

**Untersuchungen  
zur ADAM10-vermittelten  
Spaltung von L1  
in Ovarialkarzinomzellen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

**Dissertation**

(D386)

vorgelegt von

Diplombiologin

**Svenja Riedle**

Betreuer : Prof. Dr. W.E. Trommer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache : 23. April 2004

Diese Arbeit entstand von Januar 2001 bis Dezember 2003  
am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg  
in der Abteilung Zelluläre Immunologie  
des Forschungsschwerpunktes Tumorummunologie

Prüfungskommission:

- Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Altevogt

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben  
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren  
Augen erstreckt.*

*Isaac Newton*

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mit ihrer Unterstützung, Freundschaft und Liebe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich

Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt für seine Diskussionsfreude, seine Ideen und Tipps, aber vor allem für die Begeisterungsfähigkeit, mit der er meinem Pessimismus begegnet.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Trommer für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät für Chemie an der Universität Kaiserslautern zu vertreten und besonders für seine Bemühungen, die mir so kurzfristig die Prüfung ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf für die elektronenmikroskopische Aufnahme der Vesikel.

Herrn Prof. Dr. Volker Schirmacher für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Zelluläre Immunologie anzufertigen.

den Mitarbeitern des 7. Stocks für ihre Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima.

Frau Dr. Mina Fogel für ihre Kooperationsbereitschaft, die diese Arbeit sehr bereicherte.

den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für den Spaß im Labor und außerhalb, für unzählige Gesangsduette und dafür, dass auch meine Zellen irgendwann migrierten. Sabine und Paul alias Agnetha und Benny für das gemeinsame ABBA-Revival, Daniela für unterhaltsame Lach- und Sachgeschichten mit Henry, Heidi für die abenteuerliche (Hinterher-) Fahrt nach Simmern, Alex für den hautnahen Einblick in die Reproduktion der Haustaube, Steffen dass er meine Begeisterung für Neuseeland teilt und Verena für die Erkenntnis, dass Mitteleuropa die Heimat der Elben und Hobbits ist.

Steffi, Evelyn, Sven und Bernd für so manches gemütliche Feierabendbierchen, das den Stress der Doktorarbeit vergessen ließ und für die schöne Zeit, die wir in Heidelberg verbracht haben.

Sandra für gemeinsam verwirklichte Träume, wie unsere unvergessliche Radltour, und bestehende Träume von Island und Kühlräumen.

Safwan, dass sich meine Sicht der Dinge geändert hat, denn „die Hunde bellen, aber die Karawane zieht weiter.“

meinen Eltern und meiner Schwester Mona, die immer für mich da sind und mir das Selbstvertrauen geben, meinen Weg zu gehen.

Berti für seine Gesellschaft beim Zusammenschreiben.

# INHALTSVERZEICHNIS

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>A</b> | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1        | Das Ovarialkarzinom  | 1         |
| 2        | Das L1-Adhäsionsmolekül  | 1         |
| 2.1      | Vorkommen und Funktion von L1                                    | 1         |
| 2.2      | Struktur von L1  | 3         |
| 2.3      | Bindungseigenschaften von L1                                     | 5         |
| 3        | Zellmigration  | 7         |
| 4        | Metalloproteinasen   | 9         |
| 4.1      | Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)                             | 10        |
| 4.2      | Die Metalloproteinasen-Disintegrine (ADAMs)                      | 11        |
| 4.3      | Die Abspaltung von Oberflächenmolekülen durch Metalloproteinasen | 12        |
| 4.4      | Regulation der Ektodomänenspaltung                               | 14        |
| 5        | Lipid Rafts  | 15        |
| 5.1      | Zusammensetzung der Lipid Rafts                                  | 16        |
| 5.2      | Analyse der Lipid Rafts  | 17        |
| 5.3      | Funktionelle Bedeutung der Lipid Rafts                           | 18        |
| <b>B</b> | <b>FRAGESTELLUNG</b>   | <b>20</b> |
| <b>C</b> | <b>MATERIAL</b>  | <b>21</b> |
| 1        | Antikörper   | 21        |
| 1.1      | Erstantikörper   | 21        |
| 1.2      | Zweitantikörper  | 21        |
| 2        | Inhibitoren  | 22        |
| 3        | Bakterienstämme  | 22        |
| 4        | Zelllinien   | 22        |
| 5        | Plasmide   | 22        |
| 6        | Nukleotide   | 22        |
| 7        | Oligodesoxynukleotide  | 23        |
| 8        | Molekulargewichtsstandards                                       | 23        |
| 9        | Enzyme   | 23        |
| 10       | Kits   | 23        |
| 11       | Allgemeine Puffer  | 23        |
| <b>D</b> | <b>METHODEN</b>  | <b>24</b> |
| 1        | Zellbiologische Methoden   | 24        |
| 1.1      | Zellkulturbedingungen  | 24        |
| 1.2      | Bestimmung der Zellzahl  | 24        |
| 1.3      | Einfrieren und Auftauen der Zellen                               | 24        |
| 1.4      | Transfektion von Zellen  | 25        |
| 1.5      | Durchflusszytometrie   | 25        |
| 1.6      | Immunfluoreszenzfärbung für die FACS-Analyse                     | 26        |
| 1.7      | Herstellung von Präparaten für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie  | 26        |
| 1.8      | Haptotaktische Transmigration                                    | 27        |
| 2        | Biochemische Methoden  | 29        |
| 2.1      | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)     | 29        |
| 2.2      | Western Blot   | 30        |
| 2.3      | Analyse der L1-Spaltung  | 31        |
| 2.4      | Herstellung von Pervanadat                                       | 32        |
| 2.5      | Lyse von Zellen in Triton X-100 bzw. BOG-Lysispuffer             | 32        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.6      | Immunpräzipitation aus Zelllysaten  | 32        |
| 2.7      | Biotinylierung von Oberflächenproteinen   | 33        |
| 2.8      | Proteinbestimmung nach Bradford   | 33        |
| 2.9      | Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)  | 33        |
| 2.10     | Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration  | 34        |
| 2.11     | ELISA   | 34        |
| 2.12     | Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten zur Analyse von DIGs                         | 35        |
| 2.13     | Proteinfällung  | 35        |
| 2.14     | Subfraktionierung von Zellen  | 36        |
| 2.15     | Cholesterin-Manipulation  | 37        |
| 2.16     | Bestimmung des zellulären Cholesteringehalts  | 37        |
| 2.17     | Analyse von Vesikeln  | 38        |
| 3        | Molekularbiologische Arbeitsmethoden  | 39        |
| 3.1      | Transformation von Bakterien  | 39        |
| 3.2      | Chemische Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock                          | 40        |
| 3.3      | Lagerung von Bakterienkulturen  | 40        |
| 3.4      | Präparation von Plasmid-DNA   | 40        |
| 3.5      | Minipräparation von Plasmid-DNA   | 40        |
| 3.6      | Maxi-Präparation von Plasmid-DNA  | 41        |
| 3.7      | Bestimmung der DNA-Konzentration  | 41        |
| 3.8      | Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren   | 42        |
| 3.9      | Restriktionsverdau von DNA  | 42        |
| 3.10     | Umklonierung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Vektoren                                    | 42        |
| 3.11     | Phenol-Chloroform-Extraktion  | 44        |
| 3.12     | DNA-Fällung mit Ethanol   | 44        |
| 3.13     | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 44        |
| 4        | Arbeiten mit Adenoviren   | 45        |
| 4.1      | Herstellung von Adenoviren  | 45        |
| 4.2      | Aufreinigung des Adenovirus im Cäsium-Chlorid-Gradienten                                  | 47        |
| 4.3      | Photometrische Bestimmung des Virustiters   | 48        |
| 4.4      | Infektion von Zellen mit Adenoviren   | 49        |
| <b>E</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>50</b> |
| 1        | L1 und ADAM10 lokalisieren in Raft-ähnlichen Kompartimenten                               | 50        |
| 2        | L1-32 ist erst nach PMA-Stimulation biotinylierbar  | 52        |
| 3        | ADAM10 und L1 lokalisieren im Golgi/TGN und an der Plasmamembran                          | 53        |
| 4        | Die L1-Spaltung findet sowohl an der Zelloberfläche als auch im Golgi/TGN statt           | 54        |
| 5        | PMA und MCD stimulieren die L1-Spaltung in unterschiedlichen Kompartimenten               | 56        |
| 6        | MCD-Behandlung extrahiert Cholesterin und führt zur Abgabe von löslichem L1               | 57        |
| 7        | MCD führt zur Freisetzung von Vesikeln, die L1 und ADAM10 enthalten                       | 59        |
| 8        | ADAM10 in isolierten Vesikeln ist aktiv und spaltet L1                                    | 61        |
| 9        | MCD-induzierte Vesikel werden nicht von der Zelloberfläche freigesetzt                    | 62        |
| 10       | Aus Vesikeln freigesetztes lösliches L1 stimuliert die Migration                          | 64        |
| 11       | Cholesterinsenkung durch Lovastatin führt ebenfalls zur Abgabe von Vesikeln               | 65        |
| 12       | Ovarialkarzinomgewebe exprimieren L1 und ADAM10   | 66        |
| 13       | Charakterisierung des mAk 11G2 gegen ADAM10   | 67        |
| 14       | L1-Spaltung ist in Ovarialkarzinomzellen kaum stimulierbar                                | 69        |
| 15       | In Ovarialkarzinomlinien ist die Spaltung von L1 durch eine Metalloproteinase vermittelt  | 70        |
| 16       | In Ovarialkarzinomzellen ist das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 kaum biotinylierbar | 72        |
| 17       | Die Metalloproteinase ADAM10 ist in die L1-Spaltung involviert                            | 74        |

---

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 18       | Ovarialkarzinomzellen geben proteolytisch aktive Vesikel ab, die L1 und ADAM10 enthalten                      | 76         |
| 19       | In den Asziten von Tumorpatientinnen können L1-haltige Vesikel nachgewiesen werden                            | 78         |
| 20       | Herstellung von L1-Adenovirus   | 80         |
| 21       | Mit L1-Adenovirus infizierte Zellen exprimieren L1  | 82         |
| 22       | Nach Infektion mit L1-Adenovirus überexprimiertes L1 wird gespalten   | 83         |
| 23       | Virale Überexpression von L1 stimuliert die Migration   | 84         |
| 24       | Nach Infektion mit L1-Adenovirus abgegebenes lösliches L1 stimuliert die Migration                            | 85         |
| 25       | Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN beeinflusst die Abgabe von löslichem L1 sowie das Migrationsverhalten | 86         |
| 26       | L1 wird auch in ADAM10-defizienten Fibroblasten gespalten   | 89         |
| <b>F</b> | <b>DISKUSSION</b>   | <b>90</b>  |
| 1        | Spaltung von L1 in Lipid Rafts  | 91         |
| 2        | Mechanismen der L1-Spaltung   | 94         |
| 3        | Einfluss der ADAM10-vermittelten Spaltung von L1 auf die Progression von Ovarialkarzinomen                    | 96         |
| 4        | Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomlinien  | 98         |
| 5        | Die Abgabe von L1 und ADAM10 in Vesikeln  | 100        |
| <b>G</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>107</b> |
| <b>H</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>108</b> |
| <b>I</b> | <b>ANHANG</b>   | <b>130</b> |
| 1        | Abkürzungen   | 130        |
| 2        | Lebenslauf  | 133        |
| 3        | Publikationen   | 134        |

## **A EINLEITUNG**

### **1 Das Ovarialkarzinom**

Tumore der Ovarien stellen die fünfthäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen bei Frauen der westlichen Welt dar; in Deutschland erkranken jährlich etwa 8000 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Wird die Erkrankung in einem frühen Stadium diagnostiziert, liegen die Heilungschancen bei etwa 90 %. Da sich aber etwa 75 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden, ist die 5-Jahre-Überlebensrate für die Betroffenen deutlich geringer. Die meisten Ovarialkarzinome haben dann bereits Metastasen außerhalb der Eierstöcke gebildet und sprechen nur schlecht auf Therapien an (Herbst, 1994). Erschwert wird eine frühzeitige Diagnose durch den asymptomatischen Verlauf der Erkrankung, weshalb Ovarialkarzinome auch als *silent killer* bezeichnet werden.

Die Progression vom Primärtumor zur Bildung von Metastasen geht mit Veränderungen der zellulären Eigenschaften einher (Fidler, 2002). Häufig re-exprimieren neoplastische Zellen Adhäsionsmoleküle, die eine wichtige Rolle bei verschiedenen Migrationsprozessen während der Embryonalentwicklung spielen und im adulten Organismus nicht mehr vorhanden sind. Das Zelladhäsionsmolekül L1 wird in Tumoren der Ovarien und des Uterus überexprimiert, während gesundes Gewebe sowie gutartige Veränderungen negativ für L1 sind. Die Expression von L1 ist assoziiert mit dem klinischen Grad der Differenzierung des Tumors sowie einem fortgeschrittenen Stadium der Krebserkrankung.

### **2 Das L1-Adhäsionsmolekül**

#### **2.1 Vorkommen und Funktion von L1**

L1 wurde ursprünglich als Zelladhäsionsmolekül des Nervensystems identifiziert. Dort wird es in erster Linie auf Axonen und Wachstumskegeln sich entwickelnder Neuronen exprimiert. Das neuronale L1 ist an der Migration (Lindner et al., 1983), Adhäsion (Keilhauer et al., 1985), am Auswachsen von Neuriten (Chang et al., 1987; Doherty et al., 1995) sowie an der Bündelung (Faszikulierung) (Fischer et al., 1986) und Myelinisierung von Neuriten (Wood et al., 1990) beteiligt. Es spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns und des Nervensystems. Das L1-Gen ist sowohl in der Maus als



auch im Menschen X-chromosomal lokalisiert (Djabali et al., 1990). Mehr als hundert Mutationen in diesem Gen konnten bereits identifiziert werden. Diese führen zu schweren neurologischen Missbildungen und Fehlfunktionen, die auf Störungen im Bindungsverhalten des L1-Proteins zurückzuführen sind (Brümmendorf et al., 1998). Dazu gehören X-chromosomal vererbter Hydrozephalus, *MASA*-Syndrom (*Mental Retardation, Aphasia, Shuffling Gait and Adducted Thumbs*) oder spastische Paraplegie Typ I (SPG1) (Rosenthal et al., 1992; van Camp et al., 1993; Fransen et al., 1994; Jouet et al., 1994; Vits et al., 1994).

L1 tritt nicht nur im Nervensystem auf, sondern wird auch auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, wie Knochenmarkzellen, reifen Thymozyten und der Mehrheit der peripheren B- und T-Lymphozyten in der Maus gefunden (Kowitz et al., 1992; 1993). Im humanen Immunsystem wird L1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und peripheren B-Lymphozyten schwach exprimiert (Ebeling et al., 1996; Pancook et al., 1997). Während L1 im Nervensystem gut charakterisiert ist, ist über die funktionelle Bedeutung von L1 im Immunsystem noch wenig bekannt. Di Sciuillo et al. (1998) hatten berichtet, dass L1 wichtige Funktionen für die Erhaltung der normalen Lymphknotenarchitektur besitzt. Außerdem ist L1 sowohl bei der Morphogenese der Nierentubuli (Debiec et al., 1998) als auch bei der Entwicklung der Milz beteiligt. In L1-knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass es durch das Fehlen von L1 zu einer selektiven Missbildung in den Randbereichen der weißen Pulpa der Milz kommt. Die Randbereiche der weißen Pulpa waren unregelmäßig geformt und unterbrochen (Wang et al., 2000). Weiterhin kann L1 als kostimulatorisches Molekül bei der T-Zellaktivierung wirken (Balaian et al., 2000). Transfektionen von Maus-Myelomzellen mit humanem L1 erhöhten die Fähigkeit dieser Zellen, T-Lymphozyten zu aktivieren (Balaian et al., 2000).

Interessanterweise wird L1 auch auf vielen Tumoren, wie z.B. Melanom, Neuroblastom, Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Gliom und bei der monozytären Leukämie exprimiert. Über die Rolle von L1 ist hierbei noch wenig bekannt, vermutlich beeinflusst L1 aber die Progredienz dieser Tumore. So konnten Thies et al. (2002) zeigen, dass die Überexpression von L1 mit der Bildung von Metastasen beim malignen Melanom assoziiert ist. Kowitz et al. (1993) berichten, dass die Expression von L1 auf der Maus-Lymphomzelllinie Esb-MP einen Einfluss auf das Tumorstadium und die Metastasierung hat. Auch die Daten von Ohnishi et al. (1998) lassen vermuten, dass L1 durch die Erhöhung der Invasion und Migration von Gliomzellen die Metastasierung begünstigt. Schließlich hatten Arbeiten aus unserer Gruppe gezeigt, dass die Expression von L1 in

Tumoren der Ovarien und des Uterus mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten korreliert (Fogel et al., 2003).

## 2.2 Struktur von L1

L1 ist ein 200-220 kDa großes Glykoprotein, das zur Familie der Immunglobulin-(Ig-) Superfamilie (Moos et al., 1988) gehört. Das ursprünglich in der Maus charakterisierte Adhäsionsmolekül (Lindner et al., 1983) weist homologe Formen im Menschen (Wolff et al., 1988), in der Ratte (NILE) (Lee et al., 1981), im Huhn (NgCAM) (Grumet et al., 1984) und in Drosophila (Neuroglian) (Bieber et al., 1989) auf. Der extrazelluläre Teil von L1 besteht aus sechs Ig-Domänen, gefolgt von fünf Fibronektin Typ III-ähnlichen Domänen (Hortsch, 1996) (**Abb. 1**).

Die extrazellulären Domänen sind durch eine kurze transmembrane Sequenz mit einer hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne verbunden (Moos et al., 1988; Sonderegger und Rathjen, 1992; Reid und Hemperly, 1992). L1 besitzt mehr als zwanzig potentielle Glykosylierungsstellen (Moos et al., 1988). Durch Sequenzierung konnten im Maus-L1 zwei und im Menschen ein RGD-Motiv identifiziert werden, die in der sechsten Ig-Domäne lokalisiert sind. Das zweite RGD-Motiv im Menschen ist durch einen Aminosäureaustausch zu LGD mutiert. Weiterhin enthält das Molekül zwei alternativ gespleißte Mini-Exons. Durch alternatives Spleißen des Exons 2 enthält die extrazelluläre Domäne des neuronal exprimierten L1 ein aus fünf Aminosäuren bestehendes Motiv (YEGHH) (Jouet et al., 1995), das im nicht-neuronal exprimierten L1 fehlt.

Im zytoplasmatischen Bereich des L1 (Exon 27) wird durch alternatives Spleißen ein Aminosäuremotiv eingefügt (RSLE), dessen Expression ebenfalls nur in Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen wurde (Miura et al., 1991; Takeda et al., 1996). Dieses Motiv führt durch Phosphorylierung eines Tyrosins direkt vor dem RSLE-Motiv zu einer erhöhten Clathrin-vermittelten Endozytose von L1 (Kamiguchi et al., 1998) und dadurch zu einer verminderten Zelladhäsion (Long et al., 2001).

L1 liegt nicht nur in einer Transmembranform vor, sondern kann durch Abspaltung des extrazellulären Teils in eine lösliche Form überführt werden, die funktionell aktiv ist. Melanomzellen spalten L1 von der Zelloberfläche ab und bauen es in die benachbarte extrazelluläre Matrix ein (Montgomery et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass lösliches L1 die Migration von Gliomzellen stimuliert (Izumoto et al., 1996). In Form

eines Fusionsproteins schützt L1 Neuronen vor Apoptose (Chen et al., 1999a) und fördert sogar nach Durchtrennung des Rückenmarks das Axonwachstum *in vivo* (Roonprapunt et al., 2003). Weiterhin verstärkt eine lösliche chimäre Form von L1 das Neuritenwachstum (Doherty et al., 1995).

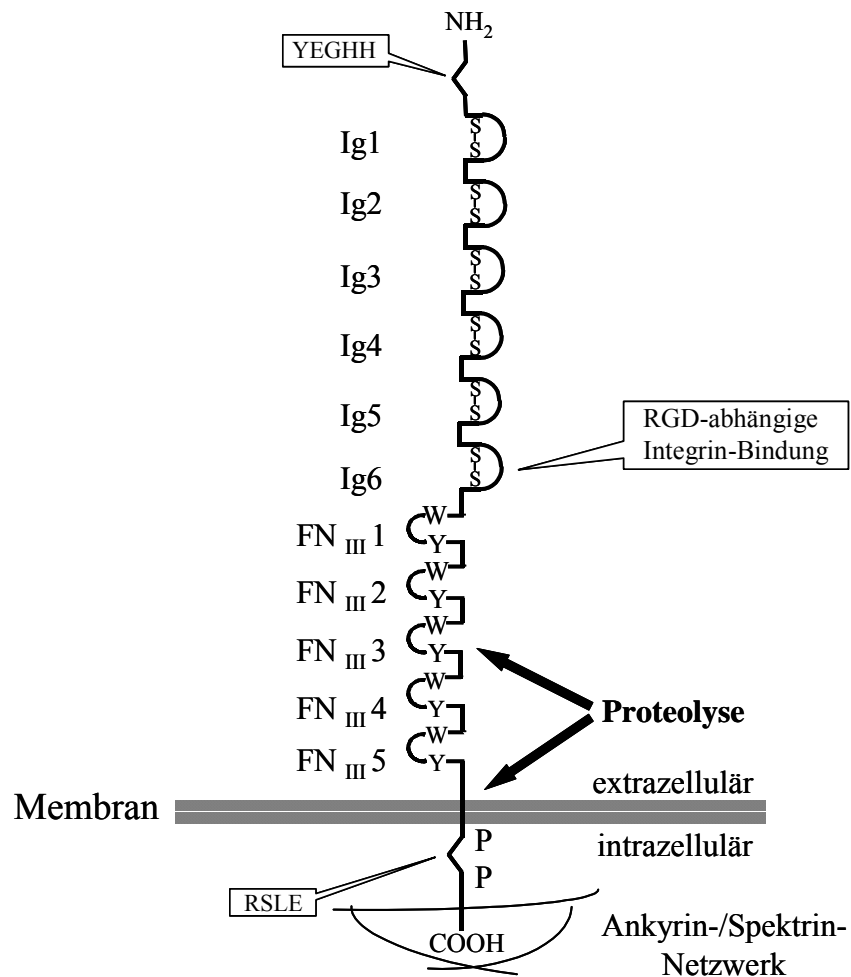


Abb. 1 : **Schematische Strukturübersicht von L1.** Die Darstellung zeigt die Ig-Domänen 1-6, gefolgt von den fünf Fibronektin Typ III-Einheiten, dem transmembranen Bereich und der hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne. Neben den Positionen der extrazellulär bzw. zytoplasmatisch alternativ gespleißten Mini-Exons (YEGHH und RSLE) sind die RGD-abhängige Integrinbindungsdomäne sowie die Bereiche der extrazellulären proteolytischen Spaltung gekennzeichnet. Das Molekül ist über Ankyrin mit dem Zytoskelett verbunden. Die zytoplasmatische Domäne enthält Phosphorylierungsstellen.

Bei der proteolytischen Prozessierung von L1 sind mehrere Proteinasen beteiligt. Arbeiten von Mechttersheimer et al. (2001) weisen darauf hin, dass die extrazelluläre Spaltung von L1 im membranproximalen Bereich durch ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) erfolgt. Weiterhin spalten die Serinproteinasen Plasmin (Nayeem et al., 1999) und Trypsin L1 im extrazellulären Bereich (Sadoul et al., 1988). Die Schnittstelle hierfür befindet sich in der dritten FNIII-Domäne und ist gekennzeichnet durch ein dibasisches Aminosäure-Motiv mit der Sequenz <sup>839</sup>QRKHSKRHIH<sup>848</sup> (Sadoul et al., 1988; Nayeem et

al., 1999). Kürzlich konnten Kalus et al. (2003) zeigen, dass L1 in diesem Bereich zusätzlich durch die Proprotein-Konvertase PC5A prozessiert werden kann. Die Spaltstelle liegt in der Sequenz  $^{840}\text{RKHSKR}^{845}$ , welche dem Erkennungsmotiv für Proprotein-Konvertasen,  $(\text{R/K})\text{X}_{0,2,4,6}(\text{K/R})$ , entspricht.

Die zytoplasmatische Domäne von L1 enthält die hoch konservierte Sequenz  $^{1224}\text{SFIGQY}^{1229}$ , welche die Bindung an Ankyrin und damit eine Assoziation mit dem Zytoskelett ermöglicht. Durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes in dieser L1-Sequenz wird die Bindung aufgehoben (Garver et al., 1997). Die Bedeutung dieser Interaktion zeigt sich in den schwerwiegenden neurologischen Defekten in AnkyrinB- und L1-knockout Mäusen (Scotland et al., 1998; Dahme et al., 1997; Demyanenko et al., 1999; Haney et al., 1999). Eine Erklärung für die bei diesen Tieren beobachteten Störungen des Axonwachstums bieten die Daten von Nishimura et al. (2003). Diese zeigen, dass die homophilische Interaktion der extrazellulären L1-Domänen die Assoziation zwischen L1 und AnkyrinB induziert. Da AnkyrinB zusätzlich mit F-Aktin verbunden ist, baut sich durch den retrograden Transport von F-Aktin eine Zugkraft auf, die Voraussetzung ist für das L1-vermittelte Auswachsen von Neuriten. Im Widerspruch dazu beschreiben Gil et al. (2003), dass Ankyrin die Aktin-abhängige retrograde Bewegung von L1 inhibiert und eine Interaktion mit statischen Komponenten des Zytoskeletts vermittelt. Vermutlich spielen die Isoformen von Ankyrin unterschiedliche Rollen bei dynamischen Prozessen bzw. der statischen Adhäsion. Im Menschen sind zwei *missense* Mutationen (S1224L und Y1229H), die mit dem MASA-Syndrom assoziiert sind, in der beschriebenen Region von L1 lokalisiert (Fransen et al., 1997; Saugier-veber et al., 1998). Beide Mutationen verhindern eine Interaktion zwischen L1 und Ankyrin und führen so zu schweren neuronalen Entwicklungsstörungen (Needham et al., 2001).

### 2.3 Bindungseigenschaften von L1

Die Gruppe der extrazellulären Bindungspartner von L1 kann unterteilt werden in i) neuronale Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) wie L1 selbst, Nr-CAM, F3/FII/contactin und Axonin-1/TAG-1/TAX-1; ii) nicht-Ig-Familien CAMs wie Integrine; iii) Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin, Phosphocan und Neurocan und iv) Rezeptoren wie Neuropilin-1 und FGF-Rezeptor. Die Assoziation mit unterschiedlichen Bindungspartnern bestimmt dabei die Funktion von L1 während der Entwicklung des Nervensystems. So nutzen PC12-Zellen die L1-L1-Interaktion für die homotypische Zelladhäsion, während die Bindung an  $\alpha\beta3$ -Integrine das Neuritenwachstum fördert (Yip und Siu, 2001; Yip et al.,

1998). Weiterhin induzieren heterophilische Interaktionen mit Axonin-1/TAG-1/TAX-1 (Kuhn et al., 1991) oder F3/FII/contactin (Brümmendorff et al., 1993; Morales et al., 1993) das initiale Auswachsen der Axone. Dieses wird durch Bindung von L1 an Neurocan blockiert (Friedlander et al., 1994; Rauch et al., 2001). Außerdem wurde beschrieben, dass die homophilische L1-Interaktion die Aktivierung des FGF-Rezeptors zur Folge hat, wodurch ebenfalls das Neuritenwachstum stimuliert wird (Doherty und Walsh, 1996). Daneben interagiert L1 mit Neuropilin-1 und ist damit Teil eines Rezeptorkomplexes, der für die Repulsion von Axonen durch Semaphorin, Sema3A, verantwortlich ist (Castellani et al., 2000). Die Assoziationen zwischen L1 und den verschiedenen Bindungspartnern können dabei in *cis*, d.h. innerhalb der selben Zellmembran, oder in *trans*, also zwischen benachbarten Zellen, stattfinden. Weiterhin wurde gezeigt, dass *cis*-Interaktionen die Affinität der L1-Bindung an Liganden in *trans* erhöhen (Feizi, 1994; Kadmon et al., 1995; Schmidt et al., 1996).

Die im L1-Gen identifizierten *missense* Mutationen erstrecken sich über 10 der 11 extrazellulären Domänen und stören sowohl die homo- wie auch heterophilischen Bindungen (De Angelis et al., 1999). Dadurch kommt es zu den schweren neuronalen Entwicklungsstörungen, die in Patienten mit MASA-Syndrom beschrieben sind.

Die Mechanismen, die die Affinität zu verschiedenen Bindungspartnern regulieren, sind jedoch nur teilweise aufgeklärt. Arbeiten von De Angelis et al. (2001) zeigen, dass die N-terminale Sequenz YEGHH, die durch das Miniexon 2 kodiert wird, für die homo- sowie die heterophilische Bindung an neuronale Liganden, wie Axonin-1/TAG1-1/TAX-1, wichtig ist. Haspel und Grumet (2003) unterscheiden zwischen zwei Bindungsmodellen (**Abb. 2**). Beim „modulären Modell“ vermitteln einzelne extrazelluläre Domänen von L1 die Assoziation mit bestimmten Bindungspartnern. Beispielsweise lokalisieren die Bindungsstellen für Neurocan und Neuropilin-1 in der Ig1-Domäne (Oleszewski et al., 1999; Castellani et al., 2002), während die Bindung an verschiedene Integrine über das RGD-Motiv in der Ig6-Domäne erfolgt (Oleszewski et al., 1999; Felding-Habermann et al., 1997; Montgomery et al., 1996). Im „kooperativen Modell“, das die Assoziation zwischen L1 und neuronalen Zelladhäsionsmolekülen beschreibt, kooperieren die ersten vier Ig-Domänen miteinander. Wahrscheinlich kommt es zur Ausbildung einer hufeisenförmigen Struktur, die bereits für die L1 verwandten Proteine Hemolin (Su et al., 1998) und Axonin-1 (Freigang et al., 2000) beschrieben wurde. Möglich wird dies durch eine 7 Aminosäuren lange Verbindung zwischen Ig2 und Ig3, die genug Flexibilität für eine Interaktion von Ig1 mit Ig3, und Ig2 mit Ig4, bietet. Die Autoren spekulieren sogar, dass die beiden Bindungsmechanismen miteinander kompetieren und so die biologischen

Funktionen von L1 modulieren. Beispielsweise könnte durch Bindung von Neurocan an die Ig1-Domäne L1 in einer gestreckten Konformation gehalten werden. So wäre die Ausbildung der hufeisenförmigen Struktur und damit die homo- bzw. heterophilische Interaktion mit neuronalen CAMs gestört. Dies würde erklären, weshalb Neurocan das Neuritenwachstum und die neuronale Adhäsion blockiert (Friedlander et al., 1994).

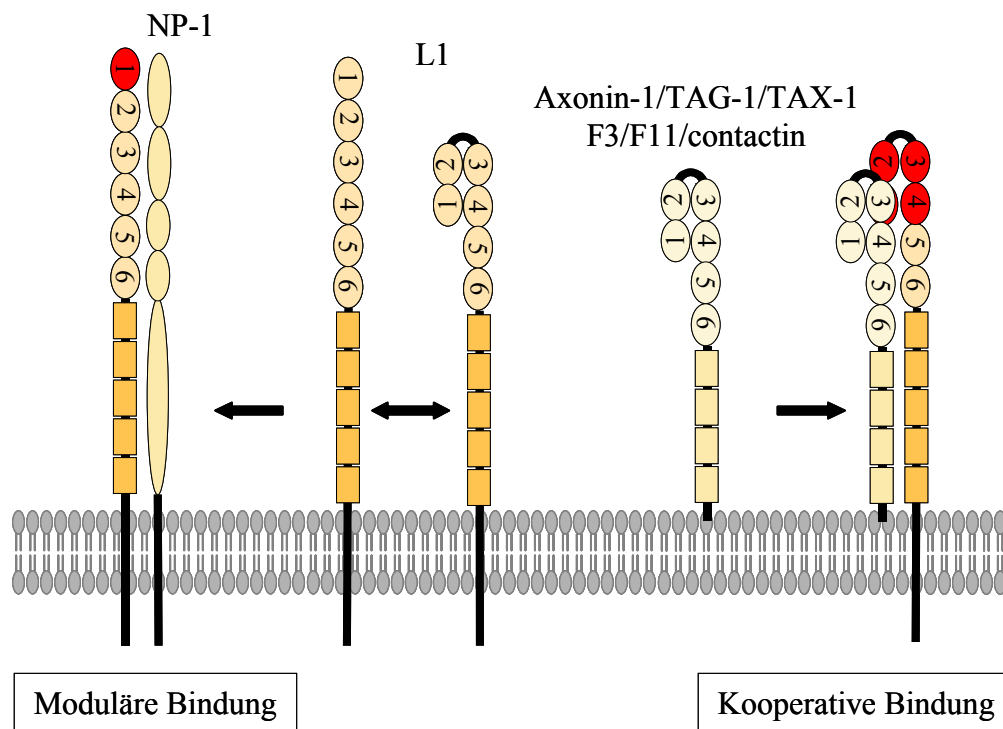


Abb. 2 : Schematische Darstellung der Interaktion der extrazellulären Domänen von L1 mit verschiedenen Bindungspartnern. Bei der modulären Bindung vermitteln einzelne Domänen die Bindung an Partner wie Neuropilin-1. Die kooperative Bindung setzt die Ausbildung einer hufeisenförmigen Struktur zwischen den Ig1-Ig4-Domänen voraus. Alle vier Domänen kooperieren miteinander und vermitteln sowohl homophilische (nicht dargestellt) wie auch heterophilische Bindungen mit neuronalen CAMs, die ebenfalls diese hufeisenförmige Struktur ausbilden. Zu diesen gehören die GPI-geankerten Proteine F3/F11/contactin und Axonin-1/TAG-1/TAX-1. Die aktiven L1-Bindungsdomänen sind jeweils in rot hervorgehoben.

### 3 Zellmigration

Zellmigration ist ein zielgerichteter Prozess, der eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, der Wundheilung aber auch bei Entzündungen und Tumormetastasierung spielt. Er erfordert die genaue Koordination verschiedener zellulärer Ereignisse, wie Polarisation, Veränderungen des Zytoskeletts und Signaltransduktion.

Migration entsteht durch die dynamische Interaktion zwischen der Zelle und dem umgebenden Substrat (Huttenlocher et al., 1995) (Abb. 3). Zunächst kommt es zur Aktinpolymerisation und damit zur Bildung von Zellausläufern, wie Lamellipodien oder

Filopodien, in die Richtung, in die die Migration stattfinden soll. Durch Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen mit der extrazellulären Matrix (EZM) werden die Ausläufer stabilisiert. Dies geschieht vor allem durch Ausbildung sog. fokaler Kontakte, einem Komplex aus Integrinen und Komponenten des Zytoskeletts, wie FAK (*focal adhesion kinase*), Paxilin und Tensin (Schaller und Parsons, 1994; Turner, 1994; Lo et al., 1994). Außerdem aktivieren die Integrine verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle, die in die Zellmotilität involviert sind. Dazu gehören Mitglieder des Ras- und MAP-Kinase Signalweges sowie die GTPasen der Rho-Familie (Huttenlocher et al., 1995; Ilic et al., 1995; Cary et al., 1998; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Anand-Apte et al., 1997; Klemke et al., 1997; Cox und Huttenlocher, 1998).

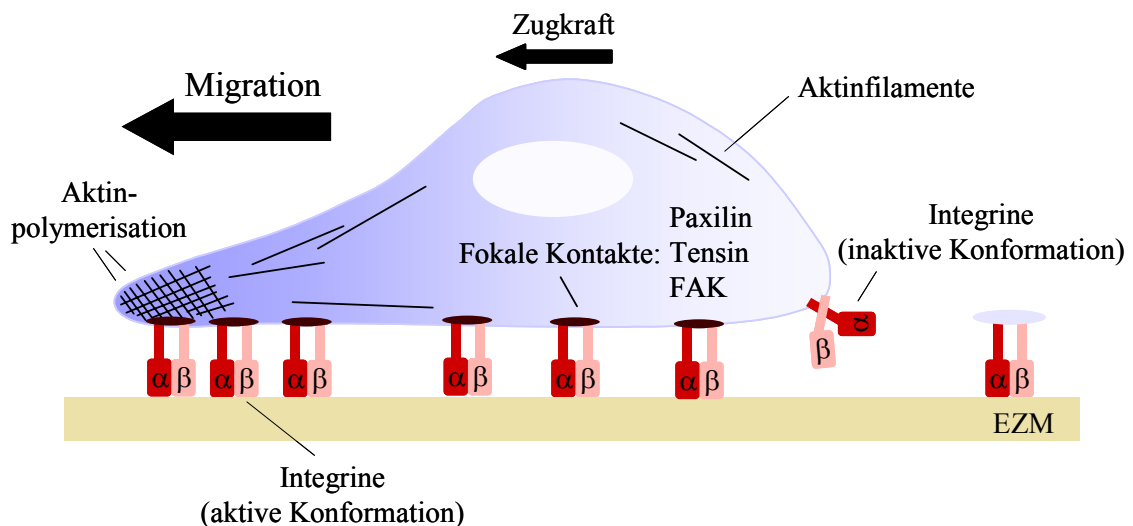


Abb. 3: **Modell einer migrierenden Zelle.** Bei der Migration kommt es zur Ausbildung von fokalen Kontakten an der Vorderseite der Zelle. Die Integrine am Hinterende der Zelle nehmen eine inaktive Konformation ein und werden vom Substrat gelöst. Durch ungleiche Adhäsionsstärken am Vorder- und Hinterende entsteht eine Zugspannung, die eine Vorwärtsbewegung ermöglicht.

