. Im Zellkulturmedium der ADAM17-defizienten Zellen war der Anteil an löslichem JAM-A niedriger als in dem der Wildtyp-Zellen (Abb. 4-18 A). Bei den ADAM10-defizienten Zellen konnte kein Unterschied in der Freisetzung von löslichem JAM-A beobachtet werden (Abb. 4-18 B). In beiden Fällen wurde überprüft, ob Wildtyp- und ADAM-defiziente MEF-Zellen gleiche Mengen an VL-JAM-A exprimierten (Abb. 4-18 A, B). Diese Befunde bestätigen, dass ADAM17 maßgeblich für die konstitutive Spaltung von JAM-A verantwortlich ist.

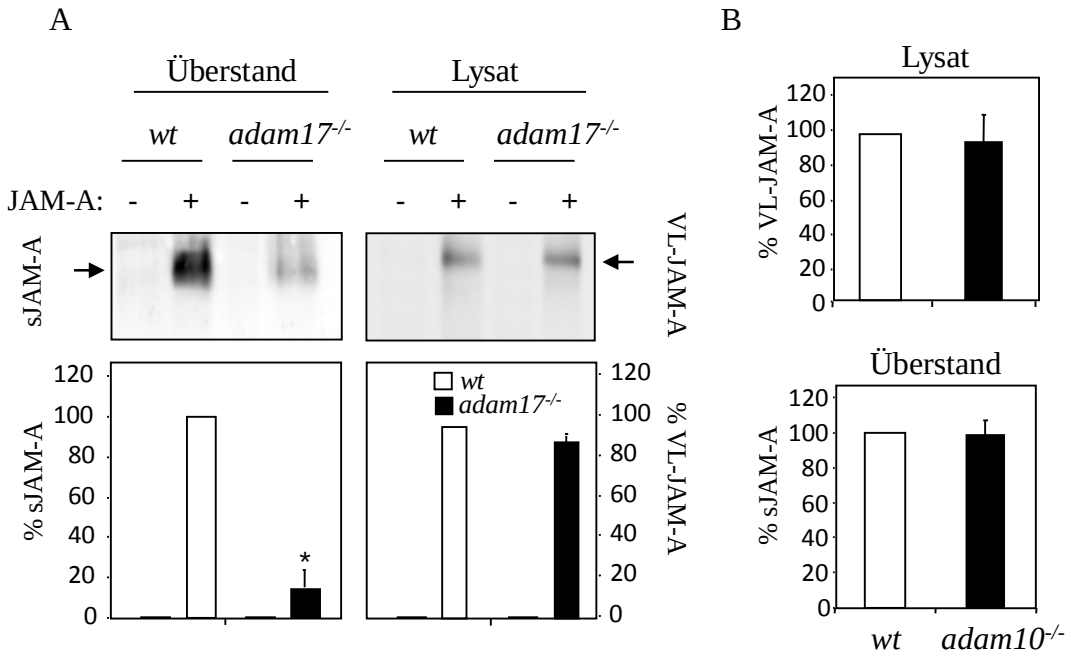


Abbildung 4-18: JAM-A *Shedding* in ADAM-defizienten Maus Fibroblasten. (A) ADAM17-defizienten und Wildtyp-MEF-Zellen wurden mit humanem JAM-A transfiziert. Der Zellkulturüberstand und die Zelllysate wurden im *Western-blot* auf den Gehalt an sJAM-A und VL-JAM-A überprüft. **(B)** ADAM10-defizienten und Wildtyp MEF-Zellen wurden mit humanem JAM-A transfiziert. Die Expression von VL-JAM-A im Zelllysat sowie die Freisetzung von sJAM-A in den Zellkulturüberstand wurden im *Western-blot* nachgewiesen. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. *, $p<0,05$ gegenüber den Wildtyp MEF-Zellen.

4.3.7 Regulation von JAM-A in den Zell-Zell-Kontakten

Es wurde beschrieben, dass die Stimulation von primären Endothelzellen (HUVEC-Zellen) mit einer Kombination aus TNF-α und IFN-γ zu einer Umverteilung von JAM-A aus dem Zellkontaktbereich zur apikalen Membran führen soll, ohne die Gesamtmenge an membrangebundenen JAM-A zu beeinflussen [Ozaki *et al*, 1999; Shaw *et al*., 2001c]. Proteine der *tight junctions* sind in *lipid raft*-ähnlichen Domänen angereichert. Bei *lipid rafts* handelt es sich um cholesterol- und sphingolipidreiche Domänen in der Zellmembran, die in nicht-ionischen Detergentien wie z.B. TritonX-100 unlöslich sind [Nusrat *et al*., 2000]. *Lipid rafts* werden deshalb auch als *detergent-insoluble glycolipid-rich domains* (DIGs), *glycosphingolipid-enriched membranes* (GEMs) oder *low-density Triton-insoluble* (LDTI) bezeichnet. Die JAM-A Umverteilung sollte daher durch eine Veränderung des Verhältnisses der JAM-A-Konzentration in der TritonX-100-löslichen zur TritonX-100-unlöslichen Fraktion in den Zelllysaten nachweisbar sein.

Um eine Aussage treffen zu können, ob das *Shedding* in den Zell-Zell-Kontakten oder auf der apikalen Zelloberfläche stattfindet, wurden die HUVEC-Zellen mit einer Kombination aus TNF-α/IFN-γ stimuliert und die TritonX-100-lösliche und -unlösliche Fraktion im *Western-blot* analysiert.

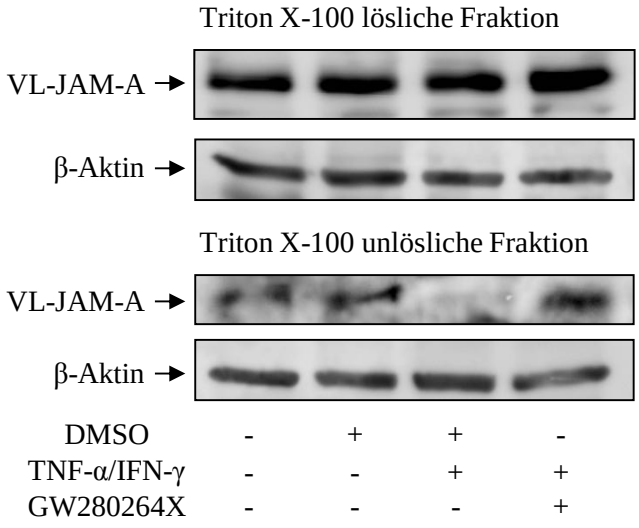


Abbildung 4-19: Einfluss von TNF-α/IFN-γ auf die JAM-A Verteilung auf primären Endothelzellen. HUVEC-Zellen wurden für 24 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (je 10ng/ml) in An- und Abwesenheit von GW254023X (10 µM) stimuliert. Die TritonX-100-lösliche und -unlösliche Zelllysat-Fraktion wurde im *Western-blot* auf den Gehalt an VL-JAM-A analysiert. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin.

Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen zu einer Abnahme des VL-JAM-A in der TritonX-100-unlöslichen Fraktion führte, was auf eine Abnahme der JAM-A-Konzentration in den *tight junctions* hindeutet (Abb. 4-19). Dieser Effekt konnte durch die Behandlung der Zellen mit dem ADAM10/17-Inhibitor (GW280264X) aufgehoben werden. In der TritonX-100-löslichen Fraktion konnte dagegen keine Veränderung der JAM-A-Konzentration detektiert werden. Diese Befunde legen nahe, dass keine Anreicherung von VL-JAM-A auf der apikalen Zelloberfläche erfolgte und deuten ferner darauf hin, dass die proteolytische Prozessierung von JAM-A in den interzellulären Verbindungen stattfindet.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde in einem nächsten Schritt die Lokalisation von endogenem JAM-A in HUVEC-Zellen untersucht. Die mit dem JAM-A-spezifischen monoklonalen Antikörper erhaltene Fluoreszenzverteilung zeigte eine Anreicherung von JAM-A in der Zellmembran an den Zell-Zell-Kontakten, wohingegen in Bereichen ohne direkte Zell-Zell-Kontakte, nur wenig JAM-A auf der Zellmembran nachweisbar war (Abb. 4-20 B).

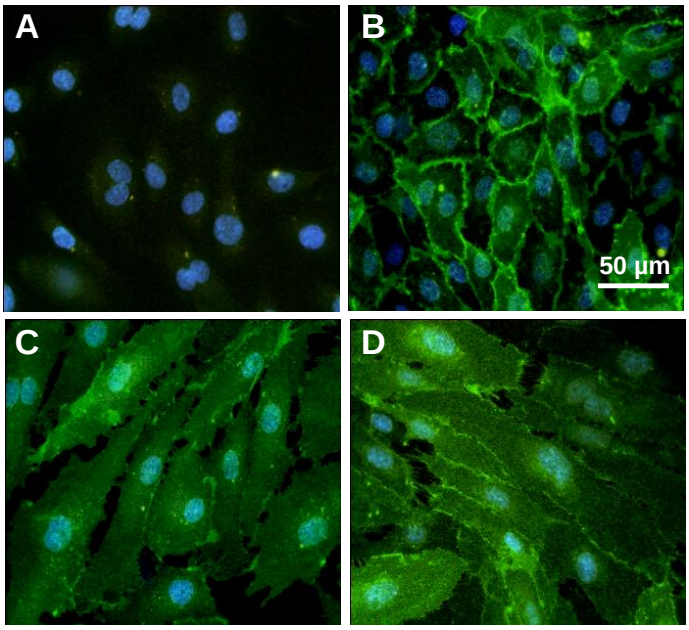


Abbildung 4-20: Immunzytochemische Untersuchung von JAM-A auf primären Endothelzellen. JAM-A wurde mittels eines monoklonalen JAM-A Antikörpers detektiert. **(A)** Ein unspezifischer IgG gleichen Isotyps diente als Kontrolle für eine unspezifische Bindung des Antikörpers. **(B)** In kultivierten HUVEC-Zellen konnte JAM-A an den Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden. Die Zellen wurden als Kontrolle mit DMSO über einen Zeitraum von 24 h behandelt. **(C)** Die Stimulation für 24 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) führte zu einer verringerten JAM-A Expression. **(D)** Die HUVEC-Zellen wurden mit den proinflammatorischen Zytokinen in Gegenwart von GW254023X (10 µM) für 24 h inkubiert.

Wie schon in den *Western-blot* Untersuchungen gezeigt werden konnte, führte die Inkubation der Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ zu einer Abnahme des VL-JAM-A in den interzellulären Zell-Zell-Kontakten. Ferner zeigte sich, dass im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, die Stimulation ein Auseinanderweichen der Zellen bewirkte (Abb. 4-20 C). Durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit TNF-α/IFN-γ und dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Abb. 4-20 D). Die *tight junctions* scheinen durch die Zytokine TNF-α/IFN-γ die Barrierenfunktion und darüber auch die parazelluläre Permeabilität zu beeinflussen. So zeigte sich, dass die Permeabilität für FITC-Dextran bei den stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten HUVEC-Zellen erhöht war, was wiederum durch die Inhibiton mit dem Inhibitor GW280264X reduziert werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen die mittels Immunfluoreszenzmikroskopie erhaltenen Daten.

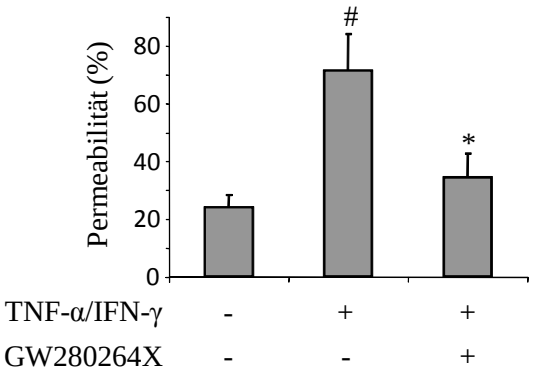


Abbildung 4-21: Einfluss von TNF-α/IFN-γ auf die Permeabilität primärer Endothelzellen. Konfluente HUVEC-Monolayer auf Transwellfiter-Einsätzen mit einer Porengröße von 5 µm wurden für 24 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/ IFN-γ (je 10ng/ml) in An- und Abwesenheit von GW254023X (10 µM) stimuliert. Im Anschluss wurde die Permeabilität für das 40 kDa große FITC-Dextran bestimmt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von jeweils drei Proben aus drei unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung. #, $p<0,05$ gegenüber unstimulierten Kontrolle bzw. *, $p<0,05$ gegenüber den stimulierten Zellen.

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Expression von JAM-A nach Stimulation mit TNF-α/IFN-γ in HUVEC-Zellen mittels quantitativer *real-time* (RT)-Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) untersucht.

Die Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen führte zu einer Zunahme von löslichem JAM-A im Zellkulturüberstand und zu einer Reduktion auf der Zelloberfläche. Nach dieser Stimulation konnte keine Geninduktion von JAM-A beobachtet werden (Abb. 4-22). Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte JAM-A-Genexpression für

die Zunahme von sJAM-A im Kulturmedium nach der Zytokinbehandlung verantwortlich ist.

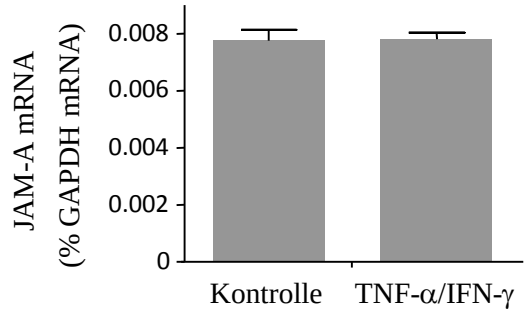


Abbildung 4-22: Analyse der Induktion von JAM-A mRNA in HUVEC-Zellen. Nach Behandlung von HUVEC-Zellen für 24 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) wurde die Menge an JAM-A mRNA mittels RT-PCR bestimmt. Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung.

4.4 Funktionelle Relevanz des durch *Shedding* entstandenen löslichem JAM-A

Die Untersuchungen von ADAM-defizienten Fibroblasten, Inhibitorstudien, RNA-Interferenz-Experimente, ADAM17-Überexpression und Stimulationsversuche zeigen, dass ADAM17 nicht nur unter konstitutiven Bedingungen, sondern auch nach Zellstimulation für die Prozessierung von JAM-A maßgeblich verantwortlich ist. Um die funktionellen Konsequenzen der durch ADAM17 vermittelten JAM-A-Spaltung zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von löslichem JAM-A auf isolierte humane Endothelzellen und Leukozyten näher betrachtet.

4.4.1 Einfluss von löslichem JAM-A auf die Endothelzellmigration

JAM-A soll an der Migration von Endothelzellen nach einer Verletzung der Endothelzellschicht beteiligt sein [Naik *et al*., 2006]. Es stellte sich die Frage, wie diese Funktion durch lösliches JAM-A beeinflusst wird. Aufgrund dessen wurde in den nachfolgenden Versuchen die Migration von Endothelzellen in Gegenwart von löslichem JAM-A in einem „*scratch assay*“ betrachtet. In diesen Wundheilungs-Test wurde ein konfluenter HUVEC-Zellrasen durch eine Pipettenspitze aufgekratzt und anschließend über einen Zeitraum von 24 h die Wundheilung dieser „Verletzung“ verfolgt. Für diese

Versuche wurde ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein genutzt, welches von Dr. R. Koenen (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt wurde. Hierbei wurde der extrazelluläre Teil von JAM-A mit einem kurzen Anteil der transmembranen Region bis zur Aminosäure 242 an den Fc-Teil von humanen IgG_1 fusioniert. Das exprimierte Protein liegt als Dimer vor, bei dem zwei dieser Fusionsproteine über den Fc-Teil mit Disulfidbrücken verbunden sind (sJAM-A.Fc).

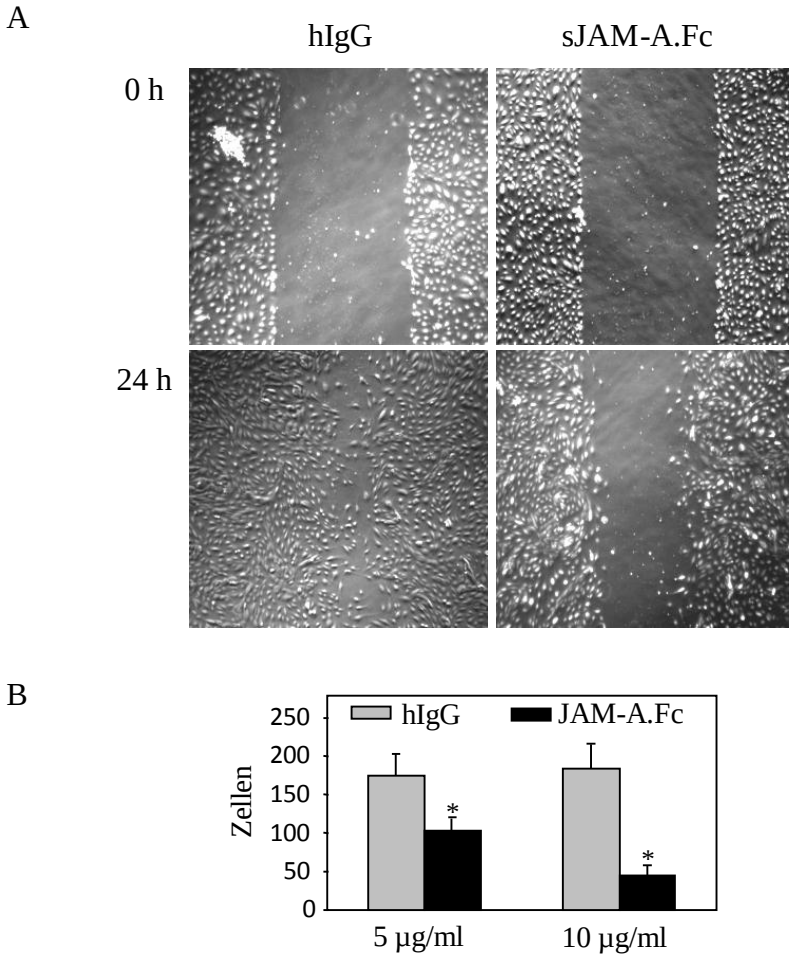


Abbildung 4-23: Antagonistischer Effekt von löslichem JAM-A auf die Endothelzellmigration. Ein konfluenter HUVEC-Zellrasen wurde durch einen definierten *„scratch"* verwundet. Nach 24 h in An- und Abwesenheit von löslichem JAM-A im Zellkulturmedium wurden die in den Riss eingewanderten Zellen gezählt. **(A)** Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. **(B)** Die statistische Auswertung wurde von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Aufnahmen durchgeführt. *, $p<0,05$ gegenüber der hIgG-Kontrolle.

HUVEC-Zellen wurden in Anwesenheit von 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml sJAM-A.Fc oder als Kontrolle mit humanem IgG (hIgG) kultiviert (Abb. 4-23 A). Die Auszählung der gewanderten Zellen nach Durchführung der Verletzung ergab, dass durch die Behandlung

mit rekombinanten JAM-A.Fc die Migration der Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle reduziert war (Abb. 4-23 B). Die Migration der Endothelzellen konnte somit durch sJAM-A.Fc konzentrationsabhängig gehemmt werden.

4.4.2 Antagonistische Effekte von sJAM-A auf die transendotheliale Migration von polymorphkernigen Leukozyten

Bereits veröffentlichte *in vitro*-Untersuchungen haben ergeben, dass JAM-A neben der Migration von Endothelzellen auch an der Transmigration von Leukozyten durch Endothelzellen beteiligt ist [Del Maschio *et al.*, 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern das *Shedding* von JAM-A durch die Interaktion von JAM-A mit leukozytären Zellen beeinflusst wird.

Erste *Western-blot* Untersuchungen zeigten, dass HUVEC-Zellen und isolierte Neutrophile nach zwei Stunden nur geringe Mengen an löslichem JAM-A freisetzten (Abb. 4-24). Durch eine Kokultur von Neutrophilen mit den HUVEC-Zellen konnte eine erhöhte sJAM-A-Freisetzung in den Kulturüberstand beobachtet werden. Um näher zu untersuchen, ob diese Zunahme der JAM-A-Proteolyse auf den Endothelzellen oder den Neutrophilen stattfindet, wurden diese jeweils mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X für 2 h vorinkubiert bevor die Kokultur durchgeführt wurde. Die JAM-A-Konzentration im Überstand der Kokultur wurde nur durch eine Vorbehandlung der primären Endothelzellen deutlich reduziert. Eine Vorbehandlung der Neutrophilen hatte dagegen keinen Effekt auf die Freisetzung von löslichem JAM-A (Abb. 4-24).

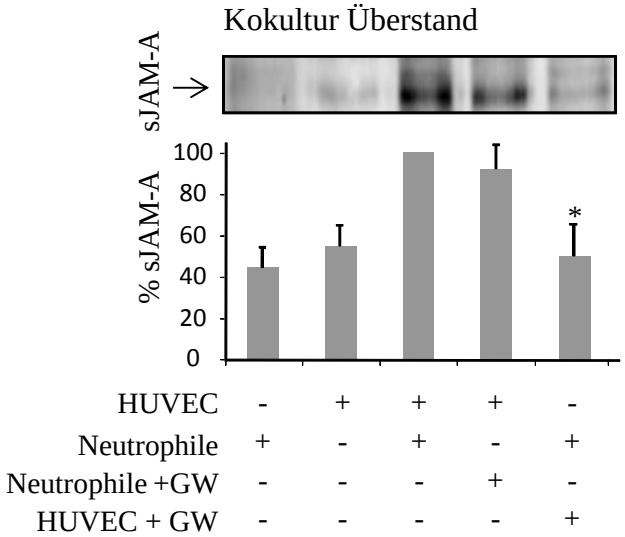


Abbildung 4-24: Freisetzung von löslichem JAM-A durch HUVEC-Zellen und Neutrophile. HUVEC-Zellen und Neutrophile wurden mit GW280264X (10 µM) für 1 h vorinkubiert oder unbehandelt belassen. Nach der Inkubation wurde der Inhibitor weggewaschen und beide Zelltypen für 2 h separat oder in Kokultur inkubiert. Die einkonzentrierten Zellkulturüberstände wurden im *Western-blot* auf den Gehalt an sJAM-A untersucht. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. *, $p<0,05$ gegenüber den unbehandelten kokultivierten Zellen.

Um den Effekt der Kokultur auf die Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC-Zellen und Neutrophilen zu analysieren, wurden diese im Durchflusszytometer auf die Expression von JAM-A untersucht. Hierbei konnte der stimulierende Effekt der Koinkubation auf HUVEC-Zellen bestätigt werden. So zeigte sich eine deutliche Reduktion der JAM-A-Expression auf der HUVEC-Zelloberfläche nach der Koinkubation mit Neutrophilen (Abb. 4-25). Diese Ergebnisse deuten an, dass in Gegenwart von Neutrophilen vermehrt JAM-A auf der Oberfläche von Endothelzellen prozessiert wird, und dass hierfür die endotheliale ADAM17-Aktivität verantwortlich ist.

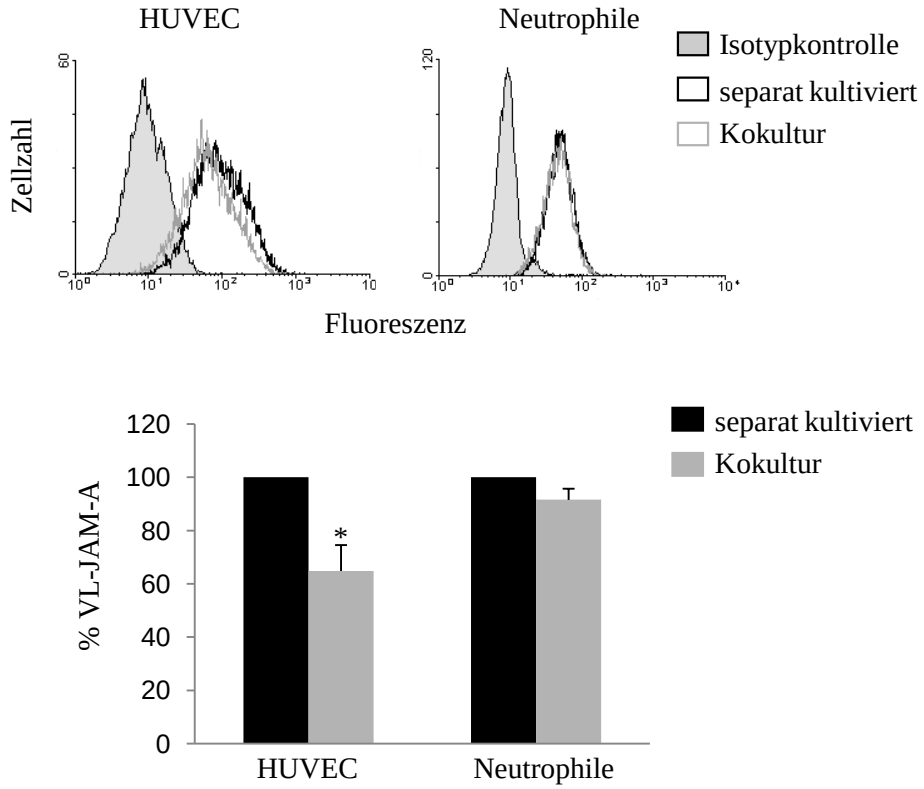


Abbildung 4-25: Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC-Zellen und Neutrophilen. HUVEC-Zellen und Neutrophile wurden für 2 h separat oder in Kokultur inkubiert. Zur Analyse der Oberflächenexpression des VL-JAM-A wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Für die quantitative Auswertung wurden die GeoMean Werte ermittelt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der Kokultur.

Aufgrund der zellulären Lokalisation von JAM-A wird vermutet, dass dieses an der festen Adhäsion von Leukozyten beteiligt ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von sJAM-A auf die Adhäsion von Neutrophilen an primäre aktivierte Endothelzellen analysiert. Hierbei hatte jedoch weder die Vorinkubation der HUVEC-Zellen noch die der Neutrophilen mit sJAM-A.Fc einen Einfluss auf die Adhäsion unter statischen Bedingungen und Flussbedingungen (Daten nicht gezeigt).

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass JAM-A zur transendothelialen Migration von Leukozyten beiträgt. Diese Funktion konnte unter anderem durch einen polyklonalen murinen JAM-A Antikörper blockiert werden [Ostermann *et al.*, 2002]. Zur Bestätigung dieser Befunde wurde in einem Transmigrationsexperiment der Einfluss eines anti-JAM-A Antikörpers auf die durch Interleukin (IL)-8 (CXCL8)-vermittelte transendotheliale Migration von humanen Neutrophilen untersucht. In Gegenwart von IL-8 zeigte sich eine

Zunahme der transendotheliale Migration von Neutrophilen durch eine konfluente HUVEC-Zellschicht um das 7-fache. Eine Vorbehandlung der Neutrophilen mit 10 µg/ml eines blockierenden JAM-A Antikörpers gegen die zweite JAM-A Ig-Domäne führte zu einer Reduktion der IL-8-vermittelten Transmigration (Abb. 4-26).

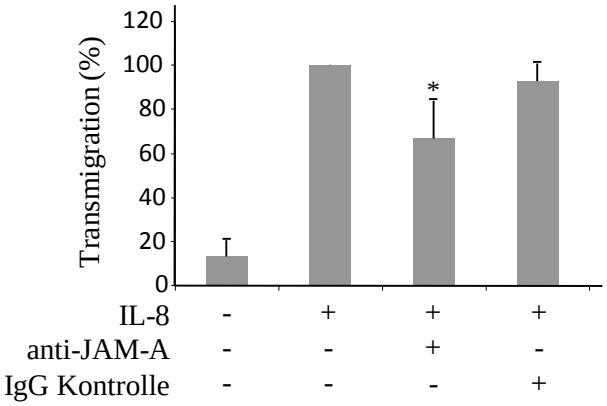


Abbildung 4-26: Antagonistischer Effekt des monoklonalen anti-JAM-A Antikörpers auf die Transmigration von Neutrophilen. Für die IL-8-vermittelte transendotheliale Chemotaxis von Neutrophilen durch einen konfluenten HUVEC-Monolayer wurden Transwell Einsätze mit einer Porengröße von 5 µm verwendet. Vor der Zugabe der Neutrophilen wurden die Zellen mit dem JAM-A Antikörper (Klon 43, 10 µg/ml) gegen die zweite Ig-Domäne oder der IgG Isotypkontrolle für 30 min bei 37°C inkubiert. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von jeweils drei Proben aus drei unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten IL-8-vermittelten Transmigration.

Im nächsten Schritt wurde der antagonistische Effekt von löslichem JAM-A im Verlauf der transendothelialen Migration untersucht. Die IL-8-vermittelte Migration der Neutrophilen durch HUVEC-Zellen zeigte wiederum eine Zunahme um den Faktor 7 gegenüber der spontanen Migration (Abb. 4-27, weiße Balken). Weiterhin zeigte sich, dass eine Vorinkubation der konfluenten HUVEC-Zellen mit dem rekombinanten sJAM-A.Fc keinen Einfluss auf das Transmigrationsverhalten hatte (Abb. 4-27, grauer Balken). Die Vorinkubation der Neutrophilen führte im Vergleich dazu zu einer Reduktion der Transmigrationsrate. Um auszuschließen, dass dieser blockierende Effekt durch den Fc-Teil vermittelt wird, wurde zusätzlich monovalentes sJAM-A und ein Fc-Block-Reagenz zur Vorinkubation der Neutrophilen verwendet. Die Behandlung mit verschiedenen sJAM-A-Konzentrationen zwischen 2 µg/ml und 10 µg/ml zeigte einen konzentrationsabhängigen antagonistischen Effekt (Abb. 4-27, schwarze Balken). Der Fc-Block führte zu keiner Veränderung der Transmigration im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem sJAM-A.Fc Konstrukt. Weiterhin wurden die Neutrophilen als Kontrolle mit humanem IgG vorinkubiert, was jedoch keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten zeigte.

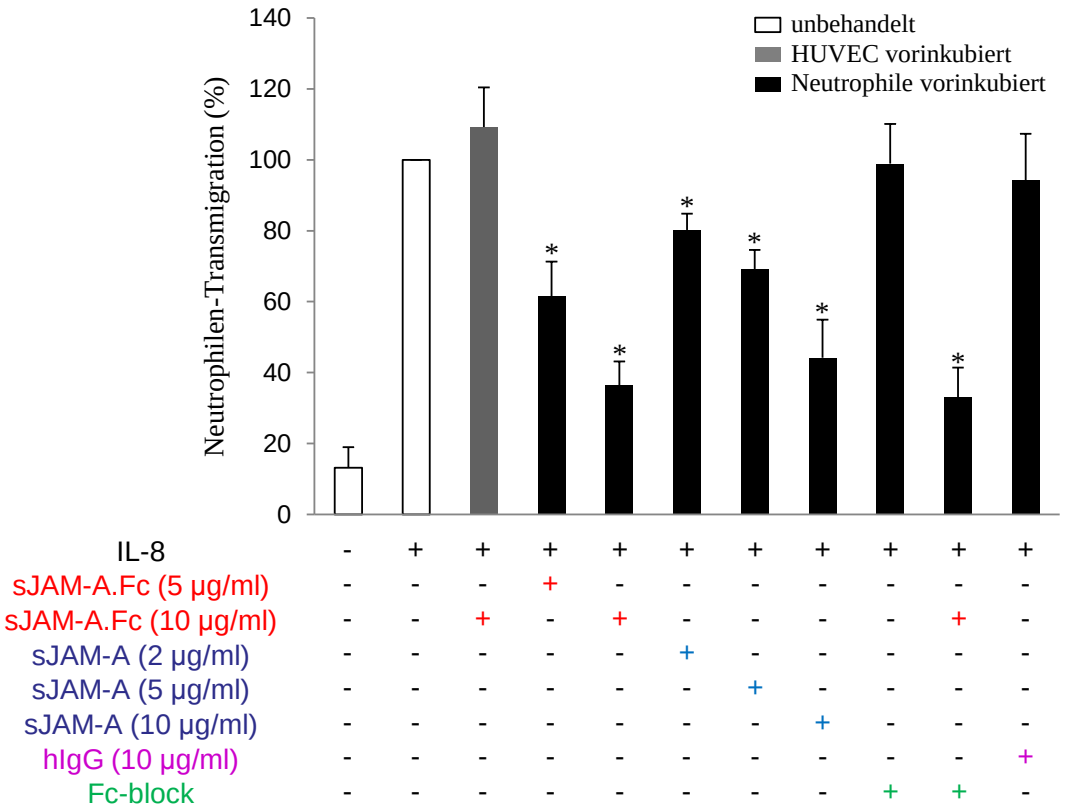


Abbildung 4-27: Antagonistischer Effekt von sJAM-A auf die Transmigration von Neutrophilen. Für die IL-8-vermittelte transendotheliale Chemotaxis von Neutrophilen durch einen konfluenten HUVEC-Monolayer wurden Transwell-Einsätze mit einer Porengröße von 5 µM verwendet. HUVEC-Zellen (grau) und Neutrophile (schwarz) wurde mit sJAM-A.Fc (5 µg/ml, 10 µg/ml, rot), monovalentem sJAM-A (2, 5 und 10 µg/ml, blau) und als Kontrolle mit hIgG (10 µg/ml, lila) oder einem Fc-Block-Reagenz (50 µg/ml, grün) in RPMI-Medium mit 2% BSA für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Nach 40 min Migration wurde die Zahl der im unteren Kompartiment vorhandenen Neutrophile bestimmt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von jeweils drei Proben aus vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten IL-8-vermittelten Transmigration.

Die vorliegenden Ergebnisse der *in vitro*-Transmigrationsexperimente belegen die wichtige Funktion von JAM-A bei der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten im Entzündungsmodell und weisen darauf hin, dass diese Funktion durch lösliches JAM-A blockiert werden kann.

4.4.3 Beteiligung von JAM-A an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

JAM-A besitzt in der extrazellulären Domäne zwei Ig-Domänen wobei die erste, distale Ig-Domäne für die homophile JAM-JAM-Interaktion verantwortlich ist. Die zweite, nahe der Membran gelegene, Ig-Domäne vermittelt die Interaktion von JAM-A mit dem $\alpha_L\beta_2$-Integrin *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1, CD11a/CD18) [Ostermann *et*

al., 2002]. Es sollte untersucht werden, welche der Interaktionen für die inhibitorische Wirksamkeit von löslichem JAM-A auf die IL-8-vermittelte Neutrophilen-Transmigration wichtig ist. IL-8 führte auch hier zu einer 7-fachen Erhöhung der transendothelialen Migration von Neutrophilen. Diese konnte, wie auch schon im oberen Abschnitt gezeigt, durch eine Vorinkubation der Neutrophilen mit sJAM-A.Fc blockiert werden. Um selektiv die homophile JAM-A/JAM-A-Bindung oder die heterophile JAM-A/LFA-1-Bindung zu blockieren, wurde ein sJAM-A-Konstrukt verwendet, welches nur die erste (sJAM-A.D1.Fc) bzw. die zweite (sJAM-A.D2.Fc) JAM-A Ig-Domäne beinhaltete. Nur eine Vorbehandlung der Neutrophilen mit der zweiten JAM-A Ig-Domäne (sJAM-A.D2.Fc) führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-vermittelten Transmigration. Um einen Einfluss des Fc-Teils auszuschließen, wurden die Fc-Rezeptoren auf den Neutrophilen in allen Versuchsansätzen mit einem Fc-Block-Reagenz blockiert (Abb. 4-28).

Die inhibitorische Wirksamkeit von löslichem JAM-A beruht also vorwiegend auf der Membran-proximalen Ig-Domäne, welche mit LFA-1 interagiert, und weniger auf der für die Homodimer-Bildung benötigten Membran-distalen Ig-Domäne. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die heterophile Interaktion von endothelialem JAM-A und leukozytärem LFA-1 einen entscheidenden Schritt bei der Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut darstellt, welcher durch lösliches JAM-A blockiert werden kann.

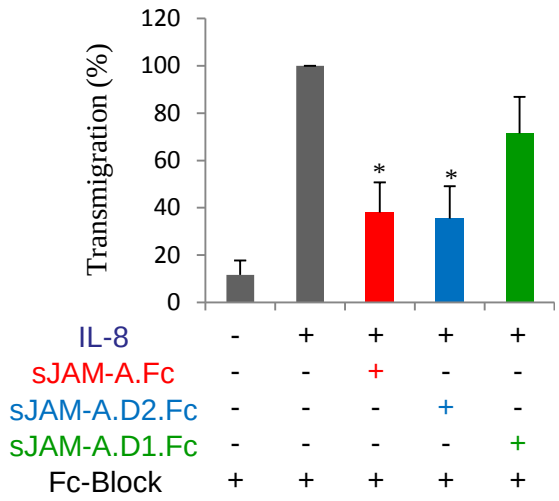


Abbildung 4-28: Antagonistischer Effekt der verschiedenen sJAM-A Varianten auf die Transmigration von Neutrophilen. Die Vorinkubation der Neutrophilen mit sJAM-A.Fc, sJAM-A.D1.Fc, sJAM-A.D2.Fc (je 10 µg/ml) oder als Kontrolle mit humanem IgG für 30 min bei 37°C wurde in Gegenwart des Fc-Block Reagenz (50 µg/ml) durchgeführt. Im Anschluss wurde die IL-8-vermittelte transendotheliale Chemotaxis von Neutrophilen durch einen konfluenten HUVEC-Monolayer nach 45 min bestimmt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von jeweils drei Proben aus vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten IL-8-vermittelten Transmigration.

Um sicherzustellen, dass alle drei rekombinanten löslichen JAM-A Varianten in der Lage sind, an humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) zu binden, wurden Bindungsversuche mit den drei verschiedenen sJAM-A.Fc Varianten durchgeführt. Dafür wurden die Neutrophilen mit sJAM-A.Fc, sJAM-A.D1.Fc, sJAM-A.D2.Fc oder als Kontrolle mit humanem IgG inkubiert. Die gebundenen sJAM-A Konstrukte konnten dann über den Fc-Teil mit Hilfe eines PE-konjugierten Anti-Fc Antikörpers im Durchflusszytometer detektiert werden.

Die effizienteste Bindung wurde hierbei mit dem sJAM-A.D2.Fc-Konstrukt beobachtet, welches aus der zweiten Ig-Domäne besteht, die für die heterophile JAM-A/LFA-1-Bindung verantwortlich ist. Das sJAM-A.Fc, welches beide Ig-Domänen beinhaltet, interagierte wesentlich schwächer mit den Neutrophilen. Eine geringe Bindung wurde ebenfalls bei dem Konstrukt mit der ersten Ig-Domäne beobachtet. Um die Spezifität der Bindung der JAM-A.Fc-Konstrukte zu prüfen, wurden die Neutrophilen mit einer äquimolaren Menge an monovalentem JAM-A vorbehandelt, was erwartungsgemäß einen Rückgang der Bindungsintensität zu Folge hatte (Abb. 4-29). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die homophile JAM-A/JAM-A-Bindung auf den Neutrophilen im Vergleich zur JAM-A/LFA-1-Bindung, nur eine untergeordnete Rolle spielt.

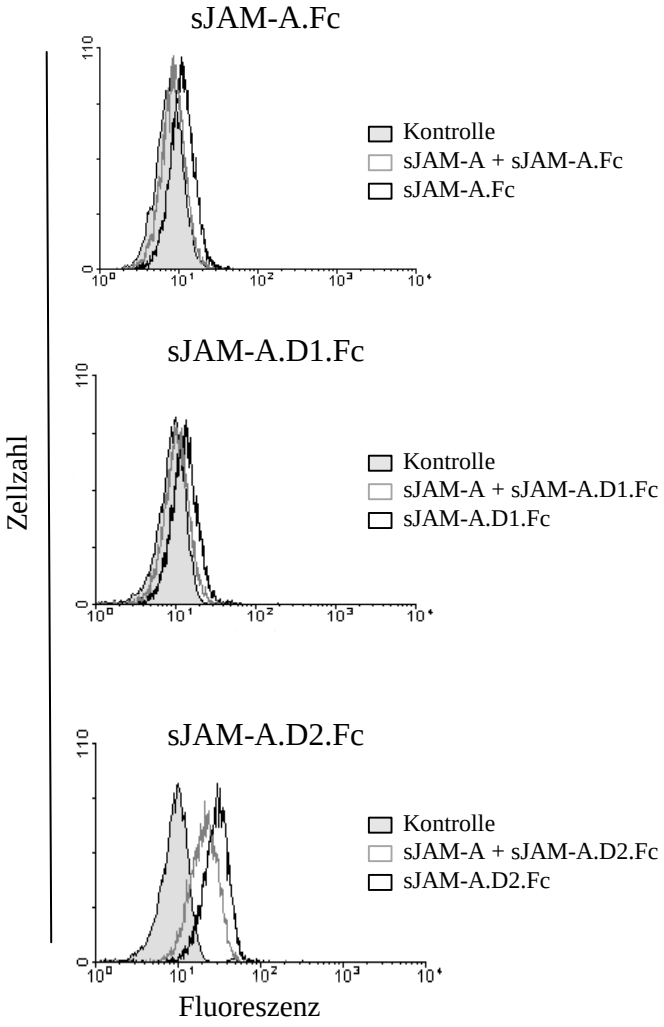


Abbildung 4-29: Bindung der sJAM-A Varianten an humane Neutrophile. Durchflusszytometrische Untersuchungen von humanen Leukozyten aus peripherem Blut. PMNs wurden mit sJAM-A.Fc, sJAM-A.D1.Fc, sJAM-A.D2.Fc (je 10 µg/ml) oder als Kontrolle mit humanem IgG für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebundene sJAM-A.Fc wurde über den Fc-Teil mit Hilfe eines PE-konjugierten Anti-Fc Antikörpers nachgewiesen. Eine Vorinkubation der PMNs mit monovalentem JAM-A führte zu einer reduzierten Bindung der drei Fc-Konstrukte.

4.4.4 Freisetzung von löslichem JAM-A in der Maus

Um die Frage zu klären, ob lösliches JAM-A auch *in vivo* gebildet wird, wurde der Serumgehalt an löslichem JAM-A in gesunden Tieren und Zytokin-behandelten Tieren mittels ELISA bestimmt (Abb. 4-30). Der basale Gehalt an JAM-A lag bei gesunden Wildtyp-Tieren bei 3,5 ng/ml. In den JAM-A-defizienten Tieren konnte erwartungsgemäß kein JAM-A detektiert werden, was die Spezifität des gewählten ELISA belegte. Bei den Wildtyp-Tieren wurde eine systemische Infektion durch die Injektion von TNF-α/IFN-γ induziert. Dies führte nach 2,5 h zu einer Verdoppelung der JAM-A-Menge im Serum.

Demnach wird lösliches JAM-A in gesunden Tieren konstitutiv in das Blut abgegeben. Im Verlauf von Entzündungen kommt es allerdings zu einer verstärkten Freisetzung.

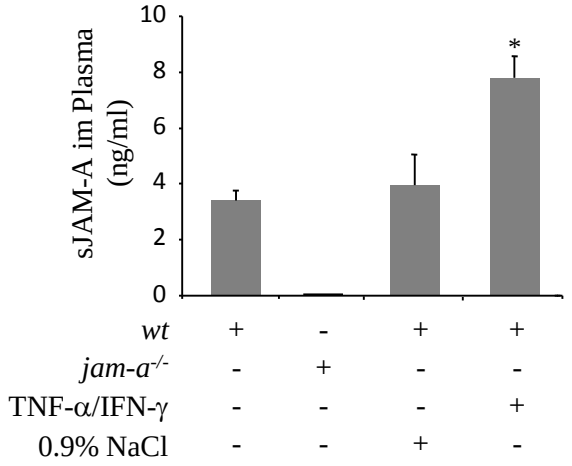


Abbildung 4-30: Induktion von löslichem JAM-A im Mausserum durch proinflammatorische Zytokine. Blutserum von unbehandelten JAM-A-defizienten und Wildtyp-Mäusen sowie von Wildtyp-Mäusen nach intravenöser Gabe von TNF-α (50 ng/g, 3 h) und IFN-γ (40 ng/g, 3 h) wurde isoliert. Pro Versuchsbedingung wurden drei Tiere eingesetzt und die sJAM-A-Konzentration mit Hilfe eines murinen JAM-A ELISAs bestimmt. Konsistent mit den Befunden aus humanen Zelllinien führte die systemische Behandlung der Wildtyp-Mäuse mit TNF-α/IFN-γ zu einer erhöhten sJAM-A-Abgabe in das Blutserum. In den JAM-A-defizienten Mäusen konnte kein lösliches JAM-A detektiert werden. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber den unbehandelten Wildtyp-Tieren.

4.4.5 Einfluss von sJAM-A auf die transendotheliale Migration von polymorphkernigen Leukozyten in der Maus

Schließlich sollte untersucht werden, ob sJAM-A auch im lebenden Organismus die Leukozytenmigration beeinflusst. Für die funktionellen Untersuchungen in der Maus sollten die bereits oben verwendeten humanen sJAM-A-Konstrukte verwendet werden. Um zunächst zu testen, ob diese in der Lage sind mit murinen Leukozyten zu interagieren, wurden Bindungsversuche mit sJAM-A.Fc, sJAM-A.D1.Fc, sJAM-A.D2.Fc und humanem IgG als Kontrolle durchgeführt.

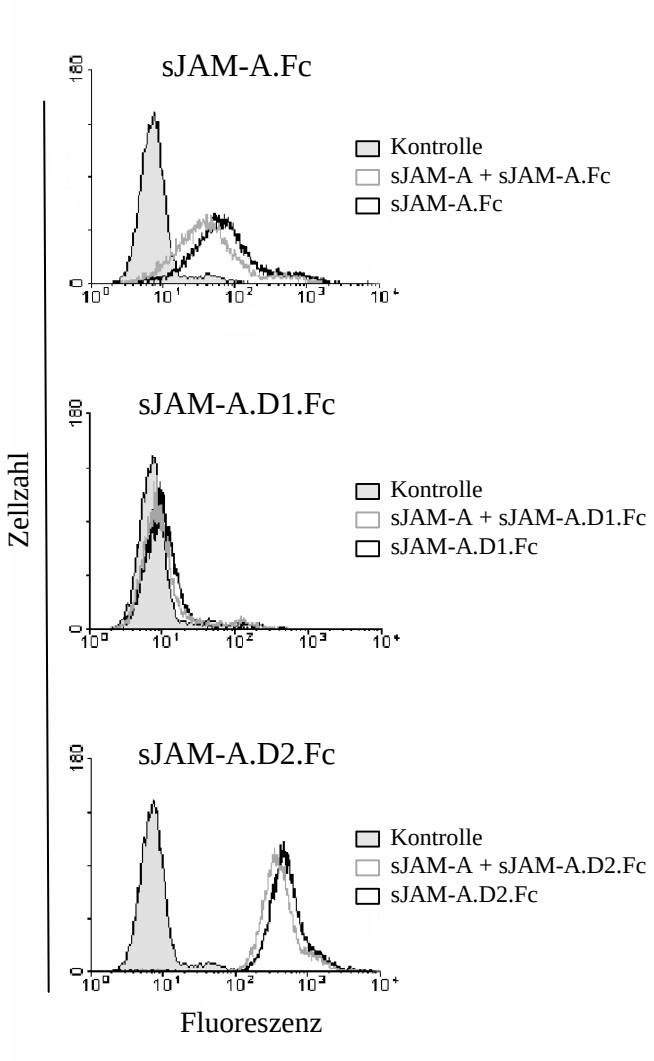


Abbildung 4-31: Bindung der sJAM-A Konstrukte an murine Leukozyten. Abgebildet sind die durchflusszytometrischen Untersuchungen von murinen Leukozyten aus Vollblut. Das Mausvollblut wurde mit sJAM-A.Fc, sJAM-A.D1.Fc, sJAM-A.D2.Fc (je 10 µg/ml) oder als Kontrolle mit humanem IgG inkubiert. Das gebundene sJAM-A.Fc wurde über den Fc-Teil mit Hilfe eines PE-konjugierten Anti-Fc Antikörpers nachgewiesen. Eine Vorinkubation mit monovalentem JAM-A führte zu einer reduzierten Bindung der drei Fc-Konstrukte.

Mit Hilfe dieser drei JAM-A Konstrukte konnte zusätzlich überprüft werden, ob die homophile JAM-A/JAM-A-Bindung oder die heterophile JAM-A/LFA-1-Interaktion auf den Lymphozyten überwog. Alle drei sJAM-A-Fc Varianten konnten an die murinen Leukozyten binden (Abb. 4-31). Wobei, wie bei den humanen Leukozyten, die effektivste Interaktion mit dem sJAM-A.D2.Fc Konstrukt zu erkennen war. Das sJAM-A.D1.Fc Konstrukt wurde dagegen kaum gebunden, wie auch schon für humane PMN beschrieben. Um die Spezifität näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit äquimolaren Mengen an monovalentem JAM-A vorinkubiert. Diese Vorinkubation führte auch bei den murinen Leukozyten zu einer Reduktion der Bindung von allen drei sJAM-A-Fc Varianten. Damit

scheint auch bei der Maus die Interaktion von löslichem JAM-A mit Leukozyten vorwiegend über LFA-1 zu erfolgen.

Die Leukozytenauswanderung *in vivo* wurde an Wildtyp- und JAM-A-defizienten Tieren im *„Air Pouch“*-Modell untersucht. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. O. Söhnlein am Karolinska Institut (Schweden) durchgeführt. Hierbei wurde den Tieren sterile Luft unter die Haut injiziert, um ein Luftpolster zu bilden. Anschließend wurde den Tieren sJAM-A.Fc, monovalentes sJAM-A oder zu Kontrolle humanes IgG intravenös verabreicht. Eine Stunde später wurde die CXC-Chemokin-induzierte Transmigration durch die Gabe des murinen Chemokins KC in das Luftpolster eingeleitet. In den Wildtyp-Tieren konnte die durch KC-induzierte Migration von Neutrophilen in den *„Air Pouch“* durch die Gabe von löslichem JAM-A reduziert werden (Abb. 4-32, grün).

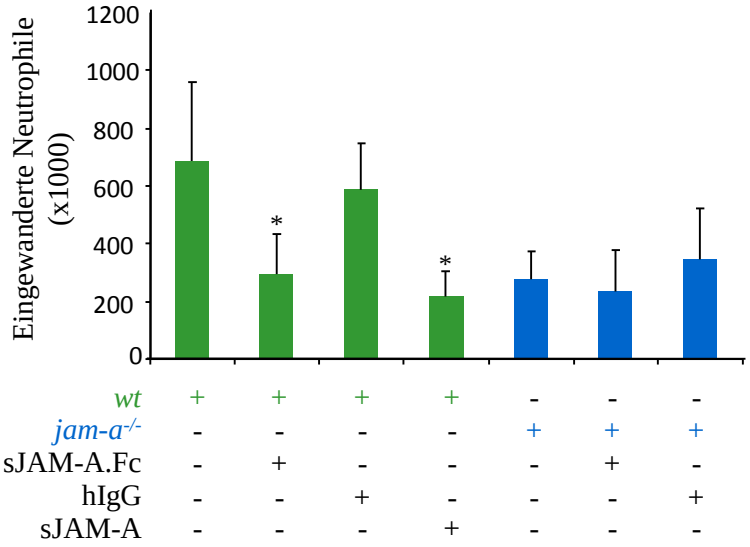


Abbildung 4-32: Antagonistischer Effekt des löslichen sJAM-A auf die Transmigration von Neutrophilen *in vivo*. Wildtyp- und JAM-A-defiziente Mäuse wurden intravenös mit sJAM-A.Fc (60 µg), monovalentem sJAM-A (40 µg) oder als Kontrolle mit humanem IgG (60 µg) für 1 h behandelt. Die Transmigration der Neutrophilen in den *„Air Pouch“* wurde durch die Gabe von KC induziert. Pro Versuchsbedingung wurden vier Tiere eingesetzt. Die eingewanderten Neutrophilen wurden im Durchflusszytometer über die Markierung der entsprechenden Leukozytenpopulation bestimmt. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Wildtyp-Tieren.

In den JAM-A-defizienten Tieren war die Anzahl der ausgewanderten Neutrophilen deutlich geringer als in den Wildtyp-Tieren und konnte nicht durch sJAM-A inhibiert werden (Abb. 4-32, blau). Diese Befunde belegen, dass JAM-A an der Leukozytenrekrutierung *in vivo* beteiligt ist und diese Funktion durch lösliches JAM-A blockiert werden kann.

II. Syndekan-1 und Syndekan-4

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Oberflächenproteoglykane untersucht, zu denen, wie schon in der Einleitung beschrieben, die Syndekane gehören. Es konnte gezeigt werden, dass auch Syndekane einer limitierten Proteolyse an der Zelloberfläche unterliegen. Experimente mit spezifischen Metalloprotease-Inhibitoren weisen darauf hin, dass dieser Prozess durch eine Metalloprotease vermittelt wird [Fitzgerald *et al*., 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus und die Regulation der Syndekan-Spaltung sowie die daran beteiligten Proteasen näher untersucht. Diese Untersuchungen wurden für Syndekan-1 und -4 durchgeführt, welche beide auf Endothel- und auf Epithelzellen exprimiert werden.

4.5 Konstitutives *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4 durch eine Metalloprotease

Zunächst wurde ein Verfahren etabliert, um lösliche Spaltfragmente von Syndekan-1 und -4 im Zellkulturüberstand der humanen Blasenkarzinom-Epithelzellen (ECV304) und humane Lungenepithelzellen (A549) nachzuweisen. Da es sich bei den Syndekanen um hochglykosylierte Proteine handelt, war ein Nachweis im *Western-blot* aufgrund einer schlechten Auftrennung nur schwer möglich. Daher wurden die Syndekane aus dem Zellkulturüberstand über eine *dot-blot*-Methode an eine kationische Nitrozellulosemembran gebunden. Hierzu wurden die Proben auf einen sauren pH (pH 4,5) umgepuffert. Bei diesen Bedingungen sind GAGs aufgrund ihres Säureanteils und der Modifikation mit Sulfatgruppen stark negativ geladen. Diese Ladung ermöglicht die Bindung der Proteoglykane an die positiv geladene Nitrozellulosemembran, wo sie mit spezifischen Antikörpern gegen Syndekan-1 bzw. -4 nachgewiesen werden konnten.
In der *dot-blot*-Untersuchung zeigte sich, dass sowohl ECV304-Zellen als auch A549-Zellen lösliches Syndekan-1 und -4 in den Zellkulturüberstand abgeben. Es erfolgte eine zeitabhängige Akkumulation der löslichen Fragmente in den Kulturüberständen (Abb. 4-33). Diese Daten zeigen, dass Syndekan-1 und -4 von Epithelzellen konstitutiv gebildet und abgegeben werden.

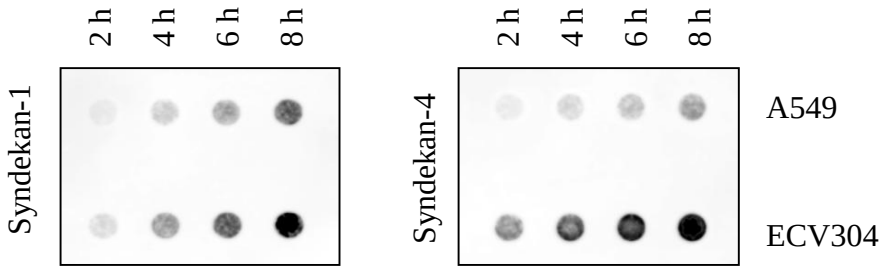


Abbildung 4-33: Nachweis von löslichem Syndekan-1 und Syndekan-4 im Überstand humaner Epithelzellen. Konfluente ECV304- und A549-Zellen wurden für 8 h in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Alle zwei Stunden wurde eine Probe der Zellkulturüberstände entnommen und in Syndekan-Puffer (pH 4,5) verdünnt. Für die Analyse im *dot-blot* wurden monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne verwendet.

Um die, an der Freisetzung von löslichen Syndekanen beteiligten, Proteasen zu identifizieren, wurden als Ausgangspunkt für die Untersuchungen die bereits vorgestellten Hydroxamat-basierten ADAM-Inhibitoren verwendet. Der Einfluss von TAPI-1, GI254023X und GW280264X auf die Epithelzellen sollte erste Informationen über die Beteiligung von Metalloproteasen an der Entstehung von löslichem Syndekan-1 und Syndekan-4 liefern.

Hierbei stellte sich heraus, dass durch die Inkubation der Zellen mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X sowie mit dem kommerziell erhältlichen Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 eine deutliche Reduktion des löslichen Fragmentes beider Syndekane erzielt werden konnte. TAPI-1 gilt ebenfalls als ein effektiver Inhibitor von ADAM17. Die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen ADAM10-Inhibitor GI254023X zeigte demgegenüber keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die Freisetzung von löslichen Syndekanen (Abb. 4-34).

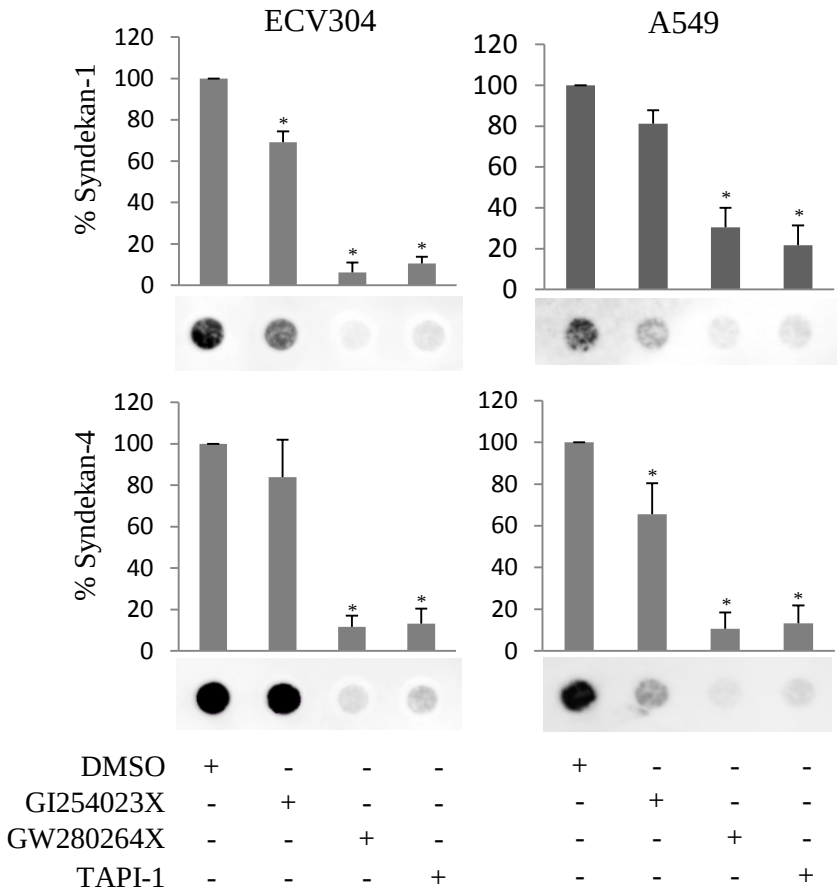


Abbildung 4-34: Das konstitutive *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4 in humanen Epithelzellen wird durch Metalloprotease-Inhibitoren reduziert. Konfluente ECV304- und A549-Zellen wurden mit GI254023X (10 µM), GW280264X (10 µM), TAPI-1 (20 µM) oder als Kontrolle mit DMSO für 16 h in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichem Syndekan untersucht. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die dazugehörigen Standardabweichungen bestimmt. *, $p<0,05$ gegenüber der DMSO Kontrolle.

Durchflusszytometrische Analysen zur Oberflächenexpression von Syndekanen auf ECV304- und A549-Zellen ergaben, dass die Behandlung mit dem Inhibitor GW280264X zu einer verstärkten Expression von Syndekan-1 und -4 auf der Zelloberfläche führte. Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass die Inhibition der Syndekan-Spaltung durch den ADAM10/17-Inhibitor zu einer Anreicherung von Syndekanen auf der Zelloberfläche führt (Abb. 4-35). Aufgrund des Inhibitionsprofils der getesteten Inhibitoren kommt ADAM17 als *Sheddase* für Syndekan-1 und -4 in Frage.

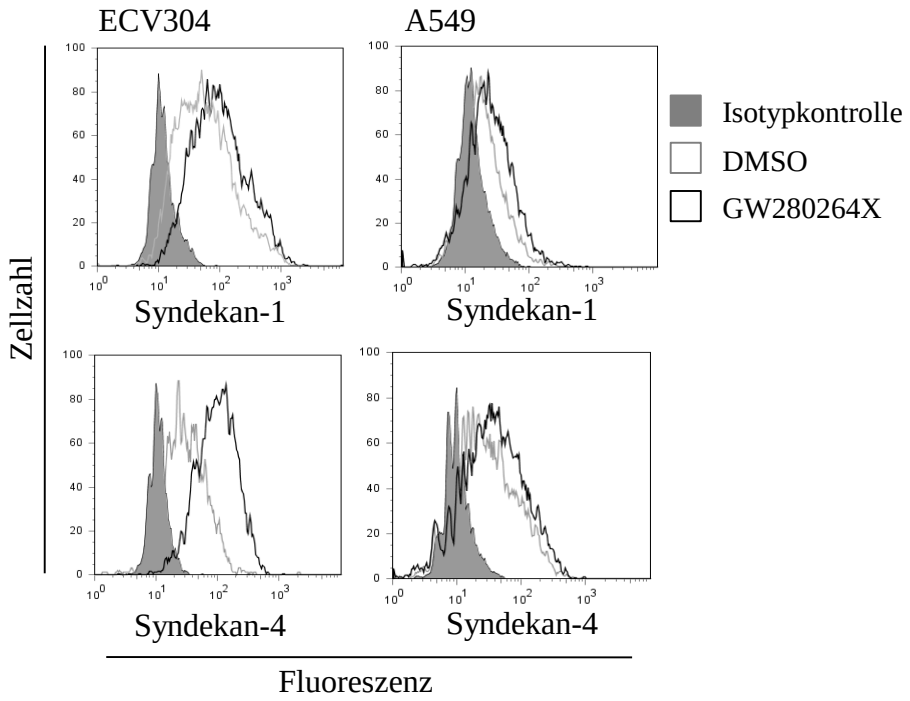


Abbildung 4-35: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren auf die Oberflächenexpression von Syndekanen. Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Syndekan-1 und -4 wurden die ECV304- und A549-Zellen nach 16 h GW280264X (10 µM) bzw. DMSO-Stimulation geerntet und durchflusszytometrisch untersucht. Die quantitative Auswertung der GeoMean-Werte von drei unabhängigen Experimenten ergab, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, eine signifikante (*) Zunahme der Oberflächenexpression nach der Behandlung mit GW280264X.

Um die Hypothese einer ADAM17-vermittelten Syndekan-Spaltung weiter untermauern zu können, wurde ein weiterer ADAM17-spezifischer Inhibitor, TMI-2 verwendet. Dieser Inhibitor hemmt insbesondere ADAM17, nicht jedoch ADAM10 oder MMPs, wie z.B. MMP7 oder MMP9 [Zhang *et al.*, 2004]. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei TMI-1 um einen kombinierten ADAM17/MMP-Inhibitor [Zhang *et al.*, 2004]. Sowohl TMI-1 als auch TMI-2 führten zu einer deutlich verminderten Freisetzung von löslichem Syndekan-1 und -4 in den Zellkulturüberstand der Epithelzelllinie A549 (Abb. 4-36).

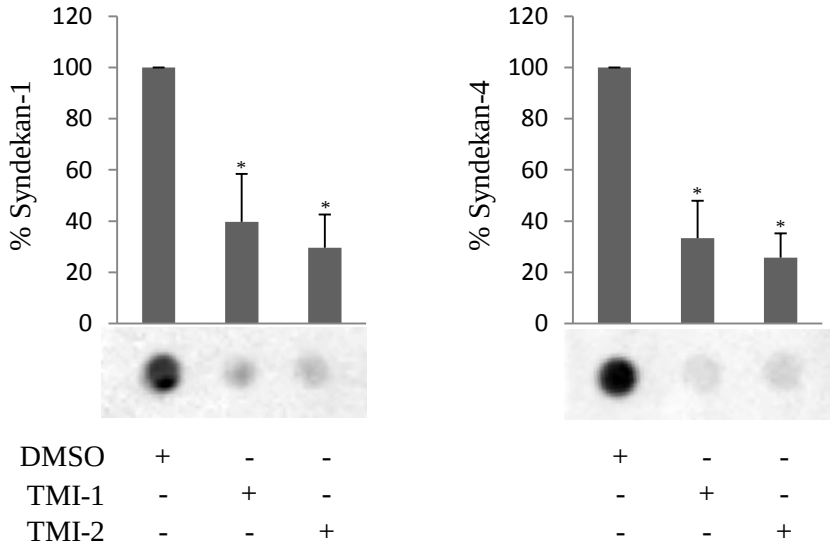


Abbildung 4-36: Inhibition des konstitutiven Syndekan-1 und Syndekan-4 *Shedding* durch Metalloprotease-Inhibitoren in humanen Epithelzellen. Konfluente A549-Zellen wurden mit TMI-1 (10 µM), TMI-2 (10 µM) oder als Kontrolle mit DMSO für 16 h in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichem Syndekan untersucht. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die dazugehörigen Standardabweichungen bestimmt. *, $p<0,05$ gegenüber der DMSO Kontrolle.

4.5.1 Einfluss von rekombinantem ADAM17 auf die Proteolyse von Syndekan-1 und -4

Um zu zeigen, dass ADAM17 generell in der Lage ist Syndekane zu spalten, wurden im folgenden Experiment die Epithelzellen mit der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 behandelt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme von löslichem Syndekan-1 und -4 im Zellkulturüberstand der beiden Epithelzelllinien (Abb. 4-37).

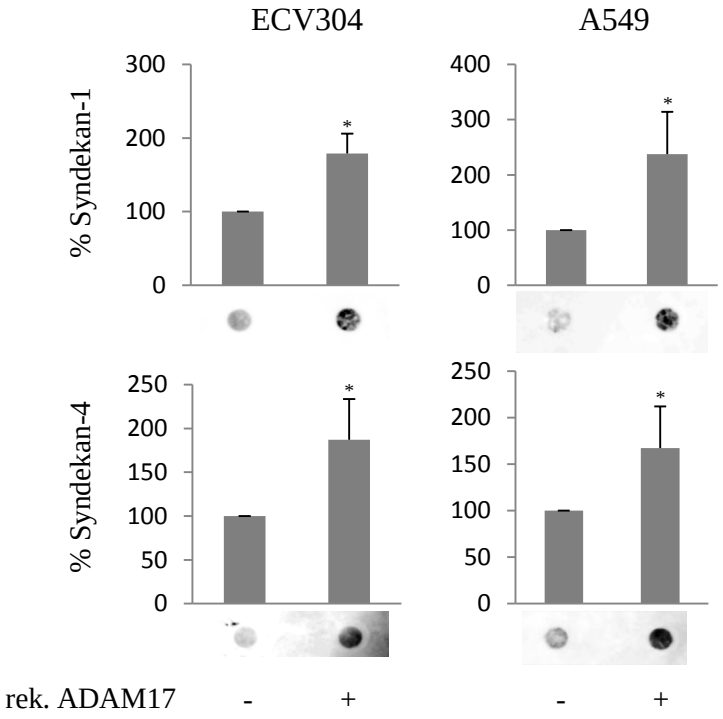


Abbildung 4-37: Rekombinantes ADAM17 führt zu einer vermehrten Abgabe von löslichen Syndekanen. ECV304- und A549-Zellen wurden für 3 h mit der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 bei 37°C in DMEM-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichem Syndekan untersucht. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

4.5.2 Reduktion des konstitutiven *Shedding* durch Herunterregulation von ADAM17

Durch die eingesetzten Metalloprotease-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass Syndekan-1 und -4 proteolytisch von der Zellmembran abgespalten werden. Ferner konnte die effektivste Inhibition mit dem ADAM10/17-spezifischen Inhibitor GW280264X erzielt werden. Eine schwächere Inhibition erfolgte mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X. Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß die beiden ADAM-Proteasen zur Syndekan-Proteolyse in Epithelzellen beitragen, wurde ein lentivirales-shRNA-System verwendet um einen stabilen *knock down* von ADAM10 und ADAM17 in den ECV304-Zellen zu erreichen.