Damit sich die Zelle fortbewegen kann, müssen Kontakte an der Rückseite wieder gelöst werden. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die Integrin-EZM-Bindung durch Veränderung der Affinität abgeschwächt wird (Hughes und Pfaff, 1998), was zum Ablösen der Integrine vom Substrat führt (Huttenlocher et al., 1995; 1996). Anschließend werden die Integrine in endozytotischen Vesikeln ins Zellinnere transportiert (Palecek et al., 1996; Regen und Horwitz, 1992) und möglicherweise an der Vorderseite der Zelle wiederverwendet (Bretscher et al., 1992). Außerdem wurde beobachtet, dass die Integrine auf dem Substrat zurückgelassen werden, während die Zelle nach vorne migriert (Regen und Horwitz, 1992). Diese „Fußabdrücke“ können dann sichtbar gemacht werden (Friedl et al., 1998).

Die Vorwärtsbewegung der migrierenden Zelle resultiert demnach aus einem Ungleichgewicht der Adhäsionsstärken am Vorder- und Hinterende der Zelle. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Zugspannung, die letztendlich eine zielgerichtete Migration ermöglicht (Huttenlocher et al., 1995; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Die Adhäsionsstärke zwischen der Zelle und ihrer Umgebung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die Dichte der Liganden auf dem Substrat, die Anzahl und Dichte der Rezeptoren auf der Zelloberfläche sowie deren Aktivierungszustand (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Veränderungen in diesen Parametern haben dramatische Effekte auf das Migrationsverhalten.

Ein der Zellmigration ähnlicher Vorgang ist die amöboide Fortbewegung des Wachstumskegels. Auch hier ist eine starke Bindung an das Substrat im peripheren Bereich des Wachstumskegels bei gleichzeitigem Lösen der Kontakte im zentralen Bereich erforderlich. Kamiguchi und Lemmon (2000) zeigten, dass L1 während des Axonwachstums in der zentralen Domäne des Wachstumskegels durch Endozytose internalisiert wird und in Vesikeln retrograd in die periphere Domäne transportiert wird; dort erfolgt der Wiedereinbau in die Plasmamembran. Es entsteht eine asymmetrische Adhäsion, welche die L1-vermittelte Migration ermöglicht.

Die Zellmigration erfordert aber nicht nur die koordinierte Adhäsion auf einem Substrat. Vielmehr durchdringt die Zelle auf dem Weg in ihr Zielgebiet Basalmembranen und Blutgefäßwände oder wandert in neues Gewebe ein. Um diese Barrieren überwinden zu können, muss die migrierende Zelle Komponenten der EZM degradieren. Sowohl Metalloproteinasen, Serinproteinasen und Cathepsine spielen bei diesem proteolytischen Prozess eine wichtige Rolle (zusammengefasst in Murphy und Gavrilovic, 1999; Ellis und Murphy, 2001; Birkedal-Hansen, 1995). Wolf et al. (2003) zeigen, dass Tumorzellen, ähnlich wie Lymphozyten und Fibroblasten (Hiraoka et al., 1998), außerdem zu einer nicht proteolytischen, amöboiden Migration fähig sind. Dabei „kriechen“ die Zellen durch bestehende EZM-Strukturen hindurch, ohne diese zu degradieren.

#### **4 Metalloproteinasen**

Neben der Degradation der EZM spalten Metalloproteinasen auch andere Proteine der Zelloberfläche. Damit modifizieren sie nicht nur Zell-EZM- sondern auch Zell-Zell-Interaktionen und nehmen so Einfluss auf Prozesse wie Differenzierung, Migration und Proliferation. Sowohl sekretierte als auch membrangebundene Formen von Metallo-



proteinasen sind an der perizellulären Proteolyse beteiligt, wichtig sind hier die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie die Metalloproteinasen-Disintegrine (ADAMs).

#### 4.1 Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die Familie der MMPs besteht aus über 20 zinkabhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind, alle Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. MMPs werden aufgrund ihrer Struktur in acht Klassen eingeteilt von denen fünf sezerniert werden, drei sind membrangebunden (MT-MMPs) (**Abb. 4**). Durch Bindung an Integrine oder CD44 können die sezernierten Formen ebenfalls an der Plasmamembran lokalisieren (Brooks et al., 1996; Yu und Stamenkovic, 1999; Yu et al., 2002). Außerdem sind Interaktionen mit zelloberflächenassoziierten Heparan-Sulfat-Proteoglykanen, Kollagen Typ IV und EMMPRIN (extrazellulärer Matrixmetalloproteinase-Aktivator) möglich (zusammengefasst in Sternlicht und Werb, 2001).

Die MMPs werden als inaktive Zymogene (pro-MMPs) synthetisiert und durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Im inaktiven Zustand koordiniert die Thiolgruppe des Cysteins der konservierten Proteinsequenz  $\text{PRCGVNP}$  der Prodomäne das Zinkatom in der katalytischen Domäne, so dass das für die Katalyse erforderliche Wassermolekül nicht gebunden werden kann. Die Dissoziation des Cysteins vom Zinkatom führt zur Aktivierung der Proteinase und wird als „*cysteine switch*“ bezeichnet (van Wart und Birkedal-Hansen, 1990).

Die meisten MMPs werden extrazellulär durch andere MMPs oder Serinproteinasen aktiviert, MT-MMPs können zudem durch intrazelluläre Furin-ähnliche Serinproteinasen im Trans-Golgi-Netzwerk gespalten und aktiviert werden (zusammengefasst in Sternlicht und Werb, 2001).

Die Aktivität der MMPs wird durch endogene Inhibitoren streng kontrolliert. Als wichtigster Inhibitor in Gewebsflüssigkeiten wurde das Plasmaprotein  $\alpha 2$ -Makroglobulin beschrieben (Sottrup-Jensen und Birkedal-Hansen, 1989).  $\alpha 2$ -Makroglobulin und MMPs bilden Komplexe, die an *scavenger*-Rezeptoren binden und irreversibel endozytiert werden. Die am besten charakterisierten endogenen Inhibitoren sind die TIMPs 1-4 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*). Diese werden gewebsspezifisch exprimiert und unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, verschiedene MMPs zu inhibieren (zusammengefasst in Edwards, 2001).

## 4.2 Die Metalloproteinasen-Disintegrine (ADAMs)

Neben den MMPs gehören die ADAMs zur Klasse der zinkabhängigen Proteinasen. Wie **Abb. 4** zeigt, handelt es sich bei dieser erst Ende der 80er Jahre entdeckten Proteinfamilie um transmembrane Proteine, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind. Die Prodomäne der ADAMs enthält eine dem „*cysteine switch*“-Motiv der MMPs ähnliche Sequenz, welche die Metalloproteinasen in einem inaktiven Zustand hält. Die Aktivierung erfolgt in Übereinstimmung mit den MMPs durch Abspaltung der Prodomäne. Dieser Prozess findet wahrscheinlich im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt und wird durch Proprotein-Konvertasen, wie Furin und PC7, vermittelt (Lum et al., 1998; Roghani et al., 1999; Kang et al., 2002). Auf diesen Mechanismus deuten u.a. Studien von Anders et al. (2001) hin, in denen nach Überexpression von PC7 und Furin die Menge an prozessiertem ADAM10 stark erhöht war. Außerdem enthalten ADAMs zwischen der Pro- und der katalytischen Domäne die Konsensussequenz für die Spaltung durch Furin-ähnliche Proprotein-Konvertasen, RXR/KR (Hurskainen et al., 1999; Moss et al., 1997; Black et al., 1997; Srour et al., 2003). Die Metalloproteinasedomäne umfasst die charakteristische Konsensussequenz HEXXHXXGXXH, in der drei Histidinreste und ein Wassermolekül das katalytische Zinkatom koordinieren (Jiang und Bond, 1992). Obwohl alle ADAMs eine konservierte Metalloproteinasedomäne besitzen, fehlt einigen Mitgliedern dieser Familie eine intakte Zinkbindungsstelle. Außerdem wird bei manchen ADAMs die Proteinasedomäne während der Reifung abgespalten (Blobel et al., 1992). Die Disintegrindomäne einiger ADAMs enthält eine RGD-Sequenz, über die eine Bindung an Integrine möglich ist. So ist beispielsweise die spezifische Interaktion zwischen humanem ADAM15 und dem  $\alpha\beta3$ -Integrin RGD-abhängig (Kratzschmar et al., 1996; Zhang et al., 1998). Darüber hinaus konnte aber auch die RGD-unabhängige Bindung von ADAM12 an  $\alpha6\beta1$ -Integrine nachgewiesen werden (Chen et al., 1999b). Die Funktionen der cysteinereichen und der EGF-ähnlichen Domänen sind bisher unklar. Es wird vermutet, dass diese Domänen in die Interaktion zwischen ADAMs und Proteinen des Biosyntheseweges (z.B. Chaperone) oder Proteinen an der Zelloberfläche involviert sind. Innerhalb des zytoplasmatischen Teils kann keine sonderliche Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Mitgliedern aufgezeigt werden. Einige ADAMs besitzen Konsensussequenzen für Serin-/Threonin- oder Tyrosinkinase, außerdem wurde bei manchen Mitgliedern ein erhöhter Anteil an Prolin für eine mögliche Interaktion mit SH3-Domänen tragenden Proteinen nachgewiesen. Weiterhin wird diskutiert, dass die Bindung der ADAMs an Integrine einen Beitrag zur

Signaltransduktion, vermittelt durch den zytoplasmatischen Teil, von Zelle zu Zelle leisten könnte (zusammengefasst in Seals und Courtneidge, 2003).

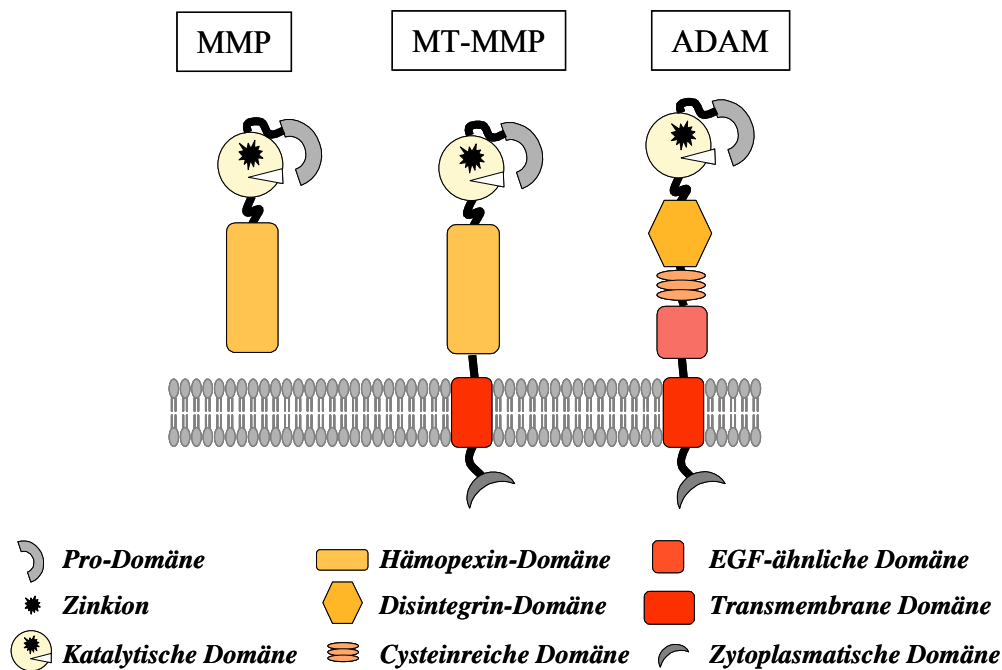


Abb. 4: Schematische Darstellung der Metalloproteinasen MMP, MT-MMP und ADAM

Die ADAMs sind die erste bekannte Proteinfamilie, die sowohl adhäsive wie auch proteolytische Funktionen in ihrer extrazellulären Domäne vereinigt. Ihre biologischen Aufgaben lassen sich in vier Gruppen zusammenfassen: Proteolyse, Zelladhäsion und -fusion sowie Signaltransduktion.

#### 4.3 Die Abspaltung von Oberflächenmolekülen durch Metalloproteinasen

Die extrazelluläre Domäne vieler integraler Membranproteine wird durch Abspaltung von der Zelloberfläche in eine lösliche Form überführt. Dieser als „*ectodomain shedding*“ bezeichnete Prozess ermöglicht es der Zelle schnell auf Veränderungen in ihrer Mikroumgebung zu reagieren und diese andererseits aktiv umzugestalten. Die Gruppe der abgespaltenen Transmembranproteine beinhaltet Zytokine, wie TNF $\alpha$  (Black et al., 1997; zusammengefasst in Mullberg et al., 2000), Zytokinrezeptoren, wie TNFR (Madge et al., 1999) sowie Vorläufer einiger Wachstumsfaktoren, wie HB-EGF (Izumi et al., 1998; Gechtman et al., 1999). Daneben werden Zelladhäsionsmoleküle, wie L-Selektin (Feehan et al., 1996) und andere Proteine, wie z.B. das Alzheimer-Vorläufer-Protein (APP), membranproximal gespalten (Esch et al., 1990).

Störungen in der strengen Regulation der beteiligten Proteinase führen zu unkontrollierter Proteolyse und schweren Erkrankungen wie Krebs, Arthritis und Alzheimer (Selkoe et al., 1998; Holmbeck et al., 1999). Die Bedeutung der MMPs und ADAMs für Zellproliferation und -migration sowie Tumorprogression wird im Folgenden näher charakterisiert.

Die Hauptaufgabe der MMPs wurde zunächst im Abbau der extrazellulären Matrix gesehen. Da Zellen aber Rezeptoren für einige Komponenten der EZM exprimieren, beeinflusst die Spaltung dieser Komponenten durch MMPs zelluläre Funktionen (Streuli, 1999). So werden durch die Proteolyse von Laminin-5 und Kollagen Typ IV kryptische Bindungsstellen exponiert, die fördernd auf die Zellmigration wirken (Giannelli et al., 1997; Koshikawa et al., 2000). Darüber hinaus sind MMPs in die Abspaltung von Zelloberflächenmolekülen involviert. Die Freisetzung der Ektodomänen von CD44 und E-Cadherin durch MMP-vermittelte Spaltung verstärkt die Invasionsfähigkeit von Zellen (Kajita et al., 2001; Noe et al., 2001). Außerdem fördert die Abspaltung des Vorläufers der  $\alpha$ 4-Integrin-Untereinheit durch MMP-14 die Migration von Brusttumorzellen (Deryugina et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von Tumorzellen in MMP-9-knockout Mäusen im Vergleich zu wildtyp Mäusen deutlich reduziert ist (Coussens et al., 2000; Bergers et al., 2000). MMPs sind in fast allen humanen Tumorarten überexprimiert. Ihre Expression korreliert mit einem verstärkten Tumorwachstum, verbesserter Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen und letztlich einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten.

Obwohl die Bedeutung der ADAMs für den Verlauf von Tumorerkrankungen noch unklar ist, lässt die Liste ihrer Substrate den Schluss zu, dass diese Proteinasefamilie ebenfalls das Wachstums- und Migrationsverhalten von Tumorzellen verändert. Neben MMP-7 spaltet ein Mitglied der ADAM-Familie den Heparin-bindenden EGF-Vorläufer und setzt damit lösliches HB-EGF frei. Dieses bindet an den EGF-Rezeptor und generiert dadurch Signale, welche die Zelle vor Apoptose schützen bzw. Zellteilung und -migration fördern (Yarden und Sliwkowsky, 2001; Yu et al., 2002). Welches Mitglied der ADAM-Familie die spaltende Proteinase ist, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Diskutiert wird sowohl eine Beteiligung von ADAM9 (Izumi et al., 1998; Weskamp et al., 2002), ADAM10 (Yan et al., 2002), ADAM12 (Asakura et al., 2002) als auch ADAM17 (Merlos-Suarez et al., 2001; Sunnarborg et al., 2002). ADAM12 ist in Darm- und Brustkrebsgeweben sowie einigen Tumorzelllinien überexprimiert (Wu et al., 1997; Iba et al., 2000); ADAM10 wird in Neuroblastomen und Phäochromozytomen hochreguliert (Yavari et al.,

1998). Der EGF-Rezeptor kann zusätzlich durch Bindung von TGF $\alpha$  aktiviert werden. Borrel-Pages et al. (2003) konnten kürzlich zeigen, dass ADAM17 für die Spaltung von pro-TGF $\alpha$  in Brusttumoren verantwortlich ist. Zudem gibt es Hinweise, dass HER4/erb4, ein weiteres Mitglied der EGFR-Familie, durch ADAM17 gespalten wird (Rio et al., 2000). Dies führt zur Bildung einer trunkierten Form des Rezeptors mit erhöhter Kinaseaktivität (Vecchi und Carpenter, 1997). Die Expression von HER4/erb4 wird ebenfalls mit der Entwicklung von Brusttumoren in Verbindung gebracht (Hackel et al., 1999). Eine Aktivierung der beteiligten ADAMs kann u.a. über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) erfolgen. Dabei führt die Bindung verschiedener Liganden wie LPA, Endothelin, Bombesin oder Thrombin an den GPCR über einen noch unbekanntem Signalweg zur Erhöhung der Aktivität verschiedener ADAMs. Diese wiederum spalten die bereits beschriebenen Vorläufer pro-HB-EGF und pro-TGF $\alpha$ , die dann den EGFR stimulieren. Schäfer et al. (2004) zeigen, dass multiple GPCR-Signale auf dem EGFR konvergieren und dadurch die Migration und Invasion von Tumorzellen fördern. Die Beteiligung der ADAMs bei diesem als Transaktivierung bezeichneten Prozess zeigt die Bedeutung dieser Proteinasenfamilie bei der Progredienz von Tumorerkrankungen.

#### **4.4 Regulation der Ektodomänenspaltung**

Die zellulären Mechanismen, die zu einer erhöhten Aktivität der Metalloproteinasen führen, sind noch weitgehend unverstanden. Experimentell kann die Ektodomänenspaltung vieler Proteine durch Phorbolster stimuliert werden. Über die beteiligten Signalkaskaden gibt es jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Izumi et al. (1998) beschrieben, dass die Proteinkinase C (PKC $\delta$ ) in die PMA-induzierte Abspaltung von pro-HB-EGF involviert ist, während Gechtman et al. (1999) eine Beteiligung des MAP-Kinase-Signalweges aufzeigten.

Physiologisch relevant ist die Erhöhung der Aktivität der Metalloproteinasen durch Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration (Hooper et al., 1997; Subramanian et al., 1997; Blobel et al., 2000; Yan et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, wird die Aktivität der MMPs durch endogene Inhibitoren wie TIMPs reguliert (Brew et al., 2000); diese sind aber nicht selektiv für MMPs. So inhibiert TIMP-3 ebenfalls ADAM17 (Amour et al., 2000) und ADAM12 (Loechel et al., 2000) und ADAM10 wird durch TIMP-1 und -3 inhibiert (Amour et al., 2000). Synthetische

Hydroxamatverbindungen ersetzen das Zink-koordinierende Wassermolekül im katalytischen Zentrum und blockieren dadurch zinkabhängige Proteinase, wie MMPs und ADAMs (Maksos et al., 1998). Einige dieser Substanzen, wie Batimastat und Marimastat, wurden bereits in der Therapie von Tumorerkrankungen getestet (Hidalgo und Eckhardt, 2001), allerdings mit zum Teil schweren Nebenwirkungen für die Patienten. Um diese zu minimieren, werden ständig neue Komponenten entwickelt, die eine selektive Inhibition der ADAMs bzw. MMPs ermöglichen sollen (Kottirsch et al., 2002; Sawa et al., 2002).

Bei den Metalloproteinase handelt es sich offensichtlich um ein sehr redundantes System, in dem mehrere Proteinase das gleiche Substrat spalten und jedes Mitglied der Familie mehrere Substrate spalten kann. Außerdem wird eine Reihe von Metalloproteinase durch den gleichen Mechanismus stimuliert. Es stellt sich also die Frage, wie eine generelle Proteolyse aller Membranproteine vermieden wird, sobald die Metalloproteinase aktiviert sind. Eine Möglichkeit, um Substratspezifität zu gewährleisten, könnte die Lokalisation von Proteinase und Substrat in gleichen oder unterschiedlichen Kompartimenten der Plasmamembran sein. Solche Kompartimente sind die sog. Lipid Rafts.

## 5 Lipid Rafts

Biologische Membranen sind keine starren Strukturen, denn die Lipide und viele Membranproteine sind permanent in lateraler Bewegung. Ausgehend von dieser Beobachtung entwarfen Singer und Nicolson im Jahr 1972 ein Modell für die Organisation biologischer Membranen, das flüssige Mosaik (*fluid mosaic*). Dieses Modell beschreibt die Membran als zweidimensionale Lösung, bestehend aus gerichteten globulären Proteinen und Lipiden. Dabei können die Membranproteine lateral ungehindert in der flüssigen Lipidmatrix diffundieren und sind homogen über diese verteilt.

Mit dem heutigen Wissen müssen biologische Membranen jedoch eher als ein „Mosaik von Lipid-Domänen“ beschrieben werden. So hatten Simons und Kollegen beobachtet, dass die Assoziation zwischen Cholesterin und Sphingolipiden zur Ausbildung von Mikrodomänen führt, die wie Flöße in einer Umgebung aus Glycerophospholipiden schwimmen. Diese Einheiten auf der Plasmamembran werden deshalb auch als Lipid Rafts bezeichnet (Simons und Ikonen, 1997; Harder und Simons, 1997).

## 5.1 Zusammensetzung der Lipid Rafts

Die Bildung von Mikrodomänen kann durch die strukturellen Eigenschaften der Membranlipide erklärt werden. Sphingolipide unterscheiden sich von anderen Phospholipiden durch ihre langen, meist gesättigten Fettsäureketten, die ein dichtes Aneinanderpacken der Sphingolipide erlauben. Es entsteht eine gelartige, geordnete Phase. Durch die Interkalation von Cholesterinmolekülen wird die laterale Mobilität erhöht. Dieser Membranzustand wird als *liquid-ordered* bezeichnet. Im Gegensatz dazu verhindern die geknickten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Glycerophospholipide eine starke Interaktion zwischen diesen Phospholipiden. Die Membranbereiche bleiben flüssiger oder *liquid-disordered*.

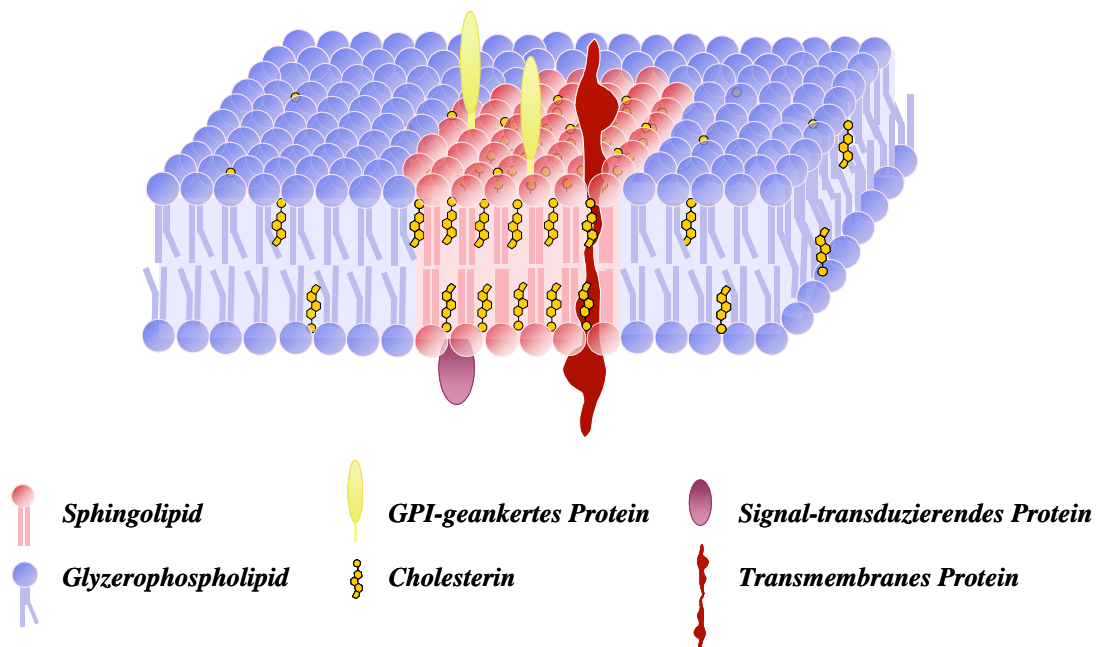


Abb. 5: **Modell der Lipid Rafts in der Zellmembran.** Durch laterale Assoziation zwischen Sphingolipiden und Cholesterin kommt es zur Ausbildung von Lipid Rafts, die angereichert sind mit GPI-geankerten Molekülen, signaltransduzierenden Molekülen sowie einigen transmembranen Proteinen.

Neben Cholesterin und Sphingolipiden sind Lipid Rafts hoch angereichert mit GPI-geankerten Molekülen, signaltransduzierenden Molekülen sowie einigen transmembranen Proteinen (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Ilangumaran et al., 2000; London und Brown, 2000; Cinek und Horejsi, 1992). Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-geankerte Proteine assoziieren aufgrund der langen, gesättigten Fettsäurekette des C-terminalen GPI-Ankers präferentiell mit Lipid Rafts (Brown, 1992; Harder und Simons, 1997). Über die Mechanismen der Assoziation von transmembranen Proteinen mit diesen Mikrodomänen ist wenig bekannt. Eine Möglichkeit zur Rekrutierung in Lipid Rafts ist die Palmitoylierung der Proteine, obwohl nicht alle palmitoylierten Proteine in Rafts

lokalisieren und nicht alle transmembranen Raftproteine palmitoyliert sind (Melkonian et al., 1999). Auch die Sequenz der transmembranen Domäne kann eine Assoziation mit Lipid Rafts vermitteln (Perschl et al., 1995; Scheiffele et al., 1997; Field et al., 1999).

Weiterhin sind Lipid Rafts angereichert mit zweifach acylierten Proteinkinasen der Src-Familie, wie Lck (Kabouridis et al., 1997), G-Proteinen (Shaul und Anderson, 1998) und anderen signaltransduzierenden Molekülen, die den Rafts auf der zytoplasmatischen Seite anheften (**Abb. 5**).

## 5.2 Analyse der Lipid Rafts

Durch die als *liquid-ordered* bezeichnete Anordnung sind die Sphingolipid-Cholesterin-Komplexe bei niedrigen Temperaturen relativ unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien wie z.B. Triton X-100 (London und Brown, 2000). Aufgrund ihrer geringen Dichte *floaten* Lipid Rafts nach kalter Extraktion in Triton X-100 bei der Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten nach oben (Brown, 1992; Kurzchalia et al., 1995; Parton und Simons, 1995). Lipid Rafts werden deshalb auch als *detergent-insoluble glycolipid-rich domains* (DIGs), *glycosphingolipid-enriched membranes* (GEMs) oder *low-density Triton-insoluble* (LDTI) bezeichnet.

Rietveld und Simons (1998) hatten gezeigt, dass Cholesterin essentiell für die Integrität der Lipid Rafts ist. Die Manipulation des Cholesteringehalts bietet demnach eine Möglichkeit, die Funktion dieser Mikrodomänen zu untersuchen. Der Entzug von Cholesterin durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD) ist dabei die am häufigsten angewandte Methode (Ilangumaran und Hoessli, 1998). Es sollte aber beachtet werden, dass die Depletion von Cholesterin nicht nur die Funktionalität der Lipid Rafts beeinflusst, sondern darüber hinaus zelluläre Prozesse verändert und sogar intrazelluläre Organelle betrifft (Keller und Simons, 1998; Schmidt et al., 2001). Neben der Behandlung mit MCD kann der Gehalt an zellulärem Cholesterin durch Inhibition der Biosynthese reduziert werden. Hierbei finden Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, sog. Statine, eine breite Anwendung (Schmitz und Drobnik, 2003; Klotz, 2003).

Erkenntnisse über die Zusammensetzung von Lipid Rafts basieren hauptsächlich auf der Extraktion der Mikrodomänen mit Triton X-100 bei 4°C und anschließender Ultrazentrifugation im Dichtegradienten (Brown, 1992; Kurzchalia et al., 1995; Parton und Simons, 1995). Die DIG-Fraktion beinhaltet jedoch alle zellulären Raftdomänen, wodurch



Proteine aus verschiedenen Lipid Rafts miteinander kombiniert werden könnten. Auf diese Weise ist es möglich ein verfälschtes Bild zu erzeugen, wonach Proteine miteinander assoziiert erscheinen, die es tatsächlich in einer intakten Plasmamembran nicht sind (Mayor und Maxfield, 1995). Heerklotz (2002) spekuliert sogar, dass Triton X-100 die Ausbildung von geordneten (*ordered*) Domänen in der homogenen Membran forciert, die anschließend als Triton X-100 unlösliche Fraktionen isoliert werden.

Neuere Methoden ermöglichen die Untersuchung von Lipid Rafts in intakten Zellen. Mit Hilfe des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) (Kenworthy und Edidin, 1998), dem *single-particle tracking* (Sheets et al., 1997) und dem *single molecule tracking* (Pralle et al., 2000) konnten Fragen hinsichtlich Zusammensetzung, Größe und Anteil von nativen Raftstrukturen an der Zelloberfläche beantwortet werden. Je nach untersuchtem Zelltyp schwankt die Größe der Lipid Rafts zwischen 25 und mehreren 100 nm.

### 5.3 Funktionelle Bedeutung der Lipid Rafts

Erste Untersuchungen zur Funktion von Mikrodomänen basierten auf der Beobachtung, dass die apikale Membran in polarisierten epithelialen Zellen im Vergleich zur basolateralen Membran stark mit Glykosphingolipiden angereichert ist (Rodriguez-Boulan et al., 1978). Van Meer und Simons (1988) postulierten, dass diese unterschiedliche Komposition durch das Sortieren von Lipiden und Proteinen in spezialisierte Mikrodomänen des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) und anschließendem apikalen Transport zur Zelloberfläche reguliert wird. Neben der Bedeutung der Lipid Rafts als Sortierstationen für Proteine (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998; Rodriguez-Boulan und Gonzalez, 1999; Benting et al., 1999) wurde eine Beteiligung dieser Mikrodomänen im endozytotischen Transport beschrieben (Mukherjee et al., 1999). Darüber hinaus spielen Lipid Rafts eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in T- und B-Zellen (Janes et al., 2000; Pierce, 2002) sowie der allergischen Reaktion (Baird et al., 1999). Es wird postuliert, dass das Clustern von Rezeptoren den Zusammenschluss von Lipid Rafts in größere Komplexe zur Folge hat. Proteine des Signaltransduktionskomplexes, die zuvor in voneinander isolierten Mikrodomänen lokalisierten, werden so in engen Kontakt gebracht und dadurch die Signalkaskade gestartet (Simons und Toomre, 2000; Anderson und Jacobson, 2002; Harris und Siu, 2002; Subczynski und Kusumi, 2003)

Viele Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten, „missbrauchen“ Lipid Rafts als Eintrittspforte in die Wirtszelle. So kann das von dem Bakterium *Vibrio cholerae*

produzierte Cholera-Toxin an das Gangliosid GM1 binden, welches auch als Raftmarker bekannt ist (Mancini und Santi, 1993). HIV-1 nutzt Lipid Rafts, um sich an die Oberfläche von T-Zellen anzuheften (Hammache et al., 1999; Liao et al., 2001). Außerdem scheint ein Zusammenhang zwischen Lipid Rafts und *Morbus Alzheimer* zu bestehen. Diese Erkrankung ist charakterisiert durch die Bildung von senilen Plaques, die durch Ablagerung des  $\beta$ -amyloiden Peptids (A $\beta$ ) entstehen. Eehalt et al. (2003) konnten zeigen, dass die Spaltung des Alzheimer-Vorläufer-Proteins (APP) zu A $\beta$  von der Integrität der Lipid Rafts abhängt. Dieser Prozess wird offensichtlich durch Cholesterin reguliert, da der Entzug von Cholesterin die  $\beta$ -Spaltung *in vitro* und im Tiermodell verhindert (Simons et al., 1998, Fassbender et al., 2001). Zudem kann durch Blockade der Cholesterinsynthese mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Prävalenz von *Morbus Alzheimer* in Patienten reduziert werden (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Schließlich sind Lipid Rafts essentiell für die Migration von Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Lipid Rafts an der Spitze von Adenokarzinomzellen akkumulieren, die in einem chemotaktischen Gradienten migrieren. Durch Depletion des zellulären Cholesterins wird die gerichtete Migration gestört (Manes et al., 1999; 2003; Gomez-Mouton et al., 2001).

## **B FRAGESTELLUNG**

Das Adhäsionsmolekül L1 ist im Nervensystem gut charakterisiert und spielt eine Rolle bei der Migration und Zielfindung der neuronalen Wachstumskegel. In Karzinomen der Ovarien und des Uterus sind die Expression und membranproximale Abspaltung von L1 mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung assoziiert. Das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 kann in Tumorslysaten detektiert werden, außerdem korreliert die Anwesenheit von ADAM10 im Tumorgewebe mit löslichem L1 im Serum der Patientinnen. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Abspaltung der Ektodomäne das Migrationsverhalten von CHO- und HEK293-Zellen beeinflusst. An diesem Prozess ist die Metalloproteinase ADAM10 beteiligt (Mechtersheimer et al., 2001). Experimentell kann die L1-Spaltung durch PMA oder Cholesterinentzug mittels MCD erhöht werden. Für das Alzheimer-Vorläufer-Protein (APP) wurde bereits beschrieben, dass die ADAM-vermittelte Spaltung nicht nur an der Plasmamembran, sondern zudem intrazellulär im Golgi/TGN stattfindet.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Über welchen Mechanismus kann der Entzug von zellulärem Cholesterin die Spaltung von L1 erhöhen?
2. In welchen subzellulären Kompartimenten findet die konstitutive sowie die regulierte Abspaltung von L1 statt?
3. Ist ADAM10 auch in Ovarialkarzinomzellen in die membranproximale Spaltung von L1 involviert?
4. Beeinflusst die Ektodomänen-Spaltung von L1 das Migrationsverhalten von Ovarialkarzinomzellen *in vitro*?