In einem ersten Schritt wurde getestet, ob die spezifischen shRNA-Konstrukte im Vergleich zur shRNA-Kontrolle, in der Lage sind einen *gene knock down* zu erzielen. Die erfolgreiche Herunterregulation durch den Einsatz der shRNA-Konstrukte konnte auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (Abb. 4-38 A) und zusätzlich auf Ebene der

Proteinoberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abb. 4-38 B).

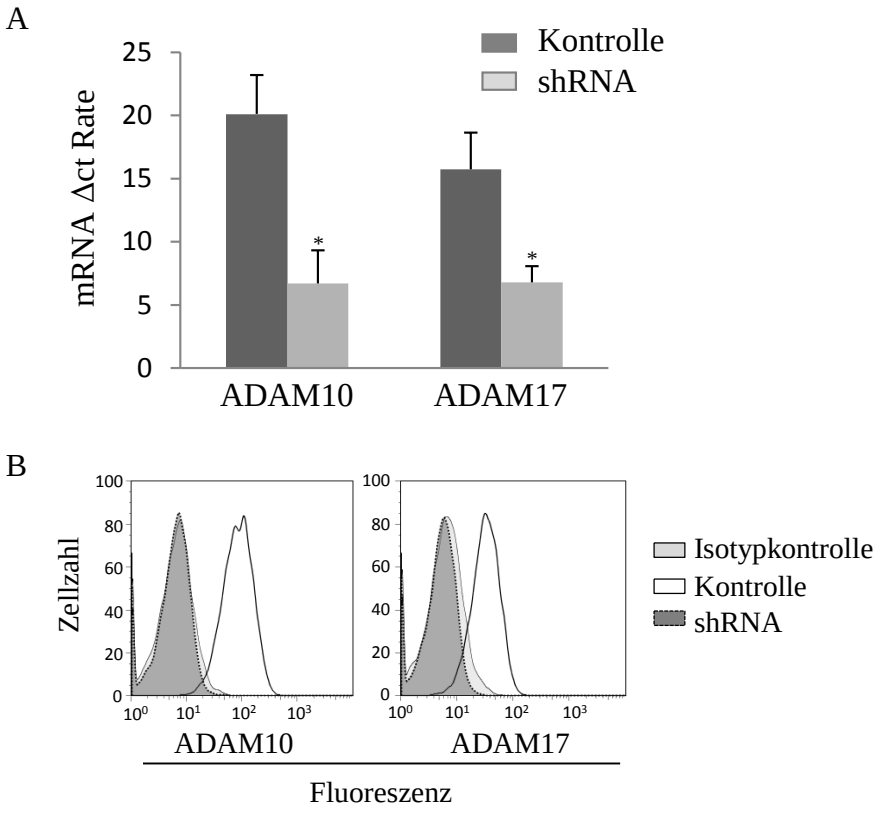


Abbildung 4-38: Analyse der ADAM10- und ADAM17-Expression in ECV304-Zellen nach dem spezifischen *knock down* von ADAM10 und ADAM17. ECV304-Zellen wurden mit shRNA für ADAM10, ADAM17 oder Kontroll-shRNA Sequenzen transduziert. **(A)** Der *knock down* wurde mittels quantitativer-RT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Die Graphen zeigen die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle. **(B)** Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von ADAM17 und ADAM10 wurden die ECV304-Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Des weiteren wurden die Zellkulturüberstände der mit shRNA herunterregulierten Zellen mittels *dot-blot* auf die Freisetzung von löslichem Syndekan-1 und -4 analysiert. Es zeigte sich, dass in den 24 h konditionierten Kulturüberständen eine stark verminderte Proteolyse der beiden Syndekane in den mit ADAM17-shRNA-behandelten Zellen in Relation zu Kontroll-shRNA-behandelten Zellen nachweisbar war (Abb. 4-39).

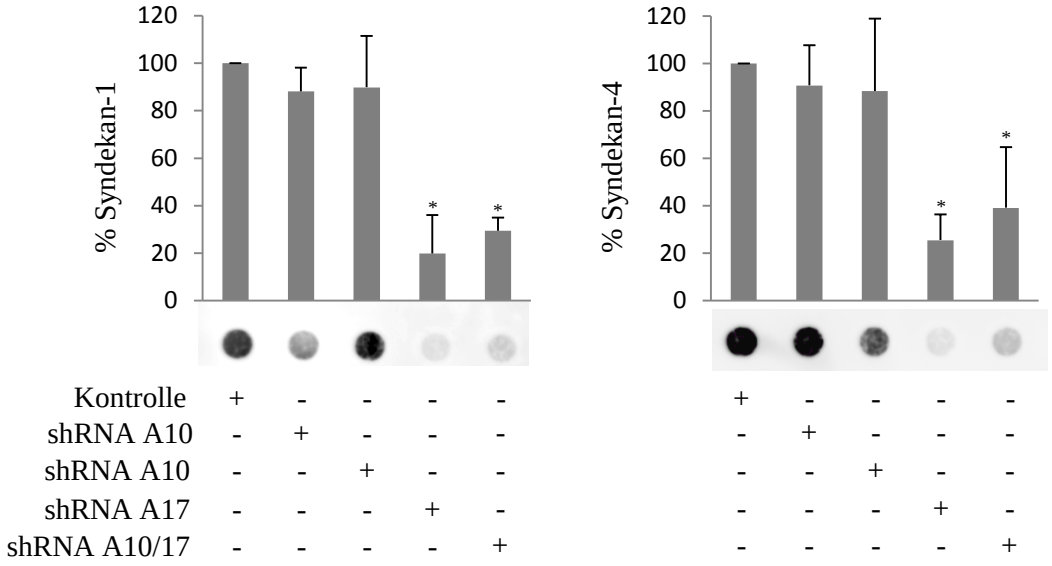


Abbildung 4-39: Konstitutives *Shedding* von Syndekan-1 und -4 nach dem *knock down* von ADAM10 und ADAM17. Die Zellkulturüberstände der mit shRNA transduzierten ECV304-Zellen wurden mittels *dot-blot*-Analyse auf den Gehalt an löslichem Syndekan untersucht. Es ist jeweils ein repräsentativer *dot-blot* der Zellkulturüberstände abgebildet. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. *, $p<0,05$ gegenüber der shRNA-Kontrolle.

Der *knock down* von ADAM10 zeigte keinen Einfluss auf das konstitutive *Shedding* von Syndekan-1 und -4. Die Ergebnisse zeigen, dass eine verminderte ADAM17-Expression mit einer verminderten Proteolyse von Syndekanen einhergeht. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Metalloprotease ADAM17 maßgeblich für das konstitutive *Shedding* von Syndekan-1 und -4 verantwortlich ist.

4.6 Regulation der Syndekan-1- und Syndekan-4-Spaltung

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Abspaltung von löslichem Syndekan-1 und -4 durch die Stimulation der Zellen gesteigert werden kann. Der Phorbolester PMA gilt als potenter Induktor vieler *Shedding*-Prozesse, unter anderem auch für die Spaltung von Syndekanen. Die Abgabe der löslichen Ektodomäne erfolgt nach Zugabe von PMA generell sehr rasch. Um dies zunächst zu bestätigen, wurde eine Behandlung der Zellen mit PMA über verschiedene Zeiträume durchgeführt. Schon in den ersten 2 h kam es zu einer deutlichen Steigerung der Freisetzung von löslichem Syndekan-1 und -4 (Abb. 4-40).

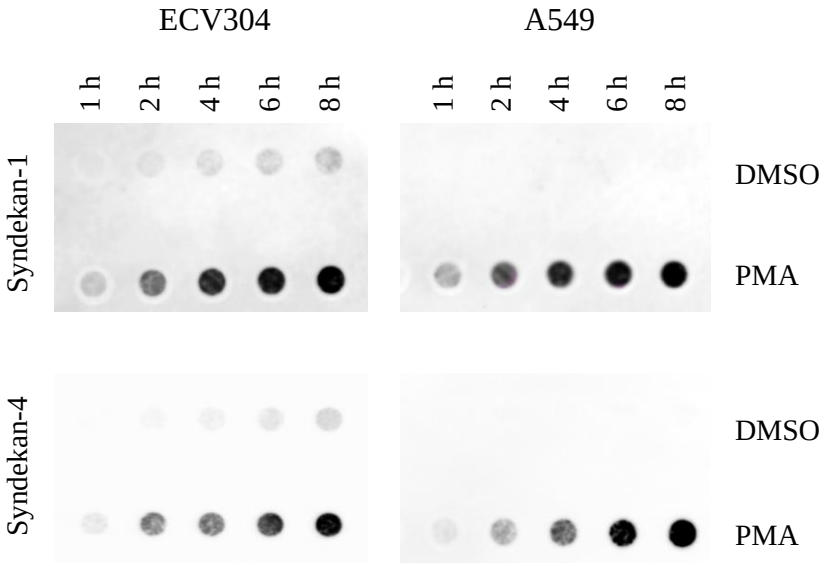


Abbildung 4-40: Zeitabhängiger PMA-Effekt des Syndekan-1 und Syndekan-4 *Shedding*. Konfluente ECV304- und A549-Zellen wurden für 8 h in serumfreiem DMEM-Medium in der Anwesenheit von PMA (200 ng/ml) oder als Kontrolle mit DMSO kultiviert. In regelmäßigen Zeitabständen (1, 2, 4, 6 und 8 h) wurde eine Probe der Zellkulturüberstände entnommen, in Syndekan-Puffer (pH 4,5) verdünnt und im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichen Syndekanen analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer *dot-blot* von vier unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde untersucht, ob die durch PMA vermittelte schnelle Freisetzung von Syndekan-1 und -4 mit einer Reduktion der Oberflächenexpression beider Syndekane einhergeht. In dem mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Histogramm war eine deutliche Abnahme der Oberflächenexpression von Syndekan-1 und -4 nach der PMA-Behandlung zu erkennen (Abb. 4-41). Demnach erfolgt die PMA-vermittelte, schnelle Freisetzung von Syndekanen durch eine erhöhte Proteolyse an der Zelloberfläche.

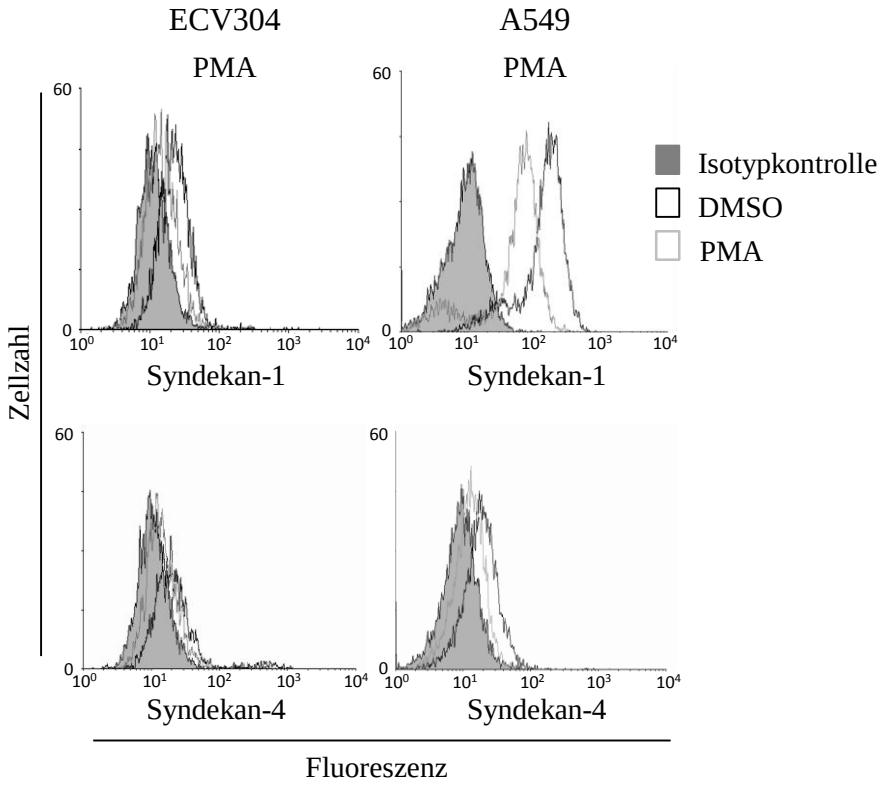


Abbildung 4-41: PMA-induziertes *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4. Konfluente ECV304- und A549-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium in Anwesenheit von PMA (200 ng/ml) oder als Kontrolle mit DMSO kultiviert. Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Syndekan-1 und -4 wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Histogramm von vier unabhängigen Experimenten.

4.6.1 Induktion der Spaltung von Syndekan-1 und Syndekan-4 durch proinflammatorische Mediatoren

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Epithelzellen und Endothelzellen mit *thrombin receptor activating peptide* (TRAP)-6 sowie mit einer Kombination aus den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α und IFN-γ *in vitro* zu einer erhöhten Freisetzung von löslichem Syndekan führt [Fitzgerald *et al.*, 2000]. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden die Epithelzellen zeitabhängig mit diesen Stimulantien inkubiert. Bei TRAP-6 handelt es sich um ein synthetisches Peptid, welches an den Thrombinrezeptor bindet und darüber einige Thrombineffekte nachahmen kann. TRAP-6 führte in diesem Fall bereits nach 30 min zu einer Induktion der Abspaltung von Syndekan-1 und -4 in beiden Epithelzelllinien (Abb. 4-42), wohingegen die proinflammatorischen Zytokine erst nach einer Behandlung über einen Zeitraum von 16-

24 h eine vermehrte Freisetzung der löslichen Syndekane in den Zellkulturüberstand von A549-Zellen bewirkten (Abb. 4-43).

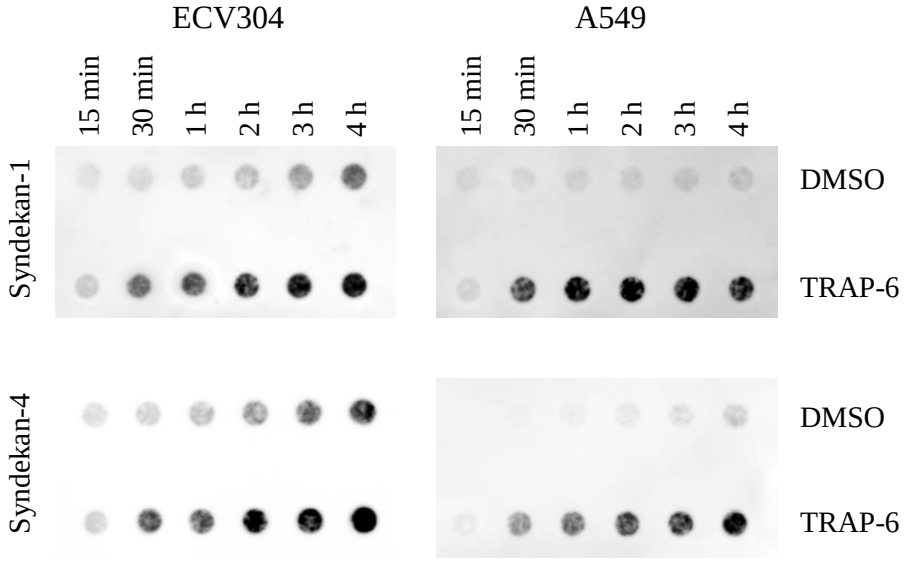


Abbildung 4-42: Zeitabhängiger TRAP-6-Effekt auf des Syndekan-1 und Syndekan-4 *Shedding.* Konfluente ECV304- und A549-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium in Anwesenheit von TRAP-6 (5 µM) oder als Kontrolle mit DMSO kultiviert. Nach 15 min, 30 min. und danach stündlich wurde je eine Probe der Zellkulturüberstände entnommen, in Syndekan-Puffer (pH 4,5) verdünnt und der Gehalt an löslichen Syndekanen mittels *dot-blot*-Analyse bestimmt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer *dot-blot* von vier unabhängigen Experimenten.

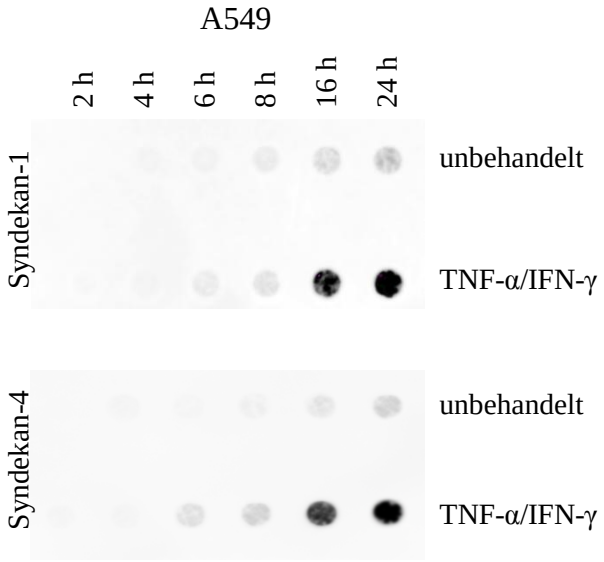


Abbildung 4-43: Zeitabhängiger TNF-α/IFN-γ-Effekt auf des Syndekan-1 und Syndekan-4 *Shedding*. Konfluente A549-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium in Anwesenheit von TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) oder unbehandelt kultiviert. Es wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben der Zellkulturüberstände entnommen und im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichen Syndekanen analysiert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer *dot-blot* von vier unabhängigen Experimenten.

Wie durchflusszytometrische Analysen zeigten, korrelierte die stimulierte Freisetzung beider Syndekane auf A549-Zellen mit einer deutlichen Abnahme der Oberflächenexpression von Syndekan-1 und -4 nach der Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen (Abb. 4-44). Folglich bewirkt die Kombination aus TNF-α/IFN-γ eine Reduktion der Syndekan-Oberflächenexpression und eine vermehrte Freisetzung der löslichen Syndekan-Ektodomäne.

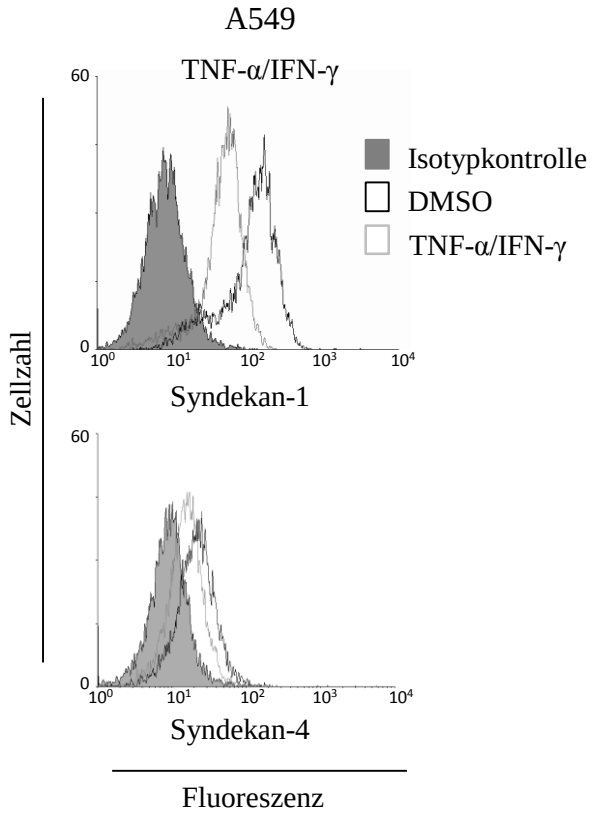


Abbildung 4-44: TNF-α/IFN-γ induziertes *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4. Konfluente A549-Zellen wurden für 16 h in serumfreiem Medium in Anwesenheit von TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) oder als Kontrolle unbehandelt kultiviert. Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Syndekan-1 und -4 wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die abgebildeten Histogramme sind repräsentative für vier unabhängige Experimente.

4.6.2 Die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM17 vermittelt das induzierbare *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4

Um die Beteiligung der Metalloprotease ADAM17 am induzierten *Shedding* der Syndekane-1 und -4 nachzuweisen, wurden Stimulationsversuche in An- und Abwesenheit von Metalloprotease-Inhibitoren durchgeführt. Es zeigte sich, dass die PMA-induzierte

Freisetzung von löslichen Syndekanen sowohl durch den Einsatz des kombinierten ADAM10/17-Inhibitors GW280264X als auch durch den ADAM17-Inhibitor TAPI-1 nahezu vollständig reduziert werden kann (Abb. 4-45).

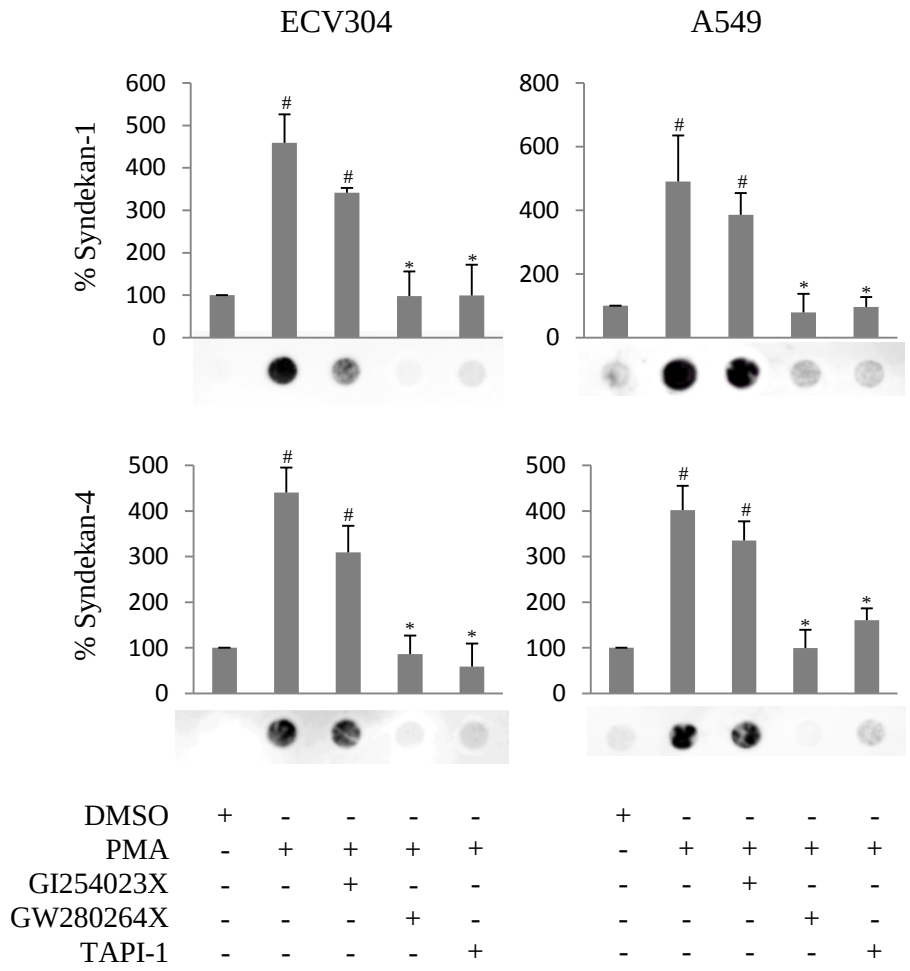


Abbildung 4-45: Das PMA-induzierte Shedding von Syndekan-1 und Syndekan-4 wird durch den ADAM10/17-Inhibitor reduziert. ECV304- und A549-Zellen wurden mit PMA (200 ng/ml) für 2 h inkubiert. Die Zellen wurden zuvor über Nacht mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X (10 µM), dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X (10 µM) und TAPI-1 (20 µM) oder als Kontrolle mit DMSO vorinkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden im Anschluss mittels *dot-blot*-Analyse auf den Gehalt an löslichem Syndekan analysiert. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die dazugehörige Standardabweichung bestimmt. #, $p<0,05$ gegenüber der DMSO Kontrolle bzw. *, $p<0,05$ gegenüber den stimulierten Zellen. Zusätzlich ist ein repräsentativer *dot-blot* abgebildet.

In den TRAP-6- und TNF-α/IFN-γ-stimulierten Epithelzellen konnte das induzierte *Shedding* der beiden Syndekane ebenfalls durch den kombinierten ADAM10/17-Inhibitor GW280264X sowie durch TAPI-1 nahezu vollständig inhibiert werden. Die Behandlung der Zellen mit GI254023X zeigte dagegen nur eine geringe nicht signifikante Abnahme (Abb. 4-46).

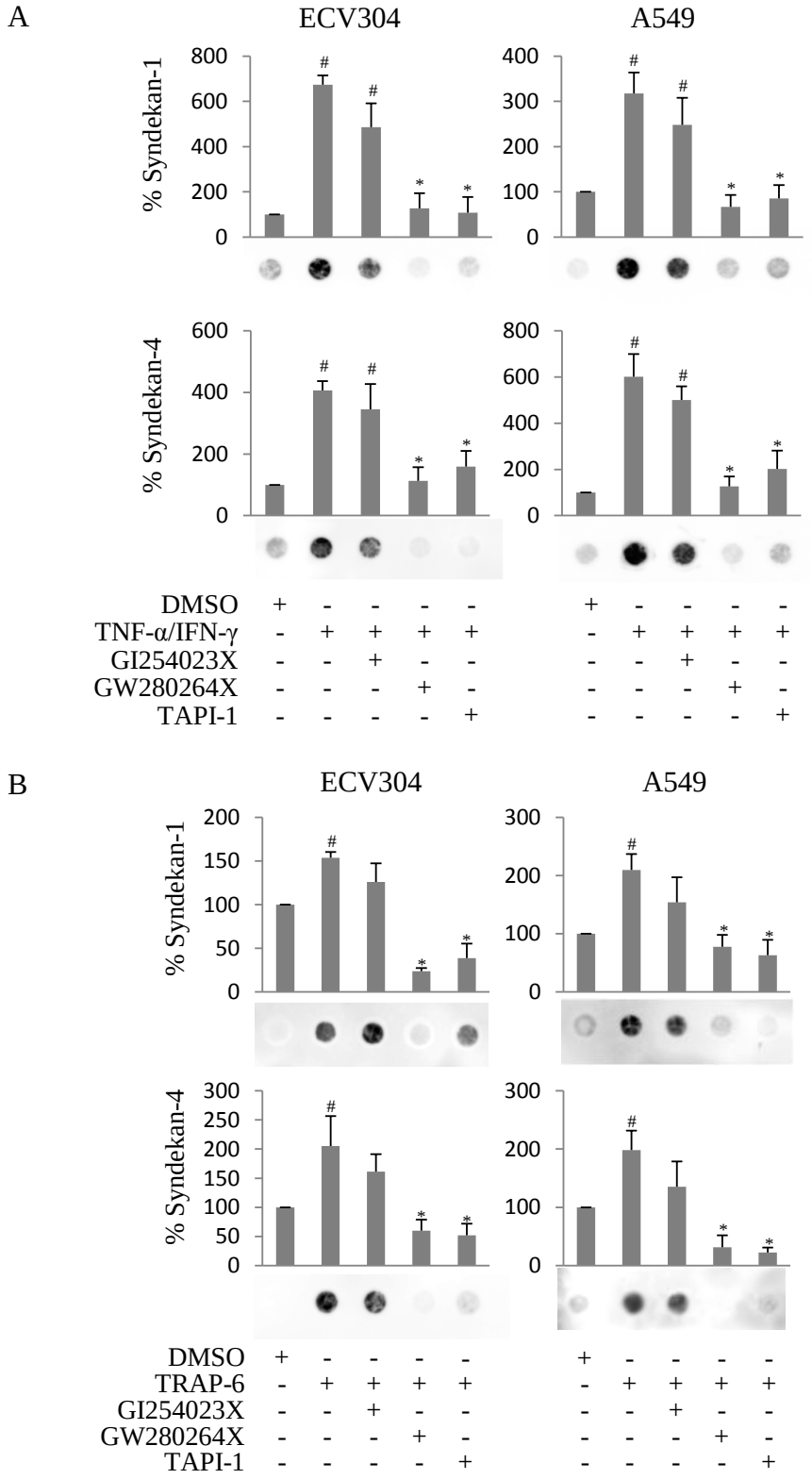


Abbildung 4-46: Das induzierte *Shedding* von Syndekan-1 und Syndekan-4 wird durch den ADAM10/17 Metalloprotease-Inhibitor reduziert. ECV304- und A549-Zellen wurden mit **(A)** TNF-α/IFN-γ (10 ng/ml) oder **(B)** TRAP-6 (5 µM) in An- oder Abwesenheit von GI254023X (10 µM), GW280264X (10 µM) oder TAPI-1 (20 µM) oder als Kontrolle mit DMSO für 16 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden im Anschluss mittels *dot-blot*-Analyse auf den Gehalt an löslichem Syndekan analysiert. Die quantitative Auswertung wurde densitometrisch von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. #, $p<0,05$ gegenüber der DMSO Kontrolle bzw. *, $p<0,05$ gegenüber den stimulierten Zellen. Zusätzlich ist jeweils ein repräsentativer *dot-blot* abgebildet.

Um die Bedeutung von ADAM17 für das durch proinflammatorische Zytokine induzierte *Shedding* von Syndekan zu bestätigen, wurden shRNA-Experimente zur Herabregulation von ADAM10 und ADAM17 durchgeführt. Eine Analyse im *dot-blot* zeigte in Analogie zu den mit Inhibitoren erhaltenen Daten, dass die durch TNF-α/IFN-γ induzierte Abgabe von löslichem Syndekan-1 und -4 durch den ADAM17-*knock down* deutlich reduziert war. Die Transduktion der Zellen mit Kontroll-shRNA, sowie der ADAM10-*knock down* zeigten keinen reduzierenden Effekt (Abb. 4-47). Eine Verstärkung des ADAM17-shRNA-Effekts durch GW280264X oder TAPI-1 konnte nicht gezeigt werden, jedoch wurde das induzierte *Shedding* von Syndekan-1 und -4 in den ADAM10 *knock down*-Zellen, sowie auch in den Kontroll-shRNA-Zellen durch die Metalloprotease-Inhibitoren reduziert.

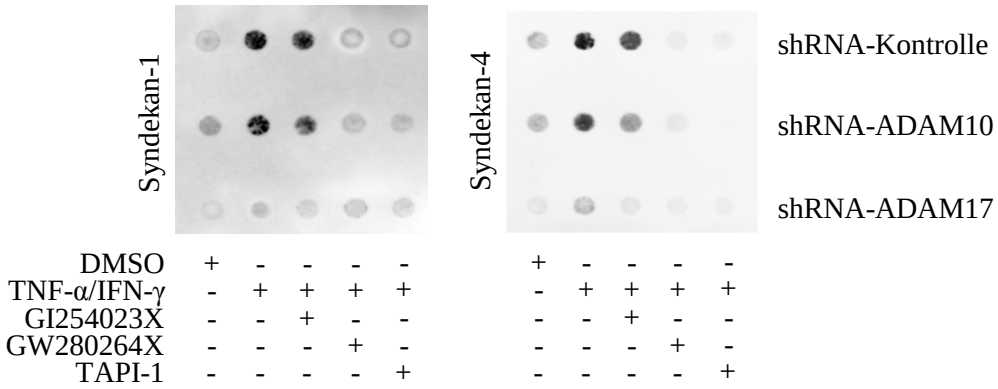


Abbildung 4-47: TNF-α/IFN-γ-induziertes *Shedding* der Syndekane nach dem *knock down* von ADAM10 oder ADAM17. Die Zellkulturüberstände der mit shRNA transduzierten ECV304-Zellen wurden mittels *dot-blot* auf den Gehalt an löslichen Syndekanen untersucht. Zusätzlich fand eine Behandlung mit den Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X (10 µM), GW280264X (10 µM), TAPI-1 (20 µM) oder als Kontrolle mit DMSO für 16 h statt. Es ist jeweils ein repräsentativer *dot-blot* der Zellkulturüberstände abgebildet.

Um ausschließen zu können, dass die Zunahme der löslichen Syndekane im Zellkulturüberstand der Epithelzellen durch eine Geninduktion und somit durch eine möglicherweise erhöhte Proteinbiosynthese bedingt wurde, sollte der Syndekan-1 und -4 mRNA-Gehalt mittels quantitativer RT-PCR bestimmt werden. Diese Versuche zeigten, dass eine Stimulation der Epithelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen zu keiner Geninduktion von Syndekan-1 und -4 führte. Darüber hinaus konnte auch keine Zunahme der ADAM10- und ADAM17-Expression beobachtet werden (Abb. 4-48).

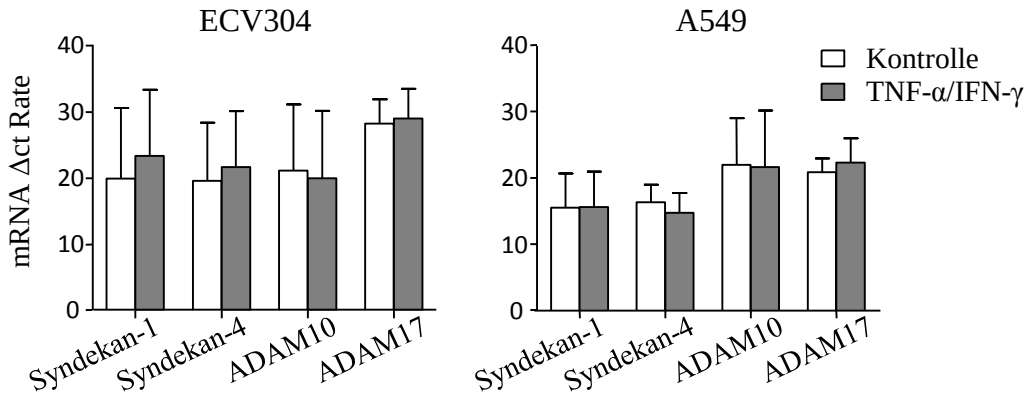


Abbildung 4-48: Analyse des mRNA-Gehalts in A549- und ECV304-Zellen. Nach Behandlung der EVC304- bzw. A549-Zellen für 24 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) wurden die Syndekan-1, Syndekan-4, ADAM10 und ADAM17 mRNA-Mengen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung.

4.7 Die regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) durch den γ-Sekretase-Komplex

Biochemische Analysen der Spaltprodukte nach dem *Shedding* von Syndekanen zeigen, dass die Spaltung im extrazellulären Teil kurz über der Membran stattfindet. Neben der löslichen N-terminalen Ektodomäne entsteht außerdem ein C-terminales Spaltfragment, welches aus der transmembranen und der intrazellulären Region besteht.

Eine zentrale Rolle in der regulierten intramembranen Proteolyse von Typ-I-Transmembranproteinen nimmt der im hydrophoben Milieu der Plasmamembran wirkende γ-Sekretase-Komplex ein. Der 400-600 kDa umfassende Komplex setzt sich aus den Proteinen Nicastrin, APH-1 (*anterior pharynx-defective* 1), Pen-2 (*presenilin enhancer* 2) und den proteolytisch aktiven Presenilinen zusammen [Tolia *et al.*, 2009]. Um eine mögliche weitere Spaltung von Syndekan-1 und -4 zu untersuchen, wurde das nach der Proteolyse in der Zellmembran verbleibende C-terminale Fragment (CTF) näher untersucht. Da es sich bei den Syndekanen um hochglykosylierte Proteine handelt, wodurch der Nachweis im *Western-blot* erschwert wird, wurden die Syndekane mit einem 2Z-His-Tag fusioniert. Über diese Markierung kann das in der Membran verbleibende Fragment im *Western-blot* mit Hilfe eines unspezifischen Kaninchen-Immunserums nachgewiesen werden. Zusätzlich lassen sich auch die unprozessierten Formen detektieren.

In einem ersten Versuch sollte getestet werden, ob die Syndekan-1- und -4-2Z-His-Tag-Fusionsproteine an die Zellmembran transportiert werden können. Dafür wurde die Zunahme der Syndekan-Oberflächenexpression nach der Transfektion von HEK293-Zellen mit den Syndekan_2Z-His-Fusionsproteinen durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 4-49).

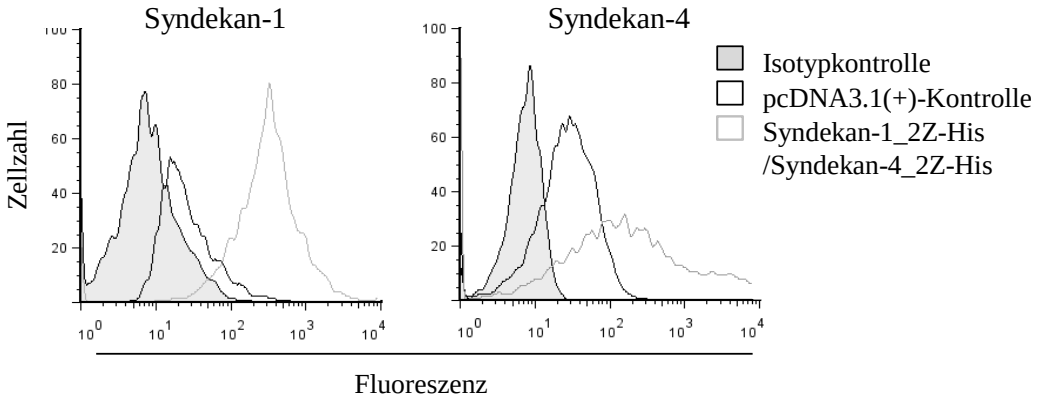


Abbildung 4-49: Analyse der Oberflächenexpression von Syndekan-1_2Z-His und Syndekan-4_2Z-His in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für Syndekan-1_2Z-His, Syndekan-4_2Z-His oder dem pcDNA3.1(+) Leervektor transfiziert. Die Überexpression von Syndekan-1_2Z-His und Syndekan-4_2Z-His wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf der Zelloberfläche kontrolliert.

Eine erste Analyse der transient transfizierten HEK293-Zellen mittels *Western-blot*-Analyse der Zelllysate ergab, dass bei dem Syndekan-1_2Z-His-Fusionsprotein zwei C-terminale Fragmente (CTF) von ca. 28 kDa und 32 kDa sowie das Voll-Längenprotein bei ca. 70 kDa nachgewiesen werden konnte. Bei den Syndekan-4_2Z-His transfizierten HEK293-Zellen zeigte sich ein CTF bei ca. 25 kDa und das Voll-Längenprotein bei ca. 47 kDa (Abb. 4-50). Während die Inhibition von ADAM10 zu keiner Abnahme der CTF-Spaltfragmente führte, konnte durch den Einsatz des ADAM10/17-Inhibitors eine nahezu vollständige Reduktion der Fragmente beobachtet werden. Wurde der γ-Sekretase-Komplex mit Hilfe des Inhibitors DAPT inhibiert, führte dies zur Akkumulation der CTFs, was darauf hinweist, dass die CTFs von Syndekan-1 und -4 einem weiteren Abbau durch die γ-Sekretase unterliegen. Um die Reihenfolge der proteolytischen Prozessierung zu ermitteln und um zu analysieren, ob der Abbau durch γ-Sekretase unabhängig von der α-Sekretase ADAM17 stattfindet, oder ob der Schnitt von ADAM17 eine Voraussetzung für die nachfolgende Prozessierung durch die γ-Sekretase darstellt, wurden die Zellen mit einer Kombination aus dem ADAM10/17-Inhibitor und dem γ-Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt. Dabei war zu erkennen, dass es zu keiner Anreicherung der CTFs durch den

DAPT-Inhibitor kam, wenn die Prozessierung durch die α-Sekretase gehemmt wurde (Abb. 4-50).

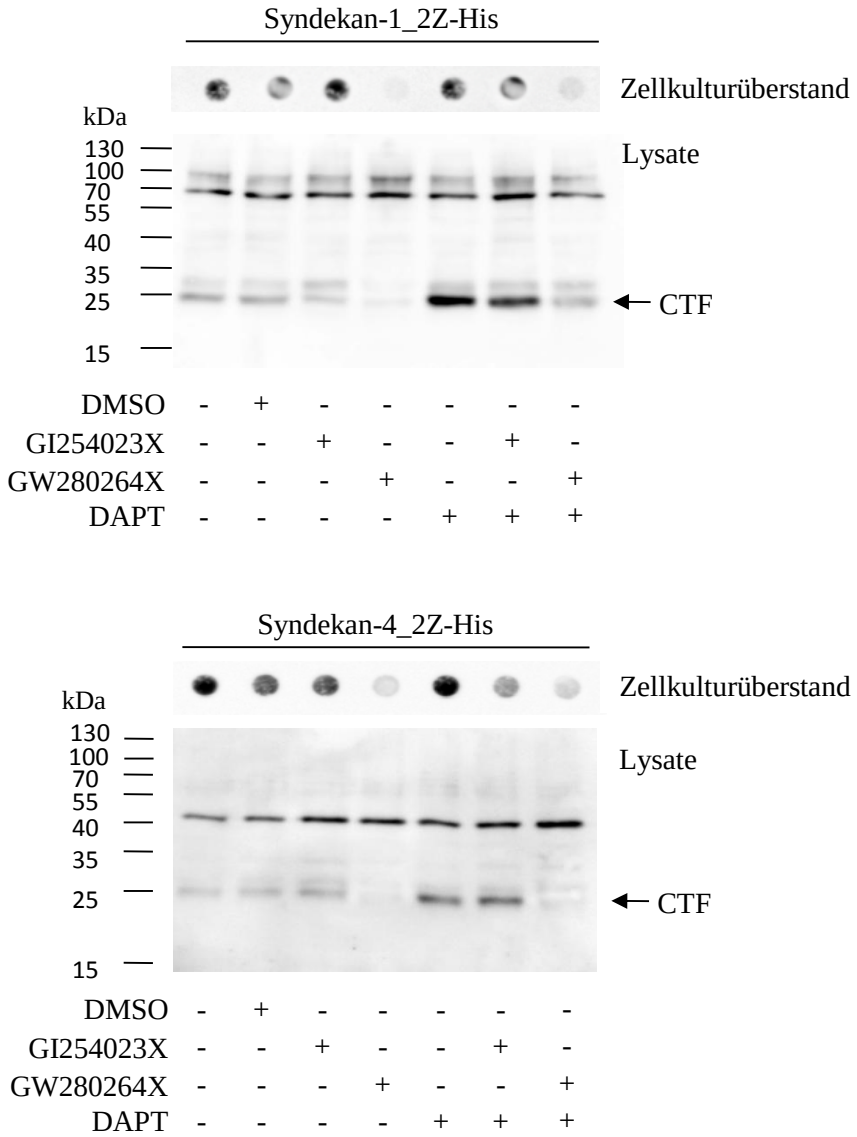


Abbildung 4-50: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren sowie des γ-Sekretase-Inhibitors auf die Bildung der Syndekan-CTFs. HEK293-Zellen wurden mit Syndekan-1_2Z-His bzw. Syndekan-4_2Z-His transfiziert. Diese transient transfizierten Zellen wurden für 16 h mit den Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X (10 µM) und GW280264X (10µM) in An- und Abwesenheit des γ-Sekretase-Inhibitors DAPT (5µM) behandelt und die Zelllysate anschließend im *Western-blot* analysiert. Für Syndekan-1 und Syndekan-4 ist jeweils ein repräsentativer *Western-blot* abgebildet. Zusätzlich wurden die Zellkulturüberstände im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichen Syndekanen untersucht und jeweils in einem repräsentativen *dot-blot* dargestellt.

Zusätzlich wurden die Zellkulturüberstände auf ihren Gehalt an löslichem Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 untersucht. Analog zu den in den Zelllysaten erhaltenen Ergebnissen, konnte die Freisetzung der Ektodomäne durch den ADAM10/17-Inhibitor verhindert

werden, nicht aber durch den ADAM10-Inhibitor. Auch der γ-Sekretase-Inhibitor war nicht in der Lage die Abspaltung der Ektodomäne zu inhibieren. Somit scheint der durch die α-Sekretase ADAM17 vermittelte Schritt notwendig zu sein, damit die γ-Sekretase im Anschluss daran das in der Membran verbleibende Fragment schneiden kann.

Nachdem die Beteiligung von ADAM17 an der Bildung der CTFs bestätigt war, wurde das induzierte *Shedding* näher betrachtet. Die PMA-Stimulation von Syndekan_2Z-His transfizierten HEK293-Zellen führte sowohl zu einer verstärkten Akkumulation der CTFs im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in den Zelllysaten, als auch zu einer Anreicherung der löslichen Syndekan-Fragmente im Zellkulturüberstand (Abb. 4-51). Dieser Effekt konnte durch Präinkubation der Zellen mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X aufgehoben werden, nicht aber durch eine Vorinkubation mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X.
Eine Inhibition des γ-Sekretase-Komplexes führte nach PMA-Stimulation zu einer Akkumulation der CTFs, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die induzierte Abgabe der löslichen Syndekan-Fragmente im Zellkulturüberstand. Eine parallele Inhibition von ADAM17 und dem γ-Sekretase-Komplex während der PMA-induzierten Syndekan-Proteolyse konnte die Akkumulation der CTFs verhindern. Zusätzlich konnte auch die PMA-induzierte Anreicherung der löslichen Syndekane im Zellkulturüberstand inhibiert werden.
Nach der PMA-induzierten Spaltung der Syndekane durch ADAM17 erfolgt also ein weiterer Abbau der CTFs durch die γ-Sekretase, welcher von einer vorhergehenden Spaltung der Syndekane durch ADAM17 abhängig ist.

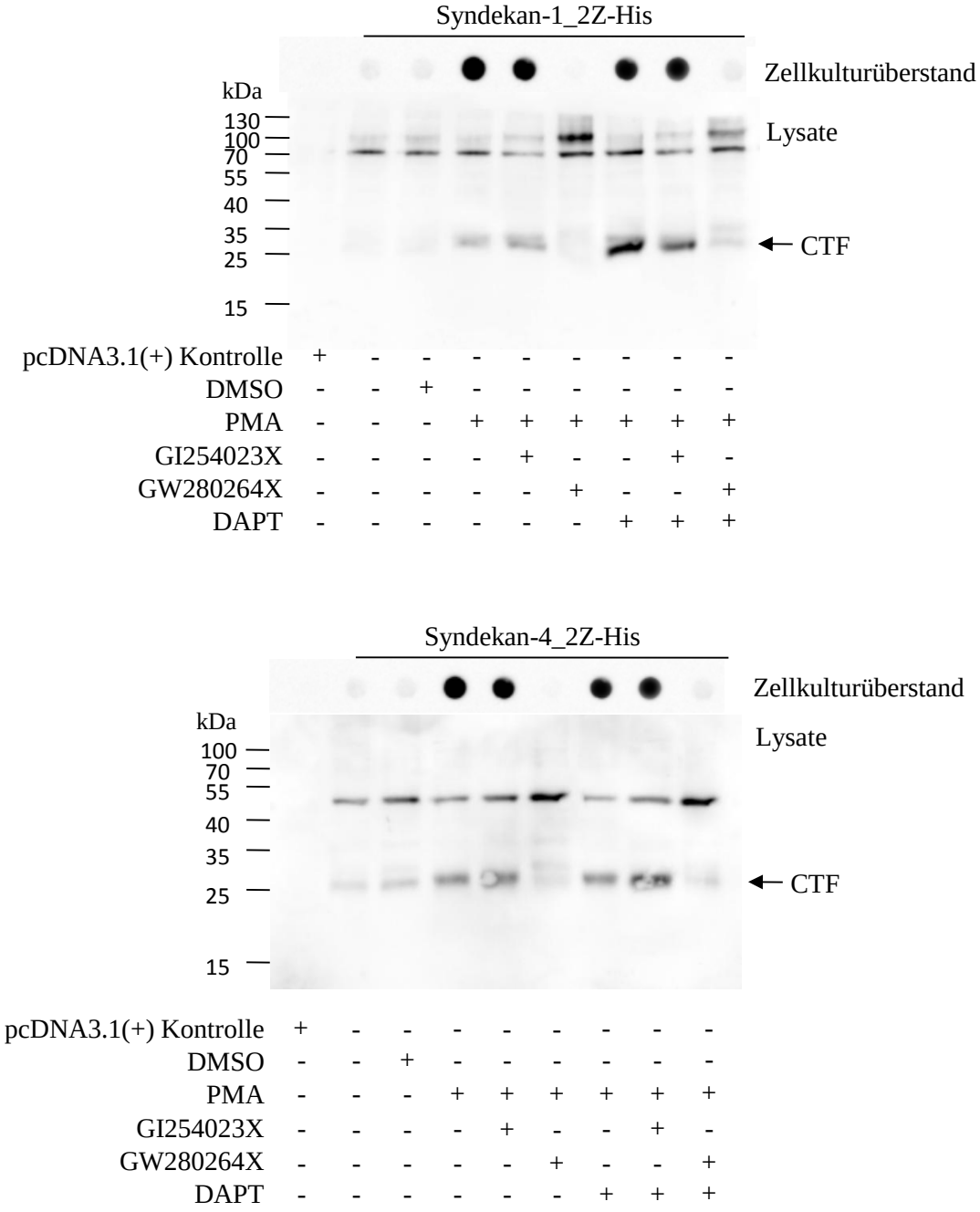


Abbildung 4-51: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren sowie des γ-Sekretase-Inhibitors auf die Bildung der CTFs in PMA-stimulierten Zellen. HEK293-Zellen wurden mit Syndekan-1_2Z-His bzw. Syndekan-4_2Z-His oder als Kontrolle mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfiziert. Diese transient transfizierten Zellen wurden für 16 h mit den Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X (10 µM) oder GW280264X (10µM) in An- und Abwesenheit des γ-Sekretase-Inhibitors DAPT (5 µM) vorinkubiert und im Anschluss das *Shedding* durch PMA (200 ng/ml) induziert. Die Zelllysate wurden im *Western-blot* analysiert. Für Syndekan-1 und Syndekan-4 ist jeweils ein repräsentativer *Western-blot* aus drei unabhängigen Versuchen abgebildet. Zusätzlich wurden die Zellkulturüberstände im *dot-blot* auf den Gehalt an löslichem Syndekan analysiert und jeweils ein repräsentativer *dot-blot* von drei unabhängigen Versuchen abgebildet.

4.8 Mögliche funktionelle Konsequenzen der Syndekan-Spaltung

Wie in den vorhergehenden Experimenten gezeigt werden konnte, führt ein verstärktes *Shedding* von Syndekanen zu einer Abnahme der Syndekan-Oberflächenexpression. Um die funktionellen Konsequenzen einer verminderten Syndekan-Oberflächenexpression am Beispiel von Syndekan-4 zu testen, wurde ein im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Sven Schmidt hergestelltes shRNA-Konstrukt für die Herunterregulation der Syndekan-4 Expression verwendet. Zunächst wurde die erfolgreiche Herunterregulation in A549-Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 452).

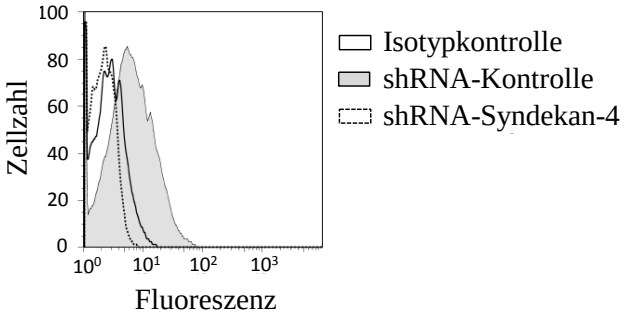


Abbildung 4-52: Analyse des Syndekan-4 *knock down* in A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit shRNA für Syndekan-4 oder Kontroll-shRNA-Sequenzen transduziert. Zum Nachweis des *knock downs* wurde die Oberflächenexpression von Syndekan-4 in A549-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Abgebildet ist ein Histogramm.

4.8.1 Die Zellmigration in Syndekan-4-defizienten Zellen

Syndekan-4-defiziente Mäuse weisen eine deutlich verzögerte Heilung von Hautwunden auf, welche möglicherweise auf einer verminderten Migration der Zellen beruht [Echtmeyer *et al*., 2001]. Aus diesem Grund sollten A549-Epithelzellen, bei denen mittels shRNA ein *knock down* von Syndekan-4 stattfand, im Bezug auf ihre Migrationsfähigkeit untersucht werden.

Für diese Analyse der Wanderungskapazität wurde ein *in vitro* Wundheilungsassay, der schon beschriebene *scratch-assay*, durchgeführt. Der konfluente Zellmonolayer wurde mit einer Pipettenspitze gleichmäßig zerstört und anschließend die Einwanderung der Zellen in diese zellfreien Wundbereiche nach 0 h und 24 h fotografisch dokumentiert und die in den Wundbereich eingewanderten Zellen ausgezählt.

Wie die abgebildeten repräsentativen Ausschnitte aus solchen Wundbereichen zeigen, waren die Kontroll-shRNA-transduzierten Zellen in der Lage die gesetzte Wunde nach 24

h vollständig zu schließen. Im Gegensatz dazu, wurden bei den Syndekan-4-herunterregulierten Zellen die Wundgebiete nicht komplett geschlossen (Abb. 4-53). An diesen Ergebnissen zeigt sich, dass Zellen mit einer reduzierten Syndekan-4-Expression eine geringere Migrationskapazität aufweisen.

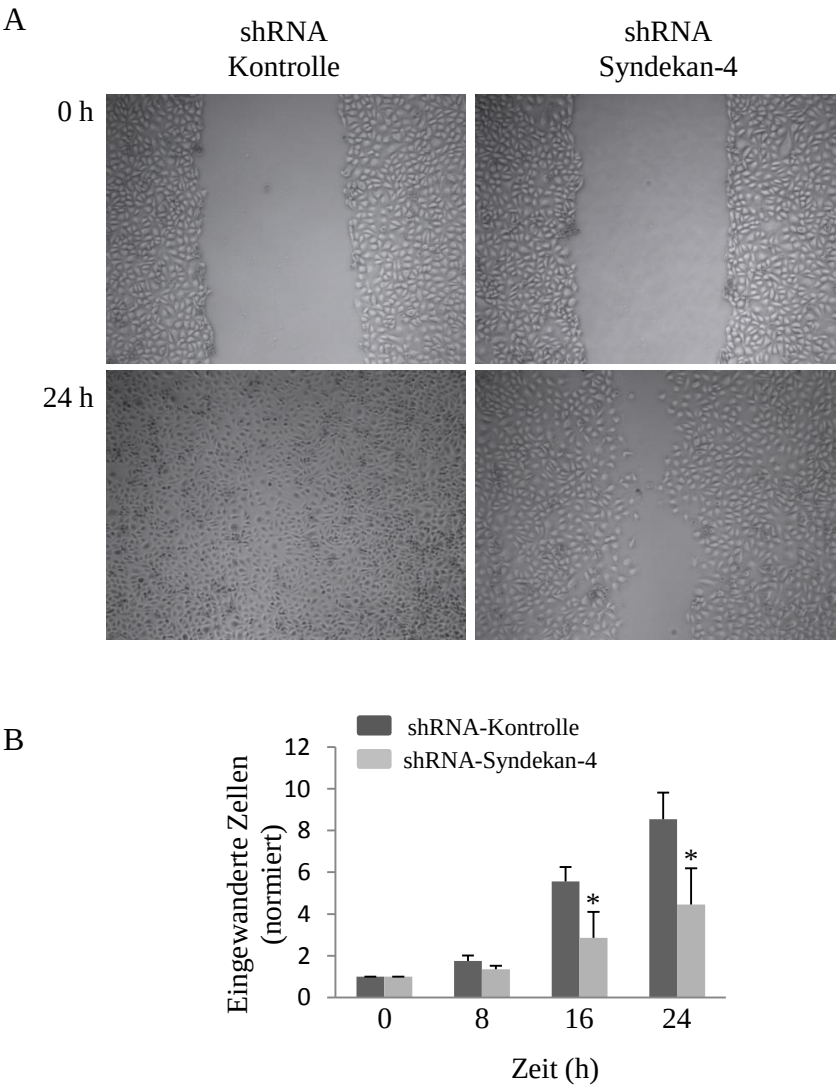


Abbildung 4-53: Migrationskapazität von A549-Zellen nach dem Syndekan-4-*knock down*. Ein konfluenter A549-Zellmonolayer wurde durch einen definierten *scratch* mit einer Pipettenspitze verwundet. Die Migration der Zellen in diese Wundbereiche wurde nach 0, 8, 16 und 24 h fotografiert und die in den Riss eingewanderten Zellen gezählt. **(A)** Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment nach 0 h und 24 h. **(B)** Die statistische Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Aufnahmen. *, $p<0,05$ gegenüber der shRNA-Kontrolle.

Während der Wundheilung beginnen die, in die Wunde eingewanderten Zellen zu proliferieren. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Proliferationsrate von Syndekan-4 *knock down*-Zellen betrachtet. Eine geringere Proliferationsrate von Syndekan-4

herunterregulierten Zellen könnte die verminderte Einwanderung von Zellen in den Wundbereich erklären.

Es bestand jedoch kein Unterschied in den aufgezeichneten Proliferationskurven zwischen den mit Kontroll-shRNA behandelten und Syndekan4-shRNA-transduzierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.8.2 Spaltung von Syndekan-1 und -4 *in vitro* und *in vivo* in der Lunge

Anschließend sollte die Frage geklärt werde, ob in Analogie zu den Befunden in kultivierten Epithelzelllinien, die ADAM-Inhibitoren und Stimulantien wie PMA und die proinflammatorischen Zytokine die Freisetzung von Syndekan-1 und -4 in primären alveolaren Epithelzellen (HSAEpC) beeinflussen. Hierfür wurden HSAEpC-Zellen mit den Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X oder mit einer Kombination der *Shedding*-Stimulantien in An- und Abwesenheit des ADAM10/17-Inhibitors inkubiert und anschließend die Menge an löslichen Syndekanen im *dot-blot* bestimmt.

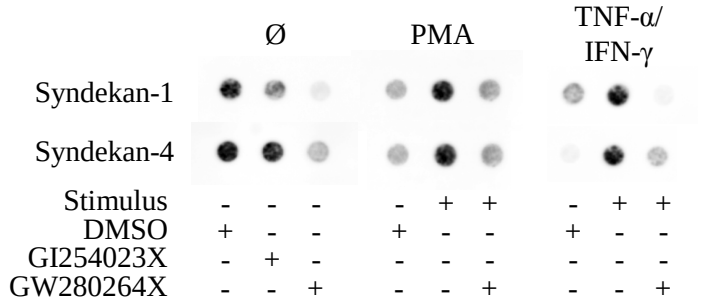


Abbildung 4-54: Abspaltung von löslichem Syndekan-1 und Syndekan-4 durch primäre Lungenepithelzellen. Zur effektiven Inhibition von ADAM10 und ADAM17 wurden die HSAEpC-Zellen über Nacht mit dem Inhibitor GW280264X (10 µM) vorinkubiert oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium mit PMA (200 ng/ml) für 2 h in An- und Abwesenheit des Inhibitors inkubiert und der Gehalt an freigesetztem Syndekan-1 bzw. -4 mittels *dot-blot*-Analyse bestimmt. Es ist jeweils ein für drei Experimente repräsentativer *dot-blot* abgebildet.

Wie bereits für die Epithelzelllinien beschrieben, konnte auch bei den HSAEpC-Zellen die Freisetzung von löslichen Syndekanen in den Kulturüberstand durch den ADAM10/17-Inhibitor GW280264X reduziert werden. Zudem konnte bestätigt werden, dass sowohl PMA als auch TNF-α/IFN-γ zu einer Induktion der Syndekan-Spaltung führen, und dass dieser Effekt ebenfalls durch den ADAM10/17-Inhibitor hemmbar ist. Der ADAM-10-

Inhibitor hingegen zeigt weder auf das konstitutive noch auf das induzierte *Shedding* einen Effekt.

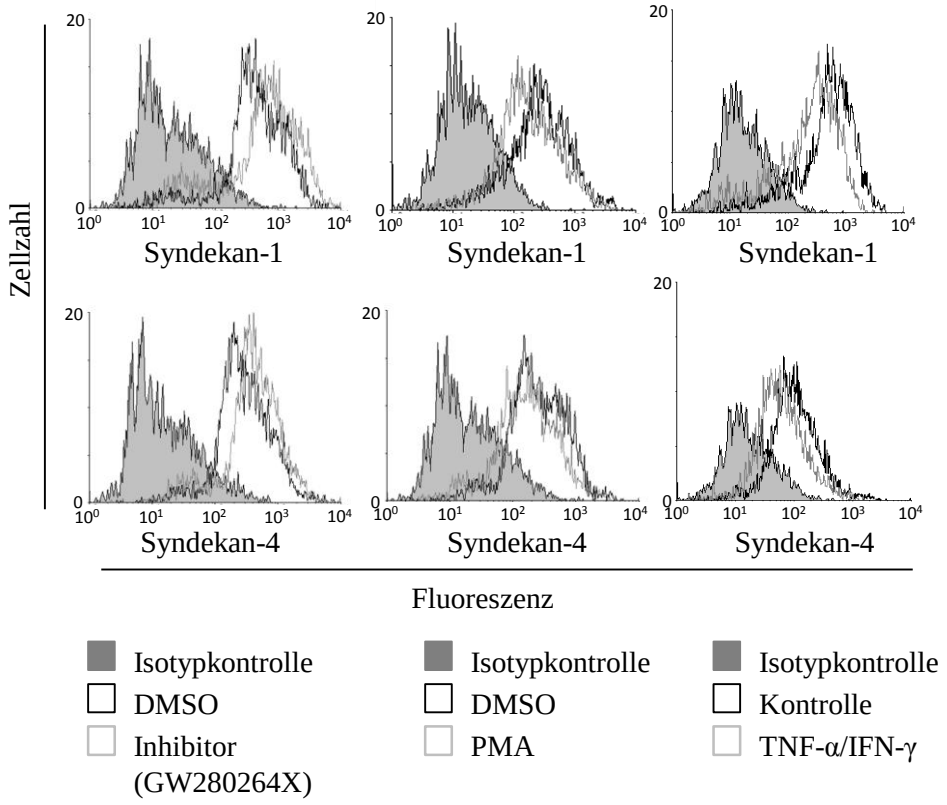


Abbildung 4-55: Spaltung von Syndekan-1 und Syndekan-4 auf der Oberfläche von primären Lungenepithelzellen. Die HSAEpC-Zellen wurden zur Inhibition von ADAM10 und ADAM17 über Nacht mit dem Inhibitor GW280264X (10 µM) oder als Kontrolle mit DMSO vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder für 2 h mit PMA (200 ng/ml) in An- und Abwesenheit von GW280264X oder für 16 h mit TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) in An- und Abwesenheit des Inhibitors stimuliert. Ein repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse ist abgebildet für drei unabhängige Versuche.

Diese Ergebnisse konnten mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen zur Oberflächenexpression von Syndekan-1 und -4 auf HSAEpC-Zellen bestätigt werden. Die Behandlung mit PMA bzw. TNF-α/IFN-γ führte zu einer Abnahme der Proteinoberflächenexpression, während die Behandlung mit den Inhibitoren die Oberflächenexpression verstärkte (Abb. 4-55).

Es ist bereits bekannt, dass in der bronchoalveolären Lavage (BAL) muriner Lungen die löslichen Formen von Syndekan-1 und Syndekan-4 vorkommen [Li *et al.*, 2002]. Die in der vorliegenden Arbeit an primären Lungenepithelzellen gewonnenen Befunde legen nahe, dass auch in der Lunge Syndekan-1 und -4 durch einen ADAM17-abhängigen

Mechanismus gespalten werden können. Um nachzuweisen, dass diese löslichen Syndekan-Varianten auch *in vivo* durch *Shedding* entstehen, wurden Wildtyp-Mäuse intratracheal mit den Metalloprotease-Inhibitoren behandelt und anschließend eine BAL gewonnen, um den Gehalt an löslichem Syndekan-1 und -4 in der Lunge nachweisen zu können. Wie in Abbildung 4-56 zu erkennen ist, führte die Behandlung mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X zu einer deutlichen Reduktion der löslichen Form im Vergleich zu den mit DMSO-behandelten Tieren.

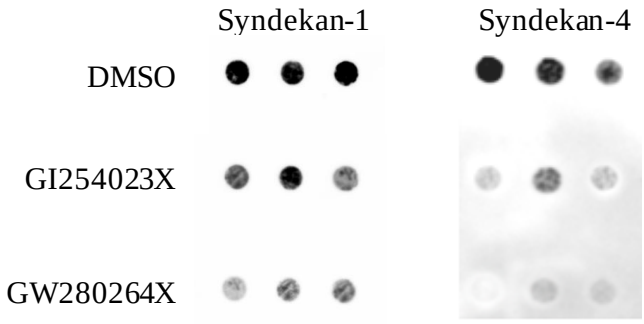


Abbildung 4-56: Metalloprotease-vermitteltes Syndekan-1 und Syndekan-4 *Shedding* in primären Lungenepithelzellen. C57BL/6-Mäuse (3 pro Gruppe) wurden intranasal mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X (30 µg/kg), dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X (30 µg/kg) oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Nach 4 h wurden die Tiere euthanasiert und der Gehalt an löslichem Syndekan-1 und -4 in der BAL mittels *dot-blot*-Analyse nachgewiesen.

III. Regulation der proteolytischen ADAM17-Aktivität

Trotz der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz verschiedener Substrate der ADAM-vermittelten Proteolyse ist über die Regulation des *Shedding*-Prozesses erst wenig bekannt. Insbesondere die Proteasen ADAM10 und ADAM17 stehen im Fokus zahlreicher Untersuchungen, da diese in zahlreiche *Shedding*-Prozesse involviert sind. In dieser Arbeit konnten drei neue Substrate von ADAM17 identifiziert werden, bei denen eine vermehrte Proteolyse durch proinflammatorische Zytokine induzierbar war. Die Untersuchungen der JAM-A-, Syndekan-1- und Syndekan-4-Proteolyse wurden an drei verschiedenen Zelltypen durchgeführt, den primären Endothelzellen (HUVEC) und den beiden Epithelzelllinien ECV304 und A549.

4.9 Zunahme der ADAM17-spezifischen proteolytischen Aktivität

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die proinflammatorischen Zytokine zu einer Geninduktion von ADAM17 führten, wurden stimulierte und unstimulierte Zellen mit Hilfe der quantitativen *real-time* (RT)-PCR analysiert (Abb. 4-57). Hierbei konnte keine Induktion der Genexpression in HUVEC-, ECV304- oder A549-Zellen nachgewiesen werden.

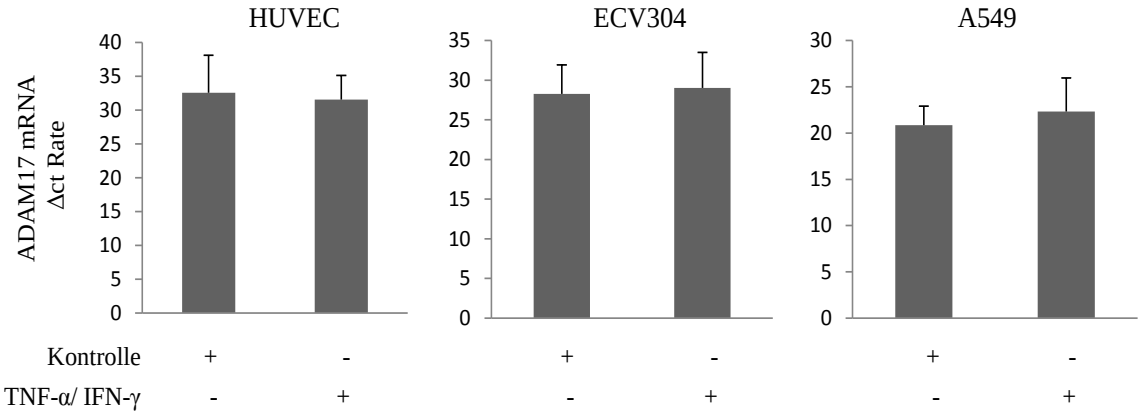


Abbildung 4-57: Quantitative RT-PCR-Analyse der ADAM17-Expression in Endothel- und Epithelzellen. Die primären humanen Endothelzellen (HUVEC) sowie zwei Epithelzelllinien (ECV304 und A549) wurden für 16 h in An- und Abwesenheit von TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) in serumfreiem Medium kultiviert und die ADAM17-Expression mittels quantitativer-RT-PCR nachgewiesen. Die Graphen zeigen die Auswertung von vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Um zu analysieren, ob die zelluläre Verteilung von ADAM17 durch die Stimulation beeinflusst wird, wurde die Oberflächenexpression von ADAM17 auf unbehandelten und Zytokin-stimulierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ zeigte dabei keinen Einfluss auf die ADAM17-Oberflächenexpression (Abb. 4-58), wodurch eine Umverteilung von ADAM17 auf die Zelloberfläche ausgeschlossen werden kann.