Da im Verlauf der Arbeit ein neuer Mechanismus zur Spaltung und Abgabe von L1 aufgezeigt werden konnte, ergab sich folgende weitere Fragestellung:

5. Spielt die Freisetzung von L1 in Vesikeln auch *in vivo* eine Rolle?

## C MATERIAL

### 1 Antikörper

#### 1.1 Erstantikörper

##### 1.1.1 Monoklonale Antikörper

| Name   | Antigen                          | Spezies | Herkunft                    |
|--------|----------------------------------|---------|-----------------------------|
| L1-11A | humanes L1                       | Maus    | Hybridom                    |
| 5G3    | humanes L1                       | Maus    | Pharmingen, Hamburg         |
| 11G2   | humanes ADAM10                   | Maus    | Eric Rubinstein, Paris      |
|        | humanes GM130                    | Maus    | BD Biosciences              |
| P1F6   | humanes $\alpha\beta$ 5-Integrin | Maus    | Chemicon, Hofheim           |
| SAM-1  | humanes $\alpha$ 5-Integrin      | Maus    | Coulter-Immunotech, Krefeld |
| 16B12  | Hämagglutinin (HA)               | Maus    | Babco, Richmond, CA         |
|        | FLAG M2                          | Maus    | Sigma, Taufkirchen          |

##### 1.1.2 Polyklonale Antikörper

| Name     | Antigen  | Spezies   | Herkunft                |
|----------|--|-----------|-------------------------|
| zytL1    | zytoplasmatischer Teil von L1                      | Kaninchen | Vance Lemmon, Cleveland |
| # 2547   | humanes ADAM10<br>CSIRNISQVLEKKRNN<br>(AS 544-555) | Kaninchen | eigene Herstellung      |
| Serum 71 | humanes ADAM10<br>CPASDPKPNFTD<br>(AS 732-748)     | Kaninchen | eigene Herstellung      |
|          | humanes ADAM10<br>CPASDPKPNFTD<br>(AS 732-748)     | Kaninchen | Chemicon, Hofheim       |

#### 1.2 Zweitantikörper

|              |  |                           |
|--------------|--|---------------------------|
| am-PE        | Phycoerythrin konjugierter anti-Maus-Antikörper  | Jackson<br>ImmunoResearch |
| ar-Alexa 488 | Alexa 488 konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper | Molecular Probes          |
| Strep-POX    | Peroxidase konjugiertes Streptavidin             | Jackson<br>ImmunoResearch |
| am-Cy3       | Cy3 konjugierter anti-Maus-Antikörper            | Dianova                   |

## 2 Inhibitoren

| Inhibitor     | Spezifität                                    | Herkunft           | Konzentration    |
|---------------|---|--------------------|------------------|
| Ro 31-9790    | Metalloproteinasen                            | Roche, Mannheim    | 30 $\mu$ M       |
| TAPI-0        | Metalloproteinasen                            | Calbiochem         | 10 $\mu$ M       |
| Leupeptin     | Serin-/Cysteinproteinasen                     | Sigma, Taufkirchen | 10 $\mu$ g / ml  |
| Aprotinin     | Serinproteinasen                              | Sigma, Taufkirchen | 10 $\mu$ g / ml  |
| Pepstatin     | Aspartatproteinasen                           | Sigma, Taufkirchen | 10 $\mu$ g / ml  |
| NaF           | Serin-/Threoninphosphatasen                   | Sigma, Taufkirchen | 1 mM             |
| PMSF          | Serinproteinasen                              | Sigma, Taufkirchen | 1 mM             |
| Mini complete | Serin-, Cystein-, Metalloproteinasen, Calpain | Roche, Mannheim    | 1 Tablette/10 ml |
| Lovastatin    | HMG-CoA-Reduktase                             | Sigma, Taufkirchen | 1 $\mu$ M        |

## 3 Bakterienstämme

|               |   |
|---------------|---|
| E.coli Top10  | F-, mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC), f80lacZDM15, DlacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1 |
| E.coli BJ5183 | EndA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str)   |

## 4 Zelllinien

|        |  |
|--------|--|
| L1-CHO | Ovarialzelllinie von chinesischen Hamstern, stabil transfiziert mit humanem L1 |
| OVM    | humane Ovarialkarzinom-Zelllinie (Achim Krüger, München)                       |
| SKOV3  | humane Ovarialkarzinom-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ)                             |
| GG     | humane Ovarialkarzinom-Zelllinie (Günkel, Frauenklinik)                        |
| m130   | humane Ovarialkarzinom-Zelllinie (Günkel, Frauenklinik)                        |
| HEK293 | humane embryonale Nieren-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ)                           |
| QBI293 | HEK293 zur Amplifikation des Adenovirus (Q-Biogene)                            |

## 5 Plasmide

|              |  |
|--------------|--|
| pcDNA3.1     | Vektor zur Transfektionen eukaryontischer Zellen; CMV Promotor, SV 40 ori, NeomycinR (Invitrogen, Karlsruhe) |
| pShuttle-CMV | Transfektor; MCS unter humaner CMV-Promotorkontrolle, KanamycinR (Q-Biogene)                                 |
| pAdEasy-1    | Ad5 $\Delta$ E1/ $\Delta$ E3 DNA-Plasmid (Q-Biogene)   |

## 6 Nukleotide

|                  |             |                      |
|------------------|-------------|----------------------|
| ADAM10-antisense | ISIS 100750 | GGTCTGAGGATATGATCTCT |
| ADAM10-mismatch  | ISIS 108030 | GGTCTGTGAATAAGGTCTCT |

## 7 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden nach der Phospho-Amidite-Methode mit einem Oligo-Synthesizer (Expedite, Perseptive Biosystems) hergestellt (Wolfgang Weinig, DKFZ, Heidelberg) und mittels HPLC analysiert. Die nachfolgenden L1-Teilsequenzen sind in 5'-3'-Leserichtung dargestellt, Hind III-Schnittstellen sind grau hervorgehoben.

Hind ATG sense TAG CAA GCT TCG GGA AAG ATG GTC GTG GCG CTG CGG TAC GT  
 Stop Hind rev GC AAG CTT CTA TTC TAG GGC CAC GGC AGG GT

## 8 Molekulargewichtsstandards

|   |                     |
|---|---------------------|
| Proteinmolekulargewichtsmarker, Rainbow | Pharmacia, Freiburg |
| $\lambda$ -DNA-HindIII-Fragmente        | GibcoBRL, Karlsruhe |
| kb-DNA-Leiter                           | GibcoBRL, Karlsruhe |

## 9 Enzyme

|                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| Hind III                 | MBI-Fermentas               |
| Kpn I                    | MBI-Fermentas               |
| Xho I                    | MBI-Fermentas               |
| Pme I                    | Qbiogene, Molecular biology |
| Pac I                    | BioLabs                     |
| PfuTurbo™ DNA Polymerase | Stratagene                  |
| T4 Ligase                | MBI Fermentas               |

## 10 Kits

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| Virus Purification Kit      | BD Biosciences |
| Maxiprep Kit                | Qiagen, Hilden |
| Miniprep Kit                | Qiagen, Hilden |
| Qiaquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |

## 11 Allgemeine Puffer

### PBS, pH 7,3

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8 mM   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 mM |
| NaCl                             | 140 mM |
| KCl                              | 2,6 mM |

### TBS

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris/HCl, pH 8,0 | 10 mM  |
| NaCl             | 150 mM |

## **D      METHODEN**

### **1      Zellbiologische Methoden**

#### **1.1    Zellkulturbedingungen**

Die adhären­­t wachsenden Zelllinien wurden in einer Dichte bis ca.  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in DMEM (Life Technologies), 10 % FCS (Life Technologies) und 2 mM Glutamin in Plastik­­kultur­­flaschen (Renner, Dannstadt) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und alle 2 bis 3 Tage, je nach Dichte, passagiert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA 5 min bei 37°C inkubiert und durch leichtes Schlagen der Zellkultur­­flasche vom Boden abgelöst. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300g pelletiert, in der gewünschten Dichte in Wachstumsmedium aufgenommen und ausgesät.

| <b>Zelllinie</b>                 | <b>Wachstumsmedium</b>                                   |
|----------------------------------|--|
| OV­­M, SKOV3, m130<br>GG, HEK293 | DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin                            |
| L1-CHO                           | DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol |
| QBI293                           | DMEM, 5 % FCS, 2 mM Glutamin                             |

Das in den Medien verwendete FCS wurde vor Verwendung 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

#### **1.2    Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen mit 0,16 % Trypanblau, 0,9 % NaCl in einer Neubauer Zählkammer.

#### **1.3    Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Zum Einfrieren wurden jeweils  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen pelletiert und in 900 µl FCS und 100 µl DMSO (Merck, Darmstadt) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zunächst bei -70°C für 24 h gelagert und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig bei 37°C. Nach einmaligem Waschen in vorgewärmtem Kulturmedium wurden die Zellen in frischem Kulturmedium ausgesät.

## **1.4 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion von QBI293-Zellen zur Herstellung des Adenovirus erfolgte mit Lipofektamin (GibcoBRL). Bei dieser Methode wird ein lipophiler Komplex aus Transfektionsreagenz und DNA gebildet, der sich an die Zelle anheftet und ein Einschleusen der DNA ermöglicht.

### **1.4.1 Transfektion mit Lipofektamin**

Am Tag vor der Transfektion wurden  $7,5 \times 10^5$  QBI293-Zellen in einer T-25 Flasche ausplattiert, so dass sie nach 24 h eine 70 %-ige Konfluenz erreicht hatten. 4  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden DNA und 20  $\mu\text{l}$  der Lipofektamin-Lösung wurden getrennt voneinander mit serumfreiem OptiMem-Medium (GibcoBRL) auf ein Volumen von je 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die beiden Suspensionen wurden gemischt und 25 min bei RT inkubiert, damit sich ein DNA-Liposomen-Komplex ausbilden kann. Währendessen wurden die Zellen mit 4 ml OptiMem-Medium gewaschen und danach mit 2,5 ml OptiMem-Medium versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der DNA-Liposomen-Komplex zu den Zellen gegeben und 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 6 ml DMEM-Medium/10 % FCS ersetzt.

### **1.4.2 Transfektion mit Oligos**

Die Transfektion der Zellen mit antisense- bzw. mismatch-Oligonukleotiden erfolgte mit Hilfe des Oligofektamin-Reagenz (Invitrogen) in einer 100 mm Kulturplatte. Die Dichte der Zellen lag bei etwa 40-50 %. Zunächst wurde die Oligo-Stocklösung mit OptiMem-Medium (GibcoBRL) auf die gewünschte Konzentration (100 bzw. 250 nM) in einem Endvolumen von 600  $\mu\text{l}$  verdünnt. Parallel dazu wurden 8,3  $\mu\text{l}$  des Oligofektamin-Reagenz mit OptiMem auf ein Endvolumen von 33,3  $\mu\text{l}$  eingestellt und 5-10 min bei RT stengelassen. Anschließend wurden die Oligonukleotide und die Oligofektamin-Lösung vermischt und für 15-20 min bei RT inkubiert. Währendessen wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Wachstumsmedium gewaschen und mit 1,6 ml serumfreiem Medium pro Platte versetzt. Schließlich wurden die Nukleotid-Oligofektamin-Komplexe zu den Zellen gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,25 ml Wachstumsmedium mit 30 % FCS wurden die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C wachsen gelassen.

## **1.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (Parks und Herzenberg, 1984) ist ein Verfahren zur Zählung und Charakterisierung von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Grundsätzlich können alle



Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung, -streuung oder Fluoreszenz charakterisieren lassen, zur durchflusszytometrischen Analyse herangezogen werden. Lichtbeugung und -streuung erlauben eine Charakterisierung der Größe sowie der Binnenstruktur eines Partikels, z. B. von Zellen oder Zellorganellen, während durch Anfärbung definierter Zelloberflächenstrukturen mit spezifischen Erst- und Farbstoff-markierten Zweitantikörpern eine weitere Differenzierung möglich ist. Die Analyse solcher Merkmale erfolgte im FACScan-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg).

### **1.6 Immunfluoreszenzfärbung für die FACS-Analyse**

Für die Färbung wurden  $1 \times 10^6$  der zu untersuchenden Zellen in Plastikröhrchen (PS-Röhrchen, 7x50 mm, Greiner, Nürtingen) überführt und bei 300g sedimentiert. Das Pellet wurde dann für 1 h mit 1  $\mu$ g Antikörper in 100  $\mu$ l FACS-Puffer bzw. mit 100  $\mu$ l Hybridomüberstand auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nun folgte die Detektion des Erstantikörpers mittels Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Zweitantikörper. Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer optimalen Konzentration an Zweitantikörper, verdünnt in FACS-Puffer, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Optimale Verdünnungen der Zweitantikörper wurden in Vorexperimenten ermittelt. Ausschließlich mit Zweitantikörper inkubierte Zellen dienten als Hintergrundkontrolle, um die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers quantifizieren zu können. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen in 300  $\mu$ l FACS-Puffer verdünnt. Es wurden jeweils 10 000 Ereignisse (lebende Zellen) je Probe aufgenommen. Tote und nicht erwünschte Zellen konnten bei der Aufnahme durch ihre unterschiedliche Größe und Granularität ausgegrenzt werden. Je nach Zelltyp wurden Analysefenster entsprechend der Zellgröße (FSC = *forward scatter*) und der Zellgranularität (SSC = *side scatter*) gewählt.

FACS-Puffer: 5 % FCS/PBS

### **1.7 Herstellung von Präparaten für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Zur Analyse im Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen in einer 12-Loch-Platte ausgesät und über Nacht im jeweiligen Kulturmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die adhären Zellen einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 min. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und für weitere 10 min in 50 mM Ammoniumchlorid/PBS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden

die Zellen mit 0,1% Saponin in 5 % Ziegen Serum/PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Danach wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus der 12-Loch-Platte entnommen und mit der mit den Zellen beschichteten Seite nach oben auf Parafilm gelegt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in PBS für 45 min. Daran schlossen sich drei Waschschrte für jeweils 5 min mit PBS an, gefolgt von der Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper für 30 min im Dunkeln. Danach folgten erneut zwei Waschschrte für jeweils 5 min mit PBS. Zur Färbung der Zellkerne wurde dem zweiten Waschschrte DAPI zugesetzt. Schließlich mussten die Zellen erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen werden. Abschließend wurden die Deckgläschen kurz in ddH<sub>2</sub>O getaucht, um Salze zu entfernen, kurz abgetupft und in Kaisergelatine eingedeckelt. Alle Arbeitsschrte wurden bei RT durchgeführt.

## 1.8 Haptotaktische Transmigration

Die haptotaktische Migration von Zellen wurde *in vitro* untersucht. Hierbei wandern Zellen in einer Transwell-Zellkulturkammer durch eine transparente Polyester membran, die mit Protein beschichtet wurde (**Abb. 6**).

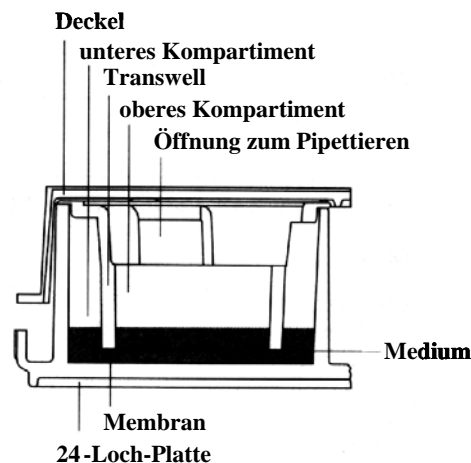


Abb 6 : **Transwell-Zellkulturkammer.** Die Zellen werden in das obere Kompartiment überführt. Während der haptotaktischen Transmigration wandern die Zellen durch die Membran, die eine spezifische Porengröße aufweist, in das untere Kompartiment. Die Membran wurde zuvor mit Fibronectin beschichtet.

Diese Kammern bestehen aus einem Kunststoffgehäuse, in dem sich ein herausnehmbarer Einsatz mit einer Polyester membran definierter Porengröße befindet. Verschlossen wird diese Kammer mit einem Kunststoffdeckel. Der herausnehmbare Membraneinsatz trennt die Kammer in zwei Kompartimente, zwischen denen ein kontrollierter Medien- und

Zellaustausch nur durch die Membran erfolgen kann. Es besteht nun die Möglichkeit, das untere Kompartiment mit Zellkulturmedium und das obere Kompartiment der Kammer mit einer Zellsuspension zu befüllen. Beschichtet man die Unterseite der Membran (dem unteren Kompartiment zugewandt) mit einem Substrat, so baut sich ein Konzentrationsgradient der entsprechenden Substanz in der Membran auf. Die im oberen Kompartiment befindlichen Zellen wandern nun aufgrund des Substratgradienten durch die Membran in das darunter liegende Kompartiment. Die Zellen, die durch die Membran gewandert sind, adhären an der Unterseite der Membran und können sowohl mikroskopisch als auch kolorimetrisch quantifiziert werden.

Zur Durchführung der Transmigrationsexperimente wurde die Unterseite der Membran zunächst für 1,5 h bei RT in einer Feuchtkammer mit Fibronectin (10 µg/ml; Life Technologies) beschichtet. Anschließend wurde der Membraneinsatz in die Kunststoffkammer eingesetzt, in die 1 ml des Migrationsmediums vorgelegt worden war. Das obere Kompartiment wurde mit 100 µl einer Zellsuspension befüllt, die  $1 \times 10^5$  Zellen in Migrationsmedium enthielt. Als Migrationsmedium wurde RPMI 1640 verwendet, dem 0,5 % BSA zugesetzt wurde. Die Transwellkammer wurde mit einem Deckel verschlossen und 16 h bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Membraneinsatz aus der Kammer entnommen und das sich im Kompartiment befindliche Medium abgesaugt. Zellen, die nicht durch die Membran migriert waren und auf der Oberseite der Membran adhärten, wurden anschließend mit einem Wattestäbchen entfernt. Der so von nicht migrierten Zellen befreite Membraneinsatz wurde in einer 24-Loch-Platte mit 500 µl Färbelösung 30 min bei RT inkubiert, um die Zellen auf der Membran zu fixieren und anzufärben. Der Einsatz wurde anschließend ausgiebig mit Wasser gespült, um nichtzellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Membran wurde mit einem Skalpell vom Membraneinsatz abgetrennt und für 10 min in 300 µl Essigsäure geschüttelt. Hierbei kam es zur Entfärbung der zuvor angefärbten migrierten Zellen. Die Absorption der Elutionslösung wurde anschließend photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dabei war die Höhe der Absorption direkt proportional zur Anzahl der migrierten Zellen.

#### **Färbelösung**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Kristallviolett      | 0,1 % |
| Borat-Puffer, pH 8,5 | 0,1 M |
| Ethanol              | 2,0 % |

Die Lösung wurde anschließend filtriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### **Elutionslösung**

|            |      |
|------------|------|
| Essigsäure | 10 % |
|------------|------|

## 2 Biochemische Methoden

### 2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann man das Molekulargewicht und den Reinheitsgrad von Proteinen bestimmen. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem starken ionischen Detergenz, mit einer negativen Ladung überzogen. Damit hängt die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Eigenladung der Proteine, sondern nur noch von ihrem Molekulargewicht ab. Unterschiede in der Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld werden durch die Porengröße des Gels bestimmt. Im oberen Sammelgel werden die Proteine bei niedriger Acrylamidkonzentration und pH 6,8 zu einer schmalen Bande konzentriert, um dann im Trenngel bei pH 8,8 und höherer Acrylamidkonzentration nach ihren Molekulargewichten getrennt zu werden. Die Vorschriften für die Durchführung und das Puffersystem entstammen dem Protokoll von Laemmli (1970). Die Lösung für das Trenngel wurde vor der Zugabe von SDS, APS und TEMED unter Vakuum an der Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zusatz der restlichen Komponenten wurde das Trenngel gegossen und zur Begradigung mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Alkoholgemisch durch Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel gegossen, in das sofort der Probenkamm eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer diente 1x Laufpuffer. Bis zu 40 µl der mit reduziertem SDS-Probenpuffer versetzten und 5 min bei 95°C erhitzten Proben wurden in die Taschen gefüllt. Außerdem wurde ein Molekulargewichtsmarker (Rainbow<sup>TM</sup>, Amersham) aufgetragen. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

#### Acrylamidlösung

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Acrylamid               | 30 %  |
| N,N'-Methylbisacrylamid | 0,8 % |

| Trenngel             | 7,5 %   | 10 %    |
|----------------------|---------|---------|
| Acrylamidlösung      | 5 ml    | 6,7 ml  |
| 3 M Tris-HCl, pH 8,0 | 2,65 ml | 2,65 ml |
| ddH <sub>2</sub> O   | 12,1 ml | 9,63 ml |
| 10 % SDS             | 200 µl  | 200 µl  |
| 10 % APS             | 65 µl   | 65 µl   |
| TEMED                | 15 µl   | 15 µl   |

**Sammelgel**

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Acrylamidlösung        | 1,35 ml |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 | 2,5 ml  |
| ddH <sub>2</sub> O     | 6 ml    |
| 10 % SDS               | 100 µl  |
| 10 % APS               | 100 µl  |
| TEMED                  | 10 µl   |

**2 x Probenpuffer**

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 6,8           | 0,5 M |
| Glyzerin                   | 10 %  |
| SDS                        | 2 %   |
| β-Mercaptoethanol (14,3 M) | 5 %   |
| Bromphenolblau             | 0,1 % |

**Laufpuffer**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 8,3 | 25 mM  |
| Glyzin           | 0,19 M |
| SDS              | 0,1 %  |

**2.2 Western Blot**

Der Western Blot dient dem Nachweis membrangebundener Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper im Anschluss an eine SDS-PAGE.

**2.2.1 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine in einem Elektro-Trockenblot auf eine Immobilon-Membran (Millipore) transferiert. Dazu wurden drei Filter (Schleicher & Schuell) in Blotpuffer getränkt und blasenfrei auf die positive Elektrode einer Blot-Apparatur (Renner) gelegt. Darauf folgte die kurz in Methanol befeuchtete und in Blotpuffer getränkte Membran und anschließend das Gel, welches ebenfalls kurz mit Blotpuffer befeuchtet wurde. Den Abschluss bildeten drei Filter, die in Blotpuffer getränkt waren und in direktem Kontakt zur negativen Elektrode standen. Die Proteine wurden bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min bei RT geblottet.

**5 x Blotpuffer**

|          |        |
|----------|--------|
| Glyzin   | 190 mM |
| Tris-HCl | 50 mM  |

**1 x Blotpuffer**

|                    |        |
|--------------------|--------|
| 5 x Blotpuffer     | 100 ml |
| Methanol           | 100 ml |
| ddH <sub>2</sub> O | 300 ml |

**TBS/Tween-Waschpuffer**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| 0,05 % Tween 20 in TBS | (v/v) |
|------------------------|-------|

**2.2.2 Reversible Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau-S**

Die Effizienz des Proteintransfers wurde mittels Färbung der Membran in einer 10 %-igen Ponceau-S-Lösung (Sigma, Taufkirchen) und anschließender Entfärbung in ddH<sub>2</sub>O überprüft.

### 2.2.3 Immunodetektion

Zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungen wurde die Membran nach dem Blotten mit 5 % Magermilch (Merck, Darmstadt) in TBS für 30 min bei RT blockiert. Anschließend wurde der Blot mit dem Erstantikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in 5 % Magermilch/TBS für mindestens 45 min bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 % Tween in TBS erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:50 000 in 5 % Magermilch/TBS für 30 min. Abschließend wurde dreimal mit 0,05 % Tween/TBS gewaschen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL, Amersham, Freiburg) verwendet. Hierbei wird in einer von der Peroxidase-katalysierten Reaktion, der Oxidation von Luminol in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Energie in Form von Licht emittiert. Dies führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms an den Positionen der Membran, an denen die verwendeten Antikörper spezifisch das Antigen detektiert haben. Die Membran wurde dazu für 1 min mit 0,125 ml Detektionsreagenzien 1 und 2 pro cm<sup>2</sup> Membran inkubiert, anschließend wurde je nach Stärke des erwarteten Signals für die entsprechende Zeit ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) aufgelegt.

### 2.3 Analyse der L1-Spaltung

Zur Analyse der Spaltung von L1 wurden die Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag etwa 90 % konfluent waren. Das Wachstumsmedium wurde abgenommen, die Zellen wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und mit 1,8 ml serumfreiem Medium versetzt. Um die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die L1-Spaltung zu testen, wurden diese vor Beginn des Experiments für die angegebene Dauer zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Stimuli in folgenden Konzentrationen behandelt :

PMA        50 bzw. 100 ng/ml  
MCD        10 bzw. 20 mM  
Pervanadat 200 µM

Die Dauer der Stimulation ist für den jeweiligen Versuch angegeben. Die Überstände wurden von den Zellen abgenommen und bei 300g zentrifugiert. Schließlich wurden die so geklärten Überstände in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Proteine durch eine TCA-Fällung konzentriert. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, von der Platte abgekratzt, bei 300g pelletiert und im jeweils angegebenen Lysispuffer lysiert.

## 2.4 Herstellung von Pervanadat

Pervanadat wurde jeweils vor Beginn des Experiments frisch angesetzt. Dazu wurden 50  $\mu$ l Wasserstoffperoxid (100 mM, Merck, Darmstadt) und 51  $\mu$ l Natriumorthovanadat (100 mM, Sigma, Taufkirchen) kurz gevortext und 15 min bei RT stehen gelassen. In den Experimenten wurde Pervanadat in einer Konzentration von 200  $\mu$ M eingesetzt.

## 2.5 Lyse von Zellen in Triton X-100 bzw. BOG-Lysispuffer

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und 5 min bei 300g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut 5 min bei 300g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, die Zellen wurden je nach Pelletgröße in einem entsprechenden Volumen Brij-96 bzw. BOG-Lysispuffer resuspendiert, kurz gevortext und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von Proteinase-Inhibitoren zum Lysispuffer wurde ein Proteinabbau durch die bei der Zellyse freigesetzten intrazellulären Proteinasen verhindert. Daraufhin wurde das Lysat für 10 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge reduziertem 2x SDS-Probenpuffer bei 95°C aufgeköcht.

|                      |               |            |
|----------------------|---------------|------------|
| <b>Lysispuffer :</b> | BOG           | 50 mM bzw. |
|                      | Brij-96       | 1%         |
| Frisch hinzugefügt:  |               |            |
| Natriumorthovanadat  | 1 mM          |            |
| NaF                  | 1 mM          |            |
| PMSF                 | 1 mM          |            |
| Aprotinin            | 10 $\mu$ g/ml |            |
| Leupeptin            | 10 $\mu$ g/ml |            |
| Pepstatin            | 10 $\mu$ g/ml |            |
| in TBS               |               |            |

## 2.6 Immunpräzipitation aus Zellysaten

Die Immunpräzipitation wurde eingesetzt, um zelluläre Antigene mit Hilfe spezifischer Antikörper zu präzipitieren und anschließend in einer Gelelektrophorese aufzutrennen. Die Zellen wurden dazu in 500  $\mu$ l BOG-Lysispuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zellyse wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 15 min bei 13 000 Upm und 4°C pelletiert. Um lösliches L1 zu präzipitieren, wurde das Zellysat über Nacht mit mAk L1-11A, der an ProteinG-

Sepharose gekoppelt ist, in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Biotinylierte Proteine wurden mit Streptavidin, das an Agarosebeads gebunden ist, präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden anschließend durch fünfmaliges Waschen von ungebundenen Proteinen gereinigt. Dabei wurde zweimal mit jeweils 1 ml BOG-Lysispuffer, einmal mit 1 ml 0,5 M LiCl in TBS und zweimal mit 1 ml TBS gewaschen. Das Sepharosepellet wurde im entsprechenden Volumen reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Von diesem Eluat wurde eine geeignete Menge im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

Streptavidin-Agarose: Sigma, Taufkirchen  
ProteinG-Sepharose: Amersham Biosciences

## **2.7 Biotinylierung von Oberflächenproteinen**

NHS-Biotin bindet an primäre Amine und ermöglicht so die Markierung von Proteinen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 0,4 mg/ml Biotin gelöst in PBS, für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit serumhaltigem Wachstumsmedium gewaschen, um überschüssiges Biotin zu quenchen. Schließlich folgten zwei Waschschrirte mit PBS. Um sicherzustellen, dass nur Zelloberflächenproteine markiert werden, erfolgte die Behandlung mit Biotin bei 4°C, da hier kaum Internalisierung des Biotins erfolgt. Auch die Waschschrirte wurden mit 4°C kalten Lösungen durchgeführt.

Sulfo-NHS-Biotin: Pierce/Perbio

## **2.8 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung wurde der Bradford-Kit der Firma Biorad verwendet. Dabei wurde die Bradfordlösung 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurden 5 µl in einer 96-Loch-Platte (Greiner) vorgelegt und mit 200 µl der verdünnten Bradford-Lösung inkubiert. Nach ca. 5 min wurde die Extinktion bei 595 nm im ELISA-Photo-Reader gemessen.

## **2.9 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)**

Zur Konzentrierung von Proteinen aus dem zellfreien Überstand wurden diese mit Trichloressigsäure gefällt. Dabei wurden 1,8 ml proteinhaltige Lösung mit 200 µl einer 100 %-igen Trichloressigsäure in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und 5 min auf Eis gefällt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C in einer Tischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1,5 ml



Diethylether versetzt. Der Ansatz wurde stark geschüttelt, bis sich der Niederschlag vollständig löste. Dann wurde 5 min bei 4°C und 13000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment erneut mit 1,5 ml Diethylether gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation, wie zuvor beschrieben, wurde das Sediment (enthielt von Salzen befreites Protein) an der Luft getrocknet und in reduziertem SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### **2.10 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration**

Für die Konzentrierung von proteinhaltigen Lösungen wurden Amicon Konzentratoren (Millipore) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet.

Die Proteinlösung wurde in den Probenbehälter eingefüllt, dieser wurde in den Sammelbehälter eingesetzt. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Zentrifugation bei 3000 Upm bei 4°C ultrafiltriert. Hochmolekulare Substanzen (> 10 kDa) verblieben im Probenbehälter, niedermolekulare Substanzen (<10 kDa) und Medium wurden durch den semipermeablen Filter hindurch gepresst und im Sammelbehälter aufgefangen. Das Endvolumen des Filtrats konnte durch die Dauer der Zentrifugation bestimmt werden.

### **2.11 ELISA**

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) weist Antigen-Antikörper-Komplexe an einer festen Phase durch Kopplung mit einer messbaren Enzym-Substrat-Reaktion nach. Er wurde hauptsächlich verwendet, um L1 im zellfreien Überstand zu detektieren. Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4°C mit  $\alpha$ -human-L1-Antikörper 5G3 in einer Konzentration von 100 ng/100  $\mu$ l PBS beschichtet. Darauf folgte ein Blockierungsschritt für 45 min bei RT mit 150  $\mu$ l einer 3 %-igen BSA-Lösung (in PBS), woran sich drei Waschgänge mit 0,05 % Tween/TBS anschlossen. Dann wurden die zu analysierenden zellfreien Überstände auf die ELISA-Platte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit biotinyliertem  $\alpha$ -L1-Antikörper (L1-11A; 1:2000 verdünnt in PBS/BSA) für eine weitere Stunde bei RT. Anschließend wurde nochmals dreimal gewaschen und mit einem Streptavidin-POX konjugierten Antikörper (1:1000 verdünnt in PBS/BSA) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100  $\mu$ l ABTS-Substratlösung, versetzt mit 0,03 % Wasserstoffperoxid, zugefügt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde die optische Dichte bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt. Es wurden Duplikate gemessen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

**ABTS-Substratlösung**

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Zitronensäure                    | 16,5 g                                      |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 36 g  |
| ddH <sub>2</sub> O               | ad 1 l, pH 4,0 mit Zitronensäure einstellen |
| ABTS                             | 50 mg/ml                                    |

**2.12 Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten zur Analyse von DIGs**

DIGs sind *detergent-insoluble glycosphingolipid enriched membrane microdomains*, die aufgrund ihrer Unlöslichkeit bei 4°C in Detergenzien wie Triton X-100 durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden können.

Zunächst wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 250 µl 1 % Triton X-100-Lysispuffer für 30 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde mit dem äquivalenten Volumen einer 85 %-igen Saccharose-Lösung in TBS (w/v) gemischt und auf den Boden eines SW60-Zentrifugenröhrchens pipettiert. Ein Stufengradient wurde aufgebaut, indem diese untere Schicht mit 3 ml einer 35 %-igen Saccharose-Lösung und anschließend mit 500 µl einer 5 %-igen Saccharose-Lösung überschichtet wurde. Der Gradient wurde für 18 h bei 200 000g und 4°C in einem Beckmann SW60-Rotor zentrifugiert. Zum Ernten der DIGs wurden je 500 µl-Fractionen von oben nach unten abgenommen, die DIG-Fraktion befand sich dabei in der 5/35 %-Interphase in Fraktion 2. (**Abb. 7**). Anschließend wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen mit Chloroform-Methanol gefällt.

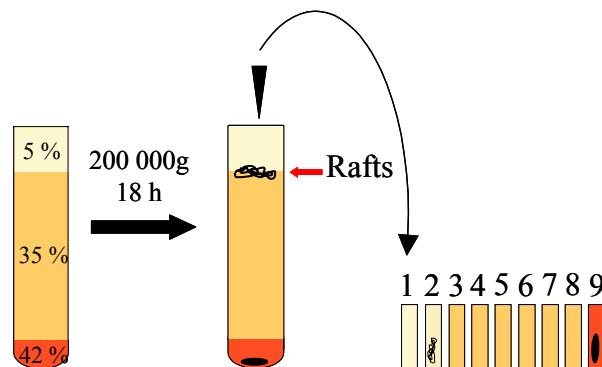


Abb. 7 : Schema zur Präparation von DIGs

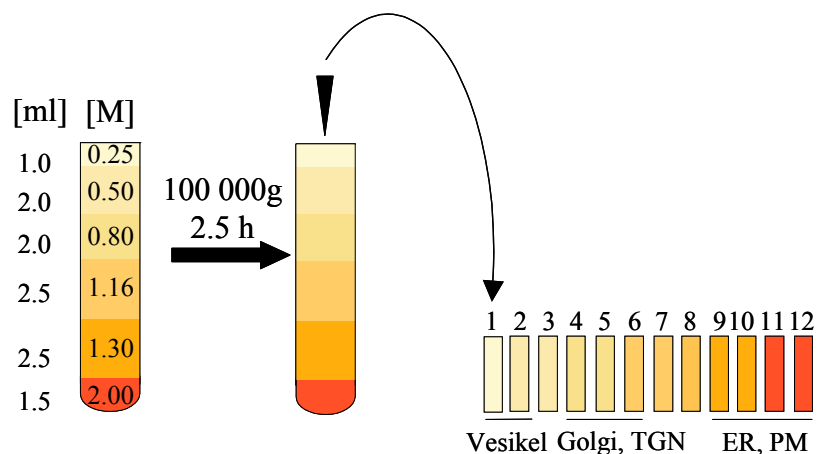
**2.13 Proteinfällung**

Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch organische Lösungsmittel gefällt. Dazu wurde pro 500 µl-Fraktion 2 ml Methanol (entspricht dem 4-fachen Volumen), 500 µl Chloroform (1-faches Volumen) und 1,5 ml ddH<sub>2</sub>O (3-faches Volumen) hinzugefügt und gut gemischt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend bei 500g für

20 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren zwei Phasen mit einer proteinhaltigen Interphase erkennbar. Die obere Phase wurde verworfen und 3 ml Methanol (6-faches Volumen) zugesetzt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 20 min bei 500g und 4°C wurde das Protein pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Proteinpellet im Exsikkator für etwa 30 min getrocknet und abschließend in 30 µl 2x Probenpuffer aufgenommen.

## 2.14 Subfraktionierung von Zellen

Um die Lokalisation der L1-Spaltung zu untersuchen, wurden L1-CHO-Zellen in einem Saccharosegradienten definierter Dichte in Golgi/TGN und Plasmamembranen fraktioniert (Yan et al., 2001). Dazu wurden  $2 \times 10^7$  Zellen mit Hilfe eines Homogenisators in 1 ml einer 0,25 M Saccharoselösung homogenisiert und drei Einfrier-/Auftauzyklen bei -20 bzw. 37°C unterworfen. Inzwischen wurde in einem SW40-Zentrifugenröhrchen ein Saccharose-Stufengradient (**Abb. 8**) vorgelegt,; dieser wurde abschließend mit dem Zellhomogenat überschichtet. Alle Saccharoselösungen wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM Magnesiumacetat angesetzt, außerdem wurde 1 Tablette Mini complete/10 ml zugegeben. Nach 2,5-stündiger Ultrazentrifugation bei 100 000g in einem SW40-Rotor wurden 1 ml-Fractionen von oben abgenommen. Die Proteine wurden Chloroform-Methanol gefällt und im Western Blot analysiert.



**Abb. 8 : Subfraktionierung von Zellen im Saccharosegradienten.** L1-CHO-Zellen wurden in 0.25 M Saccharose homogenisiert und auf einen Saccharosestufengradienten geladen. Nach 2.5-stündiger Zentrifugation wurden 1ml Fraktionen von oben abgenommen. Golgi/TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) wurde in den Fraktionen 4-6 angereichert, ER (endoplasmatisches Retikulum) und PM (Plasmamembranen) befanden sich in den Bodenfraktionen 9-12.

## 2.15 Cholesterin-Manipulation

Zur Reduktion des zellulären Cholesteringehalts wurden zwei Verfahren angewandt:

1. Behandlung der Zellen mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD).
2. Inkubation der Zellen mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin.

MCD (Fluka) bindet selektiv an Cholesterin und extrahiert dieses aus der Zellmembran. L1-CHO-Zellen wurden hierfür 1 h mit verschiedenen MCD-Konzentrationen bei 37°C inkubiert.

Lovastatin (Calbiochem) inhibiert die HMG-CoA-Reduktase, ein Schlüsselenzym in der Synthese von Cholesterin. L1-CHO-Zellen wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium mit 10 % entfettetem FCS (Sigma, Taufkirchen) und 0,5  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M Lovastatin für 24 h kultiviert. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO.