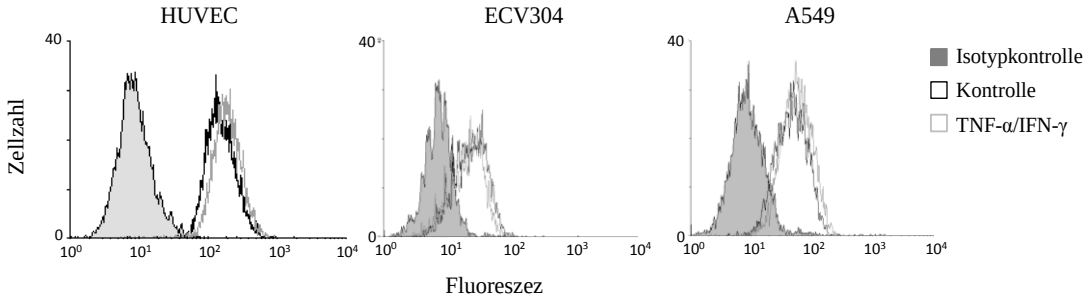


Abbildung 4-58: Oberflächenexpression von ADAM17 in Endothel- und Epithelzellen. HUVEC-, ECV 304- und A549-Zellen wurden für 16 h in An- und Abwesenheit der proinflammatorischen Zytokine TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) in serumfreien Medium kultiviert und die Oberflächenexpression von ADAM17 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Graphen zeigen die Auswertung von vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Standardabweichung. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Histogramm der ADAM17-Oberflächenexpression.

Nachdem diese Ergebnisse gezeigt haben, dass sowohl die Genexpression als auch die Lokalisation von ADAM17 durch Stimulation mit Zytokinen nicht beeinflusst wird, sollte untersucht werden, ob es zu einer Veränderung der Proteaseaktivität kommt. Für diese Analyse wurde ein synthetisches ADAM17-Substrat, das fluorogene APP-Peptid YEVHHQKLV verwendet, um die ADAM17-Aktivität in den drei Zelltypen vor und nach der Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen zu bestimmen.

Zunächst wurde die Funktionalität des Peptidsubstrats anhand seiner Spaltung durch die katalytische Domäne von humanen, rekombinanten ADAM17 bestimmt. Der Umsatz des Substrats in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an rekombinantem ADAM17 wurde über die Entstehung eines fluoreszenten Spaltproduktes bestimmt. Es konnte eine konzentrationsabhängige Spaltung des synthetischen ADAM17-Substrats nachgewiesen werden (Abb. 4-59).

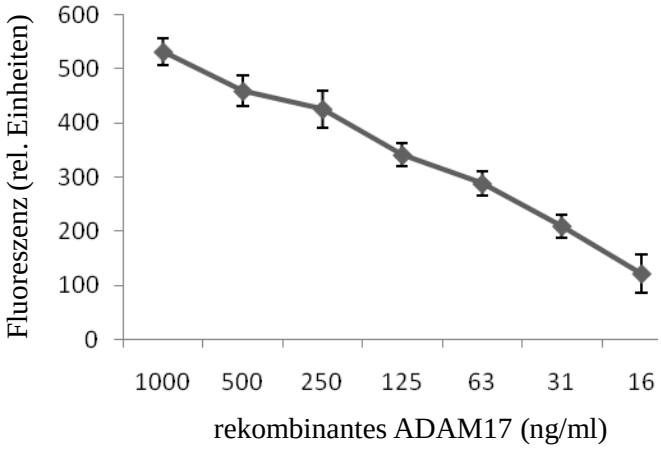


Abbildung 4-59: Spaltung des fluorogenen Substrats DABCYL-APP-EDANS durch die katalytische Domäne von humanem rekombinantem ADAM17. Als Standard wurde eine serielle Verdünnung der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 verwendet (1 µg/ml bis 16 ng/ml).

Die Inkubation von stimulierten und unstimulierten HUVEC-, ECV 304- und A549-Zellen mit dem fluorogenen Peptid zeigte eine starke Zunahme der ADAM17-Aktivität in allen drei Zelltypen nach der Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 4-60).

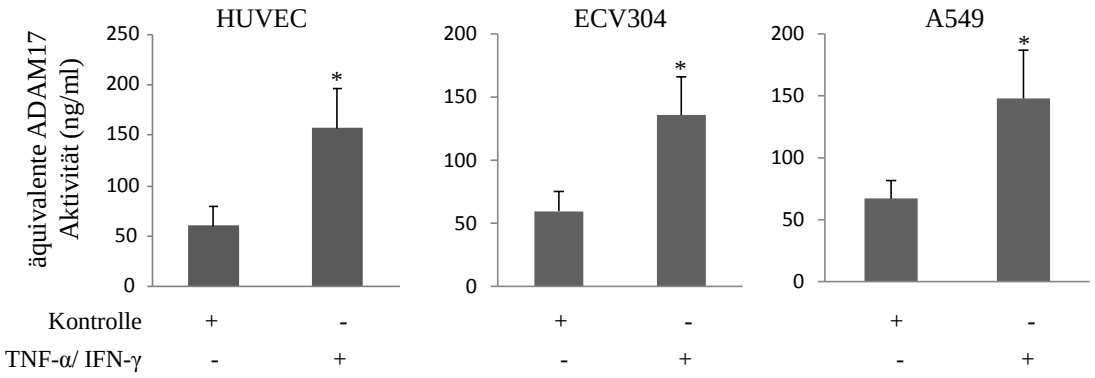


Abbildung 4-60: Aktivität der Metalloprotease ADAM17 in Endothel- und Epithelzellen. HUVEC-, ECV 304- und A549-Zellen wurden für 16 h in An- und Abwesenheit der proinflammatorischen Zytokine TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) in serumfreiem Medium kultiviert und die ADAM17-Aktivität im Zelllysat über die Spaltung des fluorogenen ADAM17-Substrats ermittelt. Die quantitative Auswertung und die Standardabweichungen beziehen sich auf vier unabhängige Versuche. *, $p<0,05$ gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Zusammengefasst lässt sich somit feststellen, dass nach Stimulation von Endothel- oder Epithelzellen mit proinflammatorischen Mediatoren weder eine Induktion der

Genexpression von ADAM17, noch eine erhöhte Expression auf der Zelloberfläche stattfindet, aber eine deutlichen Zunahme der Proteaseaktivität detektiert werden konnte.

4.9.1 Zunahme der ADAM17-spezifischen proteolytischen Aktivität während der JAM-A-Spaltung

Zur Überprüfung der an kultivierten Endothelzellen beobachteten Regulation der ADAM17-Aktivität wurden *ex vivo* Untersuchungen an isolierten murinen Aorten durchgeführt. Die isolierten Aorten wurden hierfür über Nacht in RPMI-Medium in An- und Abwesenheit von TNF-α/IFN-γ inkubiert. Im Anschluss an diese Stimulation wurden die Homogenate der Aorten mit dem fluorogenen Peptid inkubiert. Für jede Probe wurde die äquivalente ADAM17-Aktivität anhand einer seriellen Verdünnung des rekombinanten ADAM17-Standards bestimmt. Die TNF-α/IFN-γ-Inkubation führte dabei zu einer signifikanten Zunahme des Substratumsatzes und damit der ADAM17-Aktivität. Eine parallele Behandlung mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X führte zu einer Hemmung des Substratumsatzes (Abb.4-61, rot).

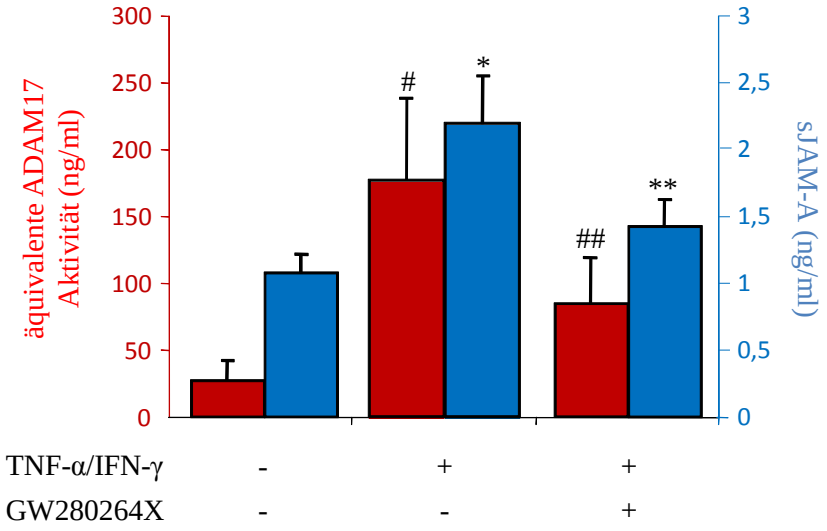


Abbildung 4-61: Aktivität der ADAM17-Metalloprotease und Freisetzung von sJAM-A. Isolierte Mausaorten wurden 16 h mit TNF-α/IFN-γ (je 10 ng/ml) in An- und Abwesenheit des ADAM10/17 Inhibitors GW280264X (10 µM) oder als Kontrolle mit DMSO in serumfreiem Medium inkubiert. Die Kulturüberstände wurden mittels mJAM-A-ELISA auf den Gehalt an sJAM-A untersucht. Die Lysate wurden auf ihre ADAM17-Aktivität analysiert. Die Auswertung und die Standardabweichung beziehen sich auf vier unabhängige Versuche. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind bei der ADAM17-Aktivität durch #, beim sJAM-A-Gehalt mit einem * gekennzeichnet, bzw. durch ## oder ** bei signifikanten Unterschieden nach Behandlung mit dem Inhibitor ($p<0,05$).

Als ein neues Substrat für ADAM17 auf vaskulären Zellen wurde in dieser Arbeit das JAM-A identifiziert. An der isolierten Aorta wurde nun geprüft, ob die erhöhte ADAM17-Aktivität mit einer verstärkten JAM-A-Spaltung korrelierte. Hierzu wurde die freigesetzte Menge an löslichem JAM-A in den Kulturüberstand mit einem für murines JAM-A spezifischen ELISA bestimmt. Die Behandlung der Aorten mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ zu einer Verdoppelung der Freisetzung von sJAM-A in den Kulturüberstand. Diese Zunahme konnte durch den Inhibitor GW280264X reduziert werden. Der kombinierte ADAM10/17-Inhibitor hemmt damit nicht nur die JAM-A-Spaltung, sondern kann auch die ADAM17-Aktivität inhibieren (Abb. 4-61, blau).

4.9.2 Induktion der ADAM17-Aktivität im Lungengewebe

Schließlich sollte geprüft werden, ob auch die in kultivierten Epithelzellen beobachtete Aktivitätsänderung von ADAM17 im *ex vivo* isolierten intakten Gewebe beobachtet werden kann. Diese Untersuchungen erfolgten am Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. C. Martin, RWTH Aachen, durchgeführt. Hierbei wurden C57BL/6-Mäuse anästhesiert, tracheomisiert und mechanisch beatmet. Die isolierte Lunge wurde über die Lungenarterie mit RPMI Medium perfundiert. Vier Stunden nach der intratrachealen Gabe von TNF-α/IFN-γ wurde die Menge an löslichem Syndekan-1 und -4 in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bestimmt.

Im *dot-blot* zeigte sich eine deutliche Zunahme der löslichen Syndekane in der BAL durch die proinflammatorischen Zytokine. Durch die gleichzeitige Hemmung der ADAM17-Protease mit dem Inhibitor GW280264X konnte der Effekt nahezu vollständig aufgehoben werden (Abb. 4-62).

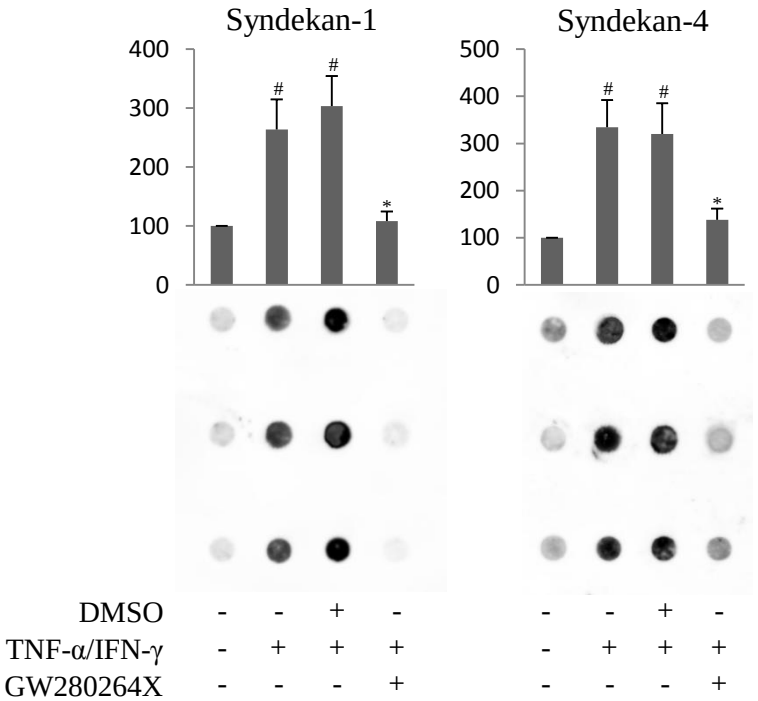


Abbildung 4-62: Induktion von löslichem Syndekan-1 und -4 im murinen Lungengewebe. In der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge wurde nach einer 4-stündigen Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (20µg/kg) in An- und Abwesenheit des ADAM10/17-Inhibitors GW280264X der Gehalt an löslichem Syndekan mittels *dot-blot*-Analyse bestimmt. Die densitometrische Auswertung und die Standardabweichung wurden von jeweils drei C57BL/6-Tieren pro Versuchsbedingung durchgeführt. #, $p<0,05$ gegenüber der DMSO Kontrolle bzw. *, $p<0,05$ gegenüber den TNF-α/IFN-γ stimulierten Zellen.

Um eine mögliche Hochregulation der ADAM17-Genexpression nachzuweisen, wurde im Anschluss mittels quantitativer *real-time* (RT)-PCR die mRNA-Expression im Lungengewebe analysiert. Hierbei konnten keine Unterschiede in der ADAM17-Expression durch die Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ im Vergleich zu den unbehandelten Lungen detektiert werden (Abb. 4-63).

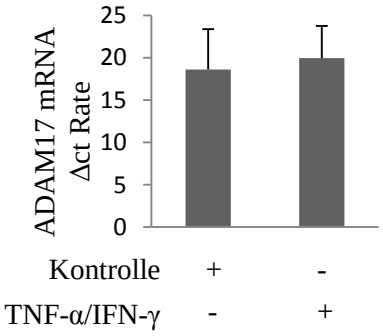


Abbildung 4-63: Analyse der ADAM17-Expression im murinen Lungengewebe. In der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge wurde nach einer Inkubation für 4 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (20µg/kg) die ADAM17 Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung sowie die Standardabweichung von jeweils drei C57BL/6-Tieren pro Versuchsansatz. Die Inkubation mit TNF-α/IFN-γ führte zu keiner Induktion der ADAM17-Genexpression.

In Analogie zu den vorhergehenden Versuchen wurde die ADAM17-Enzymaktivität in den Lysaten der isolierten Lungen mit Hilfe des fluorogenen Peptids betrachtet. Auch in der Lunge kam es durch die TNF-α/IFN-γ-Inkubation zu einer Zunahme der ADAM17-Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4-64).

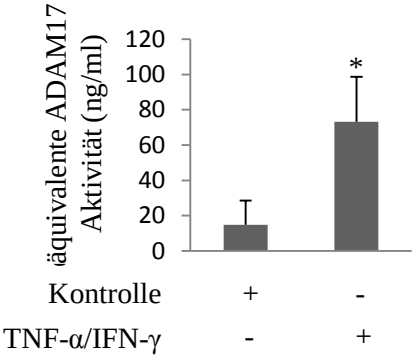


Abbildung 4-64: Aktivität der Metalloprotease ADAM17 im murinen Lungengewebe. In der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge wurde nach einer Inkubation über einen Zeitraum von 4 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ (20µg/kg) die ADAM17-Aktivität durch den Umsatz des fluorogenen-Substrates bestimmt. Die Auswertung und die Standardabweichung beziehen sich auf jeweils drei C57BL/6-Tiere pro Versuchsansatz. *, $p<0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung von vaskulärem Gewebe bzw. Lungengewebe mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ die Aktivität von ADAM17 bei gleichzeitig unveränderter Expression und Lokalisation der Protease steigert. Aufgrund der beschriebenen Versuchsanordnung und zusätzlich gewonnener *in vitro*-Daten liegt der Schluss nahe, dass die Aktivitätszunahme von ADAM17 zu einer erhöhten Proteolyse von JAM-A in Endothelzellen bzw. von Syndekan-1 und -4 in Epithelzellen führt.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die proteolytische Spaltung der membrangebundenen Proteine JAM-A, Syndekan-1 und -4 auf Endothel- und Epithelzellen untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde das Adhäsionsmolekül JAM-A auf Endothelzellen betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass JAM-A nicht nur membrangebunden, sondern zusätzlich auch als lösliches Protein existiert. Diese lösliche JAM-A-Form entsteht durch die proteolytische Abspaltung der extrazellulären JAM-A-Domäne durch die Aktivität der Metalloprotease ADAM17.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die beiden Proteoglykane Syndekan-1 und -4 auf Epithelzellen analysiert. Obwohl zu Beginn der Arbeit bereits einige Informationen zur Spaltung dieser Transmembranproteine vorlagen, war die für das *Shedding* der Proteine verantwortliche Protease bis dahin noch unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass ADAM17 für die Proteolyse von Syndekan-1 und -4 verantwortlich ist.

Die Spaltung von JAM-A und Syndekan-1 bzw. -4 durch ADAM17 konnte sowohl an kultivierten Zellen als auch im explantierten Gewebe der Maus (Aorta und isoliert perfundierte Lunge) beobachtet werden. Die Behandlung mit proinflammatorischen Mediatoren führte zu einer Erhöhung der ADAM17-Aktivität, und daraus resultierend zu einer Zunahme der Spaltung von JAM-A und den Syndekanen. Analog dazu hatte die Gabe von proinflammatorischen Mediatoren *in vivo* eine Akkumulation von löslichem JAM-A und Syndekanen im Blutserum bzw. in der bronchoalveolären Flüssigkeit zur Folge.

Neben der Identifikation von ADAM17 als die für die Spaltung verantwortliche Protease wurden im Folgenden die Konsequenzen des *Shedding* von JAM-A und Syndekanen für deren weitere Prozessierung und ihre Funktionalität näher untersucht. Im Fall der beiden Syndekane konnte eine anschließende Prozessierung durch eine γ-Sekretase nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für Syndekan-4 gezeigt werden, dass eine Herunterregulation zu einer reduzierten Epithelzellmigration führte. Für JAM-A stellte sich heraus, dass das durch die Proteolyse entstandene lösliche JAM-A die Migration von Endothelzellen hemmte und zudem die Extravasation von Leukozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* effektiv supprimierte.

In den folgenden Abschnitten wird die durch ADAM17 vermittelte Spaltung von JAM-A, Syndekan-1 und Syndekan-4 in Bezug auf den Mechanismus, die Regulation sowie die Relevanz *in vivo* und die funktionelle Konsequenz diskutiert.

5.1 Die konstitutive Spaltung von JAM-A, Syndekan-1 und -4 wird durch die Metalloprotease ADAM17 vermittelt

Erstmalig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADAM17 für die konstitutive Proteolyse sowohl von JAM-A als auch von Syndekan-1 bzw. -4 verantwortlich ist. Hierbei konnte insbesondere für JAM-A ein kleineres lösliches Fragment im Überstand der verwendeten Zellen detektiert werden. Diese Erkenntnisse konnten sowohl anhand von Inhibitorstudien mit spezifischen ADAM-Inhibitoren, RNA-Interferenz-Experimente sowie durch Transfektion von humanem JAM-A in ADAM-defiziente, murine embryonale Fibroblasten (MEF-Zellen) gewonnen werden. Dabei zeigte sich, dass neben ADAM17 als hauptverantwortliche Protease auch ADAM10 in geringem Maße an der Proteolyse von JAM-A beteiligt ist.

Für die Spaltung von Syndekanen wurden in verschiedenen Studien mehrere Matrixmetalloproteasen (MMP) verantwortlich gemacht. So ist eine Beteiligung von MMP7 (Matrilysin) durch Untersuchungen an MMP7-defizienten Mäusen nachgewiesen worden. Bei diesen Tieren wurde weniger lösliches Syndekan-1 in der bronchoalveolären Flüssigkeit nach Bleomycin-Behandlung detektiert. Zusätzlich zeigten Untersuchungen an kultivierten, murinen Krebszellen eine vermehrte Abgabe von löslichem Syndekan-1 nach Zugabe der rekombinanten MMP7-Protease [Li *et al*., 2002; Ding *et al*., 2005]. Des Weiteren wurde MMP9 als verantwortliche Protease für das Chemokin-induzierte Syndekan-1 und -4 *Shedding* beschrieben [Brule *et al*., 2006]. In weiteren Analysen konnte durch Überexpression von MT1-MMP eine erhöhte Abgabe von löslichem Syndekan-1 in HEK293T-Zellen induziert werden [Endo *et al*., 2003; Su *et al*., 2008]. Die Beteiligung der verschiedenen MMPs scheint abhängig von den jeweiligen Zelltypen und Stimulationsbedingungen zu sein. In dieser Arbeit konnte erstmalig eine Beteiligung von ADAM17 an der Syndekan-Spaltung mit Hilfe spezifischer ADAM-Inhibitoren nachgewiesen und durch RNA-Interferenz-Experimente bestätigt werden. Diese Befunde legen nahe, dass vorwiegend endogenes ADAM17 als physiologische *Sheddase* für Syndekane wirkt.

5.2 Die induzierte Spaltung von JAM-A, Syndekan-1 und -4 wird durch ADAM17 vermittelt

Bei der Proteolyse von Oberflächenmolekülen kann zwischen dem konstitutiven *Shedding* in unstimulierten Zellen und dem induzierten *Shedding* in stimulierten Zellen unterschieden werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Metalloprotease ADAM17 nicht nur für das konstitutive, sondern auch für das induzierte *Shedding* von JAM-A, Syndekan-1 und Syndekan-4 verantwortlich ist. Neben der Induktion der Spaltung durch PMA führte auch eine Behandlung mit proinflammatorischen Stimulantien, wie unter anderem die Kombination der beiden Zytokine TNF-α und IFN-γ, zu einer vermehrten Freisetzung der löslichen Ektodomänen von JAM-A und den Syndekanen.
Die präsentierten Daten belegen, dass insbesondere die Metalloprotease ADAM17 für das induzierte *Shedding* verantwortlich ist, und im Fall von JAM-A eine geringe Beteiligung von ADAM10 besteht. Neben PMA und den proinflammatorischen Zytokinen wurden in dieser Arbeit weitere Induktoren für die JAM-A-, Syndekan-1- und -4-Spaltung gefunden. So führte eine Behandlung mit PAF bzw. eine Kokultur von HUVEC-Zellen mit isolierten Neutrophilen zu einer vermehrten Freisetzung von löslichem JAM-A. Interessanterweise konnte durch eine Vorbehandlung der HUVEC-Zellen, aber nicht der neutrophilen, mit dem ADAM10/17-Inhibitor einer Reduktion der induzierten JAM-A-Spaltung erzielt werden. Weiterhin konnte eine Reduktion der JAM-A-Expression auf der HUVEC-Zelloberfläche nach der Kokultur mit Neutrophilen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass in Gegenwart von Neutrophilen vermehrt JAM-A auf der Oberfläche von Endothelzellen prozessiert wird. Es ist bekannt, dass ADAM-Proteasen in der Lage sind ihre Substrate sowohl in *cis*, also innerhalb derselben Zellmembran, als auch in *trans*, also auf benachbarten Zellen, zu prozessieren [Murphy *et al.*, 2008]. So wurde unter anderem für das ADAM10-Substrat Ephrin ein Spaltung in *trans* beschrieben [Janes *et al.*, 2005]. Die Resultate der Vorbehandlung von Endothelzellen bzw. der Neutrophilen mit dem ADAM10/17-Inhibitor weisen darauf hin, dass für die erhöhte JAM-A-Prozessierung die endotheliale ADAM17-Aktivität verantwortlich ist.

In dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, auf welchem Wege die proinflammatorischen Zytokine die ADAM17-vermittelte Spaltung induzieren. Die Analysen ergaben, dass eine Behandlung mit TNF-α/IFN-γ weder eine Geninduktion von ADAM17 bewirkte noch zu einer vermehrten zellulären Umverteilung der Protease auf die Zelloberfläche führte.

Jedoch konnte nach der Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen eine starke Zunahme der ADAM17-Aktivität *in vitro* in den verwendeten Endothel- und Epithelzellen beobachtet werden. Diese Aktivitätszunahme konnte auch im Zusammenhang mit einem TNF-α/IFN-γ induzierten JAM-A und Syndekan *Shedding* in explantiertem Gewebe detektiert werden. Für den Mechanismus der Aktivitätssteigerung dieser *Sheddase* wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, die im Folgenden diskutiert werden [Murphy, 2008].

Mittlerweile ist für eine Vielzahl weiterer Typ-I und –II transmembraner Moleküle ein konstitutiver und induzierbarer Spaltungsmechanismus beschrieben worden. Es existiert dabei aber weder eine Sequenzhomologie an den Spaltstellen, noch wurden strukturell ähnliche Merkmale entdeckt. Sehr wahrscheinlich ist in den meisten Fällen nicht die Primärsequenz, sondern vielmehr die räumliche Struktur und damit die Zugänglichkeit bestimmter Domänen des Substrats entscheidend für die Ektodomänenabspaltung, wie bereits für den IL-6-Rezeptor gezeigt werden konnte [Mullberg *et* al., 1994; Althoff *et al*., 2000].
Insbesondere die Proteasen ADAM10 und ADAM17 stehen im Fokus zahlreicher Untersuchungen, da diese an vielen *Shedding*-Prozessen beteiligt sind. Denkbar, jedoch bisher kaum untersucht, wäre beispielsweise eine Regulation der Protease-Aktivität über die zytoplasmatische Domäne von ADAM17, die über potentielle Phosphorylierungsstellen verfügt. Zumindest in einem Fall konnte die direkte Interaktion von ADAM17 mit einer MAPKKK (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK) sowie die Phosphorylierung von ADAM17 durch ERK nachgewiesen werden [Diaz-Rodriguez *et al*., 2002; Montero *et al*., 2002].

Eine weitere Möglichkeit der ADAM17-Regulation könnte die Inaktivierung des *"cysteine switch"* innerhalb der inhibitorischen Prodomäne sein. So verfügt das Cystein an Position 184 über eine redox-sensitive Sulfhydryl-(SH-)Gruppe, durch welche die Komplexierung des Zn^{2+} im katalytischen Zentrum vermittelt wird [Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990]. Eine Oxidation an dieser Stelle könnte über eine Konformationsänderung die Freigabe des Zinks und darüber eine Aktivierung von ADAM17 bewirken [Black *et al*., 1997; Moss *et al*., 1997]. Dieses Prinzip der Aktivierung durch Oxidation des *"cysteine switch"*, der ohne einen proteolytischen Prozess auskommt, ist z.B. für die Matrixmetalloprotease MMP7 beschrieben worden [Fu *et al*., 2001].

ADAM17 wird als inaktives Zymogen synthetisiert. Durch die Abspaltung der Prodomäne durch Serin-Proteasen wird die ursprünglich inaktive ADAM17-Protease in den aktiven Zustand überführt und spaltet geeignete Substrate [Srour *et al.*, 2003]. Die notwendige proteolytische Abspaltung der Domäne findet innerhalb des sekretorischen Wegs in einem späten Golgi-Kompartiment statt [Peiretti *et al*., 2003]. Zwischen der Prodomäne und der katalytischen Untereinheit hat ADAM10 ein tetrabasisches Erkennungsmotiv RKKR, welches eine Spaltstelle für Furin bzw. Furin-ähnliche Pro-Protein-Konvertasen darstellt [Howard *et al*., 1996; Pei und Weiss, 1995 und 1996; Lum *et al*., 1998]. Die Überexpression der Pro-Protein-Konvertasen Furin und PC7 resultieren in einer erhöhten proteolytischen Aktivität von ADAM10 [Anders *et al*., 2001]. Auch an dieser Stelle sind Regulationsmechanismen denkbar, die zu einer vermehrten Freisetzung der proteolytisch aktiven ADAM17-Form führen könnten.

Die Beobachtung, dass auf der einen Seite eine Protease (z.B. ADAM17) in der Lage ist, verschiedene Membranproteine (proTNFα, proTGFα, L-Selektin, APP, Prionprotein, Notch-1-Rezeptor und TNFα-2-Rezeptor) zu prozessieren, und auf der anderen Seite ein Membranprotein (TNFα, CX3CL1) durch verschiedene Proteasen (ADAM17, ADAM10, Matrilysin, MT4-MMP und Proteinase-3) freigesetzt werden kann, zeigt, dass das *Shedding* einen vielschichtigen Prozess darstellt [Peschon *et al*., 1998; Seals *et al*., 2003; Black *et al*., 2003; Becherer *et al*., 2003]. So scheint es, dass der Regulation der Protease eine entscheidende Rolle zukommt, welche Membranproteine zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Bedingungen prozessiert werden.
Zusätzlich werden eine Reihe von Metalloproteasen durch denselben Mechanismus stimuliert [Le Gall *et al*., 2009]. Es stellt sich also die Frage, wie eine generelle Proteolyse aller Membranproteine vermieden wird. Hierbei ist vermutlich die Expression und Aktivierung der beteiligten Proteasen von besonderer Bedeutung. Aber auch die Lokalisierung der *Sheddasen* sowie ihrer Substrate könnte festlegen, ob ein *Shedding*-Prozess stattfindet oder nicht. Solche Kompartimente der Plasmamembran sind die sogenannten *lipid rafts*. Die α-Sekretase ADAM17 ist in der Plasmamembran in *lipid rafts* angereichert, wohingegen sich ADAM10 überwiegend außerhalb der *lipid rafts* befindet [Hooper, 2005; Tellier *et al*., 2006]. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die ADAM17-vermittelte JAM-A-Spaltung in der Triton-X100-unlöslichen Fraktion lokalisiert ist, also mit *lipid rafts* assoziiert ist, so dass eine Kolokalisation von der verantwortlichen Protease und ihrem Substrat JAM-A gewährleistet ist. Diese Kolokalisation könnte in

weiteren Versuchen über immunzytochemische Methoden näher betrachtet werden. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit auch eine geringe Beteiligung von ADAM10 am *Shedding* von JAM-A beobachtet werden. Durch eine TNF-α/IFN-γ-Behandlung von Endothelzellen soll eine Umverteilung von JAM-A aus den *tight junctions* auf die apikale Zelloberfläche erfolgen [Ozaki *et al*., 1999; Ostermann *et al., 2002*]. Proteine der *tight junctions* sind in *lipid raft*-Domänen angereichert. Durch diese Umverteilung ist es möglich, dass JAM-A aus den *lipid rafts* auswandert und daraus eine Kolokalisation von ADAM10 und JAM-A, z.B. auf der apikalen Zelloberfläche, resultiert.

Weitere Hinweise, dass ADAM17 und ADAM10 unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen unterliegen, konnte an der proteolytischen CX3CL1- und CXCL16-Prozessierung gezeigt werden. Für diese Substrate wurde eine differentielle Regulation beschrieben. So wird das PMA-stimulierte *Shedding* durch ADAM17, das konstitutive *Shedding* hingegen durch ADAM10 vermittelt [Garton *et al*., 2001; Hundhausen *et al*., 2003; Abel *et al*., 2004]. Experimentell kann die Ektodomänen-Spaltung vieler Proteine durch Phorbolester stimuliert werden [Izumi *et al*., 1998], welche zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führen und dadurch eine erhöhte Proteolyse durch ADAM-Proteasen bewirken. Gezeigt worden ist dieser Effekt unter anderem für IL-6-R, TNF-α und L-Selektin [Mullberg et al., 1993; Peschon et al., 1998]. Neben diesem durch Aktivierung der Proteinkinase C vermittelten *Shedding* sind noch weitere Induktoren beschrieben, wie zum Beispiel Ionomycin, welches als Kalzium-Ionophor zu einem schnellen Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle führt. Im Gegensatz zu PMA scheint Ionomycin allerdings nicht die Aktivität von ADAM17, sondern hauptsächlich die von ADAM10 zu verstärken [Sahin *et al*., 2006]. So konnte das *Shedding* der hier neu beschriebenen ADAM17-Substrate nicht durch Ionomycin gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte das ADAM10-vermittelte VE-Cadherin *Shedding* durch Ionomycin, nicht jedoch durch PMA, induziert werden [Schulz *et al*., 2008].

Des Weiteren wird die Aktivität der ADAMs auch durch endogene Inhibitoren, wie z.B. den „*Tissue Inhibitors of Metalloproteases*“ (TIMP), reguliert [Brew *et al*., 2000]. Die Abspaltung der extrazellulären Domäne einiger ADAM-Substrate kann durch verschiedene Metalloprotease-Inhibitoren, darunter auch die TIMPs, reduziert werden [Crowe *et al*., 1995; Hargreaves *et al*., 1998; Borland *et al*., 1999]. TIMPs sind eine Familie natürlich vorkommender Proteine. Die vier Subtypen (TIMP1-4) regulieren als endogene Inhibitoren

die proteolytische Aktivität der Metalloproteasen (MMP) im Gewebe und tragen so zur Balance zwischen Matrixdestruktion und -formation bei [Fassina *et al*., 2000]. TIMPs können die meisten MMPs in ihrer aktiven Form inhibieren, indem sie nicht-kovalente 1:1-Komplexe mit dem katalytischen Zinkion der MMPs bilden. TIMP-1, -2 und -4 werden in löslicher Form sezerniert, wohingegen TIMP-3 mit der extrazellulären Matrix assoziiert vorliegt [Gomez *et al*., 1997]. TIMP-1 ist in der Lage, die Metalloprotease ADAM10, nicht aber ADAM17 zu inhibieren, wohingegen TIMP-3 einen regulatorischen Einfluss auf eine Vielzahl der ADAMs (z.B. ADAM17) aufweist, nicht aber ADAM10 beeinflusst [Fitzgerald *et al*., 2000; Amour *et al*., 1998; Gomez *et al*., 1997; Su *et al*., 2008]. Erste Hinweise auf den Einfluss einer TIMP-3-abhängigen Metalloprotease am Syndekan *Shedding* zeigte eine Studie von Fitzgerald *et al*., 2000. Weiterhin stellte sich heraus, dass TIMP-1 nicht in der Lage war, das *Shedding* der Syndekane zu inhibieren [Endo *et al*., 2003]. Diese Daten deuten auf eine Beteiligung von ADAM17 an der Spaltung von Syndekanen hin, welche in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist eine Inhibition der JAM-A-Spaltung durch TIMP-3 wahrscheinlich.

Ein weiterer interessanter Nebenbefund konnte bei der shRNA-vermittelten Herunterregulation der Proteasen beobachtet werden. Die Herunterregulation von ADAM10 mittels shRNA führte zu einer Hochregulation von ADAM17. Diese Beobachtung korreliert mit Daten, welche anhand von ADAM17-defizienten Zellen gewonnen wurden. In diesen Zellen konnte eine erhöhte ADAM10-Proteinkonzentration detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wurde beschrieben, dass ADAM10 in der Lage ist, ADAM17-Substrate wie TGF-α und TNF-α in ADAM17-defizienten Mäusen zu prozessieren [Le Gall *et al*., 2009]. Diese Daten weisen auf eine kompensatorische Funktion beim Ausfall einer der beiden ADAM-Proteasen durch die jeweils andere Protease hin.

Vieles spricht also dafür, dass neben der Überführung der ADAM-Proteasen in die proteolytisch aktive Form noch weitere Regulationsmechanismen existieren.

5.3 Relevanz der Proteolyse von JAM-A, Syndekan-1 und -4 *in vivo*

Neben der Identifizierung der verantwortlichen Protease im Zellkultursystem konnte auch *in vivo* eine Beteiligung von ADAM17 am JAM-A und Syndekan *Shedding* nachgewiesen

werden. Die Ektodomänen von Syndekan-1 und -4 konnten im Blutserum, Wundflüssigkeiten, aber auch in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachgewiesen werden. Besonders unter pathologischen Bedingungen konnten erhöhte Mengen an löslichem Syndekan in der Lunge detektiert werden [Seidel *et al*., 2000; Subramanian *et al*., 1997; Penc *et al*., 1998]. Die konstitutive Freisetzung von löslichem Syndekan-1 und -4 in der BAL von Mäusen konnte durch die nasale Applikation des ADAM10/17-Inhibitors *in vivo* reduziert werden. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit an explantierten Mauslungen die Induktion des *Shedding* von Syndekanen durch proinflammatorische Zytokine gezeigt werden. Wie bereits an kultivierten Endothelzellen beobachtet werden konnte, wurde das durch die Zytokine induzierte *Shedding* auch im Gewebe durch ADAM17 vermittelt, einhergehend mit einer erhöhten ADAM17-Aktivität.

JAM-A konnte ebenfalls *in vivo* im Blutserum von gesunden Wildtyp-Mäusen detektiert werden, wobei die Freisetzung der löslichen JAM-A-Variante durch die intravenöse Gabe von proinflammatorischen Mediatoren (TNF-α/IFN-γ) erhöht werden konnte. Anhand explantierter Mausaorten konnte gezeigt werden, dass auch hier das TNF-α/IFN-γ-induzierte JAM-A *Shedding* mit einem Anstieg der ADAM17-Aktivität einhergeht. Demnach bewirken diese proinflammatorischen Zytokine sowohl in der Vaskulatur als auch in der Lunge ein verstärktes *Shedding* auf Endothel- bzw. Epithelzellen, welches durch die verstärkte Aktivierung von ADAM17 vermittelt wird. Auch beim Menschen konnte lösliches JAM-A im Blutserum nachgewiesen werden. Insbesondere bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, wurde eine vermehrte Abgabe von löslichem JAM-A nachgewiesen, welche mit einer Zunahme von löslichem TNF-α korrelierte [Babinska *et al*., 2007; Cavusoglu *et al*., 2007]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Anstieg der JAM-A-Konzentration während Entzündungsreaktionen durch ein vermehrtes *Shedding* vermittelt wird, an dem die ADAM17-Protease beteiligt ist.

5.4 Konsequenzen der ADAM17-vermittelten Syndekan-Spaltung

Bei der proteolytischen Spaltung der Syndekane durch ADAM17 entsteht neben dem löslichen N-terminalen Fragment ein membranständiges C-terminales Spaltfragment (CTF). Aufgrund der geringen Größe diese CTFs und der hohen Glykosylierung der Syndekane ist ein Nachweis mittels *Western blot* erschwert. Daher wurde ein Fusionsprotein genutzt, welches am C-Terminus zwei IgG-Bindedomänen (Z-Domänen) von Protein A besitzt. Mit Hilfe dieser Fusionsproteine konnten neben dem Voll-

Längenprotein auch die durch die Spaltung entstandenen C-terminalen Fragmente im *Western blot* nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die α-Sekretase ADAM17 nicht nur für die Abspaltung der Ektodomäne von Syndekan-1 und -4 verantwortlich ist, sondern mit dem in der Zellmembran verbleibenden Fragment auch das Ausgangsprodukt für die nachfolgende Prozessierung durch den γ-Sekretase-Komplex liefert. Anhand von Untersuchungen mit dem ADAM10/17-spezifischen Inhibitor und dem γ-Sekretase-Inhibitor DAPT konnte in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass diese Prozessierung durch die γ-Sekretase im Anschluss an die ADAM17-vermittelte Spaltung erfolgt (Abb. 5-1).

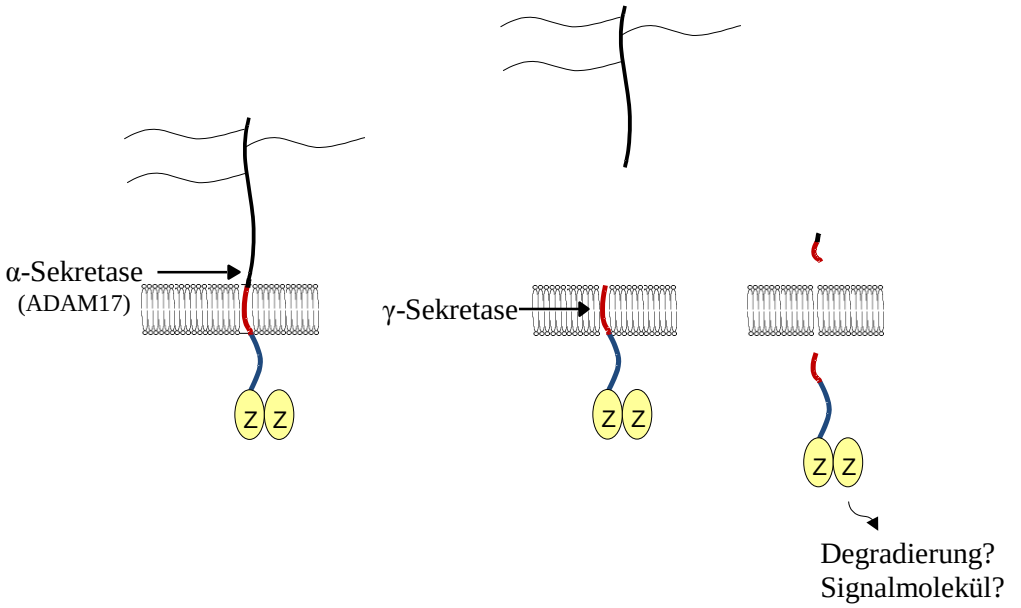


Abbildung 5-1: Modell zur sequentiellen Prozessierung von Syndekanen durch α- und γ-Sekretasen. Die proteolytische Prozessierung von Syndekanen erfolgt vermutlich schrittweise. So findet zuerst eine Prozessierung durch die α-Sekretase ADAM17 an der Zelloberfläche statt. Durch diese Proteolyse entstehen ein lösliches Fragment und ein C-terminales Fragment, welches in der Membran verbleibt und anschließend durch die γ-Sekretase innerhalb der transmembranen Domäne weiter prozessiert wird.

Um den Befund der γ-Sekretase-vermittelten Spaltung weiter abzusichern, soll in weiteren Experimenten die γ-Sekretase-Aktivität durch lentivirale Presenilin-1- und -2-shRNA-Konstrukte supprimiert werden. Entsprechende Vektoren werden derzeit in der Arbeitsgruppe hergestellt und ausgetestet.

Die γ-Sekretase ist ein Proteinkomplex mit einem großen Molekulargewicht. Er besteht aus den 4 Untereinheiten Presenilin (PS), Nicastrin, Aph1 und Pen2 [de Strooper, 2003], wobei die Preseniline 1 und 2 die katalytisch aktive Komponente des γ-Sekretase-Komplexes

bilden [de Strooper *et al*., 1998; Herreman *et al*., 1999]. Mittlerweile konnte bereits für eine Vielzahl von transmembranen Adhäsionsmolekülen gezeigt werden, dass diese sowohl durch α-Sekretasen als auch durch γ-Sekretasen prozessiert werden. So erfolgt das *Shedding* der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und N-Cadherin zunächst durch ADAM10 und anschließend durch die γ-Sekretase [Marambaud *et al*., 2002; Marambaud *et al*., 2003]. Die Substrate CD44 [Murakami *et al*., 2003] , L1 [Maretzky *et al*., 2005] und APP [Xia *et al*., 1998; Citron *et al*., 1998] werden neben ADAM10 ebenfalls durch ADAM17 in der extrazellulären Domäne und im Anschluss daran durch die γ-Sekretase in der transmembranen Domäne geschnitten.
Die γ-Sekretase hat insofern eine bedeutende Funktion, da sie im Falle von APP [Kimberly, 2001] und Notch-1R [Fortini, 2002] durch das intramembrane *Shedding* ein Fragment generiert, welches in den Kern transloziert und dort die Transkription bestimmter Zielgene reguliert. In ähnlicher Weise konnte für die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin [Maretzky *et al*., 2005] und N-Cadherin [Reiss *et al*., 2005] beobachtet werden, dass die γ-Sekretase Fragmente erzeugt, die Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen. Hierbei beeinflussen allerdings nicht die Fragmente selbst, sondern das an der intrazellulären Domäne assoziierte β-Catenin die Transkription.

Um die Funktion des durch die γ-Sekretase entstandenen C-terminalen Spaltfragmente der Syndekane zu analysieren, sind weitere Versuche zur Signaltransduktion notwendig. Möglich ist zunächst, dass es zu einer proteolytischen Degradation des entstandenen intrazellulären Spaltfragmentes im Proteasom kommt, wie bereits für die beiden Chemokine CX3CL1 und CXCL16 gezeigt werden konnte [Schulte *et al*., 2007]. Hierbei zeigten erste Experimente eine Anreicherung der CTFs nach der Verwendung des Proteasominhibitors MG-132, was dafür spricht, dass das Syndekan-CTF proteasomal abgebaut wird (Daten nicht gezeigt). Da die Inhibierung des Proteasoms eine Aktivierung der MAP-Kinasen p42/p44 verursacht [Hashimoto *et al*., 2000], ist das Proteasom ebenso an der Regulation des MAP-Kinase-Signalweges beteiligt. Für ADAM17 wurde gezeigt, dass deren Aktivierung über den MAP-Kinase-Weg erfolgt [Soond *et al*., 2005]. Demzufolge kann der, durch den Einsatz von MG-132 beobachtet, Effekt auch auf ein erhöhtes *Shedding* durch ADAM17 zurückzuführen sein.

Eine weitere Konsequenz des γ-Sekretase-Schnitts kann die Beeinflussung der Syndekan-vermittelten Signalweiterleitung in der Zelle sein. Syndekane spielen nicht nur als

Korezeptoren, z.B. für den bFGF-Rezeptor [Bernfield *et al.*, 1999], eine wichtige Rolle, sondern sind auch in der Lage, über ihre zytoplasmatische Domäne die intrazelluläre Signalweiterleitung zu modulieren. So findet man eine Aktivierung von Tyrosin-Kinasen, PKC, PIP_2-Kinase und den kleinen GTPasen Rac und Rho [Bass *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2008; Simons *et al.*, 2001]. Durch den γ-Sekretase-vermittelten Abbau der für die Signalgebung wichtigen C-terminalen intrazellulären Domäne können diese Prozesse unterbunden werden.

In der Literatur wurde eine verminderte Wanderungskapazität von Syndekan-4 *knock out*-Fibroblasten beschrieben [Echtermeyer *et al.*, 2001]. Analog dazu zeigte sichin dieser Arbeit, dass der *knock down* von Syndekan-4 mittels shRNA zu einer verringerten Migration von Epithelzellen führte. Für diese Untersuchungen wurde neben dem Migrationsverhalten dieser Zellen auch das Proliferationsverhalten untersucht. Obwohl Syndekan-4 in einigen Fällen die Proliferation von Zellen beeinflusst [Bass und Humphries, 2002], konnte in dieser Arbeit kein Einfluss des *knock down* von Syndekan-4 auf die Proliferation von Epithelzellen festgestellt werden.
Man nimmt an, dass Syndekan-4 die Proliferation von Zellen größtenteils durch die Wechselwirkung seiner Heparansulfat-Ketten mit verschiedenen Wachstumsfaktoren beeinflusst, indem es die Verfügbarkeit dieser Wachstumsfaktoren für die Zelle erhöht [Carey, 1997; Clayton *et al*. 2001; Elenius und Jalkanen, 1994]. Bei einer reduzierten Menge an Heparansulfat auf der Zelloberfläche, bedingt durch das Fehlen von Syndekan-4, könnte man daher eine Veränderung der Proliferationsrate der Zellen erwarten. Die endogene Expression von Syndekan-1 in den Syndekan-4-defizienten Zellen könnte jedoch genügen, um in ausreichender Menge Heparansulfat-Ketten auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Dies könnte die unveränderte Proliferationsrate von Syndekan-4 *knock down*-Zellen und Kontroll-Zellen erklären. Demgegenüber ist die Migration von Signaltransduktionsvorgängen in der Zelle abhängig. Die intrazellulären Signalkaskaden können, wie schon oben beschrieben, durch den γ-Sekretase-vermittelten Abbau der C-terminalen Domäne verhindert werden. Unter anderem findet über die C-terminale Domäne von Syndekan-4 eine Aktivierung des kleinen G-Protein RhoA statt, welches an der Signalübertragung von Zelloberflächen-Rezeptoren und dem Zytoskelett beteiligt ist [Midwood *et al.*, 2006]. Erste Untersuchungen zeigten zusätzlich, dass Syndekan-4 bei der Modulation verschiedener Signaltransduktionswege, einschließlich der direkten Aktivierung von PKCα, der Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) und der

Regulation von Rac1 während der Signalweiterleitung durch Wachstumsfaktoren, involviert ist [Mostafavi-Pour *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2006; Wilcox-Adelman *et al.*, 2002; Tkachenko *et al.*, 2006]. Zusammen mit Integrinen, wie vor allem dem $\alpha_5\beta_1$-Integrin, ist Syndekan-4 an der Signaltransduktion zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und der Bildung fokaler Kontakte, den Anheftungspunkten von Zellen mit der darunterliegenden Matrix, beteiligt [van der Flier *et al.*, 2001]. Die variable Region innerhalb der C-terminalen Domäne scheint dafür verantwortlich zu sein, dass Syndekan-4 zusammen mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) Tetramere ausbilden und die PKCα z.B. in fokalen Kontakten aktivieren kann [Lopes *et al.*, 2006].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch eine weitere Prozessierung des JAM-A-CTFs untersucht werden. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass durch das Anbringen der 2Z-His-Markierung an den intrazellulären JAM-A-Teil die JAM-A-Präsentation auf der Zelloberfläche verhindert wurde. Es ist möglich, dass durch die Markierung der Transport an die Zelloberfläche gestört wurde, oder aber, dass dieses JAM-A-Protein nicht mehr durch eine Interaktion mit dem Aktinzytoskelett stabilisiert werden kann.

5.5 Einfluss der Syndekan-Spaltung auf die transendotheliale Migration von Leukozyten

Die Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten der Syndekane sind in der Lage, eine große Zahl an Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen zu binden. Dazu gehören FGF-1 und -2, EGF, verschiedene Chemokine wie SDF-1, RANTES, MCP-1, MIP-1α/β und IL-8 sowie weitere Interleukine [Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Webb *et al.*, 1993; Luster *et al.*, 1995; Hoogewerf *et al.*, 1997; Koopmann *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2000; Sadir *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2002].

Auch wenn für viele dieser Faktoren die funktionelle Bedeutung der Interaktion mit GAGs noch nicht eindeutig bestimmt ist, wird angenommen, dass GAGs die gebundenen Proteine unter anderem vor einer Degradation schützen, als Lagerungsort für gebundene Proteine dienen, für deren gerichtete Präsentation an spezifische Rezeptoren notwendig sind und durch Bindung an die extrazelluläre Matrix Gradienten aufbauen, die für die gerichtete Migration von Zellen notwendig sind [Bernfield *et al.*, 1999; Whitelock und Iozzo, 2005]. Syndekane sind somit an der Modulation der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und Extravasation während Entzündungsprozessen unter anderem durch die Ausbildung des

Chemokin-Gradienten beteiligt [Li *et al.*, 2001; Götte *et al.*, 2005]. Die Syndekane können auf der dem Lumen abgewandten Oberfläche des Endothels proinflammatorische Chemokine binden, diese auf die luminale Seite (Transzytose) transportieren und sie den Leukozyten präsentieren [Wang *et al.*, 2005]. Die Ektodomänen der Syndekane wurden, wie in dieser Arbeit beschrieben, durch Proteolyse in die extrazelluläre Umgebung abgegeben und sind sowohl in Zellkulturüberständen als auch in der BAL nachweisbar. Die freigesetzten Syndekane behalten dabei die Bindungseigenschaften für die Liganden und können somit vermutlich als lösliche Agonisten (indem der gebundene Ligand Rezeptoren auf benachbarten Zellen und Neutrophilen bindet) oder Antagonisten (indem die Ligandenbindung an zelluläre Proteoglykane inhibiert wird) wirken (Abb. 5-2).

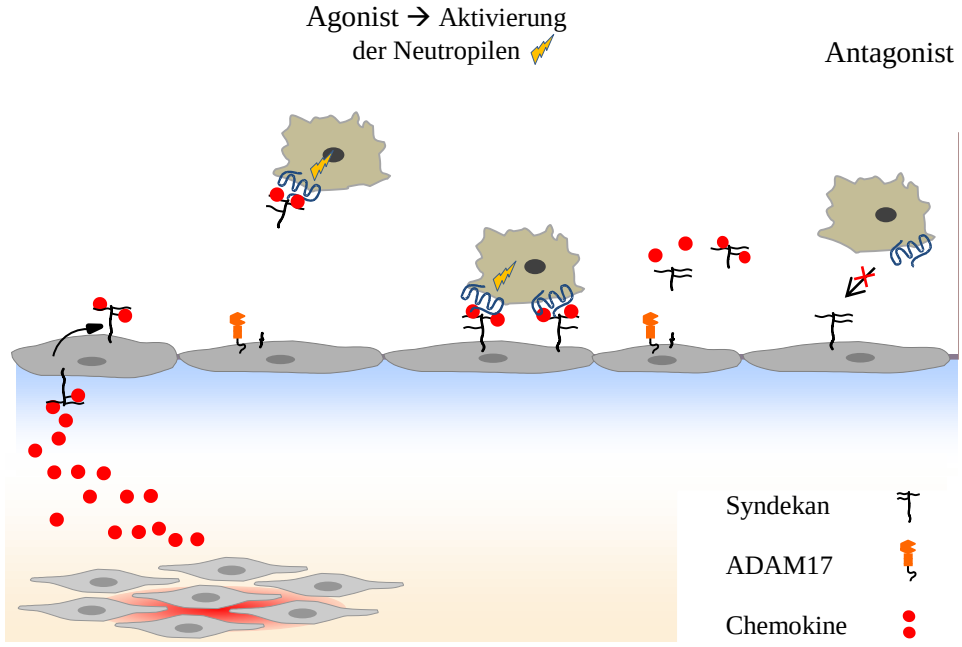


Abbildung 5-2: Modell zur Funktion des *Shedding* von Syndekanen bei der eukozytenrekrutierung. Syndekane präsentieren Chemokine auf der Oberfläche von Endothelzellen und können darüber die Aktivierung der Leukozyten vermitteln. Die Abspaltung des Chemokin-Syndekan-Komplexes durch ADAM17 kann ebenfalls zu einer Aktivierung der rekrutierenden Leukozyten im Blut führen. Des Weiteren kann die Freisetzung von löslichen Syndekanen einen antagonistischen Effekt besitzen, indem die Ligandenbindung an zelluläre Syndekane inhibiert wird.

Das Protease-vermittelte *Shedding* Chemokin-präsentierender Moleküle kann verschiedene Konsequenzen haben. Bei Lungenepithelzellen ist ein löslicher Chemokin-Gradient für die Vermittlung der Neutrophilen-Migration notwendig, wohingegen Endothelzellen den

Syndekan-1/Chemokin-Komplex auf der Zelloberfläche benötigen. So wurde beschrieben, dass lösliches IL-8 einen inhibitorischen Effekt z.B. auf die Neutrophilen-Rekrutierung im vaskulären System besitzt. Im Vergleich dazu findet man bei IL-8 eine proinflammatorische Wirkung, wenn dieses auf der Zelloberfläche durch Proteoglykane gebunden vorliegt [Marshall *et al*., 2003].

5.6 Funktionelle Konsequenzen der JAM-A Spaltung

Die erste und entscheidende physiologische Barriere für den Übertritt von Leukozyten aus dem Blutgefäß in das umliegende Gewebe stellt das vaskuläre Endothel dar. Die Kontrolle endothelialer Zellkontakte ist dabei für verschiedene physiologische Prozesse von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Lokalisation in den endothelialen Zellkontakten könnte JAM-A an der Regulation der endothelialen Permeabilität und der transmembranen Migration von Leukozyten beteiligt sein. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen eine deutliche Reduktion des VL-JAM-A in den Zell-Zell-Kontakten bewirkte, was zu einer Auflösung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte führte. Anhand des spezifischen ADAM10/17-Inhibitors konnte gezeigt werden, dass dieser JAM-A-Abbau durch die ADAM17-Protease in den Zell-Zell-Kontakten vermittelt wird. In der Literatur wurde beschrieben, dass die kombinierte Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α/IFN-γ zu einer Umverteilung von JAM-A sowie von PECAM-1 aus den lateralen Zellkontaktbereichen führen sollte, allerdings ohne Feststellung einer negativen Regulation der transendothelialen Migration von Neutrophilen unter Strömungsbedingungen *in vitro* [Shaw *et al*., 2001]. In dieser Arbeit konnte jedoch keine entsprechende Anreicherung auf der apikalen Zelloberfläche nachgewiesen werden.
In Analogie zu den immunzytochemischen Befunden führte die Behandlung mit den beiden Zytokinen TNF-α/IFN-γ zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität, welche durch den ADAM10/17-Inhibitor reduziert werden konnte. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die durch ADAM17-vermittelte JAM-A-Spaltung in den *tight junctions* zu einer erhöhten Permeabilität führt. An dieser Permeabilitätsregulation sind jedoch eine Reihe weiterer Zelladhäsionsmoleküle beteiligt. So kann VE-Cadherin über die Öffnung interendothelialer Zellkontakte eine Lockerung der endothelialen Barrierefunktion bewirken und spielt so während der transendothelialen Migration eine wichtige Rolle. VE-Cadherin ist ein Mitglied der Cadherine, welches in Bereichen der *adherens junctions* von Endothelzellen exprimiert wird und für die Stabilisierung interendothelialer Zellkontakte

verantwortlich ist [Lampugnani *et al.*, 1992]. Wie auch JAM-A wird VE-Cadherin durch eine ADAM-Protease, in diesem Fall ADAM10, prozessiert [Schulz *et al.*, 2007], was die Relevanz dieser Proteasen während Entzündungsprozessen unterstreicht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die ADAM17-vermittelte Spaltung von JAM-A ein lösliches extrazelluläres Fragment freigesetzt wird und dessen Einfluss auf die transendotheliale Migration von Leukozyten im weiteren Verlauf untersucht. JAM-A wird sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen und anderen Zellpopulationen exprimiert. JAM-A besitzt die Eigenschaft, neben homophilen Interaktionen, welche über die erste Ig-Domäne vermittelt werden, auch heterophile Interaktionen mit dem β_2-Integrin LFA-1, dem β_3-Integrin $\alpha_v\beta_3$ und dem Retrovirusprotein σ_1 einzugehen [Bazzoni *et al.*, 2000; Lamagna *et al.*, 2005]. Die heterophile JAM-A-Bindung wird über die zweite JAM-A-Ig-Domäne vermittelt [Ostermann *et al.*, 2002; Mandell *et al.*, 2005; Maginnis *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2006]. Zur Analyse der Bedeutung von endothelialem JAM-A gegenüber der Funktion von leukozytärem JAM-A bei der Transmigration von Leukozyten wurden verschiedene rekombinante lösliche JAM-A-Konstrukte verwendet, welche entweder nur aus der ersten oder der zweiten JAM-A-Ig-Domäne bestehen. Zusätzlich wurde auch die komplette extrazelluläre JAM-A-Domäne verwendet.

Zunächst konnte anhand von Bindungsstudien mit den verschiedenen JAM-A-Partialstrukturen eine schwache homophile JAM-A-JAM-A-Bindung im Vergleich zur heterophilen JAM-A/LFA-1-Bindung sowohl auf humanen als auch auf murinen Leukozyten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in transendothelialen Migrationsstudien *in vitro* und *in vivo* der Einfluss der löslichen JAM-A-Variante untersucht. Die Bedeutung von JAM-A für die Transmigration von Leukozyten wurde erstmals mit Hilfe eines spezifisch gegen JAM-A gerichteten monoklonalen Antikörpers gezeigt. Dieser konnte *in vitro* sowohl die spontane wie auch die Chemokin-induzierte Transmigration von Monozyten inhibiert [Martin-Padura *et al.*, 1998].

In dieser Arbeit konnte hingegen gezeigt werden, dass die heterophile Bindung von löslichem JAM-A an leukozytäres LFA-1 zu einer Inhibition der Leukozytenrekrutierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte und somit eine entscheidende Rolle bei der Transmigration von Leukozyten spielt. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei *in vitro* Untersuchungen zur Transmigration humaner mononukleärer Zellen durch HUVEC-Zellen gemacht, wobei hier neben der Transmigration auch die Adhäsion durch die

Vorbehandlung der Lymphozyten mit löslichem JAM-A inhibiert werden konnte [Ostermann *et al.*, 2005].

Wahrscheinlich kommt es bereits zu Beginn der Leukozytentransmigration zu einer heterophilen JAM-A/LFA-1 Bindung. Die anschließende ADAM17-vermittelte Spaltung von JAM-A kann einerseits notwendig sein, um den vollständigen Durchtritt der Leukozyten durch den endothelialen Spalt zu ermöglichen. Andererseits kann das durch die Proteolyse entstandene lösliche JAM-A-Fragment zu einer Inhibition der Transmigration führen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die abgespaltene extrazelluläre endotheliale JAM-A-Ektodomäne durch die Bindung an das leukozytäre LFA-1 die Rückwanderung aus dem Gewebe in das Gefäß (reverse Transmigration) beeinflusst (Abb. 5-3), die ebenfalls durch junktionale Adhäsionsmoleküle vermittelt werden soll [Bradfield *et al.*, 2007].

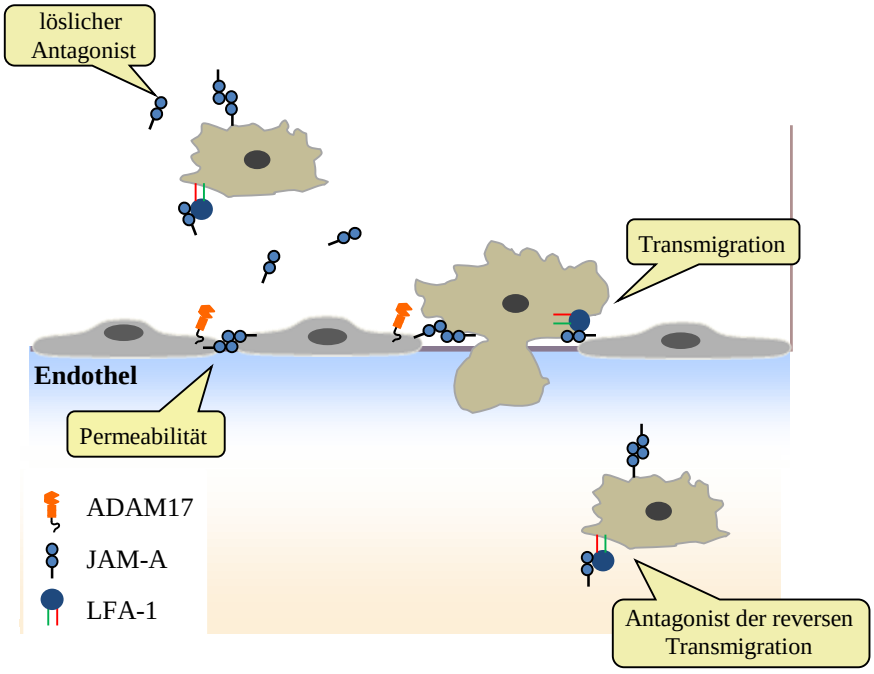


Abbildung 5-3: Modell zur Funktion des *Sheddings* von JAM-A bei der Leukozytenrekrutierung. JAM-A trägt zur Permeabilität und Transmigration bei, welche beide durch die ADAM-Aktivität beeinflusst werden. Einerseits führt die JAM-A-Spaltung zu einer Abnahme auf der Zelloberfläche und reguliert darüber die Permeabilität. Weiterhin erlaubt die Spaltung den vollständigen Durchtritt der Leukozyten. Andererseits kommt es durch die Proteolyse zu einer Freisetzung von löslichem JAM-A, welches antagonistisch sowohl auf die Transmigration als auch auf die reverse Transmigration wirken kann.

Generell sind jedoch neben JAM-A zahlreiche weitere Adhäsionsmoleküle an der transendothelialen Migration von Immunzellen beteiligt, wovon zahlreiche, z.B. VCAM-1 und VE-Cadherin, durch eine ADAM-Protease prozessiert werden können [Garton *et al*., 2003; Schulz *et al*., 2008].

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass lösliches JAM-A *in vitro* für die Migration von Endothelzellen von Bedeutung ist. Diese Versuche stellen ein stark vereinfachtes System für die Zellwanderung *in vivo* dar. Bei diesem *Assay* findet eine Wanderung der Zellen in zwei Dimensionen statt. Erfolgt hingegen eine Wanderung von Zellen *in vivo*, so handelt es sich hierbei um ein dreidimensionales System. Dennoch können aus diesen Ergebnissen Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten der Zellen gezogen und der Einfluss von löslichem JAM-A untersucht werden. Die Daten zeigten dabei eine deutliche Reduktion der Endothelzellmigration in Gegenwart der löslichen JAM-A-Ektodomäne.

5.7 Potentielle Anwendung von ADAM10/17-Inhibitoren bei Entzündungen

ADAM10 und ADAM17 gelten bereits als therapeutische Ziele zur Behandlung verschiedener Tumore und können zudem als neue Ansatzpunkte für Therapeutika vaskulärer und pulmonaler Entzündungsreaktionen angesehen werden. Synthetische Hydroxamatverbindungen ersetzen das durch Zink koordinierte Wassermolekül im katalytischen Zentrum und blockieren dadurch die zinkabhängigen Proteasen, wie MMPs und ADAMs [Maksos *et al*., 1998]. Einige Substanzen, wie z.B. Batimastat und Marimastat, wurden bereits in der Therapie von Tumorerkrankungen getestet [Hidalgo und Eckhardt 2001], allerdings mit zum Teil schweren Nebenwirkungen. Um diese minimieren zu können, wären selektive Inhibitoren, wie z.B. die in dieser Arbeit beschriebenen ADAM-Inhibitoren, eine Alternative.

Eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen wird durch die beiden Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 prozessiert. Daher kann zwischen den physiologisch- und den pathologisch-relevanten ADAM-Substraten unterschieden werden. So konnte anhand von ADAM-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass beide Proteasen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Entwicklungsprozessen spielen. So zeigen ADAM10-defiziente Mäuse eine pränatale Letalität am Embryonaltag 9,5 und weisen Entwicklungsstörungen auf, die

auf eine Beeinträchtigung des Notch-Signalweges zurückzuführen sind. ADAM10 und ADAM17 sollen den für die Embryonalentwicklung wichtigen Notch-Rezeptor spalten und darüber aktivieren [Pan und Rubin, 1997; Artanavis-Tsakonas *et al*., 1995]. ADAM17 ist unter anderem an der Regulation von Wachstumsfaktoren und Wachstumshormonen beteiligt. So werden verschiedene Mitglieder der EGF-Familie, z.B. TGF-α, geschnitten [Lee *et al*., 2003; Shi *et al*., 2003; Hinkle *et al*., 2004; Sahin *et al*., 2004]. ADAM17-defiziente Mäuse, welche kurz nach der Geburt sterben, weisen einen ähnlichen Phänotyp wie TGF-α- und EGF-Rezeptor-defiziente Mäuse auf [Peschon *et al*., 1998]. Andere Spaltungsprozesse von Oberflächenmolekülen wirken proinflammatorisch und sind, neben Entzündungen, an Krebserkrankungen sowie an pathologischen Vorgängen im Gehirn beteiligt. Hier wäre beispielsweise das *Shedding* der Vorläuferform von TNF-α zu erwähnen, welches zur Freisetzung der aktiven löslichen Form des Zytokins führt [Black *et al*., 1997].