## 2.16 Bestimmung des zellulären Cholesteringehalts

Die Cholesterin-Bestimmung wurde kolorimetrisch mit Hilfe eines Cholesterin-Farbstests (enzymatische Bioanalytik, Boehringer Mannheim) durchgeführt.

In den Versuch wurden  $5 \times 10^7$  L1-CHO-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden dazu in Glasröhrchen überführt und bei 300g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS gelöst, mit 2 ml Dichlormethan versetzt und durchmischt. Anschließend wurde 10 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren zwei Phasen sowie eine proteinhaltige Interphase erkennbar. Die untere Phase wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues, zweites Glasröhrchen überführt. Zu der restlichen Flüssigkeit innerhalb des ersten Glasröhrchens wurde 1 ml Diethylether hinzugefügt, gut gemischt und erneut bei 500g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die so entstandene obere Phase in dem ersten Glasröhrchen wurde abgenommen und zu der bereits abgenommenen unteren Phase in das zweite Glasröhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde dann für 20 bis 30 min im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 100  $\mu$ l Ethanol gelöst, anschließend wurden nacheinander 1,5 ml Lösung 1 (Phosphat-Puffer/Katalase) und 1 ml Lösung 2 (Acetyl-Aceton/Methanol) hinzugefügt und gut gemischt. Danach wurde die Probe in zwei Ansätze zu jeweils 1,25 ml geteilt. Zu einem Ansatz wurden 10  $\mu$ l Cholesterin-Oxidase hinzugefügt, der parallele Ansatz erhielt keinen Zusatz, da diese Probe bei der späteren

Messung als Referenz diente. Die Ansätze wurden 1 h lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Photometer bei 405 nm.

## **2.17 Analyse von Vesikeln**

### **2.17.1 Isolation von Vesikeln aus Zellkulturüberständen**

Zur Analyse der Vesikel wurden diese durch Ultrazentrifugation aus dem Zellüberstand isoliert. Dazu wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und zunächst bei 300g für 10 min zentrifugiert, um umherschwimmende Zellen zu pelletieren. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 800g für 20 min wurden außerdem Zelltrümmer entfernt. Anschließend wurde der so geklärte Überstand bei 100 000g für 1-3 h zentrifugiert, um die Vesikel zu pelletieren. Diese konnten direkt in 2x Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und im Western Blot analysiert werden.

### **2.17.2 Isolation von Vesikeln aus Asziten**

Die Aufreinigung der Vesikel aus Asziten erfolgte nach der Methode von Andre et al. (2002b). Dabei wurde der Aszites zunächst bei 300g für 15 min und anschließend bei 800g für 30 min zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der so geklärte Aszites wurde auf ein Kissen aus 35 %-iger Saccharose/D<sub>2</sub>O geschichtet und für 1,5 h bei 100 000g zentrifugiert. Dabei verbleiben die Vesikel im Saccharosekissen, Verunreinigungen wurden am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletiert. Anschließend wurde der Überstand bis kurz über dem Saccharosekissen abgenommen und verworfen. Das Saccharosekissen wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS verdünnt und nochmals für 1,5 h bei 100 000g zentrifugiert, um die Vesikel zu pelletieren. Diese wurden direkt in 2x Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert.

### **2.17.3 Zymogram zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität**

Die Gelatinase-Aktivität der spontan abgegebenen Vesikel von OVM- und SKOV3-Zellen wurde im Zymogram getestet. Dazu wurden die durch Ultrazentrifugation aus dem zellfreien Überstand isolierten Vesikel in 20 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min auf 50°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben im 7,5 %-igen Gelatine-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Gegensatz zum SDS-PAGE werden zur Herstellung eines Zymogramms die Proben nicht aufgeköcht und dem Probenpuffer kein Mercaptoethanol zugefügt. Weiterhin enthält das Gelatine-Polyacrylamidgel kein

SDS, um eine Denaturierung der Enzyme zu verhindern. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 4 x 10 min bei RT in 2,5 % Triton X-100 in ddH<sub>2</sub>O renaturiert und anschließend 4 x 10 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte die Inkubation im Zymograpppuffer, der auf das jeweilige Enzym abgestimmt sein muss, über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 1 h bei 37°C in die Färbelösung gelegt. Zum Schluss wurde solange entfärbt, bis durchsichtige Banden an den Stellen erschienen, an denen die Gelatine durch die in den Vesikeln enthaltenen Enzyme verdaut worden war.

|                                       |              |                                       |         |
|---------------------------------------|--------------|---------------------------------------|---------|
| <b>Trenngel</b>                       | <b>7,5 %</b> | <b>Sammelgel</b>                      |         |
| Gelatine (3 mg/ml ddH <sub>2</sub> O) | 2,85 ml      | Gelatine (3 mg/ml ddH <sub>2</sub> O) | 2,32 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)       | 1,77 ml      | Acrylamid/Bisacrylamid                | 675 µl  |
| 3 M Tris-HCl, pH 8,8                  | 1,75 ml      | 0,8 M Tris-HCl, pH 6,8                | 1,3 ml  |
| ddH <sub>2</sub> O                    | 0,56 ml      | ddH <sub>2</sub> O                    | 680 µl  |
| 10 % APS                              | 70 µl        | 10 % APS                              | 100 µl  |
| TEMED                                 | 7 µl         | TEMED                                 | 10 µl   |
| <b>Probenpuffer</b>                   |              | <b>Zymograpppuffer</b>                |         |
| Tris-HCl, pH 6,8                      | 62,5 mM      | Tris-HCl, pH 7,5                      | 50 mM   |
| Glyzerin                              | 25 %         | NaCl                                  | 200 mM  |
| SDS                                   | 4 %          | CaCl <sub>2</sub>                     | 5 mM    |
| Bromphenolblau                        | 0,01 %       | Brij-35                               | 0,02 %  |
| <b>Färbelösung</b>                    |              | <b>Entfärbelösung</b>                 |         |
| Methanol                              | 150 ml       | Eisessig                              | 10 %    |
| Eisessig                              | 70 ml        | Methanol                              | 40 %    |
| Coomassie Brilliant Blue R250         | 0,1 %        | ddH <sub>2</sub> O                    |         |
| ddH <sub>2</sub> O                    | ad 560 ml    |                                       |         |

### 3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

#### 3.1 Transformation von Bakterien

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte in geeigneten Stämmen von *Escherichia coli*. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock der Bakterien, die zuvor für die Aufnahme von DNA entsprechend vorbereitet werden mussten.

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden in LB-Medium als Suspensionskultur oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Das Wachstum der Suspensionskulturen erfolgte bei 37°C. Die LB-Agarplatten wurden bei 37°C für mindestens 12 h kultiviert. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Wachstum in Gegenwart von Antibiotika, gegen das die transformierten Bakterien eine Resistenz aufwiesen.

|                                  |       |                    |          |
|----------------------------------|-------|--------------------|----------|
| <b>Luria-Bertani-Medium (LB)</b> |       | <b>Antibiotika</b> |          |
| Bactotrypton                     | 1,0 % | Ampicilin          | 50 µg/ml |
| Hefeextrakt                      | 0,5 % | Kanamycin          | 50 µg/ml |
| NaCl                             | 0,5 % |                    |          |

|                        |      |
|------------------------|------|
| <b>Für LB-Platten:</b> |      |
| Agar/l Medium          | 15 g |

### 3.2 Chemische Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Für dieses Transformationsverfahren wurden *One Shot<sup>TM</sup> Cells* (Invitrogen) verwendet. Jeweils 50 µl der kompetenten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (2-5 µl des Ligationsansatzes) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für exakt 30 sec bei 42°C im Wasserbad erhitzt und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium, das auf 37°C vorgewärmt worden war, wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die durch Aufnahme des Vektors die entsprechende Antibiotikaresistenz erworben hatten, bildeten Kolonien, die gepickt, expandiert und zur Plasmid-DNA-Isolierung genutzt werden konnten.

#### **SOB-Medium, pH 6,8 – 7,0**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Bactotrypton      | 2,0 %  |
| Hefeextrakt       | 0,5 %  |
| NaCl              | 10 mM  |
| KCl               | 2,5 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM  |
| MgSO <sub>4</sub> | 10 mM  |

#### **SOC-Medium**

SOB-Medium + 20 mM Glukose

### 3.3 Lagerung von Bakterienkulturen

Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitpunkt aufbewahren zu können, wurden diese mit 20 % Glycerin versetzt und zur Durchmischung vorsichtig über Kopf gedreht. Die so hergestellten Stocklösungen wurden anschließend bei –70°C eingefroren.

### 3.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte entsprechend der erforderlichen Menge über eine Minipräparation (Ausbeute etwa 30 µg Plasmid-DNA) oder eine Maxipräparation (Ausbeute etwa 800 µg Plasmid-DNA). Dafür wurde zunächst jeweils eine Einzelkolonie in der zur Präparation erforderlichen Menge LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht im 37°C-Schüttler inkubiert.

### 3.5 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation geringer Mengen an Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Zunächst wurde eine Einzelkolonie der

transformierten Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Bei der anschließenden Präparation wurde genau nach Herstellerangaben verfahren. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine Kieselgelmatrix bei hoher Ionenstärke. Zellwandgebundene chromosomale DNA wird unter den angewendeten Lyse- und Neutralisationsbedingungen mit unlöslichen Komplexen aus Salzen und Proteinen kopräzipitiert, während die Plasmid-DNA im klaren Überstand bleibt. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.6 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparation der Plasmid-DNA wurden die Reagenzien der Firma Qiagen verwendet. Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA waren nötig, um genügend Material für spätere Transfektionen zu erhalten.

500 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert (GSA-Rotor, 4°C, 6000 Upm, 5 min) und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 zur Lyse der Bakterien wurde der Ansatz vorsichtig geschüttelt und nicht länger als 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 3 zur Neutralisation zugegeben, vorsichtig geschüttelt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor, 4°C, 45 min, 16 000 Upm) wurde der klare Überstand auf eine Qiagen-Säule 500 pipettiert, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde pelletiert (SS34-Rotor, 4°C, 30 min, 11000 Upm) und mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst.

### 3.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption doppel- bzw. einzelsträngiger DNA bei 260 nm unter Verwendung eines Ultrospec-II Spektralphotometers. Dabei entsprach eine O.D.<sub>260</sub> von 1,0 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 37 µg/ml einzelsträngiger DNA.

Ein Verhältnis von einer  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}} = 1,8 \text{ bis } 2,0$  entspricht einer reinen DNA.



### 3.8 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden in 0,8-1,5 %-igen Agarosegelen (Agarose: LifeTechnologies) in TAE-Puffer aufgetrennt; der Gellösung wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde mit einem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V. Als Größenstandard dienten DNA-Molekulargewichtsmarker entsprechend der zu erwartenden Bande. Die DNA konnte durch Einlagerung des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht werden.

#### 50 x TAE-Elektrophoresepuffer

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| Tris               | 242 g                         |
| Eisessig           | 57,1 ml                       |
| 0,5 M EDTA, pH 8,0 | 100 ml                        |
| ddH <sub>2</sub> O | ad 1 l; pH einstellen auf 8,5 |

### 3.9 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA diente entweder dem Nachweis bestimmter DNA-Fragmente oder dem Umklonieren von DNA-Fragmenten.

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA fand in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl statt. Dabei wurden mindestens 2 U Enzym/µg DNA unter den dem jeweiligen Enzym entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt, wobei der Verdau in der Regel für 2 h bei 37°C durchgeführt wurde. Beachtet wurde dabei, dass auf je 10 µl Reaktionsansatz nur 1 µl Enzym eingesetzt wurde, um eine inhibitorische Wirkung des Glycerins im Enzymverdünnungspuffer zu neutralisieren. Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster mit dem anhand von Restriktionsenzymsschnittkarten ermittelten Schnittmuster verglichen.

### 3.10 Umklonierung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Vektoren

Zur Herstellung der Adenoviren mussten die L1- sowie ADAM10 und ADAM10-DN-Sequenzen, die jeweils in pcDNA3-Vektoren vorlagen zunächst in den Transfervektor pShuttleCMV umkloniert werden.

#### 3.10.1 Ausschneiden der DNA aus einem Vektor

Die gewünschte DNA (Insert) wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem pcDNA3-Vektor herausgeschnitten. Nach der Gelelektrophorese im Agarosegel konnte die

Insert-Bande aus dem Gel eluiert werden. Parallel wurde der Transfektor mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten und ebenfalls über eine Gelelektion aufgereinigt.

### 3.10.2 DNA-Isolation aus einem Agarose-Gel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Reagenzien des QIAquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen) verwendet. Die DNA-Bande von Interesse wurde unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel geschnitten und in einem Eppendorf-Röhrchen mit dem dreifachen Volumen Puffer QG für 10 min bei 50°C aus dem Gel gelöst. Um die DNA an eine Matrix binden zu lassen, wurde der Ansatz auf eine QIAquick-Säule gegeben und für 1 min bei 13000 Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl Puffer QG und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Um Alkoholreste zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 13000 Upm in der Tischzentrifuge für 1 min zentrifugiert und dann auf ein frisches Eppendorf-Röhrchen gesetzt. Nun wurden 30-40 µl ddH<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben und für 1 min inkubiert, durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde die DNA von der Säule eluiert. Zur Überprüfung der Reinheit und Menge wurde eine Aliquot auf ein Agarosegel gegeben.

### 3.10.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der DNA-Ligation wurden das isolierte Insert und der linearisierte Vektor zusammengefügt. Nach Aufreinigung der DNA wurden in etwa äquimolare Mengen (5 µg) des Vektors und des Inserts mit 1 µl T4-Ligase, 1 µl 10x Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und für mindestens 4 h bei 16°C im Wasserbad ligiert. Anschließend wurde das neu entstandene Fusionsprodukt in Bakterien transformiert und amplifiziert. Durch einen gerichteten Verdau mit zwei spezifischen Endonukleasen wurde die Orientierung des Inserts bestimmt.

Bei Verwendung nur eines einzigen Restriktionsenzym zum Ausschneiden des Inserts und zum Öffnen des Vektors wurde der Vektor vor der Ligation mit SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors ohne Insert zu vermeiden. Dazu wurden 30 µg des Vektors mit 4 µl 10x SAP-Puffer und 1,5 µl SAP (Amersham) in einem Endvolumen von 40 µl für 1 h inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte bei 65°C für 15 min. Anschließend erfolgte die Ligation wie oben beschrieben.

### 3.11 Phenol-Chloroform-Extraktion

Dieses Verfahren ermöglicht das Entfernen von Proteinen, wie z.B. Enzymen, aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Dabei bewirkt die Zugabe des Phenols die Dissoziation der Protein-Nukleinsäurekomplexe, indem es hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren aufbaut. Die denaturierten Proteine wandern aufgrund ihrer zugenommenen Hydrophobizität aus der wässrigen in die organische Phase, der zugesetzte Isoamylalkohol verstärkt dabei die Phasentrennung.

Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 200 µl verdünnt, mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt und stark gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Die obere wässrige Phase (enthält die DNA) wurde abgenommen und mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung vermischt, um Phenolreste zu entfernen. Anschließend wurde nochmals bei 13000 Upm für 5 min zentrifugiert. Dabei verblieben die Salz- und Proteinverunreinigungen in der unteren Phase, die obere Phase wurde abgenommen und einer Ethanolpräzipitation unterzogen.

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol | 25 : 24 : 1 |
| Chloroform/Isoamylalkohol        | 24 : 1      |

### 3.12 DNA-Fällung mit Ethanol

Die DNA wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und mit 800 µl eiskaltem Ethanol versetzt. Nach Zugabe von 100 µl 3 M Natriumacetat wurde die DNA für mindestens 1 h bei -70°C gefällt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 13000 Upm und 4°C für 30 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die DNA wurde mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol versetzt und erneut 30 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift mit 70 %-igem Ethanol wurde die DNA unter Vakuum getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) stellt eine sehr sensitive Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen dar. In mehreren Zyklen folgt auf eine Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA die Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotidprimer-Paares an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. An die freien Hydroxylgruppen der Primer werden durch die Polymerase komplementäre Nukleotide angeheftet und so die DNA-Sequenz zwischen beiden Primern

aufgefüllt, wobei die neu synthetisierte DNA im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für die weitere Amplifizierung dient.

Die Reaktionsansätze für die PCR wurden nach Empfehlung des Herstellers pipettiert. 50 ng doppelsträngige Plasmid-DNA wurden mit je 125 ng der Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix (25 mM) gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 49 µl verdünnt. Anschließend wurde 1 µl (10 Units) PfuTurbo<sup>TM</sup> DNA-Polymerase hinzugefügt. Die Proben wurden mit 40 µl Mineralöl überschichtet und die Reaktion in einem RoboCycler 40 (Stratagene) durchgeführt.

Für die Amplifikation der humanen L1-Sequenz zur Herstellung des L1-Adenovirus wurde folgendes PCR-Programm benutzt:

|       |       |           |
|-------|-------|-----------|
| 95 °C | 1:00  | 1 Zyklus  |
| 95 °C | 1:20  | 40 Zyklen |
| 58 °C | 2:20  |           |
| 72 °C | 3:20  |           |
| 72 °C | 10:00 | 1 Zyklus  |

## 4 Arbeiten mit Adenoviren

### 4.1 Herstellung von Adenoviren

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete AdEasy-System (Q-Biogene) wurde von He et al. (1998) entwickelt. Dabei wird zur Herstellung eines rekombinanten Adenovirus die cDNA von Interesse in einen Transfervektor kloniert und über homologe Rekombination in das adenovirale Genom übertragen. Da das virale DNA-Plasmid pAdEasy-1 in den E1- und E3-Regionen deletiert ist, kann die Replikation des rekombinierten Adenovirus nur in HEK293 Zellen erfolgen, da diese die Funktion von E1 komplettieren.

Zunächst wurde die cDNA von Interesse durch einen geeigneten Restriktionsverdau aus dem pcDNA3-Vektor herausgeschnitten und in den Transfervektor pShuttle-CMV umkloniert.

| Sequenz                | Restriktionsverdau |
|------------------------|--------------------|
| bovines ADAM10-Ha      | Xho I - Kpn I      |
| bovines ADAM10-DN-Flag | Xho I              |
| humanes L1 (ΔRSLE)     | Hind III *         |

\* da es nicht gelang, die Sequenz des humanen L1 direkt vom pcDNA3-Vektor in den Transfervektor umzuklonieren, wurde die DNA zunächst in einer PCR amplifiziert. Gleichzeitig wurde durch die PCR eine zusätzliche Hind III-Schnittstelle vor der L1-Sequenz eingefügt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den Bluescript-Vektor eingesetzt und die humane L1-Sequenz über einen Hind III-Restriktionsverdau in den Transfervektor pShuttle-CMV kloniert.

Anschließend wurde das resultierende Plasmid mit PmeI linearisiert, über eine Qiaquick-Säule aufgereinigt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 0,15 µg/µl eingestellt. 5 µl dieses Plasmids wurden mit 1 µl (100 ng/µl) pAdEasy-1 und 20 µl BJ5183 in einem gekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 min auf Eis inkubiert und in eine ebenfalls gekühlte 2,0 mm Transformationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte dann bei 2,5 V, 200 Ohm, und 25 µFD in einem Biorad Gene Pulser Elektroporator. Das Transformationsgemisch wurde mit vorgewärmten LB-Medium auf 500 µl aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert. 50-100 µl des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmten LB/Kanamycin-Platten ausplattiert. Die Selektion der Rekombinanten erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden 10-20 der kleinsten Klone mit einer Pipettenspitze gepickt und in LB/Kanamycin-Medium wiederum über Nacht bei 37°C vermehrt. Zur Analyse wurden die Plasmide mittels Miniprep-Kit isoliert und 1/5 der Miniprep wurde auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. Dabei zeigten potentielle Rekombinanten eine Bande, die in etwa auf der Höhe des pAdEasy-Plasmids läuft, während negative Klone durch eine Doppelbande identifiziert werden konnten. Beim anschließenden Restriktionsverdau mit PacI bestätigte ein Fragment von 4,5 kb oder 3 kb die Rekombination. Da die Struktur des rekombinierten pAdEasy-Plasmids in *recA*<sup>+</sup> Stämmen wie BJ5183 nicht stabil ist, wurde die Miniprep-DNA in Top 10-Bakterien transformiert, amplifiziert und anschließend über einen Maxiprep-Kit isoliert. 4 µg des rekombinierten Adenovirus-Konstruktes wurden erneut mit PacI verdaut, um die ITRs (*Inverted Terminal Repeats*) freizulegen und damit die Replikation des Adenovirus zu ermöglichen. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation wurde die Maxipräparation in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. 7,5x10<sup>5</sup> QBI293-Zellen wurden in DMEM, 5% FCS in eine T-25 Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. 3-4 h vor der Transfektion wurde das Wachstumsmedium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt, um exponentielles Zellwachstum während der Transfektion zu gewährleisten. Die gesamten 20 µl des präzipitierten pAdEasy-Plasmids wurden mit 20 µl Lipofektamin vermischt, die anschließende Transfektion wurde wie unter 1.4.1 beschrieben durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen durch kräftiges Schlagen vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst, das Ablösen mit Trypsin/EDTA muss dabei unbedingt vermieden werden. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, vorsichtig in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine 6-Loch-Platte überführt. Nachdem die Zellen adhärirt hatten, wurden sie mit 1 %-iger Sea Plaque Agarose (Bio Whittaker, Molecular Applications) überschichtet, um die Diffusion des Adenovirus einzuschränken, und bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Agarose gelblich färbte, wurde die Überschichtung wiederholt, um die

Nährstoffzufuhr zu gewährleisten. Nach etwa 10-15 Tagen konnte die Bildung von Plaques beobachtet werden. Diese morphologischen Veränderungen sind ein Zeichen dafür, dass die Zellen das Virus vermehren und freisetzen. Das freigesetzte Virus wiederum infiziert benachbarte Zellen und der lytische Zyklus wiederholt sich, was makroskopisch als Plaquebildung festzustellen ist. Um die Viren zu isolieren, wurde ein Plaque unter dem Mikroskop markiert, mit einer Pipette steril gepickt und für 24 h bei 37°C in 500 µl DMEM, 5% FCS, das in einer 24-Loch-Platte vorgelegt wurde, eluiert. Am nächsten Tag wurden  $1 \times 10^5$  QBI293-Zellen/Loch einer 24-Loch-Platte mit 100 µl dieses Eluats für 90 min bei 37°C inkubiert. Das Volumen wurde danach auf 1 ml mit DMEM, 5 % FCS aufgefüllt. Die so infizierten QBI293-Zellen wurden 5-10 Tage bei 37°C inkubiert, bis ein kompletter zytopathischer Effekt erreicht wurde, d.h. bis alle Zellen abgerundet im Überstand schwammen. Um die Virenpartikel aus den Zellen freizusetzen, wurden die Zellen abgenommen und drei Einfrier-/Auftau-Zyklen bei -20°C bzw. 37 °C unterworfen. Hierbei ist zu beachten, dass der Virusüberstand nicht auf 37°C erwärmt werden darf. Die Zelltrümmer wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 13000 Upm (Eppendorf-Tischzentrifuge) und 4°C pelletiert, der Virusüberstand der 1. Amplifikation wurde bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurde das Virus in mehreren Infektionsrunden hochtitriert. Dazu wurden zunächst  $3 \times 10^6$  QBI293-Zellen in einer T-75 Zellkulturflasche mit dem Virusüberstand der 1. Amplifikation infiziert. Sobald alle Zellen abgerundet im Überstand schwammen, wurden sie abgenommen und drei Einfrier-/Auftauzyklen unterworfen, um das Virus freizusetzen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4000 Upm für 15 min pelletiert, mit dem Überstand wurden  $3 \times 10^7$  QBI293-Zellen in drei T-175 Zellkulturflaschen infiziert. Das Virus wurde wiederum isoliert, die letzte Amplifikation erfolgte in  $3 \times 10^8$  QBI293-Zellen.

#### **4.2 Aufreinigung des Adenovirus im Cäsium-Chlorid-Gradienten**

Zur Aufreinigung des L1-Adenovirus wurden die Zellen der letzten Amplifikation pelletiert, in 5 ml PBS aufgenommen und drei Einfrier-/Auftauzyklen unterworfen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4000 Upm für 15 min entfernt und der so geklärte Überstand mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,9 auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Unter sterilen Bedingungen wurde in einem SW28-Zentrifugenröhrchen ein diskontinuierlicher Cäsium-Chlorid-Gradient aus 8 ml CsCl 1,4 und 6 ml CsCl 1,2 vorgelegt und mit dem Virusüberstand überschichtet. Nach anschließender Zentrifugation für 90 min bei 100 000g ohne Bremse waren zwei Banden im Gradienten sichtbar. Bei der oberen Bande handelt es sich um defekte Viruspartikel, die untere Bande enthält die

infektiösen Viruspartikel. Mit Hilfe einer 10 ml Pipette wurde der Überstand bis kurz über der unteren Bande abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen etwa auf Höhe dieser Bande mit einer 18G-Nadel vorsichtig durchstoßen, die Viruspartikelbande wurde in eine 5 ml Spritze aufgesaugt und mit dem gleichen Volumen 1 x TE vermischt. Mit Hilfe eines Gradientenmachers wurde ein kontinuierlicher Cäsium-Chlorid-Gradient aus 12 ml CsCl 1,4 und 14 ml CsCl 1,2 in ein SW28-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit der verdünnten Virussuspension überschichtet. Nach 20-stündiger Zentrifugation bei 100 000g ohne Bremse konnte die Viruspartikelbande ebenfalls durch Punktieren des Zentrifugenröhrchens isoliert werden. Durch die anschließende Dialyse wurde das Cäsium-Chlorid entfernt und das Virus aufkonzentriert. Abschließend wurde die dialysierte Viruslösung mit Hilfe eines Ultrakonzentrators auf ein Volumen von etwa 600 µl eingengt. Die Langzeitlagerung des Virus erfolgt bei -80 °C.

Dialysemembran : Zellulose Ester Membran, MWCO 25.000, SpectraPor, Spectrum Laboratories

Konzentrator: Amicon-Ultra 15, MWCO 100 000, Millipore

#### **Cäsium-Chlorid-Lösungen**

|          |  |
|----------|--|
| CsCl 1,4 | 53 g CsCl + 87 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,6   |
| CsCl 1,2 | 26,8 g CsCl + 92 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 |

#### **Dialysepuffer (Nyberg-Hoffmann und Aguilar-Cordova, 1999)**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 7,6  | 10 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mM  |
| Saccharose        | 5 %   |

Die Aufreinigung der ADAM10- und ADAM10DN-Adenoviren erfolgte mit Hilfe des Adenovirus Purification Kits (BD Biosciences) nach Protokoll des Herstellers.

### **4.3 Photometrische Bestimmung des Virustiters**

Die photometrische Bestimmung des Virustiters basiert auf der Evaluation der Anzahl von Partikeln in Lösung in Korrelation zum DNA-Gehalt. Dabei beträgt der Extinktionskoeffizient  $1,1 \times 10^{12}$  Virenpartikel pro O.D.<sub>260</sub>-Einheit (Maizel et al., 1968).

Zur Bestimmung des Virustiters wurde die Viruslösung 1:2 mit VLP vermischt und 10 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die O.D. bei 260 nm bestimmt, als Referenz diente VLP. Aus der Absorption kann der Virustiter wie folgt berechnet werden:

$$(O.D._{260}) \times \text{Verdünnung} \times 1,1 \times 10^{12} = \text{Viruspartikel/ml}$$

#### **Virionlysispuffer (VLP)**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 7,4 | 10 mM |
| SDS              | 0,1 % |
| EDTA             | 1 mM  |

#### **4.4 Infektion von Zellen mit Adenoviren**

Die Infektion der Zellen erfolgte für 1 h bei 37°C in Suspension. Dazu wurden die Zellen pelletiert und in 500 µl des entsprechenden Wachstumsmediums aufgenommen, anschließend wurde das Virus in der jeweils angegebenen Viruspartikelkonzentration zugegeben. Nach der Infektion wurden die Zellen in einem größeren Volumen Wachstumsmedium aufgenommen, in Kulturschalen ausgesät und bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Expression der viral kodierten Proteine wurde nach 24 bzw. 48 h im FACS oder Western Blot analysiert.



## E ERGEBNISSE

Das Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein 200-220 kDa großes Glykoprotein, das nach membranproximaler Spaltung in eine lösliche Form von 200 kDa überführt wird. Nach der Spaltung verbleibt ein Fragment mit einer Größe von 32 kDa in der Membran (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000). In vorhergehenden Arbeiten von Mechtersheimer et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass die Metalloproteinase ADAM10 an der Spaltung und Abgabe von L1 beteiligt ist. Außerdem wird L1 in der 3. und 5. Fibronektin III-Domäne durch die Serinproteinase Plasmin gespalten, wodurch zytoplasmatische Spaltfragmente mit 85 bzw. 42 kDa generiert werden (Nayeem et al., 1999)(**Abb. 9**).

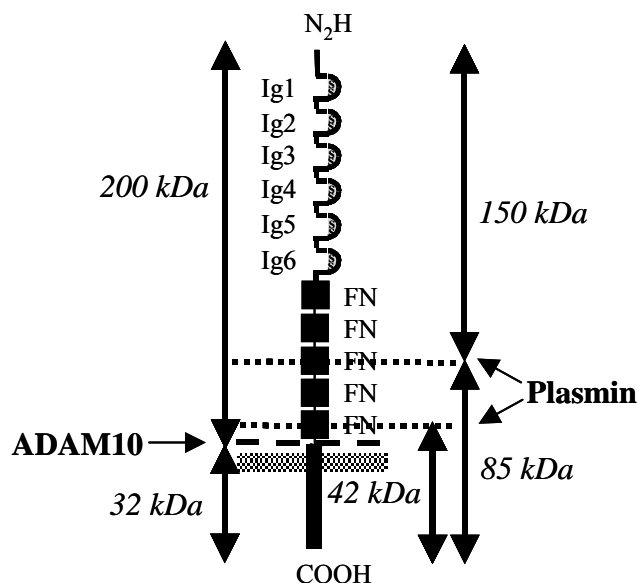


Abb. 9 : Durch ADAM10- und Plasminvermittelte Spaltung generierte L1-Fragmente

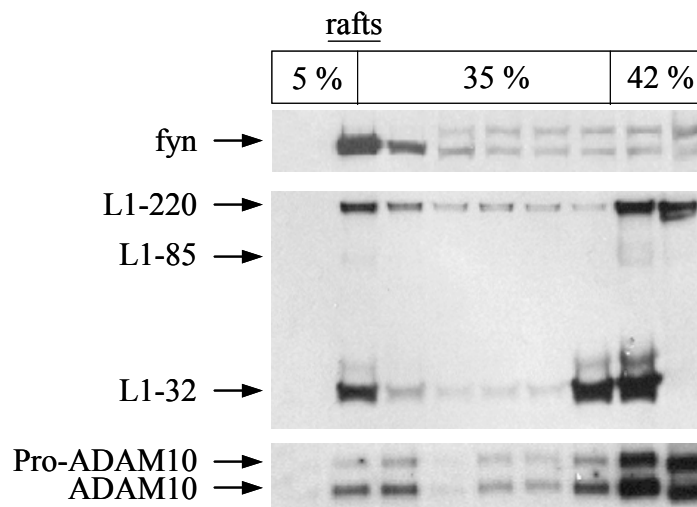
In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Lokalisation der ADAM10-vermittelten L1-Spaltung in der Zelle sowie der Mechanismus dieser Abspaltung genauer untersucht werden.

### 1 L1 und ADAM10 lokalisieren in Raft-ähnlichen Kompartimenten

Simons und Ikonen (1997) postulierten die sog. Raft-Hypothese, wonach die Assoziation zwischen Cholesterin und Sphingolipiden zur Ausbildung von Mikrodomänen führt, die wie Flöße (*rafts*) in der glyzerophospholipidreichen Plasmamembran schwimmen. Diese sind bei 4°C in Detergenzien wie Triton X-100 oder Brij-96 unlöslich. Aufgrund ihres

speziellen Lipid-Protein-Verhältnisses *floaten* Lipid Rafts in einem Saccharosegradienten nach oben und können so leicht isoliert werden (Samuel et al., 2001; Salzer und Prohaska, 2001).

P. Gutwein aus unserer Arbeitsgruppe hatte bereits in ersten Experimenten gezeigt, dass ein geringer Anteil von L1 in Raft-ähnlichen Kompartimenten lokalisiert. Meine Aufgabe bestand zunächst darin, das Verhalten von L1 im Saccharosegradienten näher zu charakterisieren. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  L1-CHO-Zellen bei 300g für 5 min pelletiert und anschließend in 250  $\mu$ l 1 % Triton X-100-Lysispuffer bei 4°C für 30 min lysiert. Dieses Lysat wurde mit 250  $\mu$ l einer 85 %-igen Saccharoselösung vermischt und auf den Boden eines SW60-Zentrifugenröhrchens pipettiert. Nach Überschichten mit einer 30 %-igen und einer 5 %-igen Saccharoselösung wurden die Proben 18 h bei 200 000g zentrifugiert. Am nächsten Tag wurden je 500  $\mu$ l-Fractionen von oben abgenommen, die Lipid Rafts befanden sich in der 5/35 %-Interphase in Fraktion 2. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit Chloroform-Methanol gefällt und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Verteilung von L1 wurde im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1 analysiert.



**Abb. 10 : Verteilung von L1 und ADAM10 im Saccharosedichtegradienten.** L1-CHO-Zellen wurden in 1% Triton X-100 bei 4°C lysiert und im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Fyn wurde mit pAk  $\alpha$ -fyn nachgewiesen, die Verteilung von L1 wurde mit pAk  $\alpha$ -zytL1 untersucht, ADAM10 wurde mit pAk  $\alpha$ -ADAM10 detektiert.

Wie **Abb. 10** zeigt, kolokalisieren L1-220 sowie das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 teilweise mit fyn, einem klassischen Raftmolekül, in Fraktion 2. Die Hauptmenge von L1-220 und L1-32 befindet sich in den Bodenfraktionen 8 und 9 und ist damit löslich in Triton X-100. Vorarbeiten von S. Mechttersheimer aus unserer Gruppe hatten eine Beteiligung von ADAM10 bei der L1-Spaltung nachgewiesen. (Mechttersheimer et al.,

2001). Daher sollte auch die Lokalisation dieser Metalloproteinase im Saccharosegradienten untersucht werden. Mit einem pAk gegen den zytoplasmatischen Teil von ADAM10 (pAk  $\alpha$ -ADAM10) konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich die aktive Form der Metalloproteinase in der Raftfraktion (Fraktion 2) zu finden ist. In den Bodenfraktionen dagegen sind die aktive sowie die pro-Form zu etwa gleichen Teilen vertreten.

## 2 L1-32 ist erst nach PMA-Stimulation biotinylierbar

Mikrodomänen sind nicht auf die Plasmamembran beschränkt, sondern existieren bereits im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), wo ihnen eine Rolle als Sortierplattformen für den apikalen und basolateralen Transport zukommt (van Meer und Simons, 1988; Simons und Ikonen, 1997).

Es sollte nun geklärt werden, ob raft-assoziiertes L1 tatsächlich an der Oberfläche lokalisiert und ob die von P. Gutwein beobachtete Zunahme der L1-Spaltung nach MCD- und PMA-Behandlung an der Oberfläche stattfindet. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  L1-CHO-Zellen für 1 h bei 37°C mit PMA bzw. MCD inkubiert, Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurden die Oberflächenproteine mit Biotin markiert. Anschließend wurde das überschüssige Biotin mit serumhaltigem Wachstumsmedium gequenchet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, von der Platte abgenommen, pelletiert und nach Lyse in Triton X-100 im Saccharosegradienten zentrifugiert. Am nächsten Tag wurden je 500  $\mu$ l-Fraktionen von oben abgenommen, 100  $\mu$ l jeder Fraktion wurden mit Chloroform-Methanol gefällt und direkt im SDS-Gel aufgetrennt. Die restlichen 400  $\mu$ l jeder Fraktion wurden in BOG-Lysispuffer lysiert, um auch die in Triton X-100 unlöslichen Raftproteine zu solubilisieren. Anschließend wurden die mit Biotin-markierten Proteine mit Streptavidin, das an Agarosebeads gekoppelt ist, präzipitiert und ebenfalls im SDS-Gel aufgetrennt. Die Analyse des Western Blots erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1. Wie **Abb. 11A** zeigt, lokalisiert ein geringer Anteil des zytoplasmatischen Spaltfragments L1-32 in Fraktion 2; diese repräsentiert die Raftfraktion. Die Hauptmenge von L1 (L1-220 und L-32) ist über den gesamten Gradienten verteilt. Die Inkubation mit PMA und MCD führt zu einer deutlichen Zunahme des Spaltfragments in allen Fraktionen des Gradienten. Die Analyse der mit Streptavidin präzipitierten Fraktionen (**Abb. 11B**) ergibt, dass in unbehandelten Kontrollzellen nur L1-220 sowie das durch Plasmin vermittelte Spaltung generierte L1-85 nachgewiesen werden kann. Ein ähnliches Muster wird in den mit MCD inkubierten Zellen beobachtet, hier erscheinen aber

zusätzlich sehr schwache L1-32-Banden hauptsächlich in den Bodenfraktionen. Erst nach PMA-Behandlung wird biotinyliertes L1-32 in allen Fraktionen des Gradienten deutlich detektierbar. Dies bedeutet, dass unter konstitutiven Bedingungen gespaltenes L1-32 nicht oder nur sehr gering an der Plasmamembran lokalisiert. Die Spaltung an der Oberfläche wird aber offensichtlich durch PMA induziert. Durch MCD kann die L1-Spaltung zwar erhöht werden, diese verstärkte Spaltung findet aber nur zu einem sehr geringen Anteil an der Zelloberfläche statt.