Zur Steuerung vaskulärer Entzündungsreaktionen tragen eine Vielzahl von transmembranen Oberflächenmolekülen bei, wie z.B. IL-6R, CX3CL1, CXCL16, VCAM-1, CD44, L1, TNF-α, TNF-α-Rezeptor und die in dieser Arbeit untersuchten Chemokin-präsentierenden Proteoglykane (Syndekan-1 und -4) oder das junktionale Adhäsionsmolekül JAM-A [Pruessmeyer und Ludwig, 2009]. Alle genannten Oberflächenmoleküle werden durch die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen ADAM10 und/oder ADAM17 auf der Zelloberfläche gespalten. Die löslichen Varianten können sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen haben. So wird einerseits durch die ADAM17-vermittelte Spaltung das proinflammatorische Zytokin TNF-α freigesetzt, andererseits entsteht eine lösliche Form des TNF-Rezeptors, welcher als löslicher TNF-α Antagonist wirken kann. Auf diesem Mechanismus beruht unter anderem auch das Wirkprinzip einiger Medikamente (z.B. Enbrel®) zu Behandlung rheumatischer Erkrankungen. Weiterhin wird durch die Spaltung des TNF-Rezeptors die Empfindlichkeit für TNF-α auf diesen Zellen reduziert [Porteur *et al*., 1990].

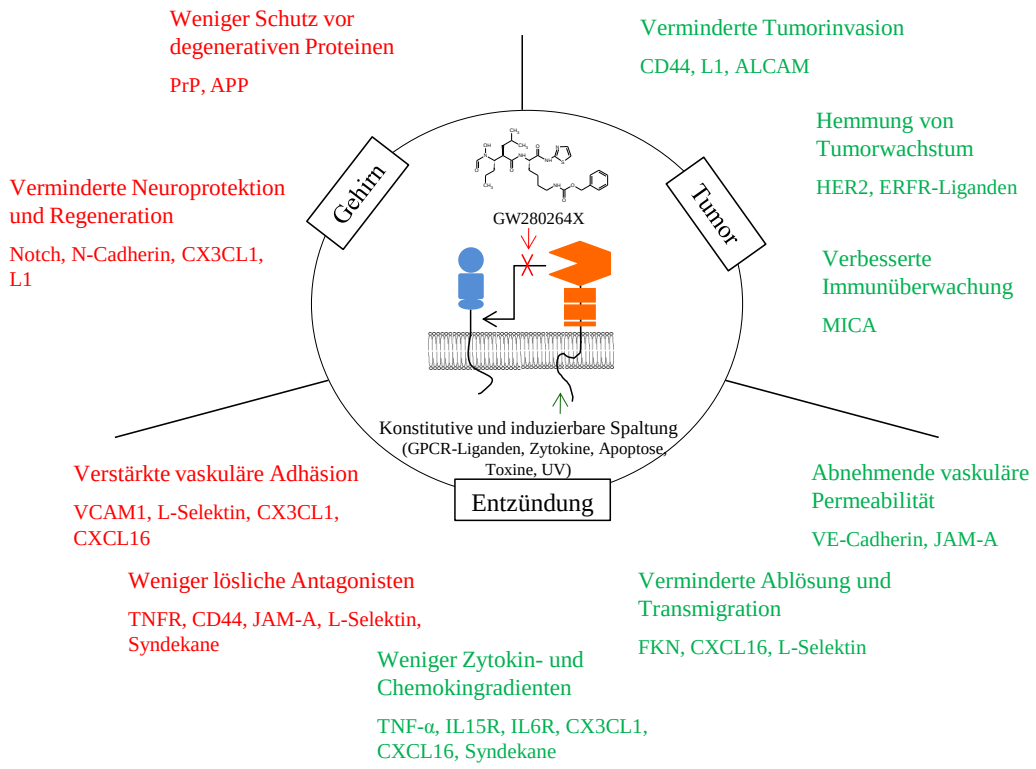


Abbildung 5-4: Mögliche Einflüsse von ADAM10/17-Inhibitoren auf das ZNS, Tumore und Entzündungen. Eventuelle Nebenwirkungen sind in rot, die positiven Effekte sind in grün dargestellt.

Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 regulieren also zahlreiche an der Leukozytenrekrutierung beteiligte Oberflächenproteine, was je nach Substrat unterschiedliche Konsequenzen haben kann. Die Inhibitoren wirken dementsprechend nicht selektiv auf einzelne Spaltungsprozesse und könnten insbesondere bei einer systemischen Applikation zu ungewollten Nebenwirkungen führen (Abb. 5-4). Um diese einzuschränken, wäre ein gezielter Einsatz der Inhibitoren in den betroffenen Regionen denkbar. Ein weiterer Ansatzpunkt zur spezifischen Intervention wäre die Herstellung therapeutischer Proteine, wie z.B. die in dieser Arbeit verwendeten JAM-A-Partialstrukturen zur Inhibierung der Leukozyteninfiltration.

Die Relevanz von ADAM17 für vaskuläre und pulmonale Entzündungen kann mit Hilfe transgener Tiere nach gezielter Ausschaltung von ADAM17 in vaskulären Zellen oder Epithelzellen analysiert werden. Entsprechende Versuche mit konditionalen *knock out*-Mäusen werden derzeit in der Arbeitsgruppe durchgeführt.
Mit der Entwicklung lentiviraler Vektorsysteme [Mann *et al.*, 1983; Watanabe und Temin, 1983; Wei *et al.*, 1981] ist ein Gentransfer in Mäuse möglich. Um die Rolle von ADAM10

und ADAM17 in einzelnen Geweben oder Zellpopulationen untersuchen zu können, wäre ein *knock down* der Proteasen mittels lentiviral applizierter shRNA möglich. Die Lentiviren können einerseits über intravenöse Injektion in die Tiere eingebracht werden oder durch eine direkte lokale Gabe in bestimmten anatomischen Bereichen, wie z.B. über eine intranasale Applikation in die Lunge, instilliert werden. Des Weiteren können Lentiviren auch in isolierte Zellen, wie z.B. Knochenmarkszellen, eingebracht werden. Die transduzierten Zellen können anschließend in lebende Mäuse transferiert werden (*bone marrow transfer*). Sowohl durch Experimente an *knock out*-Mäusen, als auch durch lentiviralen Gentransfer könnten schließlich Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Rolle ADAM10 und ADAM17 für die Leukozytenrekrutierung bei Entzündungen in der Vaskulatur oder Lunge spielen. Diese Untersuchungen werden zeigen, ob ADAM10 oder ADAM17 als therapeutische Zielstrukturen für antientzündliche Medikamente angesehen werden können und ob die in der Arbeit verwendeten Inhibitoren als solche Medikamente weiterentwickelt werden sollten.

6 Zusammenfassung

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 spalten eine Reihe von verschiedenen membrangebundenen Oberflächenmolekülen auf Endothel- und Epithelzellen. Diese proteolytische Spaltung wird auch als *Shedding* bezeichnet und führt zur Freisetzung löslicher Moleküle von der Zelloberfläche. In dieser Arbeit wurden das junktionale Adhäsionsmolekül JAM-A (*junctional adhesion molecule-A*) und Mitglieder der Proteoglykan-Familie (Syndekan-1 und Syndekan-4) als neue Substrate dieser Proteasen identifiziert. Das transmembrane JAM-A gehört zu der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und wird auf Endothel- und Epithelzellen sowie auf Leukozyten exprimiert. JAM-A ist an der Ausbildung der *tight junctions* beteiligt und spielt bei der Adhäsion sowie der transendothelialen Migration von Neutrophilen eine Rolle. Bei den Syndekanen handelt es sich um Zelloberflächenproteoglykane, die in der Lage sind, verschiedene proinflammatorische Mediatoren zu binden und zu präsentieren. In der Lunge werden Syndekan-1 und -4 als transmembrane Proteine auf Epithelzellen exprimiert und auch als lösliche Moleküle in die bronchoalveoläre Flüssigkeit abgegeben.
In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von verschiedenen Zelllinien sowie primären Endothel- und Epithelzellen die Freisetzung von löslichem extrazellulären JAM-A- und Proteoglykan-Fragmenten nachgewiesen werden. Diese Freisetzung konnte zusätzlich durch die Behandlung der Zellen mit dem Phorbolester PMA oder Kostimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α und IFN-γ verstärkt werden. Die stimulierte Spaltung beruhte auf keiner Geninduktion, war jedoch mit einer Abnahme der Oberflächenexpression der Proteine verbunden. Letztere Befunde deuten auf eine proteolytische Konvertierung der membrangebundenen Proteine JAM-A, Syndekan-1 und -4 in ihre lösliche Form hin. Sowohl das konstitutive als auch das induzierte *Shedding* sind auf die Anwesenheit und Aktivität der ADAM17-Protease angewiesen. Diese Erkenntnisse konnten anhand von Inhibitorstudien mit spezifischen ADAM-Inhibitoren, ADAM-defizienten Zelllinien, RNA-Interferenz-Experimenten sowie durch die enzymatische Spaltung mit der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 erbracht werden. Die *in vitro*-Experimente zeigen, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ das *Shedding* der Zelloberflächenmoleküle auf Endothel- und Epithelzellen induzieren und zu einer vermehrten Freisetzung der löslichen Ektodomäne von JAM-A und den Syndekanen führen. Um die physiologische Relevanz der induzierten Proteolyse zu untersuchen, wurden Mäuse systemisch mit TNF-α und IFN-γ behandelt, was zu einer

vermehrten Freisetzung von löslichem JAM-A im Blutserum dieser Tiere führte. Die Behandlung von explantierten Mausaorten bewirkte ebenfalls eine vermehrte Abgabe von löslichem JAM-A, welche mit einer erhöhten ADAM17-Aktivität einherging.

Für Syndekan-1 und -4 zeigte sich, dass diese als lösliche Form in die bronchoalveoläre Flüssigkeit von Mäusen abgegeben werden. Die Behandlung von explantierten Mauslungen mit proinflammatorischen Zytokinen führe zur verstärkten Abgabe von Syndekan-1 und -4. Dieses durch Zytokine induzierte *Shedding* wird im Lungengewebe durch eine erhöhte ADAM17-Aktivität vermittelt. Weitere *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass die α-Sekretase ADAM17 nicht nur für die Abspaltung der Ektodomäne von Syndekan-1 und -4 verantwortlich ist, sondern mit dem in der Zellmembran verbleibenden Fragment auch das Ausgangsprodukt für die nachfolgende Prozessierung durch den γ-Sekretase-Komplex liefert.

Anhand von kultivierten Endothel- und Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die induzierte Abgabe von löslichem JAM-A und den Proteoglykanen weder mit einer Geninduktion von ADAM17 zusammenhängt, noch eine vermehrte zelluläre Umverteilung der Protease auf die Zelloberfläche stattfindet. Jedoch konnte nach der Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen eine starke Zunahme der ADAM17-Aktivität beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Interaktion von endothelialem JAM-A mit leukozytärem LFA-1 eine entscheidende Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten *in vitro* und auch im murinen *air pouch* Modell spielt und dass dieser Vorgang, wie auch die Migration von Endothelzellen, durch lösliches JAM-A blockiert werden kann.

Demnach werden bei Entzündungsreaktionen durch die gesteigerte Aktivität von ADAM17 vermehrt Syndekane sowie auch JAM-A von der Zelloberfläche abgespalten und können als lösliche Moleküle die Leukozytenrekrutierung regulieren. Somit kommt der Protease ADAM17 sehr wahrscheinlich eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Leukozytenrekrutierung im Verlauf von Entzündungen zu.

Summary

Several transmembrane molecules on the surface of endothelial and epithelial cells undergo regulated cleavage by the disintegrin and metalloproteinases ADAM10 and ADAM17. This proteolytic cleavage is called Shedding and results in the release of soluble molecules from the cell surface. In this thesis, junctional adhesion molecule-A (JAM-A) and members of the proteoglycan family (syndecan-1 and syndecan-4) were identified as novel substrates for these proteases.

The transmembrane protein JAM-A is a member of the Ig superfamily and is expressed at endothelial and epithelial junctions, and on leukocytes. JAM-A participates in the organization of tight junctions and has been implicated in adhesion and transendothelial migration of neutrophils and mononuclear cells. Syndecans are cell surface proteoglycans that bind and present various proinflammatory mediators. Syndecan-1 and -4 are expressed on lung epithelial cells and a soluble form is released into the bronchoalveolar fluid during inflammation.

The results presented here show that cell lines and primary cells of human endothelial or epithelial origin release considerable amounts of soluble JAM-A and proteoglycan ectodomains. This release was enhanced by treatment with the phorbolester PMA or the proinflammatory cytokines TNFα and IFNγ. The enhanced release was not caused by increased gene induction, but was rather associated with a reduction of the protein present on the cell surface by enhanced Shedding. Both constitutive and induced release required the presence of ADAM17. This was shown by specific inhibitors that allowed discrimination between ADAM10 and ADAM17, by lentiviral silencing experiments and by treatment with the recombinant catalytic domain of ADAM17.

In cultured epithelial cell lines, enhanced Shedding of JAM-A or proteoglycans was not associated with increased mRNA expression or enhanced redistribution of ADAMs on the cell surface, but rather with increased activity of cellular ADAM17. This was demonstrated by means of a synthetic substrate assay.

Since *in vitro* experiments showed that treatment with TNF-α and IFN-γ enhanced proteolytic Shedding of the analysed cell surface molecules, this was also tested in an *in vivo* model. To this end, mice were treated systemically with TNFα/IFNγ leading to increased presence of soluble JAM-A in the serum. Both cytokines also stimulated JAM-A release from excised murine aortas which was associated with enhanced ADAM17 activity in the tissue and could be suppressed by treatment with an ADAM17 inhibitor.

Soluble syndecan-1 and -4 were released into the bronchoalveolar fluid of mice. Moreover, treatment with TNFα and IFNγ increased ADAM17 activity and syndecan release in murine lungs. Further *in vitro* studies demonstrated that cleavage by ADAM17 generates cellular fragments residing in the cell membrane, undergoing further proteolytic degradation, potentially by γ-secretase.

Functionally, soluble JAM-A blocked migration of cultured endothelial cells, reduced transendothelial migration of isolated neutrophils *in vitro* and decreased neutrophil infiltration in a murine air pouch model in a LFA-1- and JAM-A-dependent mechanism. These data suggest multiple roles of ADAM17-mediated Shedding. Shedding of JAM-A may be required to facilitate transmigration of neutrophils within the endothelial junctions. On the cell surface Shedding of syndecans may limit the presentation of chemokines. Moreover, soluble syndecan and JAM-A may act as antagonists by interacting with soluble chemokines or integrins on neutrophils and thereby downregulate transmigration.

The upregulation of ADAM17 mediated Shedding activity by proinflammatory cytokines further indicates that this protease is an important modulator of endothelial and epithelial surface molecules and leukocyte recruitment during inflammation.

7 Literaturverzeichnis

1-239

1. Abel,S. *et al.* The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* **172**, 6362-6372 (2004).

2. Alahari,S.K., Reddig,P.J. & Juliano,R.L. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int. Rev. Cytol.* **220**, 145-184 (2002).

3. Ali,S., Palmer,A.C., Banerjee,B., Fritchley,S.J. & Kirby,J.A. Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **275**, 11721-11727 (2000).

4. Althoff,K., Reddy,P., Voltz,N., Rose-John,S. & Mullberg,J. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2624-2631 (2000).

5. Amour,A. *et al.* TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* **435**, 39-44 (1998).

6. Anders,A., Gilbert,S., Garten,W., Postina,R. & Fahrenholz,F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* **15**, 1837-1839 (2001).

7. Aplin,A.E., Howe,A., Alahari,S.K. & Juliano,R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 197-263 (1998).

8. Artavanis-Tsakonas,S., Matsuno,K. & Fortini,M.E. Notch signaling. *Science* **268**, 225-232 (1995).

9. Aurrand-Lions,M., Duncan,L., Ballestrem,C. & Imhof,B.A. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 2733-2741 (2001).

10. Aurrand-Lions,M., Johnson-Leger,C., Wong,C., Du,P.L. & Imhof,B.A. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* **98**, 3699-3707 (2001).

11. Babinska,A. *et al.* The F11 receptor (F11R/JAM-A) in atherothrombosis: overexpression of F11R in atherosclerotic plaques. *Thromb. Haemost.* **97**, 272-281 (2007).

12. Barton,E.S. *et al.* Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* **104**, 441-451 (2001).

13. Bass,M.D. & Humphries,M.J. Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem. J.* **368**, 1-15 (2002).

14. Bass,M.D. *et al.* Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **177**, 527-538 (2007).

15. Bayer-Garner,I.B., Nickell,J.A. & Korourian,S. Routine syndecan-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis. *Arch. Pathol. Lab Med.* **128**, 1000-1003 (2004).

16. Bayer-Garner,I.B. & Reed,J.A. Immunolabeling pattern of syndecan-1 expression may distinguish pagetoid Bowen's disease, extramammary Paget's disease, and pagetoid malignant melanoma in situ. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 169-173 (2004).

17. Bayer-Garner,I.B., Sanderson,R.D. & Smoller,B.R. Syndecan-1 is strongly expressed in the anagen hair follicle outer root sheath and in the dermal papilla but expression diminishes with involution of the hair follicle. *Am. J. Dermatopathol.* **24**, 484-489 (2002).

18. Bazzoni,G. *et al.* Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **275**, 30970-30976 (2000).

19. Bazzoni,G. *et al.* Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem.* **275**, 20520-20526 (2000).

20. Bazzoni,G. *et al.* Expression of junctional adhesion molecule-A prevents spontaneous and random motility. *J. Cell Sci.* **118**, 623-632 (2005).

21. Becherer,J.D. & Blobel,C.P. Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs). *Curr. Top. Dev. Biol.* **54**, 101-123 (2003).

22. Bernfield,M. *et al.* Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 729-777 (1999).

23. Bjarnason,J.B. & Fox,J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. *Methods Enzymol.* **248**, 345-368 (1995).

24. Black,R.A. *et al.* Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem. Soc. Symp.* 39-52 (2003).

25. Black,R.A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733 (1997).

26. Blobel,C.P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* **90**, 589-592 (1997).

27. Blobel,C.P. *et al.* A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248-252 (1992).

28. Bode,W., Gomis-Ruth,F.X. & Stockler,W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134-140 (1993).

29. Bogenrieder,T. & Herlyn,M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**, 6524-6536 (2003).

30. Borland,G., Murphy,G. & Ager,A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits Shedding of L-selectin from leukocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 2810-2815 (1999).

31. Bradfield,P.F. *et al.* JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation. *Blood* **110**, 2545-2555 (2007).

32. Brew,K., Dinakarpandian,D. & Nagase,H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 267-283 (2000).

33. Brou,C. *et al.* A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* **5**, 207-216 (2000).

34. Brule,S. *et al.* The Shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* **16**, 488-501 (2006).

35. Buckley,C.D., Rainger,G.E., Bradfield,P.F., Nash,G.B. & Simmons,D.L. Cell adhesion: more than just glue (review). *Mol. Membr. Biol.* **15**, 167-176 (1998).

36. Buxbaum,J.D. *et al.* Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 27765-27767 (1998).

37. Carey,D.J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327 (Pt 1)**, 1-16 (1997).

38. Cavusoglu,E. *et al.* Association of plasma levels of F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) with human atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1768-1776 (2007).

39. Chantry,A. & Glynn,P. A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues. *Biochem. J.* **268**, 245-248 (1990).

40. Chantry,A., Gregson,N. & Glynn,P. Degradation of myelin basic protein by a membrane-associated metalloprotease: neural distribution of the enzyme. *Neurochem. Res.* **17**, 861-867 (1992).

41. Chantry,A., Gregson,N.A. & Glynn,P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **264**, 21603-21607 (1989).

42. Citron,M. *et al.* Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol. Dis.* **5**, 107-116 (1998).

43. Clayton,A., Thomas,J., Thomas,G.J., Davies,M. & Steadman,R. Cell surface heparan sulfate proteoglycans control the response of renal interstitial fibroblasts to fibroblast growth factor-2. *Kidney Int.* **59**, 2084-2094 (2001).

44. Couchman,J.R. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 926-937 (2003).

45. Cunningham,B.A. *et al.* Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**, 799-806 (1987).

46. Dal Canton,A. Adhesion molecules in renal disease. *Kidney Int.* **48**, 1687-1696 (1995).

47. de Strooper,B. *et al.* Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387-390 (1998).

48. Diaz-Rodriguez,E., Montero,J.C., Esparis-Ogando,A., Yuste,L. & Pandiella,A. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated Shedding. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2031-2044 (2002).

49. Ding,K., Lopez-Burks,M., Sanchez-Duran,J.A., Korc,M. & Lander,A.D. Growth factor-induced Shedding of syndecan-1 confers glypican-1 dependence on mitogenic responses of cancer cells. *J. Cell Biol.* **171**, 729-738 (2005).

50. Ebnet,K., Schulz,C.U., Meyer Zu Brickwedde,M.K., Pendl,G.G. & Vestweber,D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 27979-27988 (2000).

51. Ebnet,K. *et al.* The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* **20**, 3738-3748 (2001).

52. Echtermeyer,F. *et al.* Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J. Clin. Invest* **107**, R9-R14 (2001).

53. Edelman,G.M. Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. *Exp. Cell Res.* **161**, 1-16 (1985).

54. Edelman,G.M. Morphoregulatory molecules. *Biochemistry* **27**, 3533-3543 (1988).

55. Eggert,S. *et al.* The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 18146-18156 (2004).

56. Elenius,K. & Jalkanen,M. Function of the syndecans--a family of cell surface proteoglycans. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 11)**, 2975-2982 (1994).

57. Elenius,K. *et al.* Induced expression of syndecan in healing wounds. *J. Cell Biol.* **114**, 585-595 (1991).

58. Endo,K. *et al.* Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J. Biol. Chem.* **278**, 40764-40770 (2003).

59. Fassina,G. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin. Exp. Metastasis* **18**, 111-120 (2000).

60. Fitzgerald,M.L., Wang,Z., Park,P.W., Murphy,G. & Bernfield,M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J. Cell Biol.* **148**, 811-824 (2000).

61. Fortini,M.E. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 673-684 (2002).

62. Fu,X., Kassim,S.Y., Parks,W.C. & Heinecke,J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 41279-41287 (2001).

63. Garton,K.J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and Shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.* **276**, 37993-38001 (2001).

64. Garton,K.J. *et al.* Stimulated Shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* **278**, 37459-37464 (2003).

65. Gomez,D.E., Alonso,D.F., Yoshiji,H. & Thorgeirsson,U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 111-122 (1997).

66. Gotsch,U. *et al.* VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 5)**, 583-588 (1997).

67. Gotte,M. Syndecans in inflammation. *FASEB J.* **17**, 575-591 (2003).

68. Gotte,M., Bernfield,M. & Joussen,A.M. Increased leukocyte-endothelial interactions in syndecan-1-deficient mice involve heparan sulfate-dependent and -independent steps. *Curr. Eye Res.* **30**, 417-422 (2005).

69. Gotte,M. & Echtermeyer,F. Syndecan-1 as a regulator of chemokine function. *ScientificWorldJournal.* **3**, 1327-1331 (2003).

70. Gotte,M. *et al.* Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1135-1141 (2002).

71. Gould,R.J. *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**, 168-171 (1990).

72. Gumbiner,B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357 (1996).

73. Gumbiner,B.M. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* **148**, 399-404 (2000).

74. Hardingham,T.E. & Fosang,A.J. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* **6**, 861-870 (1992).

75. Hargreaves,P.G. *et al.* Human myeloma cells shed the interleukin-6 receptor: inhibition by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and a hydroxamate-based metalloproteinase inhibitor. *Br. J. Haematol.* **101**, 694-702 (1998).

76. Hartmann,D. *et al.* The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615-2624 (2002).

77. Hashimoto,K., Guroff,G. & Katagiri,Y. Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21(ras) in PC12 cells. *J. Neurochem.* **74**, 92-98 (2000).

78. Held,H.D. & Uhlig,S. Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains. *J. Appl. Physiol* **88**, 2192-2198 (2000).

79. Held,H.D. & Uhlig,S. Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **162**, 1547-1552 (2000).

80. Herreman,A. *et al.* Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11872-11877 (1999).

81. Hidalgo,M. & Eckhardt,S.G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 178-193 (2001).

82. Hidalgo,M. & Eckhardt,S.G. Matrix metalloproteinase inhibitors: how can we optimize their development? *Ann. Oncol.* **12**, 285-287 (2001).

83. Hinkle,C.L. *et al.* Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the Shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J. Biol. Chem.* **279**, 24179-24188 (2004).

84. Hoogewerf,A.J. *et al.* Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* **36**, 13570-13578 (1997).

85. Hooper,N.M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1-6 (1994).

86. Hooper,N.M. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 335-338 (2005).

87. Hooper,N.M., Karran,E.H. & Turner,A.J. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* **321 (Pt 2)**, 265-279 (1997).

88. Howard,L., Lu,X., Mitchell,S., Griffiths,S. & Glynn,P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem. J.* **317 (Pt 1)**, 45-50 (1996).

89. Humphries,M.J. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 29-32 (2000).

90. Humphries,M.J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 311-339 (2000).

91. Hundhausen,C. *et al.* The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**, 1186-1195 (2003).

92. Hundhausen,C. *et al.* Regulated Shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J. Immunol.* **178**, 8064-8072 (2007).

93. Hynes,R.O. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* **9**, M33-M37 (1999).

94. Hynes,R.O., Bader,B.L. & Hodivala-Dilke,K. Integrins in vascular development. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 501-510 (1999).

95. Hynes,R.O. & Lander,A.D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* **68**, 303-322 (1992).

96. Ishiguro,K., Kojima,T. & Muramatsu,T. Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconj. J.* **19**, 315-318 (2002).

97. Izumi,Y. *et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain Shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**, 7260-7272 (1998).

98. Janes,P.W. *et al.* Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* **123**, 291-304 (2005).

99. Juliano,R.L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 283-323 (2002).

100. Kansas,G.S. & Pavalko,F.M. The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion. *J. Immunol.* **157**, 321-325 (1996).

101. Karkkainen,I., Rybnikova,E., Pelto-Huikko,M. & Huovila,A.P. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol. Cell Neurosci.* **15**, 547-560 (2000).

102. Kim,C.W., Goldberger,O.A., Gallo,R.L. & Bernfield,M. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell* **5**, 797-805 (1994).

103. Kim,K.S., Bae,K.H., Kim,I.C., Byun,S.M. & Shin,Y.C. Streptokinase secretion by Serratia marcescens signaled by the C-terminal 41 amino acid segment of metalloprotease. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 725-733 (1998).

104. Kimberly,W.T., Zheng,J.B., Guenette,S.Y. & Selkoe,D.J. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J. Biol. Chem.* **276**, 40288-40292 (2001).

105. Koenen,R.R. *et al.* Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* **113**, 4799-4809 (2009).

106. Kojima,T., Shworak,N.W. & Rosenberg,R.D. Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. *J. Biol. Chem.* **267**, 4870-4877 (1992).

107. Kojima,T. *et al.* Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* **85**, 793-799 (2001).

108. Kokenyesi,R. & Bernfield,M. Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J. Biol. Chem.* **269**, 12304-12309 (1994).

109. Koo,B.K. *et al.* Structural basis of syndecan-4 phosphorylation as a molecular switch to regulate signaling. *J. Mol. Biol.* **355**, 651-663 (2006).

110. Koopmann,W., Ediriwickrema,C. & Krangel,M.S. Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 beta. *J. Immunol.* **163**, 2120-2127 (1999).

111. Kornecki,E., Walkowiak,B., Naik,U.P. & Ehrlich,Y.H. Activation of human platelets by a stimulatory monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **265**, 10042-10048 (1990).

112. Kostrewa,D. *et al.* X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J.* **20**, 4391-4398 (2001).

113. Kuno,K. & Matsushima,K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J. Biol. Chem.* **273**, 13912-13917 (1998).

114. Lamagna,C. *et al.* Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4992-5003 (2005).

115. Lammich,S. *et al.* Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3922-3927 (1999).

116. Lampugnani,M.G. *et al.* A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **118**, 1511-1522 (1992).

117. Le Gall,S.M. *et al.* ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general Shedding machinery for membrane proteins such as

transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1785-1794 (2009).

118. Lee,D., Oh,E.S., Woods,A., Couchman,J.R. & Lee,W. Solution structure of a syndecan-4 cytoplasmic domain and its interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 13022-13029 (1998).

119. Lee,D.C. *et al.* TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **995**, 22-38 (2003).

120. Li,L. *et al.* Regulation of syndecan-4 expression with mechanical stress during the development of angioplasty-induced intimal thickening. *J. Vasc. Surg.* **36**, 361-370 (2002).

121. Li,Q., Park,P.W., Wilson,C.L. & Parks,W.C. Matrilysin Shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* **111**, 635-646 (2002).

122. Li,X., Zhang,X., Lu,Z. & Klein,B. [Relative study of soluble syndecan-1 and prognosis of patients with multiple myeloma]. *Zhonghua Xue. Ye. Xue. Za Zhi.* **22**, 303-305 (2001).

123. Liang,T.W. *et al.* Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **279**, C1733-C1743 (2000).

124. Liu,Y. *et al.* Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 13)**, 2363-2374 (2000).

125. Lopes,C.C., Dietrich,C.P. & Nader,H.B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 157-167 (2006).

126. Lum,L., Reid,M.S. & Blobel,C.P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**, 26236-26247 (1998).

127. Maginnis,M.S. *et al.* Beta1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *J. Virol.* **80**, 2760-2770 (2006).

128. Malergue,F. *et al.* A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol. Immunol.* **35**, 1111-1119 (1998).

129. Mandell,K.J. & Parkos,C.A. The JAM family of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 857-867 (2005).

130. Mann,R., Mulligan,R.C. & Baltimore,D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-159 (1983).

131. Marambaud,P. *et al.* A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* **21**, 1948-1956 (2002).

132. Marambaud,P. *et al.* A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**, 635-645 (2003).

133. Maretzky,T. *et al.* ADAM10 mediates E-cadherin Shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 9182-9187 (2005).

134. Maretzky,T. *et al.* L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol. Cell Biol.* **25**, 9040-9053 (2005).

135. Marshall,L.J., Ramdin,L.S., Brooks,T., DPhil,P.C. & Shute,J.K. Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive Shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. *J. Immunol.* **171**, 2057-2065 (2003).

136. Martin-Padura,I. *et al.* Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* **142**, 117-127 (1998).

137. Martinez-Estrada,O.M., Manzi,L., Tonetti,P., Dejana,E. & Bazzoni,G. Opposite effects of tumor necrosis factor and soluble fibronectin on junctional adhesion molecule-A in endothelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **288**, L1081-L1088 (2005).

138. Matthews,H.K. *et al.* Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* **135**, 1771-1780 (2008).

139. McEver,R.P. P-selectin and PSGL-1: exploiting connections between inflammation and venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* **87**, 364-365 (2002).

140. McEver,R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 581-586 (2002).

141. Midwood,K.S., Mao,Y., Hsia,H.C., Valenick,L.V. & Schwarzbauer,J.E. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **11**, 73-78 (2006).

142. Milla,M.E. *et al.* Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* **274**, 30563-30570 (1999).

143. Montero,J.C., Yuste,L., Diaz-Rodriguez,E., Esparis-Ogando,A. & Pandiella,A. Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control Shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases. *Biochem. J.* **363**, 211-221 (2002).

144. Morgan,M.R., Humphries,M.J. & Bass,M.D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 957-969 (2007).

145. Moss,M.L. *et al.* Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J. Neuroimmunol.* **72**, 127-129 (1997).

146. Moss,M.L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385**, 733-736 (1997).

147. Mostafavi-Pour,Z. *et al.* Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* **161**, 155-167 (2003).

148. Mullberg,J. *et al.* Differential Shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett.* **332**, 174-178 (1993).

149. Mullberg,J. *et al.* The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J. Immunol.* **152**, 4958-4968 (1994).

150. Murakami,D. *et al.* Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* **22**, 1511-1516 (2003).

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

152. Musso,D.L. *et al.* N-hydroxyformamide peptidomimetics as TACE/matrix metalloprotease inhibitors: oral activity via P1' isobutyl substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2147-2151 (2001).

153. Naik,M.U. & Naik,U.P. Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta 3 specific. *J. Cell Sci.* **119**, 490-499 (2006).

154. Nourshargh,S., Krombach,F. & Dejana,E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 714-718 (2006).

155. Nunan,J. & Small,D.H. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6-10 (2000).

156. Nusrat,A. *et al.* Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 10)**, 1771-1781 (2000).

157. Ostermann,G. *et al.* Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 729-735 (2005).

158. Ostermann,G., Weber,K.S., Zernecke,A., Schroder,A. & Weber,C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* **3**, 151-158 (2002).

159. Ozaki,H. *et al.* Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J. Immunol.* **163**, 553-557 (1999).

160. Pan,D. & Rubin,G.M. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**, 271-280 (1997).

161. Park,P.W. *et al.* Syndecan-1 Shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of Pseudomonas aeruginosa. *J. Biol. Chem.* **275**, 3057-3064 (2000).

162. Park,P.W., Reizes,O. & Bernfield,M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J. Biol. Chem.* **275**, 29923-29926 (2000).

163. Pawson,T. Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* **373**, 477-478 (1995).

164. Pei,D. & Weiss,S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375**, 244-247 (1995).

165. Pei,D. & Weiss,S.J. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 9135-9140 (1996).

166. Peiretti,F. *et al.* Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp. Cell Res.* **285**, 278-285 (2003).

167. Penc,S.F. *et al.* Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem.* **273**, 28116-28121 (1998).

168. Peschon,J.J. *et al.* An essential role for ectodomain Shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281-1284 (1998).

169. Ponting,C.P., Phillips,C., Davies,K.E. & Blake,D.J. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* **19**, 469-479 (1997).

170. Porteu,F. & Nathan,C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J. Exp. Med.* **172**, 599-607 (1990).

171. Pruessmeyer,J. & Ludwig,A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 164-174 (2009).

172. Pruessmeyer,J. *et al.* A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced Shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 555-564 (2010).

173. Rabinowitz,M.H. *et al.* Design of selective and soluble inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE). *J. Med. Chem.* **44**, 4252-4267 (2001).

174. Ranscht,B. & Dours-Zimmermann,M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* **7**, 391-402 (1991).

175. Rapraeger,A. & Bernfield,M. Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. Protease releases a heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain. *J. Biol. Chem.* **260**, 4103-4109 (1985).