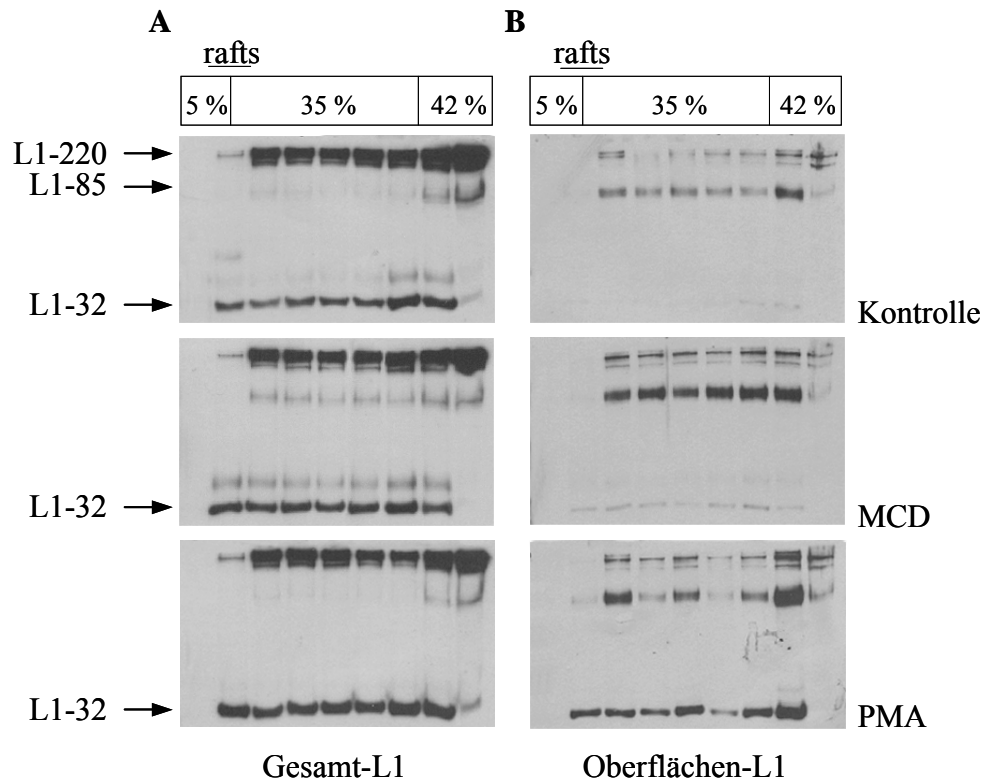


Abb. 11 : Analyse der L1-Spaltung im Saccharosedichtegradienten nach Stimulation mit PMA und MCD. L1-CHO-Zellen wurden mit 50 ng/ml PMA bzw. 10 mM MCD behandelt, anschließend wurden die Oberflächenproteine mit 0,4 mg/ml Biotin bei 4°C markiert. Die Zellen wurden in 1 % Triton X-100-Lysispuffer bei 4°C solubilisiert und im Saccharosegradienten aufgetrennt. (A) Nachweis von Gesamt-L1. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden gefällt, die Verteilung von L1 wurde mit pAk  $\alpha$ -zytL1 im Western Blot analysiert. (B) Nachweis von Oberflächen-L1. Die mit Biotin markierten Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mit Streptavidin-Agarose präzipitiert, der Nachweis von L1 im Western Blot erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1.

### 3 ADAM10 und L1 lokalisieren im Golgi/TGN und an der Plasmamembran

Für das Alzheimer-Vorläufer-Protein (APP) wurde bereits beschrieben, dass die Hauptmenge des Proteins nicht an der Membran, sondern intrazellulär im Golgi lokalisiert und dort von mehreren Sekretasen gespalten wird; ADAM10 wird dabei als  $\alpha$ -Sekretase diskutiert. (Kuentzel et al., 1993). Dallas et al. (1999) konnten zudem für Osteoblasten-

ähnliche Zellen zeigen, dass die prozessierte Form von ADAM10 an der Plasmamembran und im TGN exprimiert wird. Die Autoren vermuten, dass ADAM10 bereits im TGN katalytisch aktiv ist und dort an der Aktivierung des Notch-Rezeptor-Homologs beteiligt ist. In Analogie zu diesen Befunden konnte angenommen werden, dass ADAM10 bereits intrazellulär L1 spalten kann.

Zunächst sollte deshalb die subzelluläre Lokalisation von L1 und ADAM10 im konfokalen Mikroskop genauer untersucht werden. Dazu wurden L1-CHO-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit Antikörpern gegen die jeweiligen Ektodomänen von L1 und ADAM10 gefärbt. L1 wurde dabei mit mAk L1-11A detektiert, der Nachweis von ADAM10 erfolgte mit pAk #2547. Außerdem wurde der Golgi-Komplex mit einem Antikörper gegen das cis-Golgi residente Protein GM130 (mAk  $\alpha$ -GM130) sichtbar gemacht.

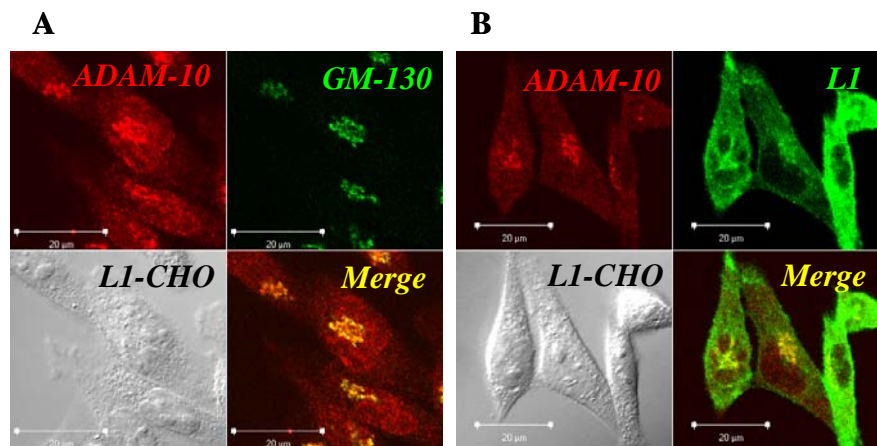


Abb. 12 : **Konfokalmikroskopische Analyse der Lokalisation von ADAM10 und L1.** (A) ADAM10 wurde mit pAk #2547 und ar-Cy3 detektiert, der Nachweis von GM130 erfolgte mit mAk  $\alpha$ -GM130 und am-Alexa 488. (B) L1 wurde mit mAk L1-11A und am-Alexa 488 gefärbt (Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Gutwein).

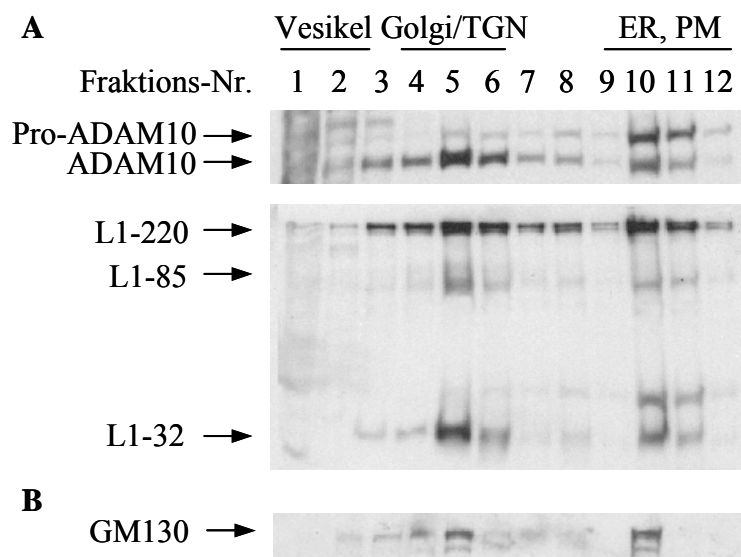
Die Färbung der Metalloproteinase ADAM10 kolokalisiert dabei hauptsächlich mit dem Golgi-Marker GM130, eine schwache Fluoreszenz wird über den gesamten Zellkörper verteilt beobachtet (**Abb. 12A**). Die L1-Färbung dagegen wird vor allem an der Zelloberfläche detektiert, zusätzlich kolokalisieren L1 und ADAM10 im Golgi (**Abb. 12B**).

#### 4 Die L1-Spaltung findet sowohl an der Zelloberfläche als auch im Golgi/TGN statt

Die Fluoreszenzfärbung und Analyse im konfokalen Mikroskop hatte gezeigt, dass die Hauptmenge von ADAM10 im Golgi lokalisiert. Auch L1 wird zu einem gewissen Anteil in diesem intrazellulären Kompartiment detektiert. Dieses Ergebnis lässt aber keine

Aussage darüber zu, ob die Metallproteinase im Golgi enzymatisch aktiv ist, d.h. ob L1 bereits intrazellulär gespalten wird. Um neue Erkenntnisse über die Lokalisation der L1-Spaltung zu gewinnen, wurden L1-CHO-Zellen in einem Saccharosegradienten definierter Dichte in Golgi/TGN und Plasmamembranen fraktioniert (Yan et al., 2001). Dazu wurden  $2 \times 10^7$  Zellen mit Hilfe eines Homogenisators in einer 0,25 M Saccharoselösung homogenisiert und anschließend auf einen stufenweisen Saccharosegradienten geladen. Nach 2,5-stündiger Zentrifugation bei 100 000g wurden 1 ml-Fraktionen von oben abgenommen, mit Chloroform-Methanol gefällt, im SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die anschließende Färbung mit Ponceau-S zeigt den Hauptproteinanteil in den vorderen Fraktionen 1 und 2 sowie den Bodenfraktionen 10-12 (Daten nicht gezeigt).

Bei der Untersuchung der Verteilung von L1 wird deutlich, dass L1-220 in den Fraktionen 3-12 zu finden ist, während das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 hauptsächlich in den Fraktionen 4-6 und zu einem geringeren Teil in den Fraktionen 10 und 11 lokalisiert (**Abb. 13A**). Durch Oberflächenbiotinylierung konnte gezeigt werden, dass die Fraktionen 10-12 der Plasmamembran entsprechen (Daten nicht gezeigt), die Fraktionen 4-6 wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen das cis-Golgi-residente Protein GM130 (Nakamura et al., 1995) als Golgi/TGN identifiziert (**Abb. 13B**)

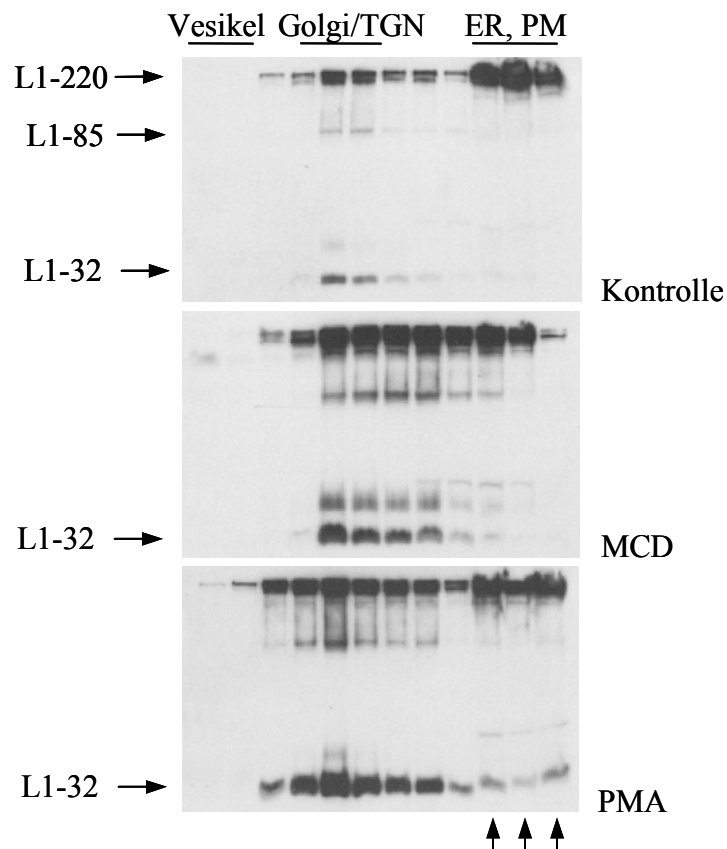


**Abb 13 :** (A) *Subzelluläre Lokalisation von L1 und ADAM10.* L1-CHO-Zellen wurden in 0,25 M Saccharose homogenisiert, bei anschließender Zentrifugation im Saccharosegradienten wurden Golgi/TGN und Plasmamembranen angereichert. Die Verteilung von L1 wurde mit pAk  $\alpha$ -zytL1 analysiert, ADAM10 wurde mit pAk  $\alpha$ -ADAM10 detektiert. (B) *Golgi/TGN-Fraktionen* wurden mit mAk  $\alpha$ -GM130 identifiziert.

Die Analyse der Verteilung von ADAM10 ergibt eine Kollokalisierung v.a. der aktiven Form der Metalloproteinase mit L1-32 in den Golgi/TGN-Fraktionen. Außerdem werden sowohl pro-ADAM10 als auch die aktive Form an der Plasmamembran exprimiert (**Abb. 13A**). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Spaltung der L1-Ektodomäne an der Plasmamembran und im Golgi/TGN stattfindet.

## 5 PMA und MCD stimulieren die L1-Spaltung in unterschiedlichen Kompartimenten

Die Stimulation von L1-CHO-Zellen mit MCD und PMA und die anschließende Oberflächenbiotinylierung hatten ergeben, dass das durch ADAM10 generierte Spaltfragment L1-32 nur nach PMA-Behandlung biotinylierbar ist. Durch Subfraktionierung der Zellen in Golgi/TGN und Plasmamembran sollte nun geklärt werden, ob diese beiden Stimuli die Spaltung von L1 in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle anregen. Dazu wurden  $2 \times 10^7$  L1-CHO-Zellen für jeweils 1 h mit PMA bzw. MCD inkubiert und nach Homogenisation wie beschrieben im Saccharosegradienten zentrifugiert.



**Abb. 14: Lokalisation der verstärkten L1-Spaltung nach Behandlung mit MCD und PMA.** L1-CHO-Zellen wurden 1 h mit 50 ng/ml PMA bzw. 10 mM MCD behandelt, anschließend in einer 0,25 M Saccharoselösung homogenisiert und im Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Analyse von L1 im Western Blot erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1.

In unbehandelten Zellen war der Hauptanteil von L1-32 wieder in den Golgi/TGN-Fraktionen zu finden. Durch Behandlung mit MCD kann die Spaltung in diesen Fraktionen stark erhöht werden, es wird jedoch keine verstärkte Spaltung an der Plasmamembran beobachtet. Im Gegensatz dazu wird durch die Inkubation mit PMA die Spaltung von L1 sowohl intrazellulär im Golgi/TGN als auch an der Plasmamembran stimuliert (**Abb. 14**).

## **6 MCD-Behandlung extrahiert Cholesterin und führt zur Abgabe von löslichem L1**

Cyclodextrine sind wasserlösliche, zyklische Oligosaccharide mit einer nicht-polaren Höhle, in der hydrophobe Komponenten gelöst werden können. Da  $\beta$ -Cyclodextrine *in vitro* eine höhere Affinität zu Sterolen als zu Lipiden haben und außerdem eine hohe Spezifität für Cholesterin aufweisen, werden sie häufig benutzt, um der Plasmamembran Cholesterin zu entziehen und dadurch die Lipid Rafts zu zerstören (Pitha, 1988; Irie et al., 1992; Ohtani et al., 1989; Ilangumaran und Hoessli, 1998).

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass MCD die Spaltung von L1 in intrazellulären Kompartimenten verstärkt. Dies wird zum Einen dadurch deutlich, dass MCD zwar die Spaltung von L1 erhöhen kann, das Spaltfragment aber nicht biotinylierbar ist, zum Anderen wird eine starke Zunahme des Spaltfragments L1-32 in den Golgi/TGN-Fraktionen des Saccharosegradienten und nicht an der Plasmamembran beobachtet. Es war also naheliegend zu untersuchen, ob nach Behandlung mit MCD trotzdem lösliches L1 im Zellüberstand nachgewiesen werden kann oder ob L1-200 nach Spaltung in der Zelle verbleibt. Dazu wurden L1-CHO-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von MCD für 30 bzw. 60 min in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Proteine des zellfreien Überstands mit TCA gefällt, im SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Zellen wurden von der Platte abgenommen und der Cholesteringehalt kolorimetrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit MCD tatsächlich zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des zellulären Cholesterins führt (**Abb. 15B**). Durch 30-minütige Inkubation mit 10 mM MCD kann der Cholesteringehalt auf 65 % der Kontrollzellen gesenkt werden, nach 60-minütiger Behandlung sogar auf 45 %. Der Cholesterinentzug wird bei 20 mM MCD sogar noch verstärkt (30-minütige Behandlung extrahiert 50 % des Cholesterins, 60-minütige Stimulation senkt den Gehalt auf 41 %). Die Analyse der Zellüberstände mit einem Antikörper gegen die Ektodomäne von L1 (mAk L1-11A) zeigt, dass der Entzug von zellulärem Cholesterin durch MCD zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Zunahme von löslichem L1 führt (**Abb. 15A**).



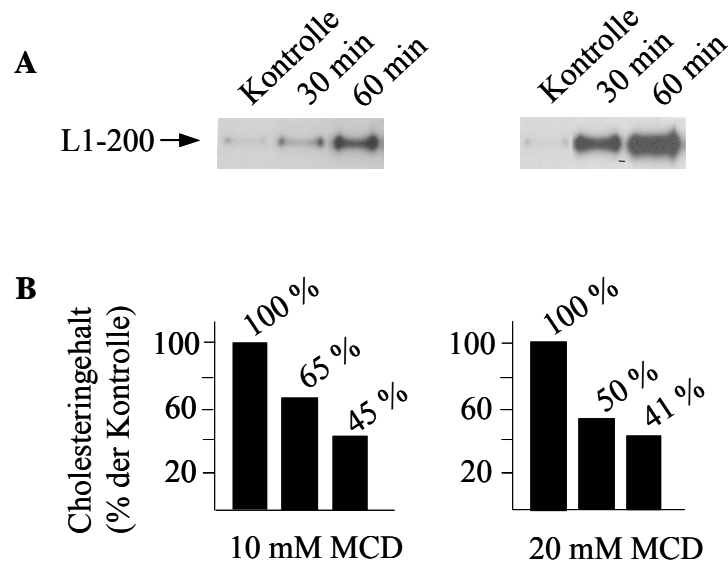


Abb. 15: L1-CHO-Zellen wurden für 30 bzw. 60 min mit 10 bzw. 20 mM MCD behandelt. (A) **Lösliches L1 im zellfreien Überstand nach Behandlung mit MCD.** Die Überstände wurden TCA gefällt, lösliches L1 wurde mit mAk L1-11A analysiert. (B) **Kolorimetrische Messung des Gehalts an freiem Cholesterin nach Behandlung mit MCD**

P. Gutwein aus unserer Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass sowohl die konstitutive als auch die PMA-induzierte Abspaltung von L1 mit dem Metalloproteinase-Inhibitor Ro 31-9790 blockiert werden können (Gutwein et al., 2000). Um zu untersuchen, ob auch die durch MCD stimulierte Spaltung von L1 Metalloproteinase-abhängig ist, wurden L1-CHO-Zellen für 30 min mit Ro 31-9790 vorinkubiert und anschließend für 1 h mit MCD behandelt. Bei der Analyse der TCA-gefällten Überstände wird deutlich, dass durch die Vorinkubation mit Ro 31-9790 die MCD-induzierte Spaltung nicht inhibiert wird (Abb. 16A). Wird lösliches L1 dagegen mit einem ProteinG-Sepharose-gekoppelten Antikörper gegen die Ektodomäne (mAk L1-11A) immunpräzipitiert, so wird bei der Analyse im Western Blot eine deutliche Reduktion der Abgabe von L1-200 durch Vorinkubation mit Ro 31-9790 nach MCD-Behandlung beobachtet (Abb. 16A). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass L1 im Überstand neben der löslichen Form noch in anderer Weise vorliegt. Tatsächlich konnte in den TCA-gefällten Überständen nach MCD-Behandlung in einem 7,5 %-igen SDS-Gel neben L1-200 auch Gesamt-L1 nachgewiesen werden (Abb. 16B).

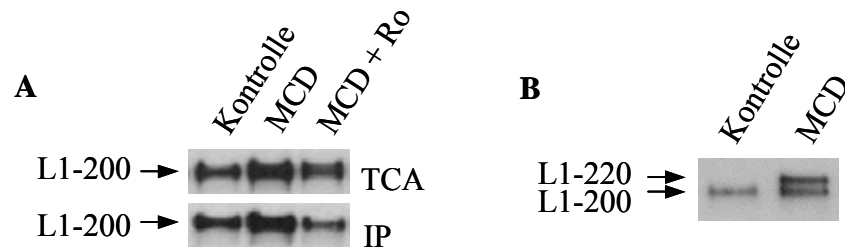
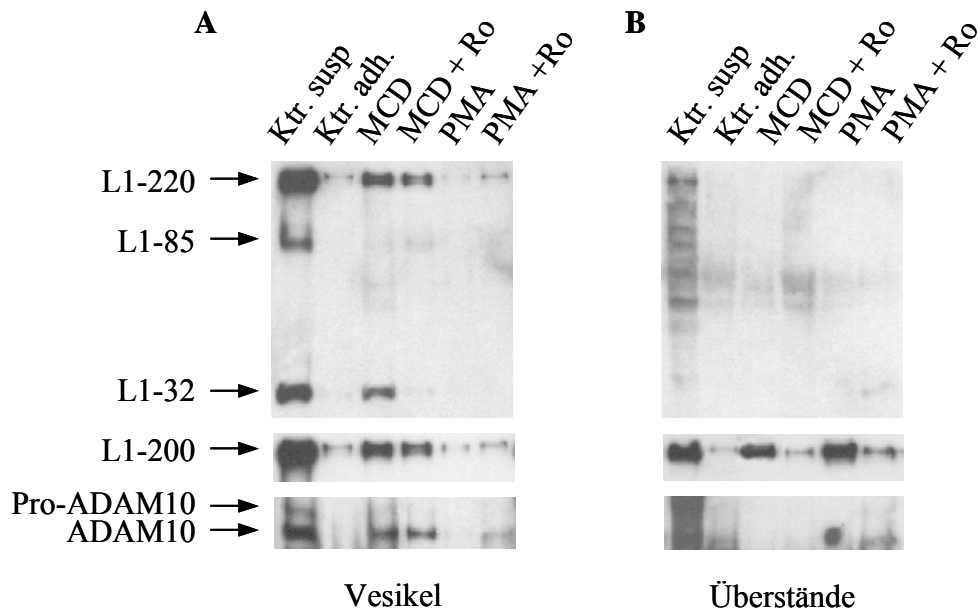


Abb. 16 : **Effekt von Ro 31-9790 auf die Abgabe von löslichem L1.** L1-CHO-Zellen wurden 30 min mit Ro 31-9790 vorinkubiert und anschließend 60 min mit 10 mM MCD behandelt. (A) **TCA-Fällung.** Die zellfreien Überstände wurden mit TCA gefällt, lösliches L1 wurde mit mAk L1-11A detektiert. **Präzipitation.** Lösliches L1 wurde mit ProteinG-Sepharose-gekoppeltem mAk L1-11A aus dem zellfreien Überstand präzipitiert und mit mAk L1-11A im Westen Blot nachgewiesen. (B) Analyse der TCA-gefällten Überstände nach MCD-Behandlung im 7,5 %-igen SDS-Gel mit mAk L1-11A

## 7 MCD führt zur Freisetzung von Vesikeln, die L1 und ADAM10 enthalten

Die Abgabe von L1 kann, wie bereits gezeigt, durch Extraktion von zellulärem Cholesterin mit MCD erhöht werden. Kojro et al. (2001) hatten ebenfalls beschrieben, dass die ADAM10-vermittelte Spaltung von APP nach Cholesterinzug hochreguliert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cholesterin eine Rolle in der ADAM10-vermittelten Spaltung spielt. Die molekularen Mechanismen der Beteiligung von Cholesterin in diesem Prozess waren aber zu diesem Zeitpunkt noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass durch Manipulation des Cholesteringehalts die zellulären Funktionen stark beeinflusst werden. So hatten einige Studien gezeigt, dass MCD den MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalweg aktiviert (Furuchi und Anderson, 1998) und den Phosphorylierungszustand einiger Proteine ändert (Visconti et al., 1999). Außerdem hatten Ilangumaran und Hoessli (1998) berichtet, dass die Behandlung mit MCD die Abgabe von Membranvesikeln induziert, die durch Zentrifugation bei 100 000g sedimentiert werden können. Es sollte nun untersucht werden, ob die Behandlung mit MCD zur Freisetzung von Vesikeln führt, die L1 enthalten und in denen L1 gespalten wird. Dazu wurden L1-CHO-Zellen 1 h mit MCD bzw. PMA in serumfreiem Medium behandelt, ein Teil der Zellen wurde zudem mit Ro 31-9790 vorinkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und zunächst bei 300g für 10 min, sowie bei 800g für 20 min zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Durch anschließende Ultrazentrifugation bei 100 000g für 3 h wurden vorhandene Vesikel pelletiert, in Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert. Die vesikelfreien Überstände nach Zentrifugation wurden mit TCA gefällt und ebenfalls im Western Blot untersucht. Zudem wurden die adhärent wachsenden L1-CHO-Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte abgenommen und 1 h bei 37°C in Suspension inkubiert, anschließend

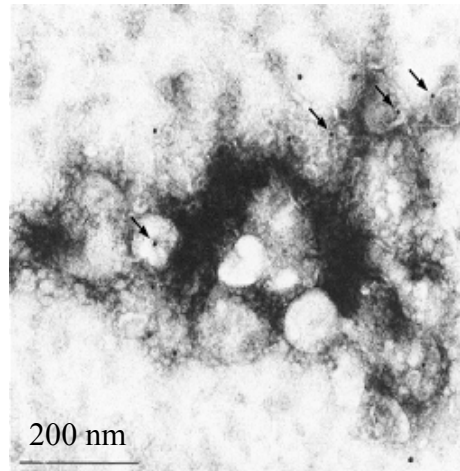
wurden die Vesikel wie oben beschrieben isoliert. Dabei zeigt sich, dass die Behandlung mit MCD die Abgabe von Vesikeln induziert, die im 100 000g Pellet detektiert werden können. Außerdem führt die Inkubation in Suspension zur massiven Freisetzung von Vesikeln, die Behandlung mit PMA dagegen stimuliert die Vesikelbildung kaum (**Abb. 17A**).



**Abb. 17 :** (A) *Nachweis von L1 und ADAM10 in isolierten Vesikeln.* L1-CHO-Zellen wurden in Suspension genommen oder adhären wachsend 1 h mit 10 mM MCD und 50 ng/ml PMA stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde vor MCD-Behandlung 30 min mit Ro 31-9790 vorinkubiert. Die Vesikel wurden aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert und im Western Blot analysiert. Der Nachweis von L1 erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1, ADAM10 wurde mit  $\alpha$ -ADAM10 pAk detektiert. (B) *Nachweis von löslichem L1 im vesikelfreien Überstand.* Der Überstand nach Abzentrifugieren der Vesikel wurde mit TCA gefällt und im Western Blot mit mAk L1-11A, pAk  $\alpha$ -zytL1 und  $\alpha$ -ADAM10 pAk geprobt.

Sowohl in den MCD-induzierten Vesikeln als auch in den Vesikeln, die von den in Suspension inkubierten Zellen abgegeben wurden, kann L1-220 mit einem Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil von L1 (pAk  $\alpha$ -zytL1) nachgewiesen werden. Außerdem ist das Spaltfragment L1-32 in den Vesikeln detektierbar. Nach Vorinkubation mit Ro 31-9790 verschwindet L1-32 in den Vesikeln, Ro 31-9790 hat aber keinen Einfluss auf die Abgabe der Vesikel (**Abb. 17A**). Die Analyse der vesikelfreien Überstände mit mAk L1-11A und pAk  $\alpha$ -zytL1 ergibt nur Signale mit dem mAk gegen die Ektodomäne von L1 (**Abb. 17B**). Dies zeigt, dass L1 im Überstand nach Entfernen der Vesikel ohne zytoplasmatischen Teil und damit löslich ist. Mit einem kommerziellen  $\alpha$ -ADAM10 pAk kann außerdem die aktive Form von ADAM10 in den Vesikeln nachgewiesen werden (**Abb. 17A**).

Eine elektronenmikroskopische Analyse des 100 000g Pellets nach MCD-Behandlung in Zusammenarbeit mit Dr. Zentgraf bestätigt, dass vesikuläre Strukturen mit einer Größe von etwa 100 nm isoliert wurden. Zudem kann mit dem mAk L1-11A gegen die Ektodomäne und einem mit Goldpartikeln markierten Zweitantikörper gezeigt werden, dass L1 mit diesen Vesikeln assoziiert ist (**Abb. 18**).



*Abb. 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Vesikeln mit Nachweis von L1. L1-CHO-Zellen wurden mit MCD behandelt und die Vesikel durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert. Vesikelassoziiertes L1 wurde mit mAk L1-11A und einem mit Goldpartikeln markierten Zweitantikörper nachgewiesen. (Durchführung in Zusammenarbeit mit Dr. Zentgraf).*

Dieses Ergebnis gibt zudem einen Hinweis auf die Orientierung von L1 in diesen Vesikeln: die Ektodomäne von L1 ragt aus den Vesikeln heraus, der zytoplasmatische Teil ist im Lumen der Vesikel verborgen.

## **8 ADAM10 in isolierten Vesikeln ist aktiv und spaltet L1**

Die Behandlung mit MCD führt zur Freisetzung von Vesikeln, welche sowohl die aktive Form von ADAM10 als auch Gesamt-L1 und das Spaltfragment L1-32 enthalten. Um zu untersuchen, ob die Metalloproteinase ADAM10 in den isolierten Vesikeln aktiv ist, wurden L1-CHO-Zellen mit MCD zur Vesikelbildung stimuliert. Durch Vorinkubation mit Ro 31-9790 wurde verhindert, dass L1 durch die MCD-Behandlung bereits durchgespalten wird. Anschließend wurden die Vesikel aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation isoliert und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Spaltung durch Aufkochen bei 95°C in Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Zusätzlich wurde die Bandenintensität von L1-32 densitometrisch bestimmt (**Abb. 19B**).

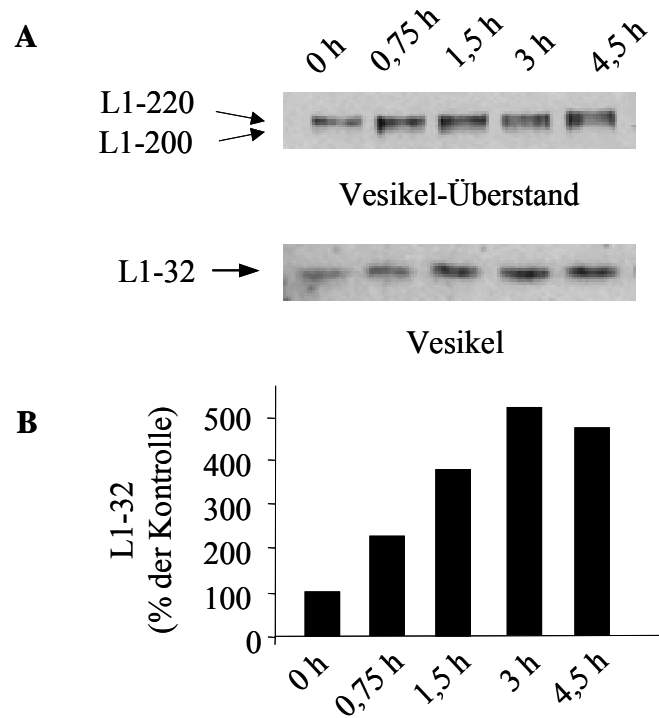


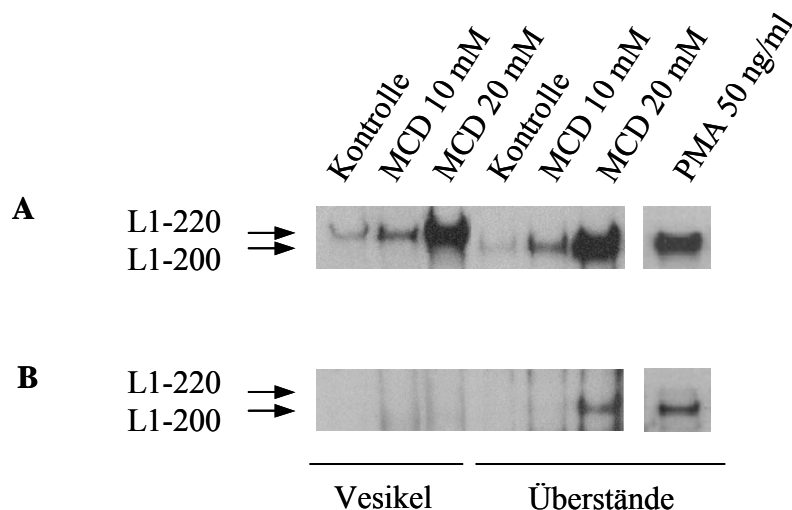
Abb. 19 : (A) *Spaltung von L1 in isolierten Vesikeln.* L1-CHO-Zellen wurden nach Vorinkubation mit Ro 31-9790 mit 10 mM MCD stimuliert. Die Vesikel wurden aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert und bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt und das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 mit pAk  $\alpha$ -zytL1 analysiert. Lösliches L1 wurde mit mAk L1-11A nachgewiesen. (B) *Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität von L1-32*

Dabei wird deutlich, dass das zytoplasmatische Spaltprodukt L1-32 über einen Zeitraum von 3 h um etwa das 5-fache ansteigt, durch längere Inkubation kann keine weitere Erhöhung erzielt werden. Gleichzeitig kann mit dem mAk L1-11A die Zunahme von löslichem L1 detektiert werden (Abb. 19A). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Metalloproteinase ADAM10 in Vesikeln aktiv ist und die Spaltung von L1 in isolierten Vesikeln anhält.

## 9 MCD-induzierte Vesikel werden nicht von der Zelloberfläche freigesetzt

Es sollte nun geklärt werden, ob die nach MCD-Behandlung abgegebenen Vesikeln von der Plasmamembran oder aus einem intrazellulären Kompartiment stammen. Dazu wurden zunächst alle Oberflächenproteine von L1-CHO-Zellen mit Biotin markiert, anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit MCD bzw. PMA behandelt. Die abgegebenen Vesikel wurden aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation isoliert und in BOG-Lysispuffer lysiert. Anschließend wurde vesikuläres L1 und lösliches L1 aus dem Überstand nach Ultrazentrifugation mit mAk L1-11A, gekoppelt an ProteinG-Sepharose,

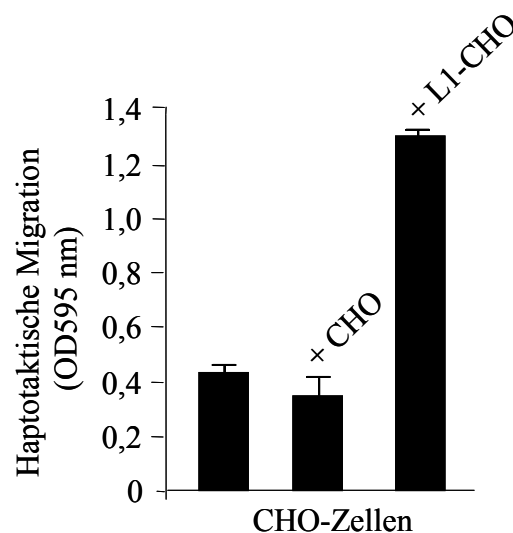
immunpräzipitiert. Zur Analyse wurden die Proben in einem 7,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Ein Teil jedes Versuchsansatzes wurde mit mAk L1-11A geprobt, Biotin markiertes L1 wurde mit Streptavidin-POX detektiert. Wie bereits beschrieben, führt die Behandlung mit MCD zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme von löslichem L1-200 im Überstand, parallel dazu nimmt L1-220 in den Vesikeln mit steigender MCD-Konzentration zu (**Abb. 20A**). Dieses vesikuläre L1 trägt aber keine Biotinmarkierung und stammt demnach nicht von der Plasmamembran. Lösliches L1 im Überstand ist erst ab einer für die Zellen toxischen MCD-Konzentration von 20 mM biotinyliert und mit Streptavidin-POX detektierbar. Nach PMA-Stimulation abgegebenes lösliches L1 ist ebenfalls biotinyliert (**Abb. 20B**). Damit war gezeigt, dass MCD zur Freisetzung von Vesikeln führt, die aber nicht an der Zelloberfläche generiert werden, sondern aus dem Inneren der Zelle stammen. Außerdem bestätigte die Biotinylierbarkeit von löslichem L1 nach PMA-Behandlung, dass PMA die Spaltung von L1 überwiegend an der Plasmamembran stimuliert. Im Gegensatz dazu wird durch Behandlung mit 10 mM MCD die Vesikulierung und Spaltung von L1 in Vesikeln angeregt. Das nach MCD-Stimulation (10 mM) im Überstand detektierbare lösliche L1 stammt ebenfalls nicht von der Plasmamembran, sondern wird wahrscheinlich aus den Vesikeln abgegeben. Somit konnte bestätigt werden, dass MCD und PMA die Spaltung von L1 in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle stimulieren (**Abb. 14**).



**Abb. 20 :** (A) *Nachweis von L1-220 in Vesikeln und L1-200 im vesikelfreien Überstand.* L1-CHO-Zellen wurden mit 0,4 mg/ml Biotin bei 4°C biotinyliert und danach 1 h bei 37°C mit 10 mM MCD und 50 ng/ml PMA behandelt. Vesikel wurden aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert und in BOG-Lysispuffer bei 4°C lysiert, anschließend wurden vesikuläres und lösliches L1 im vesikelfreien Überstand mit L1-11A-Sepharose präzipitiert. L1 wurde im Western Blot mit mAk L1-11A detektiert. (B) *Nachweis von Oberflächen-L1 in Vesikeln und im vesikelfreien Überstand.* Biotinyliertes L1 wurde im Western Blot mit Streptavidin-POX nachgewiesen.

## 10 Aus Vesikeln freigesetztes lösliches L1 stimuliert die Migration

Mechtersheimer et al. (2001) hatten bereits gezeigt, dass lösliches L1 die haptotaktische Migration von Zellen stimulieren kann. Um zu prüfen, ob aus Vesikeln abgegebenes lösliches L1 ebenfalls funktionell aktiv ist, sollten CHO-Zellen mit vesikulärem L1 zur Migration angeregt werden. Dazu wurden CHO- und L1-CHO-Zellen durch Behandlung mit MCD zur Vesikelbildung stimuliert, durch Vorinkubation mit Ro 31-9790 wurde wiederum die Spaltung in den Vesikeln verhindert. Anschließend wurden die Vesikel aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation pelletiert und für 4 h bei 37°C inkubiert, um lösliches L1 aus den Vesikeln freizusetzen. Durch nochmaliges Ultrazentrifugieren wurden die Vesikel aus dem Reaktionsansatz entfernt, der Überstand wurde in die haptotaktische Migration eingesetzt. Als Substrat diente Fibronectin. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37°C und anschließendem Anfärben der Zellen mit Kristallviolett wurde die Migrationsrate photometrisch bestimmt. Dabei ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Anzahl der migrierten Zellen. Bei jedem Migrationsversuch wurden Duplikate gemessen und davon Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Wie **Abb. 21** zeigt, kann nur der Vesikelüberstand der L1-CHO-Zellen die Migration verstärken, der Überstand der CHO-Zellen hat keinen Einfluss auf die Migration.



**Abb. 21 : Transmigration von CHO-Zellen auf Fibronectin nach Zugabe von Vesikelüberstand.** CHO- und L1-CHO-Zellen wurden nach Vorinkubation mit Ro 31-9790 mit 10 mM MCD zur Vesikelbildung stimuliert. Die Vesikel wurden aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert und 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Vesikel aus dem Reaktionsansatz entfernt und der Einfluss des vesikelfreien Überstandes auf die haptotaktische Migration von CHO-Zellen untersucht. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die migrierten Zellen angefärbt. Die Migrationsrate wurde photometrisch bei einer OD von 595 nm bestimmt.

## 11 Cholesterinsenkung durch Lovastatin führt ebenfalls zur Abgabe von Vesikeln

Der Entzug von Cholesterin mit MCD verstärkt die Abgabe von Vesikeln. Es sollte nun untersucht werden, ob die Reduktion des zellulären Cholesterins durch Inhibition der Synthese ebenfalls zur vermehrten Vesikelbildung führt. Dazu wurden L1-CHO-Zellen für 24 h in der Gegenwart von Lovastatin kultiviert. Dieses Statin blockiert die HMG-CoA-Reduktase, ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Cholesterin, und senkt damit den Cholesteringehalt der Zelle. Nach 24 h wurden die Vesikel aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation pelletiert, die vesikelfreien Überstände wurden mit TCA gefällt (Abb. 22A). Zudem wurden die Zellen von der Platte abgenommen und der Cholesteringehalt kolorimetrisch bestimmt (Abb. 22C). Dieser konnte durch die Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  Lovastatin auf 64 % der Kontrollzellen abgesenkt werden, mit 1  $\mu\text{M}$  Lovastatin kann diese Reduktion nur noch geringfügig verstärkt werden (58 %).

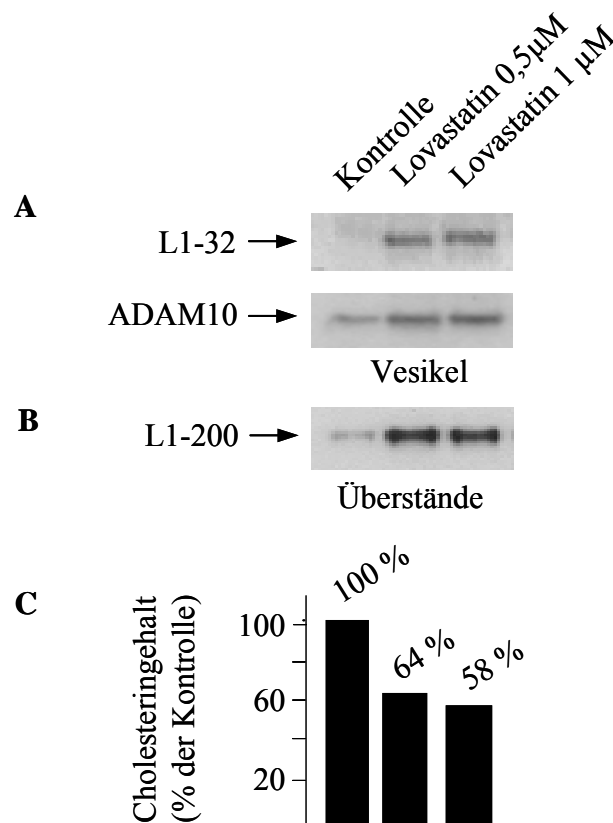


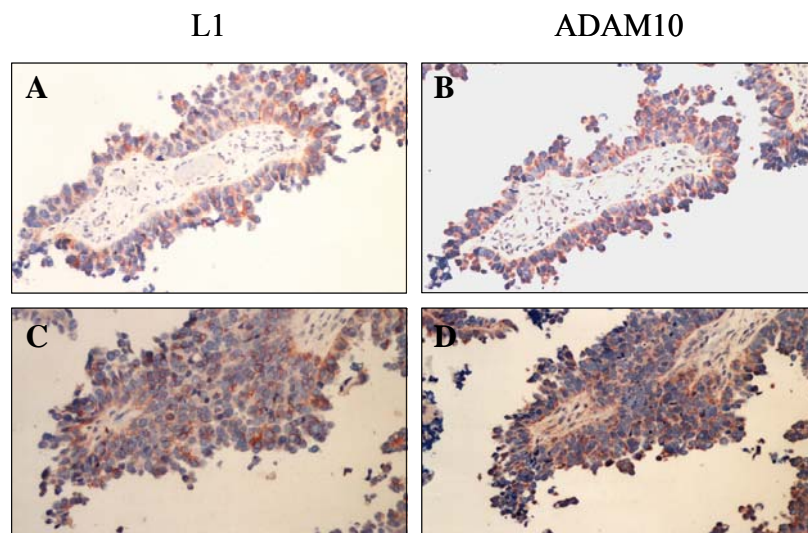
Abb. 22 : L1-CHO-Zellen wurden 24 h in Gegenwart von 0,5 bzw. 1  $\mu\text{M}$  Lovastatin inkubiert. (A) **Lösliches LI im vesikelfreien Überstand.** Nach Abzentrifugieren der Vesikel wurde der Überstand TCA gefällt, lösliches LI wurde mit mAk L1-11A detektiert. (B) **L1-32 und ADAM10 in isolierten Vesikeln.** Durch Ultrazentrifugation bei 100 000g wurden die Vesikel aus dem zellfreien Überstand isoliert. Der Nachweis von LI erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytLI, ADAM10 wurde mit pAk  $\alpha$ -ADAM10 nachgewiesen (C) **Kolorimetrische Messung des Gehalts an freiem Cholesterin nach Inkubation in Lovastatin.**



Eine Analyse des vesikelfreien Überstandes mit mAk L1-11A zeigt, dass Lovastatin die Abgabe von löslichem L1 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen deutlich erhöht (**Abb. 22A**). Außerdem wird durch die Blockade der Cholesterinsynthese die Bildung von Vesikeln, die das Spaltprodukt L1-32 sowie ADAM10 enthalten, induziert. Durch die längere Versuchsdauer sind nun auch in den unbehandelten Zellen ADAM10-haltige Vesikel detektierbar (**Abb. 22B**).

## 12 Ovarialkarzinomgewebe exprimieren L1 und ADAM10

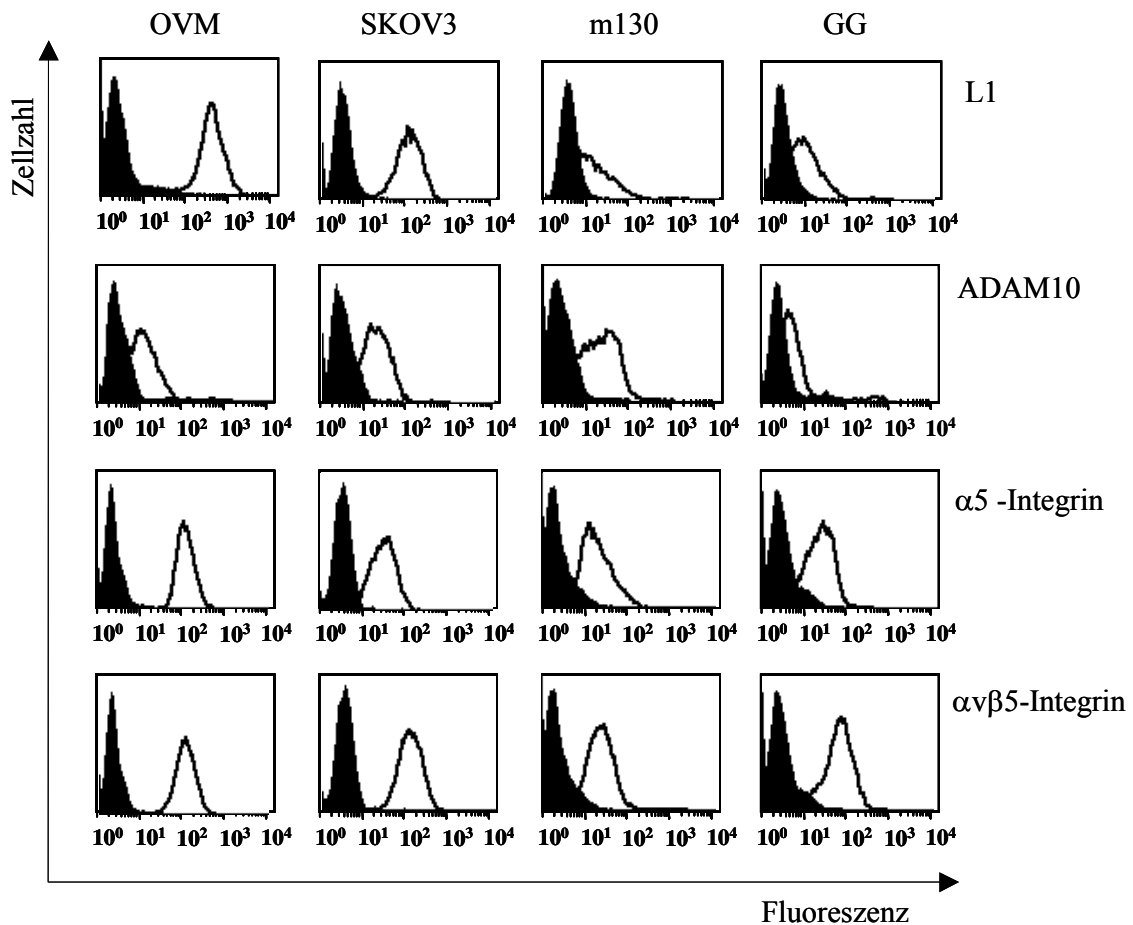
In Zusammenarbeit mit M. Fogel konnte für einige Ovarialkarzinomgewebe eine Koexpression von L1 und ADAM10 gezeigt werden (**Abb. 23**). Außerdem konnte lösliches L1 im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen nachgewiesen werden (Fogel et al., 2003).



**Abb. 23: Expression von L1 und ADAM10 auf Ovarialkarzinomgeweben.** Die Gewebeschnitte wurden mit (A, C) mAk L1-11A gegen hL1 und (B, D) pAk #2547 gegen hADAM10 gefärbt (Daten in Zusammenarbeit mit M.Fogel, Rehovot, Israel).

Um die Mechanismen zu verstehen, die in Ovarialkarzinomen zur Freisetzung von löslichem L1 führen, sollte anhand von Zelllinien die Regulierbarkeit und Lokalisation der L1-Spaltung näher untersucht werden. Dazu wurden zunächst einige Ovarialkarzinomlinien auf Oberflächenexpression von L1 und ADAM10 getestet. Die FACS-Analyse mit mAk L1-11A ergibt, dass OVM- und SKOV3-Zellen stark positiv für L1 sind, während GG- und m130-Zellen kaum L1 an ihrer Oberfläche exprimieren (**Abb. 24**). In allen untersuchten Ovarialkarzinomlinien kann ADAM10 mit Hilfe des pAk #2547 an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (**Abb. 24**).

Zellen benötigen zur Migration auf Fibronectin die  $\alpha 5$ -Integrinuntereinheit. Außerdem ist das  $\alpha \nu \beta 5$ -Integrin in die durch lösliches L1 verstärkte Migration involviert (Mechtersheimer et al., 2001). Da in weiteren Versuchen das Migrationsverhalten von Ovarialkarzinomzellen auf Fibronectin untersucht werden sollte, wurde zusätzlich das Integrinprofil der Zellen analysiert. Wie **Abb. 24** zeigt, exprimieren die getesteten Ovarialkarzinomlinien sowohl die  $\alpha 5$ -Integrinuntereinheit wie auch das  $\alpha \nu \beta 5$ -Integrin an ihrer Oberfläche.



**Abb. 24** : FACS-Analyse verschiedener Ovarialkarzinomlinien. **L1-Expression.** Zur Analyse der L1-Expression wurden die Zellen mit mAk L1-11A und einem am-PE gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. **ADAM10-Expression.** Der Nachweis der ADAM10-Expression erfolgte mit pAk #2547 und einem ar-Alexa 488 konjugierten Zweitantikörper. **Integrinprofil.** Die Zellen wurden zudem mit mAk gegen die  $\alpha 5$ -Integrinuntereinheit (SAM-1) sowie  $\alpha \nu \beta 5$ -Integrin (P1F6) und am-PE analysiert.

### 13 Charakterisierung des mAk 11G2 gegen ADAM10

Durch die Kooperation mit Prof. Dr. Rubinstein stand unserer Arbeitsgruppe erstmalig ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung, der wahrscheinlich humanes ADAM10 erkennt. Um dies zu bestätigen, sollte dieser mAk 11G2 genauer charakterisiert und mit den in unserem Labor hergestellten pAk #2547 sowie Serum 71 gegen ADAM10 verglichen

werden. Dazu wurden zunächst  $1 \times 10^6$  OVM-Zellen in BOG-Lysispuffer lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13000 Upm pelletiert, anschließend wurde das Lysat auf zwei Ansätze verteilt. Der erste Ansatz wurde mit Serum 71 gegen ADAM10 versetzt, der zweite Ansatz erhielt ein irrelevantes Kontrollserum (Serum 27). Nach einstündiger Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit ProteinG-Sepharose präzipitiert. Die Proteine wurden durch Aufkochen in nicht-reduzierendem Probenpuffer eluiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Analyse im Western Blot erfolgte mit mAk 11G2.

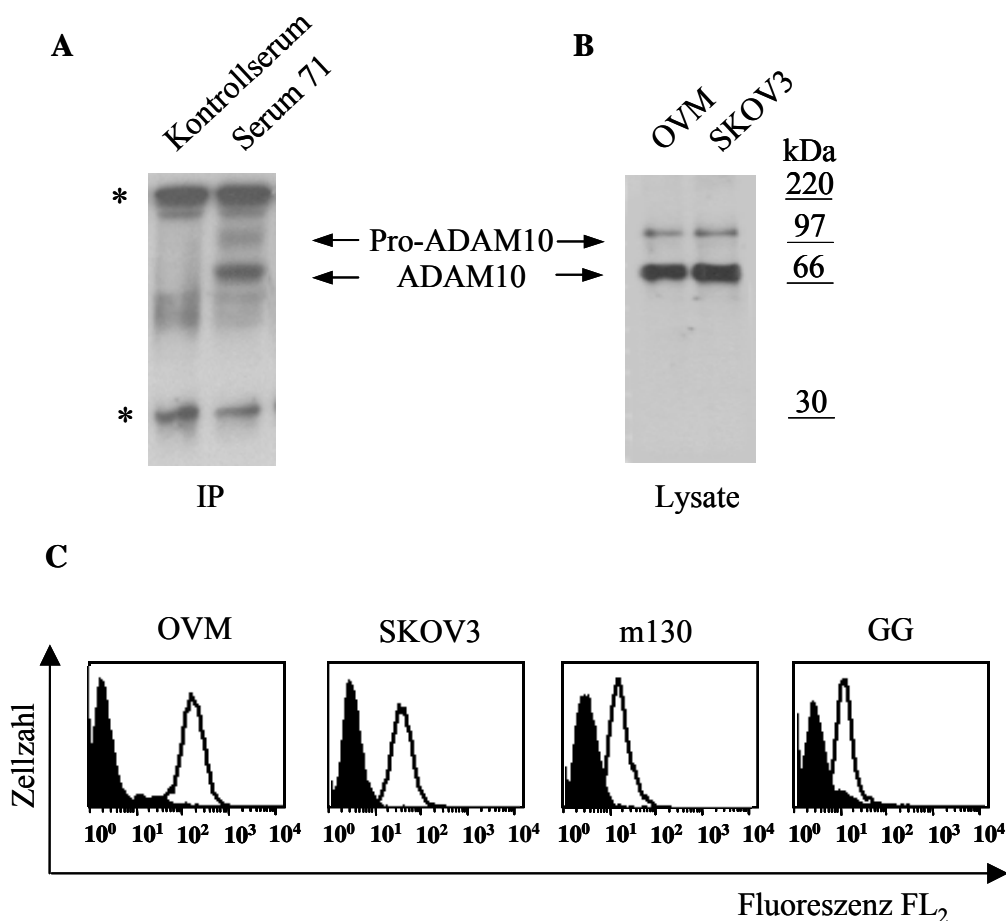


Abb. 25 : **Charakterisierung des mAk 11G2 gegen ADAM10.** (A) **Nachweis von ADAM10 nach Präzipitation.** OVM-Zellen wurden bei  $4^\circ\text{C}$  in BOG-Lysispuffer lysiert, anschließend wurde ADAM10 mit Serum 71 präzipitiert. Zur Kontrolle wurde mit dem irrelevanten Serum 27 inkubiert (\*: unspezifische Banden). (B) **Nachweis von ADAM10 im Gesamtlisat.** OVM- und SKOV3-Zellen wurden bei  $4^\circ\text{C}$  in BOG-Lysispuffer solubilisiert. Der Nachweis von ADAM10 erfolgte jeweils unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit mAk 11G2. (C) **Analyse der ADAM10-Expression im FACS.** Verschiedene Ovarialkarzinomlinien wurden mit mAk 11G2 und am-PE gefärbt und im FACS analysiert.

Wie **Abb. 25A** zeigt, erkennt der zu testende Antikörper nach Präzipitation mit Serum 71 zwei Banden bei 97 und 66 kDa, die mit der Pro- und der aktiven Form von ADAM10 korrelieren. Da diese Banden bei der Präzipitation mit dem Kontrollserum 27 nicht

erscheinen, kann davon ausgegangen werden, dass mAk 11G2 spezifisch mit ADAM10 reagiert. Um zu untersuchen, ob mAk 11G2 die ADAM10-Banden auch im Gesamtlisat detektiert, wurden OVM- und SKOV3-Zellen wiederum in BOG-Lysispuffer lysiert. Das zellfreie Lysat wurde mit nicht-reduzierenden Probenpuffer versetzt und im SDS-Gel aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot konnten mit mAk 11G2 ebenfalls die beiden spezifischen ADAM10-Banden detektiert werden (**Abb. 25B**). Schließlich sollte noch geklärt werden, ob mAk 11G2 auch für die Analyse der Oberflächenexpression von ADAM10 im FACS geeignet ist. Dazu wurden die Ovarialkarzinomzellen, die bereits mit pAk #2547 untersucht worden waren (**Abb. 24**), mit mAk 11G2 gefärbt und analysiert. Wie **Abb. 25C** zeigt, kann auch hier die Expression von ADAM10 in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden.

Bisher ist noch nicht geklärt, welches Epitop im ADAM10-Protein von mAk 11G2 erkannt wird. Da unter reduzierenden Bedingungen jedoch keine ADAM10-Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt), erkennt der Antikörper vermutlich eine bestimmte Struktur oder eine Modifikation des nativen ADAM10-Proteins. Auf jeden Fall liegt die Erkennungsstelle im extrazellulären Bereich der Metalloproteinase, da mAk 11G2 ADAM10 auf der Oberfläche lebender Zellen färbt (siehe FACS-Analyse, **Abb. 25**).

## 14 L1-Spaltung ist in Ovarialkarzinomzellen kaum stimulierbar

Arbeiten aus unserer Gruppe hatten bereits einen Zusammenhang zwischen der Spaltung von L1 und der verstärkten Zellmigration hergestellt (Mechtersheimer et al., 2001). Es war also zunächst wichtig zu wissen, ob und in welchem Ausmaß Ovarialkarzinomzellen L1 spalten. Zur Untersuchung der Regulierbarkeit der Spaltung von L1 sollten die beiden Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 mit verschiedenen Reagenzien stimuliert werden. Als Kontrolle wurden L1-CHO-Zellen eingesetzt, da hier bereits ein erhöhtes Abspalten durch PMA und Pervanadat beschrieben war (Gutwein et al., 2000). Die Zellen wurden mit PMA, MCD und Pervanadat in den angegebenen Konzentrationen für jeweils 1 h bei 37°C behandelt, anschließend von der Platte abgenommen, pelletiert und in BOG-Lysispuffer lysiert. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile bei 13000 Upm für 10 min wurde das Lysat im Western Blot analysiert. Zusätzlich wurde die Bandenintensität von L1-32 densitometrisch bestimmt.

Wie in **Abb. 26A** dargestellt, kann das Spaltfragment L1-32, welches indikativ für das *shedding* der Ektodomäne ist, sowohl in Lysaten von L1-CHO-Zellen als auch in den beiden Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 nachgewiesen werden. In L1-CHO-

Zellen kann die Spaltung von L1 durch PMA um das etwa 5-fache erhöht werden. Die Inkubation mit MCD verstärkt die Spaltung um das 4-fache, durch Pervanadat wird das Spaltprodukt L1-32 verdoppelt. Im Gegensatz dazu wird in den beiden Ovarialkarzinomlinien nur eine schwache Hochregulation der Spaltung erzielt (Abb. 26A/B). Selbst eine Erhöhung der PMA-Konzentration auf 600 ng/ml zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Spaltung (Daten nicht gezeigt).

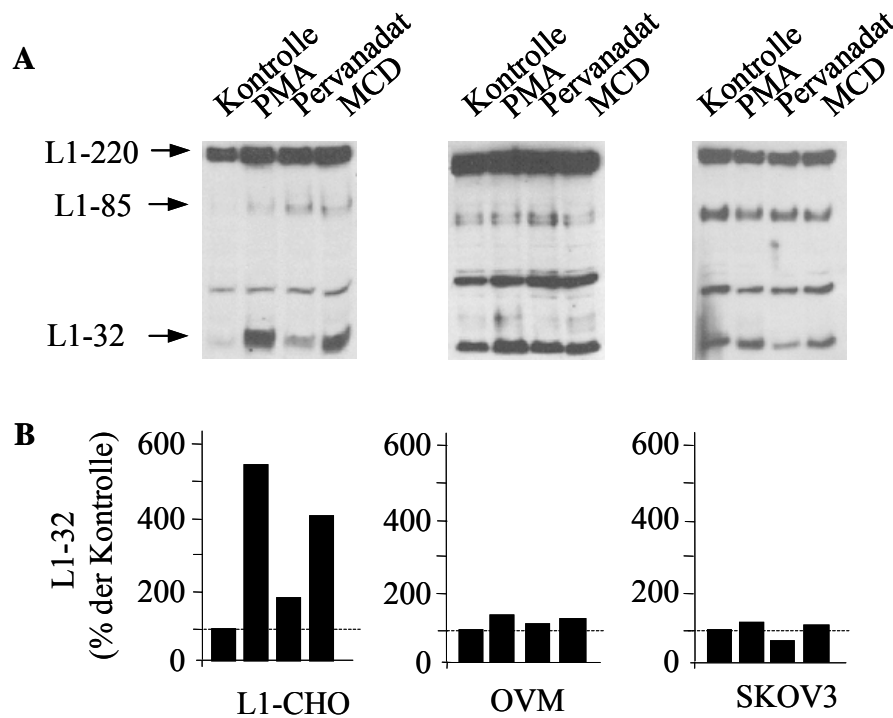


Abb. 26 : (A) Spaltung von L1 in L1-CHO-, OVM- und SKOV3-Zellen nach Stimulation mit PMA, MCD und Pervanadat. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C mit 100 ng/ml PMA, 10 mM MCD bzw. 200  $\mu$ M Pervanadat behandelt und anschließend für 45 min in BOG-Lysepuffer bei 4°C solubilisiert. Die Detektion von L1 im Western Blot erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1. (B) Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität von L1-32

## 15 In Ovarialkarzinomlinien ist die Spaltung von L1 durch eine Metalloproteinase vermittelt

Arbeiten von S. Beer aus unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Spaltung von Maus-L1 durch den Metalloproteinase-Inhibitor TAPI blockiert werden kann (Beer et al., 1999). Dieses auf Hydroxamat basierende Reagenz inhibiert ähnlich wie Ro 31-9790 sowohl konventionelle Matrix-Metalloproteinasen als auch Mitglieder der ADAM-Familie. Um zu untersuchen, ob auch in Ovarialkarzinomzellen die Spaltung von L1 Metalloproteinase-vermittelt ist, wurden OVM- und SKOV3- sowie L1-CHO-Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und für 2 h mit TAPI-0 vorinkubiert. Anschließend

wurden die Überstände abgenommen und durch frisches serumfreies Medium ersetzt, dem nochmals TAPI-0 zugesetzt wurde. Ein Teil der Zellen wurde zudem mit PMA stimuliert, die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach weiteren 3 h wurden die Überstände abgenommen, ein Teil wurde TCA-gefällt und im Western Blot auf lösliches L1 getestet. Zusätzlich wurden die Überstände im ELISA auf lösliches L1 untersucht.

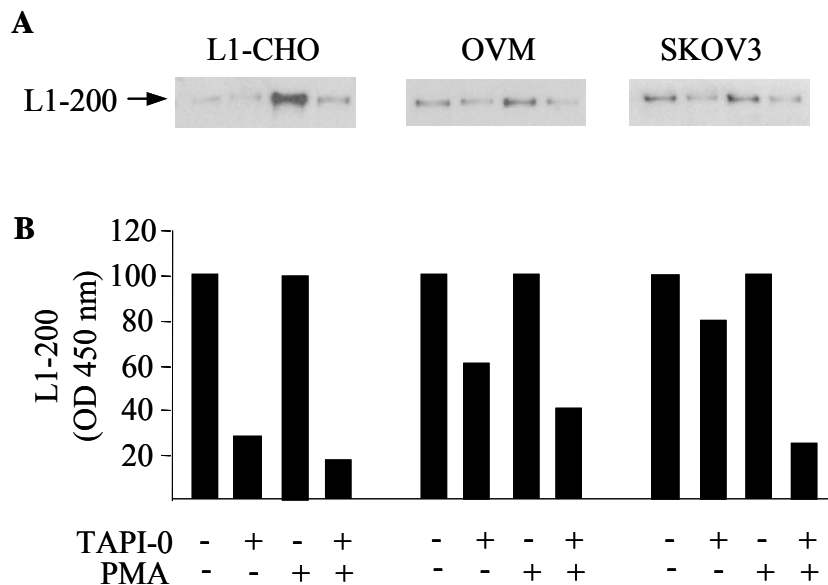


Abb. 27 : *Effekt des Metalloproteinase-Inhibitors TAPI-0 auf die konstitutive und PMA-induzierte Spaltung von L1.* L1-CHO-, OVM- und SKOV3-Zellen wurden bei 37°C für 2 h mit 10 µM TAPI-0 vorinkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen 3 h in serumfreiem Medium inkubiert oder mit 100 ng/ml PMA stimuliert. (A) **Western Blot.** Der Nachweis von löslichem L1 erfolgte mit mAk L1-11A. (B) **ELISA.** Zur Auswertung wurden die nicht mit TAPI-0 vorinkubierten Proben als 100 % gesetzt und die TAPI-0-Inhibition in % dieser Kontrolle angegeben.

Dabei zeigt sich, dass in L1-CHO-Zellen die konstitutive Abgabe von löslichem L1 durch TAPI-0 auf etwa 25 % der Kontrollzellen gesenkt werden kann. In den beiden Ovarialkarzinomlinien wird ebenfalls eine Inhibition der L1-Spaltung durch TAPI-0 beobachtet, allerdings kann hier die Spaltung nur auf etwa 60 % (OVM) bzw. 80 % (SKOV3) der Kontrollzellen reduziert werden. Auch die PMA-induzierte Spaltung wird in allen drei Zelllinien durch den Metallproteinase-Inhibitor vermindert. Auffallend ist dabei, dass die L1-Spaltung nach Stimulation mit PMA stärker durch TAPI-0 inhibierbar ist als die konstitutive Abgabe (**Abb. 27B**). Wie bereits bei der Analyse des Spaltprodukts L1-32 (**Abb. 26A/B**) wird auch auf der Ebene des löslichen L1 nur eine schwache PMA-Induktion in den Ovarialkarzinomlinien beobachtet (**Abb. 27A**).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 konstitutiv lösliches L1 abgeben, aber kaum stimulierbar sind. Dennoch ist die L1-Spaltung durch TAPI-0 blockierbar und daher Metalloproteinase-vermittelt.

## 16 In Ovarialkarzinomzellen ist das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 kaum biotinylierbar

Durch die FACS-Analyse der Ovarialkarzinomlinien konnte gezeigt werden, dass OVM- und SKOV3-Zellen eine starke Expression von L1 und ADAM10 an ihrer Oberfläche aufweisen. Aus Untersuchungen an L1-CHO-Zellen geht aber hervor, dass das Spaltprodukt L1-32 nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch im Golgi/TGN detektierbar ist (**Abb. 13**). Durch Oberflächenbiotinylierung sollten deshalb weitere Erkenntnisse über die Lokalisation der Spaltung in Ovarialkarzinomzellen gewonnen werden. Untersucht wurde dabei die konstitutive sowie die PMA-induzierte L1-Spaltung in L1-CHO-Zellen und den Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3. Dazu wurden die Zellen für 1 h mit PMA stimuliert, die Kontrollzellen wurden in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, die Oberflächenproteine wurden mit Biotin markiert. Um überschüssiges Biotin zu quenchen wurden die Zellen einmal mit serumhaltigem Medium gewaschen, anschließend von der Platte abgenommen und in BOG-Lysispuffer lysiert. Ein Teil des zellfreien Lysates wurde direkt mit 2x Probenpuffer versetzt und zur Analyse von L1 verwendet. Aus dem restlichen Lysat wurden über Nacht alle Biotin-markierten Proteine mit Hilfe von Streptavidin-Agarose präzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Streptavidinbeads gewaschen und die Proteine durch Aufkochen in 2x Probenpuffer eluiert. Die Analyse im Western Blot erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1. Wie in **Abb. 28B** dargestellt, kann in L1-CHO-Zellen nach PMA-Stimulation und Biotinylierung das Spaltprodukt L1-32 mit Streptavidin-Agarose präzipitiert werden. Dies beweist, dass die induzierte Spaltung an der Plasmamembran stattgefunden hat. Unter konstitutiven Bedingungen befindet sich nur ein sehr geringer Anteil von L1-32 an der Oberfläche. Im Gegensatz dazu kann in den Ovarialkarzinomzellen OVM und SKOV3 das zytoplasmatische Spaltfragment zwar im Lysat nachgewiesen werden (**Abb. 28A**), dieses kann jedoch kaum biotinyliert und präzipitiert werden (**Abb. 28B**). Die Spaltung von L1 findet daher in den Ovarialkarzinomlinien wohl nur zu einem geringen Anteil an der Zelloberfläche statt. In allen drei Zelllinien können sowohl Gesamt-L1 als auch das durch Plasmin-vermittelte Spaltung generierte L1-85 biotinyliert und präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt).

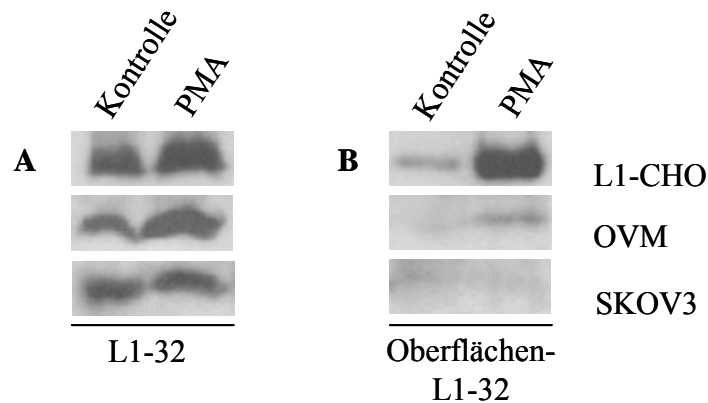


Abb. 28 : L1-CHO-, OVM- und SKOV3-Zellen wurden 3 h mit 100 ng/ml PMA behandelt, anschließend wurden die Oberflächenproteine mit 0,4 mg/ml Biotin bei 4°C markiert, die Zellen wurden in BOG-Lysispuffer bei 4°C lysiert. (A) Nachweis von L1-32. Das Lysat wurde im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1 analysiert. (B) Nachweis von biotinyliertem L1-32. Biotinmarkierte Proteine wurden aus dem Lysat mit Streptavidin-Agarosebeads präzipitiert. Der Nachweis von L1 erfolgte im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1.

Dieses Ergebnis führte zu der Frage, ob eine membranproximale L1-Spaltung an der Oberfläche der Ovarialkarzinomzellen überhaupt möglich ist, d.h. ob diese Zellen die katalytisch aktive Form von ADAM10 an ihrer Oberfläche exprimieren. Da der pAk #2547 sowohl die pro- als auch die aktive Form von ADAM10 erkennt, konnte nach der FACS-Analyse noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob in Ovarialkarzinomzellen die prozessierte Form von ADAM10 an der Oberfläche lokalisiert. Um dies zu klären, wurden die Oberflächenproteine von OVM- und SKOV3- sowie L1-CHO-Zellen mit Biotin markiert. Anschließend wurden die Zellen in BOG-Lysispuffer lysiert, die biotinylierten Proteine wurden mit Streptavidin-Agarosebeads aus dem Lysat präzipitiert.