176. Rapraeger,A., Jalkanen,M., Endo,E., Koda,J. & Bernfield,M. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **260**, 11046-11052 (1985).

177. Rawlings,N.D. & Barrett,A.J. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**, 183-228 (1995).

178. Reiss,K. *et al.* ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* **24**, 742-752 (2005).

179. Rio,C., Buxbaum,J.D., Peschon,J.J. & Corfas,G. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* **275**, 10379-10387 (2000).

180. Rioux,V., Landry,R.Y. & Bensadoun,A. Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4. *J. Lipid Res.* **43**, 167-173 (2002).

181. Ruoslahti,E. & Obrink,B. Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.* **227**, 1-11 (1996).

182. Ruoslahti,E. & Yamaguchi,Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* **64**, 867-869 (1991).

183. Sadir,R., Baleux,F., Grosdidier,A., Imberty,A. & Lortat-Jacob,H. Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 8288-8296 (2001).

184. Sahin,U. & Blobel,C.P. Ectodomain Shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS Lett.* **581**, 41-44 (2007).

185. Sahin,U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain Shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* **164**, 769-779 (2004).

186. Saunders,S., Jalkanen,M., O'Farrell,S. & Bernfield,M. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J. Cell Biol.* **108**, 1547-1556 (1989).

187. Schlondorff,J. & Blobel,C.P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain Shedding. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 21)**, 3603-3617 (1999).

188. Schulte,A. *et al.* Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 233-240 (2007).

189. Schulz,B. *et al.* ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ. Res.* **102**, 1192-1201 (2008).

190. Seals,D.F. & Courtneidge,S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **17**, 7-30 (2003).

191. Seftor,R.E., Seftor,E.A. & Hendrix,M.J. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 359-375 (1999).

192. Seidel,C. *et al.* High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood* **96**, 3139-3146 (2000).

193. Seidel,C. *et al.* Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* **95**, 388-392 (2000).

194. Shaw,S.K. *et al.* Reduced expression of junctional adhesion molecule and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) at human vascular endothelial junctions by cytokines tumor necrosis factor-alpha plus interferon-gamma Does not reduce leukocyte transmigration under flow. *Am. J. Pathol.* **159**, 2281-2291 (2001).

195. Shi,W. *et al.* TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. *Dev. Biol.* **261**, 371-380 (2003).

196. Simons,M. & Horowitz,A. Syndecan-4-mediated signalling. *Cell Signal.* **13**, 855-862 (2001).

197. Sobocka,M.B. *et al.* Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood* **95**, 2600-2609 (2000).

198. Soehnlein,O. *et al.* Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* **112**, 1461-1471 (2008).

199. Soond,S.M., Everson,B., Riches,D.W. & Murphy,G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J. Cell Sci.* **118**, 2371-2380 (2005).

200. Springer,T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314 (1994).

201. Srour,N. *et al.* TACE/ADAM-17 maturation and activation of Sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* **554**, 275-283 (2003).

202. Stocker,W. & Bode,W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 383-390 (1995).

203. Stocker,W. *et al.* The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823-840 (1995).

204. Stone,A.L., Kroeger,M. & Sang,Q.X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J. Protein Chem.* **18**, 447-465 (1999).

205. Su,G., Blaine,S.A., Qiao,D. & Friedl,A. Membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated stromal syndecan-1 Shedding stimulates breast carcinoma cell proliferation. *Cancer Res.* **68**, 9558-9565 (2008).

206. Subramanian,S.V., Fitzgerald,M.L. & Bernfield,M. Regulated Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 14713-14720 (1997).

207. Takai,Y. & Nakanishi,H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J. Cell Sci.* **116**, 17-27 (2003).

208. Takeichi,M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* **75**, 464-474 (1977).

209. Tanaka,Y., Adams,D.H. & Shaw,S. Regulation of leukocyte recruitment by proadhesive cytokines immobilized on endothelial proteoglycan. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **184**, 99-106 (1993).

210. Taylor,K.R. & Gallo,R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* **20**, 9-22 (2006).

211. Tedder,T.F., Steeber,D.A., Chen,A. & Engel,P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**, 866-873 (1995).

212. Tellier,E. *et al.* The Shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**, 3969-3980 (2006).

213. Tkachenko,E., Elfenbein,A., Tirziu,D. & Simons,M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ. Res.* **98**, 1398-1404 (2006).

214. Tolia,A. & de Strooper,B. Structure and function of gamma-secretase. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 211-218 (2009).

215. van der,F.A. & Sonnenberg,A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **305**, 285-298 (2001).

216. Van Wart,H.E. & Birkedal-Hansen,H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 5578-5582 (1990).

217. Vestweber,D. & Blanks,J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* **79**, 181-213 (1999).

218. Vincent,B. *et al.* The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 37743-37746 (2001).

219. Vives,R.R., Sadir,R., Imberty,A., Rencurosi,A. & Lortat-Jacob,H. A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization. *Biochemistry* **41**, 14779-14789 (2002).

220. Wang,Z., Gotte,M., Bernfield,M. & Reizes,O. Constitutive and accelerated Shedding of murine syndecan-1 is mediated by cleavage of its core protein at a specific juxtamembrane site. *Biochemistry* **44**, 12355-12361 (2005).

221. Watanabe,S. & Temin,H.M. Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors. *Mol. Cell Biol.* **3**, 2241-2249 (1983).

222. Webb,L.M., Ehrengruber,M.U., Clark-Lewis,I., Baggiolini,M. & Rot,A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 7158-7162 (1993).

223. Wei,C.M., Gibson,M., Spear,P.G. & Scolnick,E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **39**, 935-944 (1981).

224. Weidemann,A. *et al.* A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* **41**, 2825-2835 (2002).

225. Weskamp,G., Kratzschmar,J., Reid,M.S. & Blobel,C.P. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J. Cell Biol.* **132**, 717-726 (1996).

226. Whitelock,J.M. & Iozzo,R.V. Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chem. Rev.* **105**, 2745-2764 (2005).

227. Wilcox-Adelman,S.A., Denhez,F. & Goetinck,P.F. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 32970-32977 (2002).

228. Williams,L.A., Martin-Padura,I., Dejana,E., Hogg,N. & Simmons,D.L. Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol. Immunol.* **36**, 1175-1188 (1999).

229. Wolfsberg,T.G., Primakoff,P., Myles,D.G. & White,J.M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* **131**, 275-278 (1995).

230. Wolfsberg,T.G. *et al.* ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev. Biol.* **169**, 378-383 (1995).

231. Woods,A., Oh,E.S. & Couchman,J.R. Syndecan proteoglycans and cell adhesion. *Matrix Biol.* **17**, 477-483 (1998).

232. Xia,W. *et al.* Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* **37**, 16465-16471 (1998).

233. Yap,A.S., Brieher,W.M. & Gumbiner,B.M. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 119-146 (1997).

234. Yap,A.S., Brieher,W.M., Pruschy,M. & Gumbiner,B.M. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* **7**, 308-315 (1997).

235. Yavari,R., Adida,C., Bray-Ward,P., Brines,M. & Xu,T. Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1161-1167 (1998).

236. Yung,S. *et al.* Syndecan-4 up-regulation in proliferative renal disease is related to microfilament organization. *FASEB J.* **15**, 1631-1633 (2001).

237. Zhang,Y. *et al.* Characterization of (2R, 3S)-2-([[4-(2-butynyloxy)phenyl]sulfonyl]amino)-N,3-dihydroxybutanamide, a potent and selective inhibitor of TNF-alpha converting enzyme. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 1845-1857 (2004).

238. Zhang,Y. *et al.* Identification and characterization of 4-[[4-(2-butynyloxy)phenyl]sulfonyl]-N-hydroxy-2,2-dimethyl-(3S)thiomorpho linecarboxamide (TMI-1), a novel dual tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/matrix metalloprotease inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 348-355 (2004).

239. Zimmermann,P. & David,G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* **13 Suppl**, S91-S100 (1999).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A10	ADAM10
A17	ADAM17
Abb.	Abbildung
ADAM	*a disintegrin and metalloproteinase*
ADAM-TS	*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 1*
AF-6	ALL-1 fusion partner from chromosome 6; S-afadin
Amp	Ampicillin
ANOVA	*analysis of variance*
AP-β	Amyloidprotein-β
APP	β-Amyloidvorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BACE	*beta-amyloid converting enzyme*
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	$Kalzium^{2+}$
ca.	circa
CAM	*cellular adhesion molecule*
CAR	*cell adhesion recognition*
CMV	*Cytomegalie Virus*
cDNA	complementäre DNA
CTF	C- terminales Fragment
DAPI	4’,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPT	N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine-t-butyl ester
d.h.	das heißt
DIG	*detergent-insoluble glycolipid-rich domains*
DNA	*Desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
DMEM	*Dulbeccos Modified Eagles Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	*Escherichia coli*
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	N,N'-1,2-ethanediylbis(N-(carboxymethyl)glycine)edetic acid
EGF	*epidermal growth faktor*
EGM	*endothelial cell growth medium*

EGTA	(Ethylenebis(oxyethylenenitrilo))tetra-; ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N'N'-tetraacetic acid
E-Selektin	Endothelzellen-Selektin
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	*fluorescence activated cell sorter*
FAK	*focal adhesion kinase*
FCS	*fetal calf serum*
FGF	*fibroblast growth factor*
F11R	F11 Antigen (JAM-A)
FSC	*forward scatter*
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GEM	*glycosphingolipid-enriched membrane*
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBSS	*Hank's buffered salt solution*
HB-EGF	*heparin binding epidermal growth factor*
HEPES	4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid
hIgG	humanes IgG
HGF	*hepatocyte growth factor*
HCl	Salzsäure
His	Histidin
H_2O	Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cells*
ICAM	*Inter-cellular adhesion molecule*
IC_{50}	Inhibitorkonzentration für halbmaximalen Hemmeffekt
IFN-γ	*Interferon-gamma*
IgG	Immunoglobulin G
Ig	Immunoglobulin
IgSF	Immunoglobulin Superfamilie
IL	Interleukin
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
JAM	*junctional adhesion molecule*
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDTI	*low-density Triton-insoluble*

LFA-1	*lymphocyte function associated antigen-1*
LPS	Lipopolysaccharid
L- Selektin	Leukozyten- Selektin
LT	Leukotrien
µ	mikro
m	milli
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
Mac-1	*macrophage antigen-1;* Komplement Rezeptor Typ 3; CD11b/CD18; αMβ2
MadCAM-1	*mucosal-addressin cell adhesion molecule-1*
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MBP	*myelin basic protein*
mg	Milligramm
Mg^{2+}	$Magnesium^{2+}$
min	Minute
mM	Millimol/l
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten RNA
MUPP1	*multi PDZ domain protein 1*
n	nano
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
N- Cadherin	Neuronales Cadherin
NCAM	*neural cell adhesion molecule*
OD	optische Dichte
°C	Grad Celsius
Cl	Chlor
p	pico
PAR-3	*partitioning defective protein-3*
PBS	*phosphate buffered saline*
P-Cadherin	Plazentales-Cadherin
PCR	*polymerase-chain-reaction,* Polymerasekettenreaktion
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PDZ	PSD-95, disc large, ZO-1
PECAM-1	*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*; CD31
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	para-Formaldehyd
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
PG	Proteoglykane

pH	*potentia hydrogenii* (Wasserstoffstärke)
PIP_2	Phosphatidyllinositol 4,5-Biphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidas
PrP	Prion-Protein
P-Selektin	Platelet (Blutplättchen)-Selektin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
PVDF	Polyvinylidenifluorid
RANTES	*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*
RGD-Motiv	Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	*reverse transcriptase polymerase chain reaction*
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA/shRNA	*small interfering RNA/ short interfering RNA*
sJAM-A.Fc	soluble JAM-A.Fc protein
SSC	*sidewards scatter*
SV-40	Simian Virus 40
SVMP	*snake venom metalloproteinase*
TACE	*tumor necrosis factor alpha-converting enzyme*
Tab.	Tabelle
T-Cadherin	Truncated-Cadherin
TEMED	NNN'N'-Tetramethylendiamin
TGF-α	*transforming growth factor-alpha*
TGF-β	*transforming growth factor-beta*
TIMP	*tissue inhibitor of metalloproteinase*
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit, enzymatische Einheit
V	Volt
VCAM	*vascular cell adhesion molecule*
VE- Cadherin	*vascular endothelial*-Cadherin
VL	Voll-Längenprotein
VLA-4	*very late antigen-4*
WT	Wildtyp

z.B.	zum Beispiel
Zn^{2+}	$Zink^{2+}$
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	*Zonula occludens*-1

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

8.2 DNA-Sequenz von Syndekan-1_2Z-His

GGTACCGGCAGC**ATG**AGGCGCGCGGCGCTCTGGCTCTGGCTGTGCGCGCTGGCGCTGA
GCCTGCAGCCGGCCCTGCCGCAAATTGTGGCTACTAATTTGCCCCCTGAAGATCAAGA
TGGCTCTGGGGATGACTCTGACAACTTCTCCGGCTCAGGTGCAGGTGCTTTGCAAGAT
ATCACCTTGTCACAGCAGACCCCCTCCACTTGGAAGGACACGCAGCTCCTGACGGCTA
TTCCCACGTCTCCAGAACCCACCGGCCTGGAGGCTACAGCTGCCTCCACCTCCACCCTG
CCGGCTGGAGAGGGGCCCAAGGAGGGAGAGGCTGTAGTCCTGCCAGAAGTGGAGCC
TGGCCTCACCGCCCGGGAGCAGGAGGCCACCCCCCGACCCAGGGAGACCACACAGCT
CCCGACCACTCATCAGGCCTCAACGACCACAGCCACCACGGCCCAGGAGCCCGCCACC
TCCCACCCCCACAGGGACATGCAGCCTGGCCACCATGAGACCTCAACCCCTGCAGGAC
CCAGCCAAGCTGACCTTCACACTCCCCACACAGAGGATGGAGGTCCTTCTGCCACCGA
GAGGGCTGCTGAGGATGGAGCCTCCAGTCAGCTCCCAGCAGCAGAGGGCTCTGGGGA
GCAGGACTTCACCTTTGAAACCTCGGGGGAGAATACGGCTGTAGTGGCCGTGGAGCCT
GACCGCCGGAACCAGTCCCCAGTGGATCAGGGGGCCACGGGGGCCTCACAGGGCCTC
CTGGACAGGAAAGAGGTGCTGGGAGGGGTCATTGCCGTAGGCCTCGTGGGGCTCATCT
TTGCTGTGTGCCTGGTGGGTTTCATGCTGTACCGCATGAAGAAGAAGGACGAAGGCAG
CTACTCCTTGGAGGAGCCGAAACAAGCCAACGGCGGGGCCTACCAGAAGCCCACCAA
ACAGGAGGAATTCTATGCCGGCGGCCGCATTGAAGGCCGCGTCGAGCTGGTTCCGCGT
GGATCGAAAGAGGAGAAATTAACCATGAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGC
GTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATC
CAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAG
CTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGCCATGAACAAATTCAACAAAGAACAACAA
AACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCT
TCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAA
AAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGCCATGGGAGGATCCAGATCTCATCA
TCACCATCACCAT**TGA**CTCGAG

Abbildung 8-1: DNA-Sequenz von Syndekan-1_2Z-His einschließlich der Restriktionsschnittstellen. 1404 bp Farbcodierung: rot (*Kpn*I Restriktionsschnittstelle), grün (*Not*I Restriktionsschnittstelle), unterstrichen (Kozak Konsensus Sequenz), schwarz fett (Startcodon ATG), schwarz (Syndekan-1), lila (Faktor Xa Schnittstelle), gelb (2Z), türkis (6 Histidine), schwarz fett (Stopp-Codon TGA), blau (*Xho* I Restriktionsschnittstelle)

8.3 DNA-Sequenz von Syndekan-4_2Z-His

GGTACCGGCAGC**ATG**GCCCCCGCCCGTCTGTTCGCGCTGCTGCTGTTCTTCGTAGGCG
GAGTCGCCGAGTCGATCCGAGAGACTGAGGTCATCGACCCCCAGGACCTCCTAGAAG
GCCGATACTTCTCCGGAGCCCTACCAGACGATGAGGATGTAGTGGGGCCCGGGCAGG
AATCTGATGACTTTGAGCTGTCTGGCTCTGGAGATCTGGATGACTTGGAAGACTCCAT
GATCGGCCCTGAAGTTGTCCATCCCTTGGTGCCTCTAGATAACCATATCCCTGAGAGG
GCAGGGTCTGGGAGCCAAGTCCCCACCGAACCCAAGAAACTAGAGGAGAATGAGGTT
ATCCCCAAGAGAATCTCACCCGTTGAAGAGAGTGAGGATGTGTCCAACAAGGTGTCA
ATGTCCAGCACTGTGCAGGGCAGCAACATCTTTGAGAGAACGGAGGTCCTGGCAGCTC
TGATTGTGGGTGGCATCGTGGGCATCCTCTTTGCCGTCTTCCTGATCCTACTGCTCATG
TACCGTATGAAGAAGAAGGATGAAGGCAGCTATGACCTGGGCAAGAAACCCATCTAC
AAGAAAGCCCCCACCAATGAGTTCTACGCGTGAGGCGGCCGCATTGAAGGCCGCGTC
GAGCTGGTTCCGCGTGGATCGAAAGAGGAGAAATTAACCATGAACAAATTCAACAAA
GAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAAC
GAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGC
AGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGCCATGAACAAATTCAA
CAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAA
CAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTT
TAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGCCATGGGAGGAT
CCAGATCTCATCATCACCATCACCAT**TGA**CTCGAG

Abbildung 8-2: DNA-Sequenz von Syndekan-4_2Z-His einschließlich der Restriktionsschnittstellen. 1071 bp Farbcodierung: rot (*Kpn*I Restriktionsschnittstelle), grün (*Not*I Restriktionsschnittstelle), unterstrichen (Kozak Konsensus Sequenz), schwarz fett (Startcodon ATG), schwarz (Syndekan-4), lila (Faktor Xa Schnittstelle), gelb (2Z), türkis (6 Histidine), schwarz fett (Stopp-Codon TGA), blau (*Xho* I Restriktionsschnittstelle)

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Interzelluläre Verbindungen **2**

Abbildung 1-2: Modell zur Leukozytenrekrutierung. **6**

Abbildung 1-3: Struktur von humanem JAM-A. **8**

Abbildung 1-4: Schematische Kern-Domänen Struktur von Syndekan. **11**

Abbildung 1-5: Zytoplasmatische Domäne von Syndekan. **12**

Abbildung 1-6: Proteinfamilie der Metzinkine. Familie der Zn^{2+}-abhängigen Metalloproteasen. **15**

Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAMs im Vergleich zu SVMPs und ADAM TS. **17**

Abbildung 3-1: Vektorkarte pcDNA3.1(+) Vektor (Invitrogen) **33**

Abbildung 3-2: Vektorkarte pcDNA3.1(+)_2Z-His **34**

Abbildung 3-3: Vektorkarte pcDNA3.1(+)_Syndekan-1_2Z-His bzw. pcDNA3.1(+)_Syndekan-4_2Z-His **34**

Abbildung 3-4: Vektorkarte pLVTHM (Tronolab, Lausanne, CH) **35**

Abbildung 3-5: Vektorkarte psPAX2 (Tronolab, Lausanne, CH) **35**

Abbildung 3-6: Vektorkarte pMD2.G (Tronolab, Lausanne, CH) **36**

Abbildung 3-7: Vektorkarte pLVTHM_sh_RNA **36**

Abbildung 4-1: Nachweis von JAM-A in primären humanen Endothelzellen und HEK293-Zellen. **61**

Abbildung 4-2: Deglykosylierung von JAM-A in HUVEC-Zellen. **62**

Abbildung 4-3: Freisetzung von JAM-A in primären humanen Endothelzellen. **64**

Abbildung 4-4: Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC-Zellen. **64**

Abbildung 4-5: Freisetzung von löslichem JAM-A. **65**

Abbildung 4-6: Das induzierte Shedding von JAM-A. **66**

Abbildung 4-7: Das konstitutive Shedding von JAM-A wird durch Metalloprotease-Inhibitoren reduziert. **67**

Abbildung 4-8: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren auf die Oberflächenexpression von JAM-A. **68**

Abbildung 4-9: Das PMA-induzierte Shedding von JAM-A wird durch den ADAM17 Metalloprotease-Inhibitor reduziert. **69**

Abbildung 4-10: Das induzierte Shedding von JAM-A wird durch den ADAM17 Metalloprotease-Inhibitor reduziert. **70**

Abbildung 4-11: Rekombinantes ADAM17 führt zu einer erhöhten Proteolyse von JAM-A. **71**

Abbildung 4-12: Überexpression von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen. **72**

Abbildung 4-13: Knock down von ADAM10 und ADAM17 in HUVEC- und HEK293-Zellen. **74**

Abbildung 4-14: Knock down von ADAM10 und ADAM17 in HUVEC- und HEK293-Zellen. **75**

Abbildung 4-15: Freisetzung von sJAM-A nach dem knock down von ADAM10 und ADAM17. **76**

Abbildung 4-16: Knock down von ADAM10 und ADAM17 in HUVEC- und HEK293-Zellen. **77**

Abbildung 4-17: Nachweis der ADAM10- und ADAM17-Expression in ADAM-defizienten Maus-Fibroblasten. **77**

Abbildung 4-18: JAM-A Shedding in ADAM-defizienten Maus Fibroblasten. **78**

Abbildung 4-19: Einfluss von TNF-α/IFN-γ auf die JAM-A Verteilung auf primären Endothelzellen. **79**

Abbildung 4-20: Immunhistochemische Untersuchung von JAM-A auf primären Endothelzellen. **80**

Abbildung 4-21: Einfluss von TNF-α/IFN-γ auf die Permeabilität primären Endothelzellen. **81**

Abbildung 4-22: Analyse der Induktion von JAM-A mRNA in HUVEC-Zellen. **82**

Abbildung 4-23: Antagonistischer Effekt von löslichem JAM-A auf die Endothelzellmigration. **83**

Abbildung 4-24: Freisetzung von löslichem JAM-A durch HUVEC-Zellen und Neutrophile. **85**

Abbildung 4-25: Oberflächenexpression von JAM-A auf HUVEC-Zellen und Neutrophilen. **86**

Abbildung 4-26: Antagonistischer Effekt des monoklonalem anti-JAM-A Antikörpers auf die Transmigration von Neutrophilen. **87**

Abbildung 4-27: Antagonistischer Effekt von sJAM-A auf die Transmigration von Neutrophilen .**88**

Abbildung 4-28: Antagonistischer Effekt der verschiedenen sJAM-A Varianten auf die Transmigration von Neutrophilen. **90**

Abbildung 4-29: Bindung der sJAM-A Varianten an humane Neutrophile. **91**

Abbildung 4-30: Induktion von löslichem JAM-A im Mausserum durch proinflammatorische Zytokine. **92**

Abbildung 4-31: Bindung der sJAM-A Kontrukte an murine Leukozyten. **93**

Abbildung 4-32: Antagonistischer Effekt des löslichen sJAM-A auf die Transmigration von Neutrophilen in vivo. **94**

Abbildung 4-33: Nachweis von löslichem Syndekan-1 und Syndekan-4 im Überstand humaner Epithelzellen. **96**

Abbildung 4-34: Das konstitutive Shedding von Syndekan-1 und Syndekan-4 in humanen Epithelzellen wird durch Metalloprotease-Inhibitoren reduziert. **97**

Abbildung 4-35: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren auf die Oberflächenexpression von Syndekanen. **98**

Abbildung 4-36: Inhibition des konstitutiven Syndekan-1 und Syndekan-4 Shedding durch Metalloprotease-Inhibitoren in humanen Epithelzellen. **99**

Abbildung 4-37: Rekombinantes ADAM17 führt zu einer vermehrten Abgabe von löslichen Syndekanen. **100**

Abbildung 4-38: Analyse der ADAM10- und ADAM17-Expression in ECV304-Zellen nach dem spezifischen knock down von ADAM10 und ADAM17. **101**

Abbildung 4-39: Konstitutives Shedding von Syndekan-1 und -4 nach dem knock down von ADAM10 und ADAM17. **102**

Abbildung 4-40: Zeitabhängiger PMA-Effekt des Syndekan-1 und Syndekan-4 Shedding. **103**

Abbildung 4-41: PMA-induziertes Shedding von Syndekan-1 und Syndekan-4. **104**

Abbildung 4-42: Zeitabhängiger TRAP-6-Effekt auf des Syndekan-1 und Syndekan-4 Shedding. **105**

Abbildung 4-43: Zeitabhängiger TNF-α/IFN-γ-Effekt auf des Syndekan-1 und Syndekan-4 Shedding. **105**

Abbildung 4-44: TNF-α/IFN-γ induziertes Shedding von Syndekan-1 und Syndekan-4. **106**

Abbildung 4-45: Das PMA-induzierte Shedding von Syndekan-1 und Syndekan-4 wird durch den ADAM10/17-Inhibitor reduziert. **107**

Abbildung 4-46: Das induzierte Shedding von Syndekan-1 und Syndekan-4 wird durch den ADAM10/17 Metalloprotease-Inhibitor reduziert. **108**

Abbildung 4-47: TNF-α/IFN-γ-induziertes Shedding der Syndekane nach dem knock down von ADAM10 oder ADAM17. **109**

Abbildung 4-48: Analyse des mRNA-Gehalts in A549- und ECV304-Zellen. **110**

Abbildung 4-49: Analyse der Oberflächenexpression von Syndekan-1_2Z-His und Syndekan-4_2Z-His in HEK293-Zellen. **111**

Abbildung 4-50: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren sowie des γ-Sekretase-Inhibitors auf die Bildung der Syndekan-CTFs. **112**

Abbildung 4-51: Einfluss der Metalloprotease-Inhibitoren sowie des γ-Sekretase-Inhibitors auf die Bildung der CTFs in PMA-stimulierten Zellen. **114**

Abbildung 4-52: Analyse des Syndekan-4 knock down in A549-Zellen. **115**

Abbildung 4-53: Migrationskapazität von A549-Zellen nach dem Syndekan-4-knock down. **116**

Abbildung 4-54: Abspaltung von löslichem Syndekan-1 und Syndekan-4 durch primäre Lungenepithelzellen. **117**

Abbildung 4-55: Spaltung von Syndekan-1 und Syndekan-4 auf der Oberfläche von primären Lungenepithelzellen. **118**

Abbildung 4-56: Metalloprotease-vermitteltes Syndekan-1 und Syndekan-4 Shedding in primären Lungenepithelzellen. **119**

Abbildung 4-57: Quantitative-RT-PCR-Analyse der ADAM17-Expression in Endothel- und Epithelzellen. **120**

Abbildung 4-58: Oberflächenexpression von ADAM17 in Endothel- und Epithelzellen. **121**

Abbildung 4-59: Spaltung des fluorogenen Substrats DABCYL-APP-EDANS durch die katalytische Domäne von humanem rekombinantem ADAM17. **122**

Abbildung 4-60: Aktivität der Metalloprotease ADAM17 in Endothel- und Epithelzellen. **122**

Abbildung 4-61: Aktivität der ADAM17-Metalloprotease und Freisetzung von sJAM-A. **123**

Abbildung 4-62: Induktion von löslichem Syndekan-1 und -4 im murinem Lungengewebe. **125**

Abbildung 4-63: Analyse der ADAM17-Expression im murinem Lungengewebe. **126**

Abbildung 4-64: Aktivität der Metalloprotease ADAM17 im murinem Lungengewebe. **126**

Abbildung 5-1: Modell zur sequentiellen Prozessierung von Syndekanen durch α- und γ-Sekretasen. **135**

Abbildung 5-2: Modell zur Funktion des Sheddings von Syndekanen bei der Leukozytenrekrutierung. **139**

Abbildung 5-3: Modell zur Funktion des Sheddings von JAM-A bei der Leukozytenrekrutierung. **142**

Abbildung 5-4: Mögliche Einflüsse von ADAM10/17-Inhibitoren auf das ZNS, Tumoren und Entzündungen. **145**

Abbildung 6-1: DNA-Sequenz von Syndekan-1_2Z-His einschließlich der Restriktionsschnittstellen. **176**

Abbildung 6-2: DNA-Sequenz von Syndekan-4_2Z-His einschließlich der Restriktionsschnittstellen. **177**

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Expression und Funktion von Syndekan-1 und -4 während Entzündungsprozessen **14**

Tabelle 3-1: Verwendete Primärantikörper **29**

Tabelle 3-2: Verwendete Sekundärantikörper **29**

Tabelle 3-3:Verwendete Stimulantien, ihre Konzentrationen, Stimulationsdauer und Bezugsquelle **30**

Tabelle 3-4:Verwendete shRNA Zielsequenzen **31**

Tabelle 3-5:Verwendete siRN Sequenzen (Stealth RNAi, Invitrogen) **31**

Tabelle 3-6: Verwendete Primer **32**

Tabelle 3-7: Standardrezept für einen PCR Ansatz **56**

Tabelle 3-8: Standard PCR-Temperaturpogramm. **56**

Tabelle 3-9: PCR Pogramm für die qPCR am LightCycler480 (Roche) **58**

11 Veröffentlichungen

Publikationen

Koenen R.R.*, Pruessmeyer J.*, Soehnlein O., Fraemohs L., Zernecke A., Schwarz N., Reiss K., Sarabi A., Lindbom L., Hackeng T.M., Weber C., Ludwig A.
Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases.
Blood **113**, 4799-4809 (2009)

Pruessmeyer J. & Ludwig A.
The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer.
Semin. Cell Dev. Biol. **20**, 164-174 (2009).

Pruessmeyer J., Martin C., Hess F.M., Schwarz N., Schmidt S., Kogel T., Hoettecke N., Schmidt B., Sechi A., Uhlig S., Ludwig A.
A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced Shedding of Syndekan-1 and -4 by lung epithelial cells.
J. Biol. Chem. **285**, 555-564 (2010).

(* = contributed equally)

Poster Präsentationen

Shedding of the junctional adhesion molecule JAM-A by the disintegrin and metalloproteinase ADAM17 regulates neutrophil transmigration.
Jessica Pruessmeyer, Rory Koenen, Line Fraemohs, Christian Weber, Andreas Ludwig
37th Symposium of the German Society for Immunology (DGfI), Heidelberg, 2007
Symposiom of the Bonner Forum for Biomedicine, Bonn, 2007

Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases.
J. Pruessmeyer, R. Koenen, L. Fraemohs, O. Soehnlein, C. Weber, A. Ludwig
Society for Immunology (DGfI), Wien, Österreich, 2008

Sequential steps of leukocyte recruitment via the transmembran chemokin CX3CL1.
N. Schwarz, J. Pruessmeyer, F.M. Hess, R. Windoffer, M. Voss, A. Sarabi, C. Weber, A. Sechi, S. Uhlig, A. Ludwig
2nd European Congress of Immunology, Berlin, 2009
Signal Transduction and Disease, Aachen, 2009

The proinflammatory cytokines IFNγ and TNFα induce shedding of endothelial and epithelial surface molecules via upregulation of ADAM17 activity.
Jessica Pruessmeyer, Nicole Schwarz, Martin F Hess, Tanja Kogel, Christian Martin, Stefan Uhlig, Andreas Ludwig
2nd European Congress of Immunology, Berlin, 2009
Signal Transduction and Disease, Aachen, 2009

Vorträge

Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases.
J. Pruessmeyer, R. Koenen, L. Fraemohs, O. Soehnlein, C. Weber, A. Ludwig
Society for Immunology (DGfI), Wien, Österreich, 2008

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben:

Ein großes Dankeschön an Dr. Andreas Ludwig für das interessante Thema, über das ich in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen konnte und die freundliche und engagierte Betreuung. Ich habe viel bei dir gelernt und wollte mich ganz herzlich für die große Unterstützung bedanken.

Ich bedanke mich bei Hernn Prof. Stefan Uhlig für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und für die Übernahme des Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Lothar Elling für die schnelle unkomplizierte Übernahme des Gutachtens.

Die Person, der ich nicht nur für die fachliche Unterstützung und vielen guten Tipps danken möchte, sondern auch für viele schöne Kaffee-Pausen und die Zeit in Aachen, ist Nicole Schwarz.

Für die technische Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft wenn es mal zu viele Proben auf einmal waren, möchte ich mich bei Tanja Kogel und Melanie Esser bedanken.

Außerdem danke ich Daniele Dreymüller für ihre große Hilfe beim Korrekturlesen.

Für die schöne Zeit in den letzten Jahren, aber auch besonders für die mentale Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Sarah Febiri und Nina Dickgreber. Wir sehen uns zur Kieler Woche ☺

Von ganzen Herzen möchte ich meinen Eltern sowie dem Rest meiner Familie für ihre Hilfe, den Rückhalt und ihre Geduld sowie ihrer niemals endenden Motivation bedanken.

Mein letzter Dank gilt Gregor Reimling. Er war zu jeder Zeit für mich da und hat mich besonders während meiner Dissertation jederzeit mit voller Kraft unterstützt.

Curriculum Vitae

Jessica Prüßmeyer

Persönliche Daten

Geburtsdatum	21. April 1980
Geburtsort	Minden
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsweg

Schulausbildung:

1986 – 1990	Grundschule Petershagen
1990 – 1996	Hauptschule Petershagen

Berufsausbildung:

10/1996 – 03/1999	Städtische Lehranstalt für pharmazeutisch-Technische Assistenten, Minden Berufsabschluss: Pharmazeutisch-technische Assistentin

Weiterbildung:

1999 – 2001	Weser-Kolleg Minden Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium:

10/2001 – 05/2006	Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrecht-Universität Kiel Diplom Biochemikerin
10/2005 - 04/2006	Diplomarbeit: Institut für Biochemie (Kiel) Titel: Einfluss der Metalloprotease ADAM10 auf die Funktion des vaskulär-endothelialen (VE)-Cadherins

seit 07/2006	RWTH Aachen Ph.D. Studentin, Biologie Institut für Pharmakologie und Toxikologie & Institut für Molekulare Herz-Kreislaufforschung (IMCAR) Titel: Limitierte Proteolyse endothelialer und epithelialer Oberflächenmoleküle durch die Metalloprotease ADAM17

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jessica Prüßmeyer, die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Auch wurde die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Des Weiteren erkläre ich, bisher kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum_____ Unterschrift _____
(Jessica Prüßmeyer)