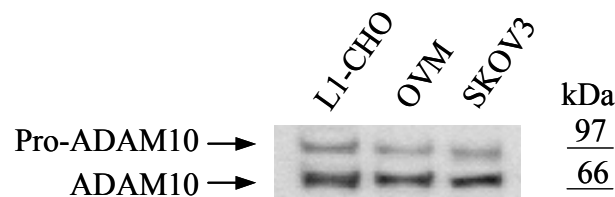


Abb. 29 : Analyse der Oberflächenexpression von ADAM10. Die Oberflächenproteine von L1-CHO-, OVM- und SKOV3-Zellen wurden bei 4°C mit 0,4 mg/ml Biotin markiert. Anschließend wurden die Zellen in BOG-Lysispuffer lysiert, die biotinmarkierten Proteine wurden mit Streptavidin-Agarosebeads aus dem Lysat präzipitiert. Der Nachweis von ADAM10 erfolgte im Western Blot mit Serum 71.

Bei der Analyse im Western Blot mit einem Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil von ADAM10 (Serum 71) werden zwei Banden bei 97 kDa und 66 kDa detektiert, diese korrelieren mit der Proform sowie der aktiven Form von ADAM10 (Abb. 29).



Durch FACS-Färbung und biochemische Analysen im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 sowohl L1 als auch die aktive Form von ADAM10 an ihrer Oberfläche exprimieren. Trotzdem deuten die Daten aus den gezeigten Biotinylierungsexperimenten darauf hin, dass die Spaltung von L1 in diesen Zellen kaum an der Plasmamembran stattfindet. Es stellt sich nun die Frage, ob ein anderes Mitglied der ADAM-Familie in die Spaltung von L1 involviert ist oder ob die Aktivität von ADAM10 an der Oberfläche durch bisher unbekannte Regulationsmechanismen unterdrückt wird.

## 17 Die Metalloproteinase ADAM10 ist in die L1-Spaltung involviert

Zunächst aber sollte geklärt werden, ob ADAM10 in Ovarialkarzinomzellen überhaupt die für die L1-Spaltung verantwortliche Proteinase ist. Dazu wurde die Expression von ADAM10 in OVM-Zellen mit spezifischen *antisense*-Oligonukleotiden (AON) blockiert und anschließend der Effekt auf die Abgabe von löslichem L1 sowie die Zellmigration untersucht. Die synthetisch hergestellten, kurzen RNA-Stücke sind komplementär zur endogenen mRNA und hybridisieren mit dieser, wodurch die Produktion des entsprechenden Proteins vorübergehend blockiert wird. Zur Kontrolle wurden die Zellen zudem mit *mismatch*-Oligonukleotiden behandelt, die nicht mit der Expression von ADAM10 interferieren sollten. 48 h nach Transfektion wurde zunächst die Expression von ADAM10 und L1 im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Wie **Abb. 30A** zeigt, kann mit Hilfe der AON die Expression von ADAM10 im Vergleich zu den Kontrolloligonukleotiden deutlich reduziert werden. Wie erwartet, bleibt die L1-Expression durch beide Oligonukleotide unbeeinflusst. Zur Analyse des abgegebenen löslichen L1 wurden die Zellen 24 h nach Transfektion für weitere 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände mit TCA gefällt und im Western Blot mit mAk L1-11A untersucht. Dabei konnte eine deutliche Abnahme von L1-200 nach Behandlung mit AON auf etwa 20 % (100 nM AON) bzw. 10 % (250 nM AON) der Kontrollzellen beobachtet werden (**Abb. 30B**).

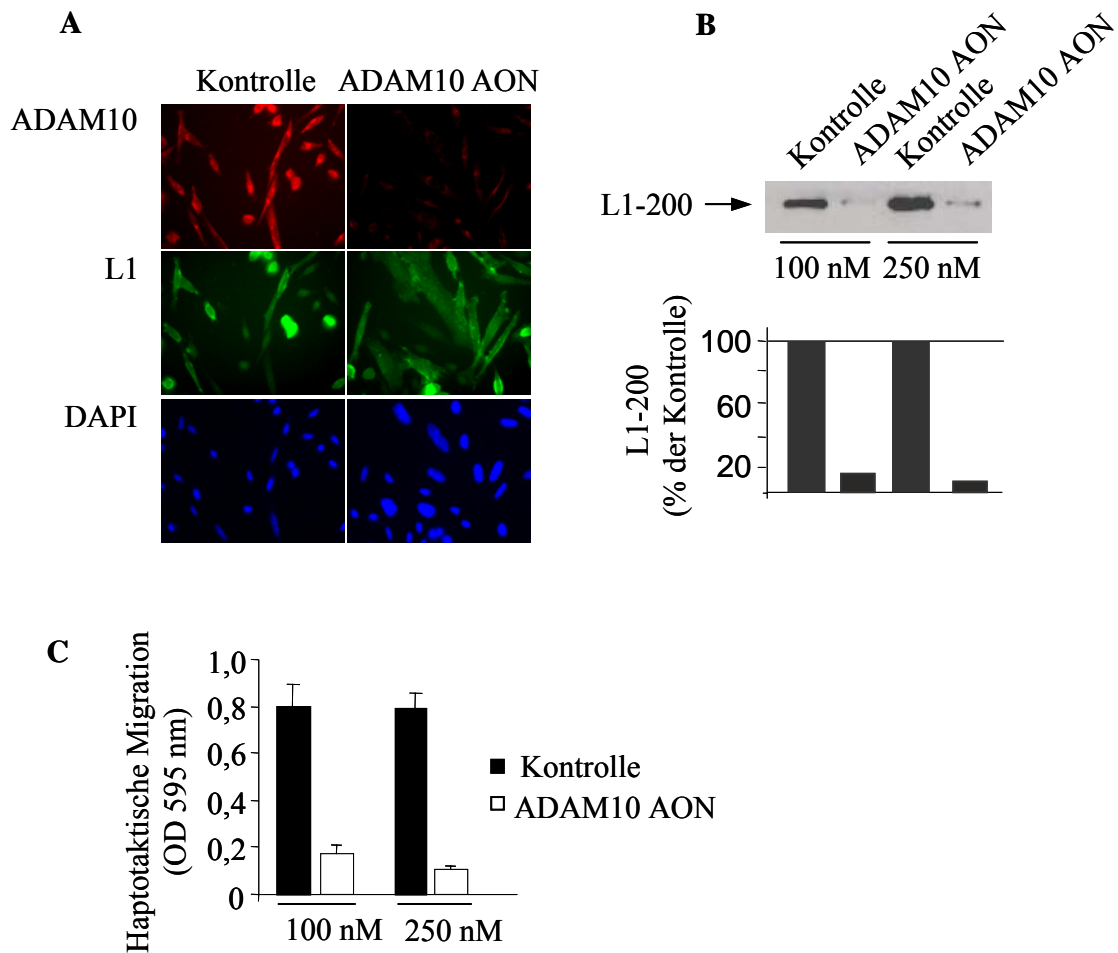


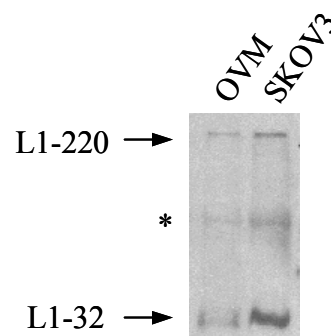
Abb. 30 : **Effekt von ADAM10-antisense-Oligonucleotiden auf (A) die Expression von ADAM10 und L1.** OVM-Zellen wurden mit 250 nM AON bzw. Kontrolloligonucleotiden transfiziert, 48 h nach Transfektion wurde die Expression von ADAM10 und L1 untersucht. Der Nachweis von ADAM10 erfolgte mit pAk #2547 und ar-Cy3, L1 wurde mit mAk LI-11A und am-Alexa 488 detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. **(B) die Abgabe von löslichem L1.** Die transfizierten Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium inkubiert, anschließend wurden die Proteine des zellfreien Überstandes mit TCA gefällt. Die Analyse im Western Blot erfolgte mit mAk LI-11A; zusätzlich wurde die Bandenintensität von L1-200 densitometrisch bestimmt. **(C) die haptotaktische Migration.** 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/100  $\mu$ l Medium in die haptotaktische Migration eingesetzt. Als Substrat diente Fibronectin. Die Migration erfolgte für 16 h bei 37°C. (Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Schlich und Dr. Gutwein).

Wie bereits erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen der Abspaltung von L1 und dem Migrationsverhalten von Zellen. Durch Transfektion mit AON sollte demnach auch die haptotaktische Migration der OVM-Zellen vermindert werden. Wie **Abb. 30C** zeigt, korreliert die reduzierte Abgabe von löslichem L1 nach Behandlung mit AON tatsächlich mit einer schlechteren Migrationsrate. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine Beteiligung von ADAM10 bei der membranproximalen Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomzellen.

## 18 Ovarialkarzinomzellen geben proteolytisch aktive Vesikel ab, die L1 und ADAM10 enthalten

Die Abgabe von Vesikeln ist ein vitaler Prozess, der am besten in Zellen des Immunsystems charakterisiert ist. Hier spielen die abgegebenen Vesikel eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und regulieren dadurch die Immunantwort (zusammengefasst in Dainiak, 1991). In neoplastischen Zellen wird dagegen eine kontinuierliche und stark erhöhte Freisetzung von Vesikeln beobachtet. Die verstärkte Abgabe von Vesikeln wird sogar als ein Merkmal der malignen Transformation diskutiert (Taylor und Black, 1986). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die beiden Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 unter konstitutiven Bedingungen Vesikel freisetzen, in denen L1 nachgewiesen werden kann.

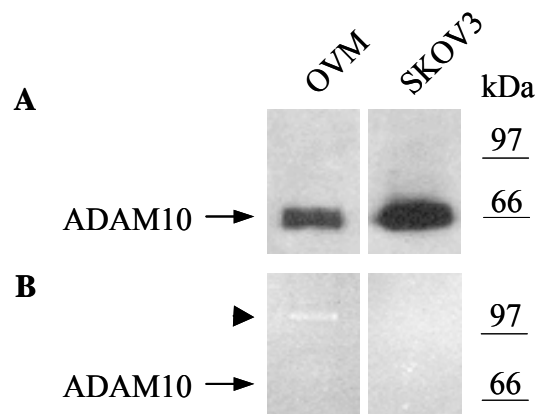
Dazu wurden je  $2 \times 10^7$  OVM- und SKOV3-Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend die Vesikel durch Ultrazentrifugation isoliert. Der Nachweis von L1 erfolgte mit pAk  $\alpha$ -zytL1. Wie **Abb. 31** zeigt, kann in den Ovarialkarzinomlinien eine starke Abgabe von Vesikeln beobachtet werden, die sowohl L1-220 sowie das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 enthalten.



**Abb. 31 : Nachweis von L1 in isolierten Vesikeln.** OVM- und SKOV3-Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium inkubiert, die Vesikel wurden aus dem zellfreien Überstand durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert. L1 wurde im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1 detektiert. (\*: unspezifische Banden).

Dolo et al. (1998) hatten beschrieben, dass die Brusttumorzelllinien 8701-BC und MCF7 in hohem Maße gelatinolytisch aktive Membranvesikel sezernieren. Auch die Ovarialtumorzelllinie CABA1, die aus einem Aszites etabliert wurde, setzt vermehrt Vesikel frei, die hohe Aktivitäten an MMP-2 und MMP-9 aufweisen (Dolo et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem für L1-CHO-Zellen gezeigt werden, dass die Manipulation des Cholesteringehalts die Ausschüttung von Vesikeln stimuliert, in denen die Metalloproteinase ADAM10 noch immer aktiv ist und L1 spaltet (**Abb. 19**). Da die

Freisetzung von gelatinolytisch aktiven Vesikeln die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen positiv beeinflusst (Ginestra et al., 1998) und damit eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielt, sollte nun geklärt werden, ob die von OVM- und SKOV3-Zellen abgegebenen Vesikel ADAM10 enthalten, das proteolytisch aktiv ist. Dazu wurden wiederum je  $2 \times 10^7$  OVM- und SKOV3-Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend die Vesikel durch Ultrazentrifugation isoliert. Ein Teil der Vesikel wurde direkt in Probenpuffer aufgenommen, im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Mit einem Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil von ADAM10 (Serum 71) konnte in den Vesikeln beider Ovarialkarzinomlinien die aktive Form von ADAM10 detektiert werden (**Abb. 32A**).



*Abb. 32 : OVM- und SKOV3-Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium inkubiert, die Vesikel wurden aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation isoliert. (A) Nachweis von ADAM10 in isolierten Vesikeln. Der Nachweis von ADAM10 im Western Blot erfolgte mit Serum 71. (B) Zymogram von isolierten Vesikeln. Die proteolytische Aktivität der Vesikel wurde in einem gelatinehaltigen Gel analysiert.*

Zum Nachweis der gelatinolytischen Aktivität wurden die isolierten Vesikel in Probenpuffer aufgenommen und auf ein gelatinehaltiges Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie R-250 gefärbt und mit Essigsäure entfärbt. Im Zymogram kann eine proteolytische Aktivität bei etwa 97 kDa detektiert werden (**Abb. 32B**), diese korreliert aber nicht mit der aktiven Form von ADAM10 (**Abb. 32A**). Wahrscheinlich handelt es sich bei der 97 kD-Bande um MMP-9, da für diese Matrix-Metalloproteinase bereits eine Assoziation mit Vesikeln beschrieben wurde (Dolo et al. 1998, 1999). Außerdem ist bekannt, dass SKOV3-Zellen keine MMP-9-Aktivität im Zymogram zeigen (Moore et al., 1997). Obwohl die von den OVM- und SKOV3-Zellen abgegebenen Vesikel große Mengen an aktivem ADAM10 enthalten, konnte unter den gewählten Bedingungen (Hall et al., 2003) keine gelatinolytische Aktivität für ADAM10 nachgewiesen werden.

## 19 In den Asziten von Tumorpatientinnen können L1-haltige Vesikel nachgewiesen werden

Die Bildung eines Aszites ist ein Begleitsymptom vieler Krebserkrankungen. Normalerweise produziert das Peritoneum, eine zweischichtige Membran die den Bauchraum auskleidet, eine Flüssigkeit, die das Aneinandergleiten der abdominalen Organe gewährleistet. Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es zur exzessiven Produktion und Ansammlung dieser Flüssigkeit zwischen den beiden Zellschichten des Peritoneums kommen. Die Bildung eines Aszites wird daher auch als Bauchwassersucht bezeichnet. Um die Schmerzen, die durch den Aszites ausgelöst werden, zu lindern, wird die Flüssigkeit im Bauchraum durch eine sog. Parazentese abgesaugt. Zahlreiche Studien hatten bereits berichtet, dass Tumorzellen Vesikel abgeben, die im Aszites akkumulieren. So wurden in Asziten von Melanompatienten sowie Patienten mit Ovarialtumoren Exosomen-ähnliche Vesikel gefunden, die Tumorantigene auf ihrer Oberfläche tragen (Andre et al., 2002a). Dolo et al. (1999) hatten zudem beschrieben, dass in Serum und Aszites von Ovarialtumorpatientinnen Membranvesikel zirkulieren. In Zusammenarbeit mit M. Fogel (Rehovot) konnte außerdem gezeigt werden, dass L1 in Tumoren der Ovarien und des Uterus detektiert werden kann. Dabei korreliert die Expression von L1 mit dem klinischen Stadium der Erkrankung (Fogel et al., 2003).

Es sollte nun untersucht werden, ob im Aszites von Tumorpatientinnen Vesikel nachgewiesen werden können, die L1 enthalten. Die Aufreinigung der Vesikel aus Asziten erfolgte nach der Methode von Andre et al. (2002b). Dabei wird der Aszites zunächst bei 300g für 15 min und anschließend bei 800g für 30 min zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der so geklärte Aszites wird auf ein Kissen aus 35 %-iger Saccharose/D<sub>2</sub>O geschichtet und für 1,5 h bei 100 000g zentrifugiert. Die Vesikel verbleiben im Saccharosekissen, Verunreinigungen werden am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletiert (Pellet ). Anschließend wird der Überstand bis kurz über dem Saccharosekissen abgenommen und verworfen. Das Saccharosekissen wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS verdünnt und nochmals für 1,5 h bei 100 000g zentrifugiert, um die Vesikel zu pelletieren (**Abb. 33A**). Beide Pellets wurden direkt in 2x Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert. Die Detektion von L1 erfolgte mit biotinyliertem mAk L1-11A und Streptavidin-POX. Wie **Abb. 33B** zeigt, können aus dem Aszites einer Ovarialtumorpatientin Vesikel isoliert werden, in denen L1 nachgewiesen werden kann.

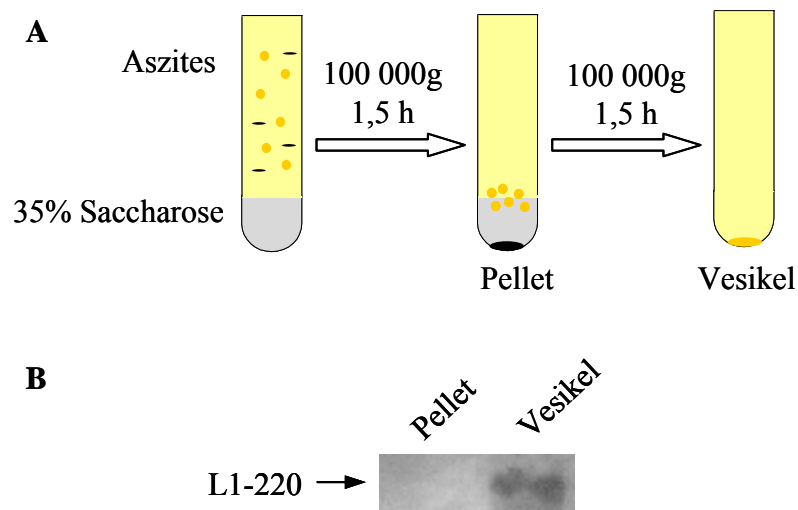


Abb. 33 : (A) **Schema zur Aufreinigung von Vesikeln aus Asziten über ein Saccharosekissen.** Der von Zellen und Zelltrümmern geklärte Aszites wird auf ein 35 %-iges Saccharosekissen/D<sub>2</sub>O geschichtet und bei 100 000g zentrifugiert. Dabei verbleiben Vesikel im Saccharosekissen, Verunreinigungen werden pelletiert (**Pellet**). Anschließend wird der Überstand bis kurz über dem Saccharosekissen abgenommen, dieses wird in PBS verdünnt und die Vesikel werden durch nochmaliges Ultrazentrifugieren isoliert (**Vesikel**). (B) **Nachweis von L1 in isolierten Vesikeln, aufgereinigt aus Asziten, mit mAk L1-11A-bio und Streptavidin-POX.**

Mit der beschriebenen Methode wurden die Asziten von fünf weiteren Tumorpatientinnen auf die Anwesenheit von L1-haltigen Vesikeln getestet. Dabei kann im Aszites einer Patientin L1 nachgewiesen werden (#24F). Dieses ist bei 100 000g pelletierbar und muss deshalb mit Vesikeln assoziiert sein (**Abb. 34A**).

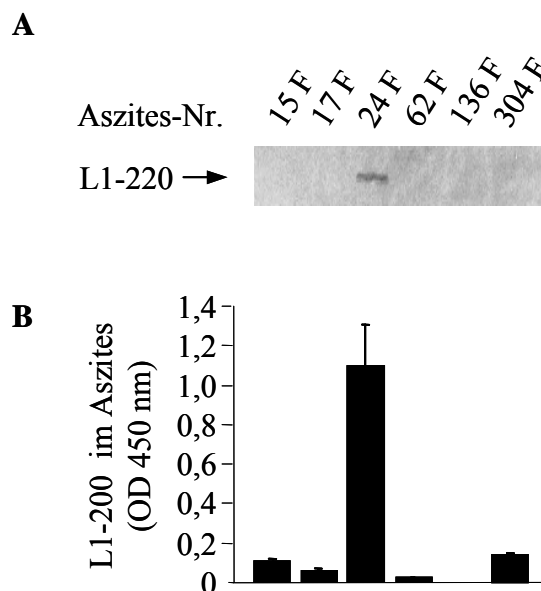


Abb. 34 : (A) **Nachweis von L1 in Vesikeln, aufgereinigt aus Asziten.** Vesikel wurden aus Asziten von Tumorpatientinnen durch Ultrazentrifugation bei 100 000g isoliert. L1 wurde im Western Blot mit biotinyliertem mAk L1-11A und Streptavidin-POX detektiert. (B) **Nachweis von löslichem L1 im vesikelfreien Aszites.** Nach Abzentrifugieren der Vesikel wurde der Überstand in einem  $\alpha$ -human L1-ELISA auf lösliches L1 getestet

Zusätzlich kann im Aszites dieser Patientin nach Abzentrifugieren der Vesikel lösliches L1 mit Hilfe eines  $\alpha$ -human-L1 ELISAs detektiert werden (**Abb. 34B**).

## 20 Herstellung von L1-Adenovirus

Die Entwicklung von replikationsdefizienten Adenoviren erlaubt den erfolgreichen und sicheren Transfer von Genen in Säugertierzellen. Zur schnellen und effizienten Überexpression von L1 in Ovarialkarzinomzellen sollte daher ein rekombinantes Adenovirus hergestellt werden, das für L1 kodiert. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete AdEasy<sup>TM</sup> System wurde von He et al. (1998) entwickelt. Dabei wird zunächst das Gen von Interesse in eine Transfektor kloniert und über homologe Rekombination in das adenovirale Genom übertragen. Anschließend wird das so generierte Adenovirus in HEK293-Zellen repliziert und amplifiziert.

Zunächst wurde die humane L1-Sequenz, die im pcDNA3-Vektor vorlag, herausgeschnitten und in den Transfektor pShuttleCMV kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pShuttleCMV-L1 wurde mit PmeI linearisiert und zusammen mit dem viralen *backbone* AdEasy<sup>TM</sup> durch Elektroporation in *E.coli* BJ5183 transformiert. Nach Amplifikation der Bakterien wurde die Plasmid-DNA mittels Miniprep-Kit isoliert und zur Analyse auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. **Abb. 35A** zeigt das Laufverhalten von unverdautem pShuttleCMV-L1 sowie pAdEasy<sup>TM</sup> zur Kontrolle. Daneben wurde die Plasmid-DNA von vier BJ5183-Klonen aufgetragen. Von diesen enthält nur Klon #4 ein Plasmid von etwa 30 kb und stellt damit einen potentiellen Rekombinanten dar. Da die Struktur des rekombinierten AdEasy-Plasmids in *recA+* Stämmen wie BJ5183 nicht stabil ist, wurde das isolierte 30 kDa-Plasmid von Klon 4 in Top10-Bakterien transformiert und amplifiziert. Die Plasmid-DNA von vier Klonen wurde anschließend mittels Miniprep-Kit isoliert und zur Bestätigung der Rekombination mit Hilfe eines Restriktionsverdau analysiert. Wie in **Abb. 35B** dargestellt, wird nach dem Verdau mit PacI ein Fragment von 30 kb sowie ein kleineres Fragment von 4,5 kb detektiert. Diese beiden Fragmente bestätigen die erfolgreiche Rekombination und damit die Herstellung des „L1-Adenovirus“.

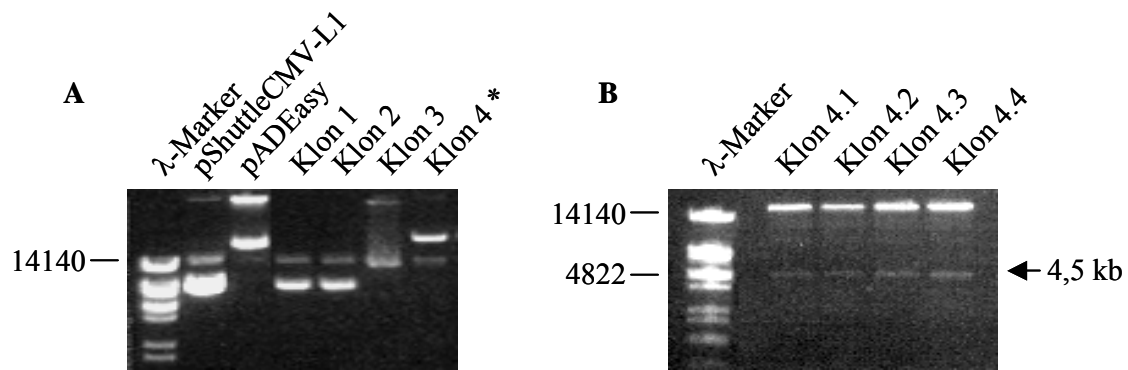


Abb. 35 : (A) **Analyse der Rekombination in BJ5183 zur Herstellung von LI-Adenovirus.** Nach Rekombination in BJ5183 wurde die Plasmid-DNA isoliert und auf ein 0,8 %- iges Agarosegel aufgetragen. Außerdem ist das Laufverhalten des unverdauten pShuttleCMV-L1 sowie von pAdEasy<sup>TM</sup> dargestellt. (B) **Kontrollverdau des rekombinierten AdEasy-Plasmids mit PacI.** Top10-Bakterien wurden mit dem rekombinierten pAdEasy-Plasmid transformiert. Die Plasmid-DNA von vier Klonen wurde isoliert, mit PacI verdaut und auf ein 0,8 %- iges Agarosegel aufgetragen.

Das rekombinierte pAdEasy-L1-Konstrukt wurde erneut mit PacI verdaut, um die ITRs (*Inverted Terminal Repeats*) freizulegen, und damit die Replikation des Adenovirus zu ermöglichen, und anschließend in QBI293-Zellen transfiziert. Um die Diffusion des Virus einzuschränken wurden die Zellen mit Sea Plaque Agarose überschichtet. Einige Tage nach der Transfektion kann unter dem Mikroskop die Bildung von Plaques beobachtet werden.

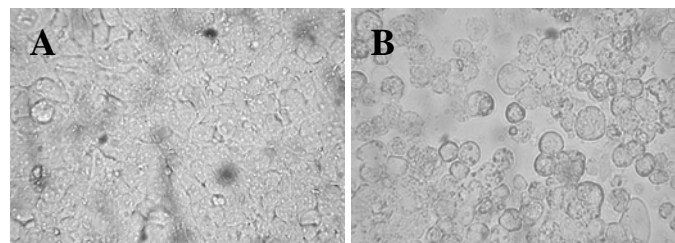


Abb. 36 : **Plaquebildung im konfluenten Zellrasen** (A) Zellen, die keinen Virus produzieren, bilden einen **konfluenten Zellrasen** in der Kulturplatte. (B) **Plaques.** Die aktive Produktion des Virus führt zu **morphologischen Veränderungen (CPE)**. Die Zellen runden sich ab und lösen sich vom Boden der Kulturplatte. Außerdem kommt es zur **Lyse der Zellen und Freisetzung des Virus**.

Dabei handelt es sich um spezifische Regionen im konfluenten Zellrasen, in denen sich die Zellen abrunden und vom Boden der Zellkulturplatte lösen. Durch die aktive Produktion des Adenovirus nimmt der Zellkern nun den Hauptteil der Zelle ein. Dieses Erscheinungsbild wird als zytopathischer Effekt (CPE) bezeichnet. Die Vermehrung des Virus führt zur Lyse der Zellen und damit zur Freisetzung des Virus mit anschließender Infektion benachbarter Zellen. Nach mehreren kompletten lytischen Infektionszyklen können die Plaques mit bloßem Auge als weiße Flecken identifiziert werden (**Abb. 36B**).



Die weiteren Arbeitsschritte bis zur Aufreinigung des intakten Virus wurden wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

## 21 Mit L1-Adenovirus infizierte Zellen exprimieren L1

Zunächst musste geklärt werden, ob durch die Infektion mit L1-Adenovirus eine Überexpression von L1 in Ovarialkarzinomzellen erreicht werden kann. Da die Ovarialkarzinomlinien GG und m130 laut FACS-Färbung (**Abb. 24**) kaum L1 an ihrer Oberfläche exprimieren, sollten diese Zellen mit L1-Adenovirus infiziert werden. Dazu wurden die Zellen bei 300g pelletiert und in 500  $\mu$ l Wachstumsmedium aufgenommen. Die Infektion erfolgte in Suspension für 90 min bei 37°C mit je  $10^3$  OPU/Zelle. Anschließend wurden die Zellen in Kulturplatten ausgesät, in denen sie normal adhärten. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Infektion wurden die Zellen außerdem mit YFP-Adenovirus (1  $\mu$ l/ $10^6$  Zellen), der von Dr. Patrick Keller zur Verfügung gestellt wurde, infiziert. Die Expression wurde nach 48 h im FACS analysiert.

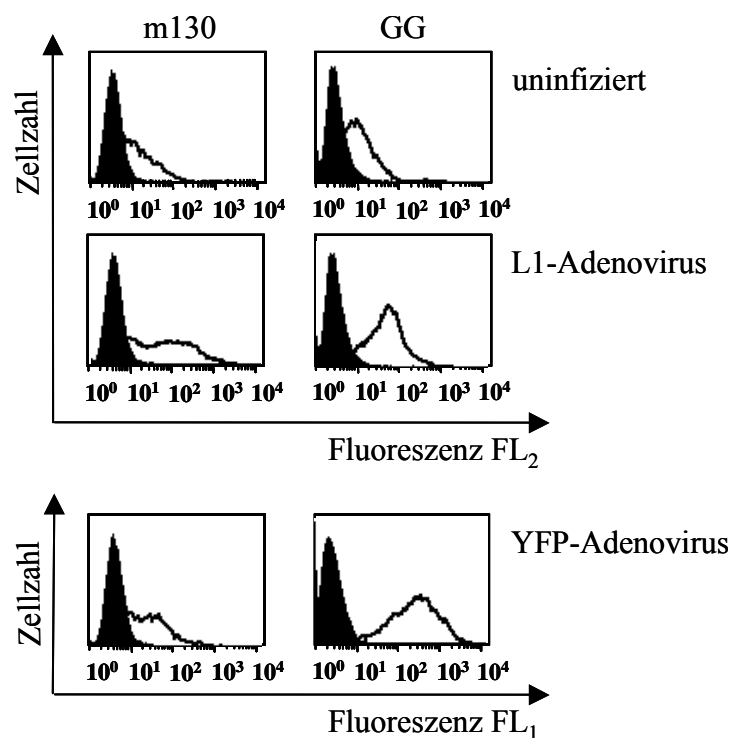
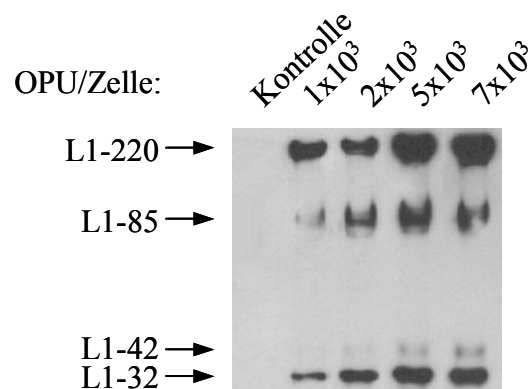


Abb. 37 : FACS-Analyse von Ovarialkarzinomlinien nach Infektion mit L1-Adenovirus bzw. YFP-Adenovirus. m130- und GG-Zellen wurden mit L1-Adenovirus ( $10^3$  OPU/Zelle) bzw. YFP-Adenovirus (1  $\mu$ l/ $10^6$  Zellen) infiziert. 48 h nach Infektion wurde die Oberflächenexpression von L1 mit mAk L1-11A und einem am-PE konjugierten Zweitantikörper im FL<sub>2</sub>-Kanal nachgewiesen. Die Expression von YFP wurde direkt im FL<sub>1</sub>-Kanal analysiert.

Wie in **Abb. 37** dargestellt, führt die Infektion mit L1-Adenovirus zu einer deutlich verstärkten Expression von L1 an der Oberfläche der GG- und m130-Zellen. Auch das viral kodierte YFP wird an der Plasmamembran der beiden Ovarialkarzinomlinien stark exprimiert.

## 22 Nach Infektion mit L1-Adenovirus überexprimiertes L1 wird gespalten

Damit L1 seine migrationsfördernde Funktion ausüben kann, muss es, wie bereits beschrieben, membranproximal gespalten werden. In diese Spaltung ist die Metalloproteinase ADAM10 involviert (Mechtersheimer et al., 2001; **Abb. 30**). Nun war es also wichtig zu sehen, ob das nach Infektion überexprimierte L1 in den Ovarialkarzinomlinien durch endogenes ADAM10 gespalten werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden pro Ansatz  $5 \times 10^4$  m130-Zellen mit steigender Anzahl an Viruspartikeln infiziert und anschließend in einer 12-Loch-Platte ausgesät. 48 h nach Infektion wurden die Zellen abgenommen und in BOG-Lysispuffer lysiert. Das zellfreie Lysat wurde im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1 analysiert. Die deutlich verstärkte Expression von L1 ist auch im Lysat bereits ab  $10^3$  OPU/Zelle zu sehen. Außerdem sind sowohl L1-85, das durch Plasmin-vermittelte Spaltung entsteht, sowie das durch die Metalloproteinase ADAM10 vermittelte Spaltfragment L1-32 detektierbar. Durch eine steigende Anzahl an Viruspartikeln kann die Expression von L1 sogar noch weiter erhöht werden, zwischen  $5 \times 10^3$  und  $7 \times 10^3$  OPU/Zelle ist aber keine Steigerung mehr sichtbar (**Abb. 38**).



**Abb. 38** : Analyse der Spaltung von viral überexprimiertem L1. m130-Zellen wurden mit L1-Adenovirus mit steigender Anzahl an Viruspartikeln infiziert, 48 h nach Infektion wurden die Zellen in BOG-Lysispuffer lysiert. Der Nachweis von L1 im Western Blot erfolgt mit pAk  $\alpha$ -zytL1.

## 23 Virale Überexpression von L1 stimuliert die Migration

Mit dem Wissen, dass die Infektion mit L1-Adenovirus zur verstärkten Expression und Spaltung von L1 führt, sollte der Effekt der Überexpression von L1 auf die haptotaktische Migration von Ovarialkarzinomzellen untersucht werden. Dazu wurden GG-Zellen mit  $10^3$  OPU/Zelle des L1-Adenovirus infiziert. Um auszuschließen, dass bereits die Infektion die Migration beeinflusst, erfolgte eine Kontrollinfektion mit YFP-Adenovirus. Anschließend wurden die Zellen auf je 2 Kulturplatten pro Ansatz verteilt. Um zu testen, ob L1 nach membranproximaler Spaltung als lösliche Form in den Überstand abgegeben wird, wurde der erste Ansatz 24 h nach Infektion für weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Überstände wurden abgenommen und mit TCA gefällt, die Zellen lysiert. Eine Analyse der Zelllysate mit pAk  $\alpha$ -zytL1 bestätigt die Überexpression und Spaltung von L1 nach Infektion mit L1-Adenovirus in den GG-Zellen. Die verstärkte Spaltung von L1 nach Überexpression spiegelt sich auch in der Zunahme von löslichem L1 im Überstand wider (**Abb. 39A**). Die Analyse des Migrationsverhaltens der Zellen des zweiten Ansatzes auf Fibronektin zeigt, dass die Kontrollinfektion mit YFP die Migrationsrate der GG-Zellen kaum verändert. Die virusvermittelte Überexpression von L1 dagegen stimuliert die Migration deutlich (**Abb. 39B**). Auch die Migration von OVM- und SKOV3-Zellen kann durch die Infektion mit L1-Adenovirus verstärkt werden (Daten nicht gezeigt).

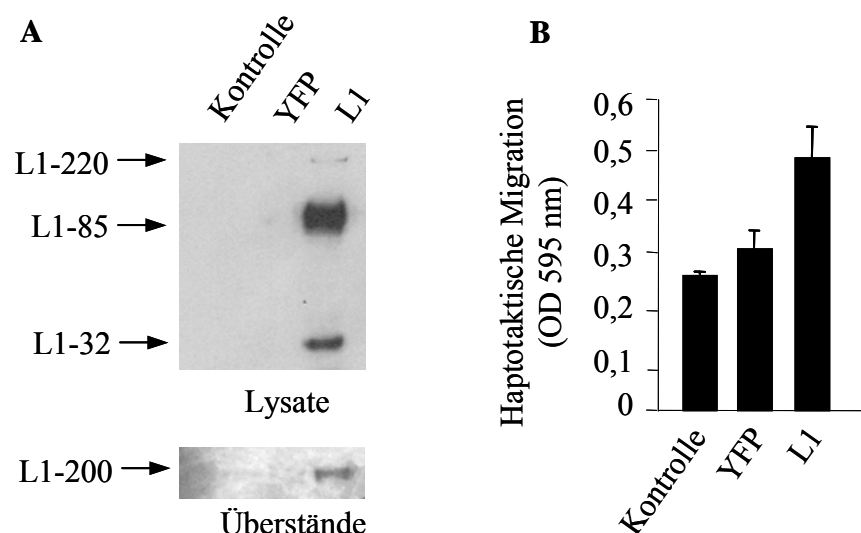


Abb. 39 : GG-Zellen wurden mit L1- bzw. YFP-Adenovirus infiziert, die Analyse erfolgte 48 h nach Infektion. (A) **Spaltung von L1**. L1 wurde im Zelllysate mit pAk  $\alpha$ -zytL1 nachgewiesen, lösliches L1 im Überstand wurde mit mAk L1-11A detektiert. (B) **Effekt der L1-Überexpression auf die haptotaktische Migration**. Die Zellen wurden in der haptotaktischen Migration auf Fibronektin untersucht, pro Transwellkammer wurden  $3 \times 10^5$  Zellen eingesetzt.

## 24 Nach Infektion mit L1-Adenovirus abgegebenes lösliches L1 stimuliert die Migration

S. Mechtersheimer aus unserer Arbeitsgruppe hatte auf die Bedeutung von löslichem L1 für die Migration hingewiesen. So können Zellen, die kein L1 exprimieren, durch exogene Gabe von löslichem L1 zur Migration stimuliert werden (Mechtersheimer et al., 2001). Es sollte nun geklärt werden, ob das nach Infektion mit L1-Adenovirus vermehrt abgegebene lösliche L1 funktionell aktiv ist und die Migration fördern kann. Dazu wurden  $3 \times 10^6$  GG-Zellen mit L1-Adenovirus in einer Konzentration von  $10^3$  OPU/Zelle bzw. mit  $3 \mu\text{l}$  YFP-Adenovirus infiziert, Kontrollzellen blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen jedes Ansatzes ausgesät, nach 24 h wurde das Wachstumsmedium durch je 15 ml serumfreies RPMI-Medium ersetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und bei 300g zentrifugiert, um umherschwimmende Zellen zu pelletieren. Der so geklärte Überstand wurde mit Hilfe eines Konzentrators auf  $350 \mu\text{l}$  aufkonzentriert. Schließlich wurden HEK293-Zellen, die kein endogenes L1 exprimieren, mit je  $100 \mu\text{l}$  der GG-Überstände bzw. RPMI-Medium versetzt und in der haptotaktischen Migration analysiert.

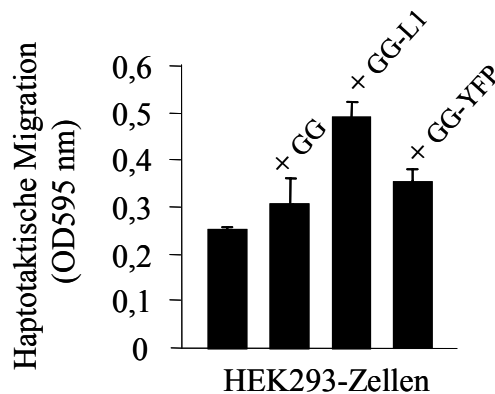


Abb. 40 : *Effekt des nach Infektion mit L1-Adenovirus abgegebenen löslichen L1 auf die haptotaktische Migration.* GG-Zellen wurden mit L1- bzw. YFP-Adenovirus infiziert oder blieben unbehandelt. Die Überstände der Zellen wurden gesammelt, aufkonzentriert und in der haptotaktischen Migration von HEK293-Zellen auf Fibronectin getestet. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt.

Wie in **Abb. 40** dargestellt, wird durch die Überstände der Kontrollzellen bzw. der Zellen nach YFP-Infektion die Migration der HEK293-Zellen gegenüber der basalen Migrationsrate nur wenig erhöht. Das nach virusvermittelter Überexpression vermehrt abgegebene L1 dagegen stimuliert die Migration der HEK293-Zellen. Damit wurde gezeigt, dass durch Infektion mit L1-Adenovirus eine Überexpression des Adhäsionsmoleküls erreicht wird. Dieses wird gespalten und als funktionell aktive lösliche Form in den Zellüberstand abgegeben.

## 25 Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN beeinflusst die Abgabe von löslichem L1 sowie das Migrationsverhalten

In L1-exprimierenden CHO- und HEK293-Zellen konnte die Spaltung von L1 durch eine dominant-negative Form von ADAM10 fast vollständig inhibiert werden, während die Überexpression von ADAM10 zu einer deutlich erhöhten Spaltung führte (Mechtersheimer et al., 2001; Gutwein et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in den Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 die L1-Spaltung durch den Metalloproteinase-Inhibitor TAPI-0 teilweise blockiert wird (**Abb. 27**). Zudem kann mit Hilfe spezifischer antisense-Oligonukleotide, die mit der Expression von ADAM10 interferieren, die Abgabe von löslichem L1 reduziert werden (**Abb. 30A**). Um die Beteiligung von ADAM10 bei der membranproximalen Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomlinien weiter zu untermauern, sollte der Effekt der Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN auf die Abgabe von L1-200 untersucht werden. Da sich der L1-Adenovirus bereits als effizienter Vektor für den Gentransfer erwiesen hatte, wurden Adenoviren konstruiert, die für ADAM10 bzw. ADAM10-DN kodieren. Beide Sequenzen lagen in pcDNA3-Vektoren vor und wurden nach Klonieren in den Transfervektor pShuttleCMV über homologe Rekombination in den viralen Vektor pAdEasy™ überführt. Die Selektion der Rekombinanten und die Amplifikation der Viren erfolgte wie für das L1-Adenovirus beschrieben.

Bei der dominant-negativen Form von ADAM10 wurde die Aminosäure Glutaminsäure an Position 384 (Zink-bindendes Motiv) durch Alanin ausgetauscht (Lammich et al., 1999). Diese Mutante ist proteolytisch nicht aktiv und kompetiert nach Überexpression mit endogenem ADAM10 um das Substrat. Um den Einfluss der viralen Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN auf die Abgabe von löslichem L1 zu untersuchen, wurden je  $8 \times 10^5$  OVM-Zellen mit steigender Anzahl an Viruspartikeln infiziert, anschließend in Kulturplatten ausgesät und bei 37°C kultiviert; uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. 24 h nach Infektion wurden die Zellen für weitere 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Zur Analyse von löslichem L1 wurden die Überstände abgenommen und TCA gefällt. Um zu testen, ob die Infektion mit den Adenoviren zur Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN führt, wurden die Zellen in BOG-Lysispuffer lysiert. Der Nachweis von ADAM10 im Western Blot erfolgte mit einem Antikörper gegen das c-terminale HA-tag, ADAM10-DN wurde mit einem Antikörper gegen das c-terminale FLAG-tag detektiert.

Wie **Abb. 41A** zeigt, können nach Infektion mit ADAM10-DN-Adenovirus Banden bei 97 ka und 66 kDa detektiert werden, die in den Kontrollzellen nicht erscheinen. Diese Banden korrelieren mit der pro- sowie der aktiven Form der Metalloproteinase. Nach

Infektion mit ADAM10-Adenovirus bestätigt eine spezifische Bande bei 97 kDa die Expression (**Abb. 41B**). Mit beiden Adenoviren wird bereits mit  $10^3$  OPU/Zelle eine deutliche Überexpression des jeweiligen Proteins erzielt. Als Ladungskontrolle wurde der Western Blot mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin überprobt.

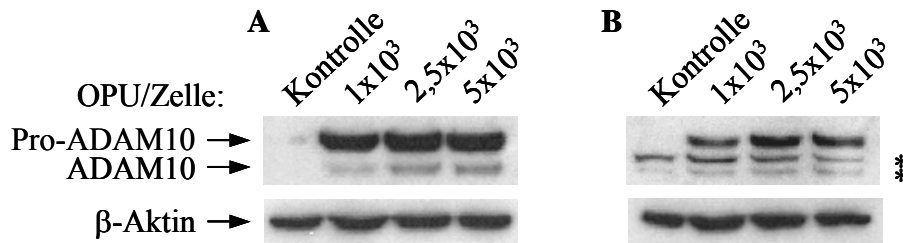


Abb. 41 : OVM-Zellen wurden mit ADAM10- bzw. ADAM10-DN-Adenovirus mit steigender Anzahl an Viruspartikeln infiziert. (A) Nachweis von ADAM10-DN-Flag. 48 h nach Infektion wurde die Expression von ADAM10-DN mit mAk  $\alpha$ -FLAG nachgewiesen. (B) Nachweis von ADAM10-HA. Der Nachweis von ADAM10 erfolgte mit mAk  $\alpha$ -HA. Als Ladungskontrolle wurde der Western Blot mit mAk  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin überprobt. (\* : unspezifische Banden)

Die Analyse der Überstände mit mAk L1-11A ergibt, dass nach Infektion mit ADAM10-DN-Adenovirus mit  $5 \times 10^3$  OPU/Zelle eine deutliche Abnahme des löslichen L1 zu beobachten ist (**Abb. 42A**). Bei einer Infektion mit  $1-2,5 \times 10^3$  OPU/Zelle wird nur eine minimale Reduktion von L1-200 erreicht, obwohl die Metalloproteinase bei dieser Viruspartikelzahl bereits in den OVM-Zellen exprimiert wird (**Abb. 43A**). Auch die Überexpression von ADAM10 führt ab  $5 \times 10^3$  OPU/Zelle zu einer sichtbar erhöhten Spaltung und Abgabe von L1 (**Abb. 42 B**).

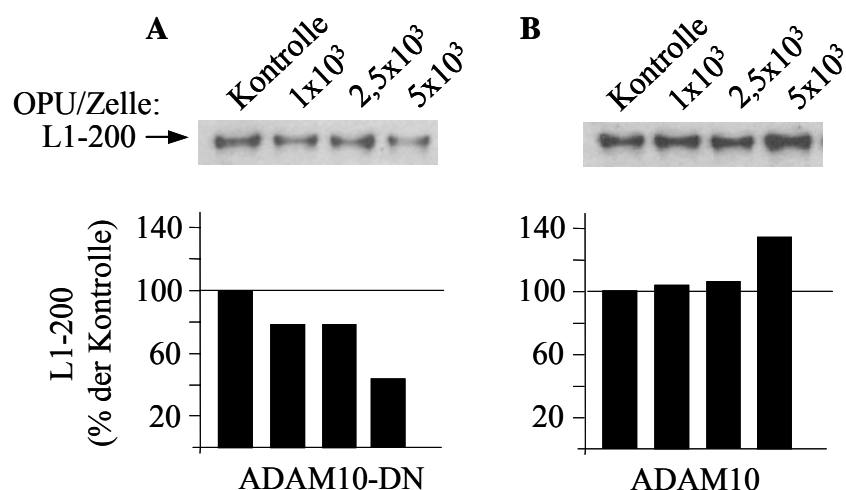
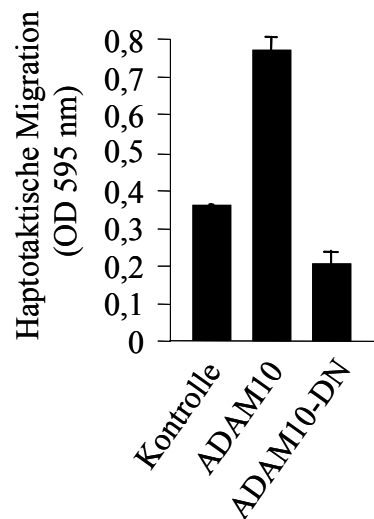


Abb. 42 : OVM-Zellen wurden mit ADAM10- bzw. ADAM10-DN-Adenovirus mit steigender Anzahl an Viruspartikeln infiziert. 48 h nach Infektion wurde im Western Blot lösliches L1 im Überstand mit mAk L1-11A nachgewiesen (A) Effekt der Überexpression von ADAM10-DN auf die Abgabe von löslichem L1. (B) Effekt der Überexpression von ADAM10 auf die Abgabe von löslichem L1.

Demnach kann auch in Ovarialkarzinomzellen die Menge an löslichem L1 durch die Überexpression von ADAM10 bzw. ADAM10-DN verändert werden.

Um nochmals den Zusammenhang zwischen löslichem L1 und dem Migrationsverhalten von Zellen herzustellen, wurden OVM-Zellen in einem zweiten Versuch mit den beiden Adenoviren infiziert und in die haptotaktische Migration eingesetzt. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Migrationsrate nach Infektion mit ADAM10-DN. Außerdem konnte nach Überexpression von ADAM10 eine stark erhöhte Migration beobachtet werden (**Abb. 43**).



**Abb. 43** : *Effekt der Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN auf die haptotaktische Migration.* OVM-Zellen wurden mit je  $2,5 \times 10^3$  OPU/Zelle infiziert. 48 h nach Infektion wurde das Migrationsverhalten der Zellen auf Fibronektin untersucht. Pro Transwellkammer wurden  $2 \times 10^5$  Zellen eingesetzt, uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Migration erfolgte für 16 h bei 37°C. (Daten in Zusammenarbeit mit D.Gast)

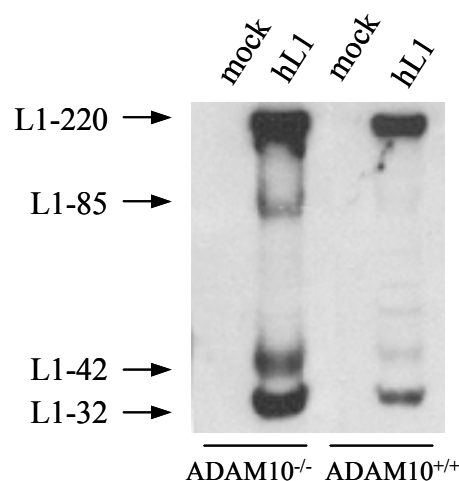
Die besten Effekte wurden jeweils mit einer Virenkonzentration von  $2,5 \times 10^3$  OPU/Zelle erzielt, obwohl im vorherigen Experiment erst bei  $5 \times 10^3$  OPU/Zelle eine deutliche Ab- bzw. Zunahme an löslichem L1 detektiert wurde. Möglicherweise wird die Infektionseffizienz durch zelluläre Parameter wie die Proliferationsrate oder Zellzyklusphasen beeinflusst.

Die Ergebnisse der Überexpression von ADAM10 und ADAM10-DN (**Abb. 42**) sowie der Inhibition der ADAM10-Expression durch spezifische antisense-Oligonukleotide (**Abb. 30**) zeigen erstmals eine Beteiligung der Metalloproteinase ADAM10 bei der membranproximalen Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomzellen. Außerdem konnte bestätigt werden, dass die Abgabe von löslichem L1 das Migrationsverhalten von Zellen beeinflusst, da sowohl durch Überexpression von L1 als auch ADAM10 die haptotaktische Migration deutlich verstärkt werden kann (**Abb. 39; 43**).

## 26 L1 wird auch in ADAM10-defizienten Fibroblasten gespalten

ADAM10 wurde als  $\alpha$ -Sekretase für APP beschrieben (Lammich et al., 1999) und ist außerdem in die Spaltung des zellulären Prion Proteins (PrP<sup>Z</sup>) involviert (Vincent et al., 2001). Sowohl im APP- als auch im PrP<sup>Z</sup>-Katabolismus wird aber die Beteiligung einer weiteren, noch nicht identifizierten Aktivität bei der konstitutiven Spaltung diskutiert (Lopez-Perez et al., 2001; Vincent et al., 2001). Um zu überprüfen, ob humanes L1 auch in ADAM10-defizienten Zellen gespalten werden kann, wurden ADAM10-knockout und wildtyp embryonale Mausfibroblasten mit L1-Adenovirus infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen in BOG-Lysispuffer lysiert und im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1 analysiert. Wie bereits für Maus-L1 beschrieben (P. Saftig, mündliche Mitteilung), wird auch humanes L1 in ADAM10-defizienten Fibroblasten membranproximal gespalten (**Abb. 44**).

Eine genauere Analyse von L1-32 im Gradientengel ergibt keine Größenunterschiede zwischen dem in ADAM10-knockout und in wildtyp Fibroblasten generierten zytoplasmatischen Spaltfragment (Daten nicht gezeigt). Die vorliegenden Ergebnisse zur Inhibierbarkeit der L1-Spaltung nach Blockade der ADAM10-Expression durch antisense-Oligonukleotide sowie Überexpression von ADAM10-DN in Ovarialkarzinomzellen lassen daher vermuten, dass abhängig vom Zelltyp oder Organismus verschiedene Metalloproteinasen die membranproximale Spaltung von L1 vermitteln.



**Abb. 44 : Überexpression und Spaltung von L1 in ADAM10-knockout und wildtyp Mausfibroblasten.** ADAM10-defiziente und wildtyp Mausfibroblasten wurden mit L1-Adenovirus infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen bei 4°C in BOG-Lysispuffer lysiert. L1 wurde im Western Blot mit pAk  $\alpha$ -zytL1 nachgewiesen.



## F DISKUSSION

Plasmamembranen verleihen Zellen deren Individualität, indem sie sie von ihrer Umgebung und gegeneinander abgrenzen. An Zelloberflächen finden dazu wichtige biologische Aktivitäten statt, wie z.B. die in der vorliegenden Arbeit beschriebene proteolytische Abspaltung der Ektodomäne des integralen Membranproteins L1. Weitere bekannte und gut studierte Beispiele sind APP und TNF $\alpha$ , die ebenfalls an der Zelloberfläche prozessiert werden (Esch et al., 1990; Massague und Pandiella, 1993). Dieser als *ectodomain shedding* bezeichnete Prozess erlaubt es der Zelle, ihr Oberflächenprofil einer veränderten Mikroumgebung anzupassen. Außerdem fungieren die löslichen Proteine als Mediatoren der Zell-Zell- sowie der Zell-EZM-Kommunikation. Zahlreiche Studien hatten darüber hinaus gezeigt, dass die nach Abspaltung der Ektodomäne generierten zytoplasmatischen Spaltfragmente durch  $\gamma$ -Sekretasen (Preseniline) prozessiert werden können. Durch diese *regulierte intramembrane Proteolyse* (RIP) entstehen intrazelluläre Domänen, welche die Genexpression beeinflussen (Heldin und Ericsson, 2001; Ebinu und Yankner, 2002). So bildet der intrazelluläre Teil von APP nach Prozessierung durch eine  $\gamma$ -Sekretase einen Komplex mit dem Adaptorprotein Fe65 sowie der Histon-Acetyltransferase Tip60, der die Transkription stimuliert (Cao und Südhof, 2001). Lai und Feng (2004) konnten zeigen, dass die Bindung von Neuregulin an Erb4 die Spaltung der Ektodomäne und anschließende Proteolyse des zytoplasmatischen Fragments durch eine  $\gamma$ -Sekretase induziert. Die intrazelluläre Domäne transloziert in den Zellkern und aktiviert die Expression von MBP (*myelin basic protein*) und somit die Reifung der Oligodentrozyten.

Für das Zelladhäsionsmolekül L1 wurde bereits beschrieben, dass die Spaltung der Ektodomäne lösliches L1 bereitstellt, das eine wichtige biologische Rolle in der Zellmigration spielt (Mechtersheimer et al., 2001). Nach der Spaltung verbleibt ein Fragment von 32 kDa in der Plasmamembran, welches sowohl die transmembrane als auch die zytoplasmatische Domäne enthält (Beer et al., 1999). Dieses Spaltfragment kann nicht nur in humanen Tumorklinen sondern auch *in vivo* nachgewiesen werden. Im sich entwickelnden Mausgehirn wird L1-32 am Tag 1 nach Geburt detektiert (Mechtersheimer et al., 2001), außerdem findet die Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomen statt (Fogel et al., 2003). In L1-exprimierenden CHO- und HEK293-Zellen ist die Metalloproteinase

ADAM10 in die Abspaltung der L1-Ektodomäne involviert (Mechtersheimer et al., 2000; Gutwein et al., 2003).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der L1-Spaltung sowie der Mechanismus der erhöhten Spaltung nach Cholesterinentzug näher untersucht.

## 1 Spaltung von L1 in Lipid Rafts

Solubilisiert man L1-CHO-Zellen in nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 bei 4°C, so kann nach Ultrazentrifugation im Dichtegradienten L1-220 sowie das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 teilweise in der sog. DIG-Fraktion (*detergent-insoluble glycolipid-rich domains*) detektiert werden. Diese Fraktion repräsentiert die zellulären Lipid Rafts, kleine Mikrodomänen, die durch laterale Assoziation von Cholesterin mit Sphingolipiden entstehen.

Eine Assoziation von L1 mit Lipid Rafts wurde bereits in der Literatur beschrieben. Im Maus-Cerebellum kann L1 *in vivo* zwischen Tag 8 bis Tag 28 nach Geburt in DRMs (*detergent resistant membranes*) detektiert werden. Hier erfordert die Migration des Wachstumskegels während der Entwicklung eine räumlich definierte Verteilung der DRMs. Störungen in der Integrität dieser Mikrodomänen im peripheren Bereich des Wachstumskegels inhibieren die Migration auf L1 und N-Cadherin. Die Zerstörung der DRMs des zentralen Bereichs hat dagegen keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten (Nakai und Kamiguchi, 2002). Dieses Beispiel zeigt, dass DRMs in verschiedenen Bereichen des Wachstumskegels auf Signale die von Zelladhäsionsmolekülen vermittelt werden unterschiedlich reagieren. Die Autoren vermuten außerdem, dass die Ausbildung eines Komplexes zwischen L1 und Axonin-1/TAG-1/TAX-1 in Lipid Rafts *in cis* Signale an src-Kinasen weiterleitet, die das Migrationsverhalten des Wachstumskegels regulieren. Gleichzeitig kann L1 außerhalb der DRMs mit  $\beta$ 1-Integrinen interagieren und so die Zellmotilität kontrollieren. APP (*alzheimer precursor protein*) lokalisiert ähnlich wie L1 nur teilweise in Lipid Rafts, der Hauptanteil befindet sich außerhalb dieser Mikrodomänen. Eehalt et al. (2003) zeigten, dass APP in den Lipid Rafts durch die  $\beta$ -Sekretase gespalten wird, während die Spaltung außerhalb durch eine  $\alpha$ -Sekretase vermittelt wird. Es ist also möglich, dass auch in Tumorzellen die Lokalisation von L1 innerhalb bzw. außerhalb der Lipid Rafts sowohl die Bindungspartner, die spaltende Proteinase als auch unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie Migration oder Adhäsion, determiniert.

Lipid Rafts spielen demnach nicht nur eine wichtige Rolle als Plattformen in der Signaltransduktion, vielmehr unterteilen sie die Plasmamembran in unterschiedliche Kompartimente und ermöglichen dadurch spezifische Akkumulation bzw. Ausschluss bestimmter Proteine.

Da die im Saccharosegradienten isolierte DIG-Fraktion die gesamten zellulären Lipid Rafts gleicher Dichte enthält, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob ADAM10 und L1 in identischen Mikrodomänen kolokalisieren. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass L1 und die spaltende Proteinase durch Lokalisation in unterschiedlichen Lipid Rafts voneinander getrennt werden. Für APP wurde postuliert, dass APP und die  $\beta$ -Sekretase BACE-1 in separaten Lipid Rafts lokalisieren und APP erst nach Endozytose und Fusion der Mikrodomänen in Endosomen gespalten wird (Ehehalt et al., 2003).

Der Hauptanteil von L1 und ADAM10 ist löslich in Triton X-100 und befindet sich daher außerhalb der Lipid Rafts. Dies könnte bedeuten, dass L1 und ADAM10 nur vorübergehend in die Mikrodomänen rekrutiert werden. Ein Beispiel der Regulation einer Metalloproteinase durch transiente Lokalisation in Lipid Rafts stellt MT1-MMP dar. Diese Metalloproteinase spielt eine wichtige Rolle in der perizellulären Degradation der EZM sowie der Spaltung verschiedener Oberflächenmoleküle wie E-Cadherin (Ito et al., 1999; Steinhusen et al., 2001) oder CD44 (Kajita et al., 2001). Rozanov et al. (2004) konnten zeigen, dass MT1-MMP nur transient mit Lipid Rafts assoziiert ist. Nach Deletion der zytoplasmatischen Domäne wird die Metalloproteinase hingegen dauerhaft in caveolinreiche Mikrodomänen rekrutiert. Damit hat MT1-MMP keinen Zugang mehr zu E-Cadherin und die Spaltung des Substrats ist blockiert. Dies wiederum hat zur Folge, dass sich Tumorzellen nicht mehr von neoplastischen Clustern lösen können und die Zellinvasion vermindert wird. Die strenge Kontrolle der proteolytischen Aktivität von MT1-MMP setzt offensichtlich die Lokalisation in verschiedenen Regionen der Plasmamembran voraus. Ähnlich könnte die ADAM10-vermittelte Spaltung von L1 durch transiente Assoziation mit Lipid Rafts reguliert werden.

Der genaue Mechanismus der Rekrutierung von transmembranen Proteinen wie L1 in Lipid Rafts ist noch immer unklar. Für Neurofascin, ein Mitglied der L1-Familie, konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation in Lipid Rafts teilweise von der Palmitoylierung des Cysteins<sup>1213</sup> in der transmembranen Domäne abhängt (Ren und Bennett, 1998); dieses Cystein ist in L1 konserviert. Da Palmitin ähnlich wie die Fettsäureketten GPI-geankerter Moleküle gesättigt ist, sollten palmitylierte Moleküle ebenfalls präferentiell mit den *liquid-*

*ordered* Lipid Rafts assoziieren (McConville und Ferguson, 1993). Obwohl die C1213L-Mutante von Neurofascin in Fraktionen höherer Dichte als die Wildtypform lokalisiert, befindet sich C1213L immer noch angereichert in DIGs. Unveröffentlichte Daten von S. Schlich aus unserem Labor zeigen, dass die Mutagenese des konservierten Cysteins zu Alanin einen ähnlichen Effekt auf das *floating*-Verhalten von L1 hat. Dies macht deutlich, dass neben der Palmytylierung eventuell Protein-Interaktionen eine Assoziation von Neurofascin bzw. L1 mit Lipid Rafts ermöglichen. Im Cerebellum interagiert L1 mit dem GPI-geankerten Molekül F3/F11/contactin und wird möglicherweise so in Lipid Rafts rekrutiert (Olive et al., 1995).

Die Integrität der Lipid Rafts ist abhängig vom Cholesteringehalt der Membran (Simons und Ikonen, 1997; Jacobson und Dietrich, 1999; London und Brown, 2000). Obwohl die einstündige Behandlung mit MCD den Cholesteringehalt von L1-CHO-Zellen auf etwa 45 % der Kontrollzellen reduziert, bleibt der Anteil an raft-assoziiertem L1 unverändert. Diese Beobachtung kann viele Ursachen haben. In der Membran von Enterozyten existieren Lipid Rafts als cholesterinunabhängige Domänen (Hansen et al., 2001). Ilangumaran und Hoessli (1998) berichten ebenfalls, dass der Entzug von Cholesterin die Schwebedichte von Thy-1 und GM1 im Saccharosegradienten nicht verändert. Die Autoren vermuten, dass die Dichte der DRMs nicht durch das mittels MCD entzogene Cholesterin bestimmt wird. Zahlreiche Studien zeigen, dass die Wahl des nicht-ionischen Detergenz das *floating*-Verhalten von Proteinen im Dichtegradienten bestimmt. So ist PLP (Proteolipid Protein) beispielsweise nach Lyse in CHAPS bei 4°C mit DIGs assoziiert aber löslich in Triton X-100 (Simons et al., 2000; Kim und Pfeiffer, 1999; Taylor et al., 2002). Offensichtlich existieren also unterschiedliche Lipid Rafts, die sich sowohl in ihrem Cholesteringehalt als auch in der Protein-Lipid-Zusammensetzung unterscheiden. Dies macht deutlich, dass die häufig angewandte Methode der Extraktion in nicht-ionischen Detergenzien bei 4°C mit anschließender Zentrifugation im Dichtegradienten zur Isolierung von DIGs das tatsächliche Bild der zellulären Lipid Rafts verzerren kann.

Mikrodomänen sind nicht auf die Plasmamembran beschränkt, sondern existieren bereits im TGN (van Meer und Simons, 1988; Simons und Ikonen, 1997). Von dort werden die Lipid Rafts in sekretorischen Vesikeln u.a. zur Plasmamembran transportiert. Dabei bildet sich ein Konzentrationsgradient von Cholesterin und Sphingolipiden entlang des sekretorischen Weges, mit zunehmender Anreicherung hin zur Plasmamembran, aus (Liscum und Munn, 1999; van Meer und Holthuis, 2000). Möglicherweise *floaten* diese

Vesikel bis in die DIG-Fraktion, obwohl sie die Zelloberfläche noch nicht erreicht haben. Falls L1-32 mit diesen sekretorischen Vesikeln assoziiert ist, würde dies erklären, weshalb das zytoplasmatische Spaltfragment der DIG-Fraktion in unstimulierten Zellen nicht biotinyliert ist.

## 2 Mechanismen der L1-Spaltung

Verschiedene Analysemethoden weisen darauf hin, dass die Spaltung von L1 nicht nur an der Plasmamembran, sondern bereits im Golgi/TGN stattfindet. Einige Studien hatten bereits gezeigt, dass APP durch ADAM10 an der Zelloberfläche gespalten wird (Sisodia, 1992; Lammich et al., 1999). Wenig später beschrieben Skovronsky et al. (2000) die Spaltung von APP im Golgi/TGN durch ADAM10 oder ADAM17. In diesem Kompartiment erfolgt außerdem die Prozessierung der Metalloproteinasen durch Abspaltung der Prodomäne (Lum et al., 1998; Roghani et al., 1999; Kang et al., 2002). Die zinkabhängige Metalloproteinase BMP-1 (*bone morphogenetic protein*) wird ebenfalls im TGN aktiviert. Weiterhin vermuten die Autoren, dass BMP-1 bereits intrazellulär katalytisch aktiv ist (Leighton und Kadler, 2003). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte durch Subfraktionierung von L1-CHO-Zellen die aktive Form von ADAM10 im Golgi/TGN detektiert werden. Außerdem kolokalisiert hier das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 mit der Metalloproteinase. Die Behandlung mit PMA stimuliert die Spaltung von L1 hauptsächlich an der Plasmamembran und zu einem geringen Anteil intrazellulär. Jolly-Tornetta und Wolf (2000) hatten ebenfalls beschrieben, dass PMA die  $\alpha$ -Spaltung von APP an der Zelloberfläche und im Golgi/TGN reguliert.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, kann die L1-Spaltung durch Reduktion des zellulären Cholesteringehalts mittels MCD stimuliert werden. Auf den ersten Blick stimmen diese Daten mit der Beobachtung von Kojro et al. (2000) überein. Die Autoren hatten postuliert, dass die verstärkte Spaltung von APP durch ADAM10 durch die erhöhte Fluidität der Membran nach Cholesterinentzug bedingt ist. Die in meiner Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigen jedoch, dass MCD die Freisetzung von Vesikeln induziert, in denen sowohl ADAM10 als auch L1 detektiert werden kann. Dies könnte ein wichtiger Weg der Spaltung von L1 sein. Nach Biotinylierung der Oberflächenproteine und anschließender Behandlung mit MCD kann ausgeschlossen werden, dass die Vesikel von der Zelloberfläche abgeschnürt werden. Darüber hinaus stimuliert MCD die Spaltung von L1 nicht an der Oberfläche sondern im Golgi/TGN. Dieses Ergebnis war erstaunlich, da MCD als membranimpermeables Reagenz nur das Cholesterin der Plasmamembran

entziehen kann (Ohtani et al., 1989; Kilsdonk et al., 1995). Dennoch hatten einige Studien gezeigt, dass MCD zur partiellen Fragmentierung des Golgi-Apparates in vesikuläre Strukturen führt (Hansen et al., 2001). Bisher ist jedoch nicht geklärt, ob und über welchen Mechanismus die morphologische Veränderung des Golgi/TGN die Spaltung von L1 stimuliert. Es wäre denkbar, dass der Cholesterinentzug zusätzlich zelluläre Signalwege aktiviert, die letztendlich in einer erhöhten Aktivität von ADAM10 im Golgi/TGN resultieren. Furuchi und Anderson (1998) hatten beschrieben, dass die Depletion von Cholesterin die Aktivität von Erk (*extracellular regulated kinase*) erhöht. Die Spaltung von L1 kann partiell durch einen MAP-Kinase-Inhibitor blockiert werden. (Gutwein et al., 2000). Auch über den Mechanismus der erhöhten Vesikelfreisetzung nach MCD-Behandlung kann nur spekuliert werden. De Strooper et al. (1993) hatten gezeigt, dass die  $\alpha$ -Sekretase sowohl im Golgi als auch in sekretorischen Vesikeln lokalisiert. Lösliches APP $\alpha$  wird innerhalb des sekretorischen Weges vom Golgi/TGN zur Plasmamembran generiert und sekretiert (Xu et al., 1995; Sambamurti et al., 1992; Kouchi et al., 1998). Ausgehend von den Daten der vorliegenden Arbeit kann folgende Hypothese aufgestellt werden. L1 wird im Golgi/TGN sowie in sekretorischen Vesikeln auf dem Weg zur Zelloberfläche gespalten; nach Transmigration durch die Plasmamembran werden diese Vesikel freigesetzt.

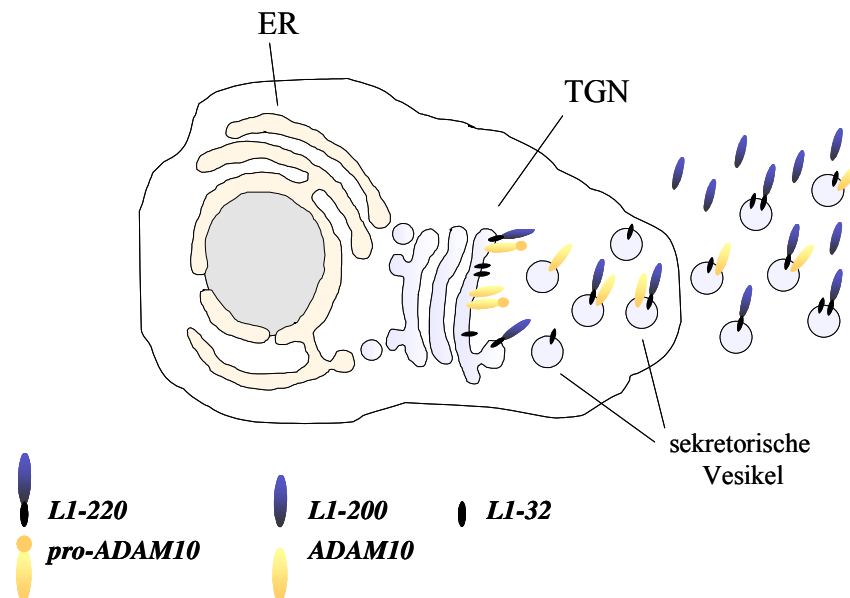


Abb. 45 : Modell zur Abgabe von L1 und ADAM10 in Vesikeln.

Die Behandlung mit MCD erhöht dabei einerseits die Rate der Vesikelabgabe im Golgi/TGN, andererseits wird durch die erhöhte Fluidität die Exozytose dieser Vesikel erleichtert (siehe **Abb. 45**). Das Ausschleusen der Vesikel erfolgt vermutlich über einen SNARE-unabhängigen Mechanismus, da Lang et al. (2001) beschrieben hatten, dass der Entzug von Cholesterin zur Dispersion der SNARE-Komplexe in der Plasmamembran führt und dadurch die Exozytose sekretorischer Vesikel vermindert. Hemler (2003) spekuliert, dass Tetraspan-reiche Mikrodomänen die Fusion von Vesikeln mit der Membran ermöglichen. Außerdem hatten Claas et al. (2001) gezeigt, dass die Depletion von Cholesterin zur Bildung von Vesikeln führt, die Tetraspans enthalten.

### **3 Einfluss der ADAM10-vermittelten Spaltung von L1 auf die Progression von Ovarialkarzinomen**

In vielen Karzinomen des Uterus und der Ovarien wird die Metalloproteinase ADAM10 mit L1 ko-exprimiert, außerdem korreliert die Anwesenheit von ADAM10 im Tumorgewebe mit löslichem L1 im Serum der Patientinnen. Darüber hinaus kann das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 in Tumorslysaten detektiert werden (Fogel et al., 2003). Diese Daten zeigen, dass L1 *in vivo* gespalten wird und dass die Metalloproteinase ADAM10 möglicherweise in die membranproximale Spaltung von L1 involviert ist. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen ADAM10, der Spaltung von L1 und dem Migrationsverhalten von Tumorzellen anhand von Ovarialkarzinomlinien analysiert. Zur effizienten Überexpression von L1 und ADAM10 wurden Adenoviren konstruiert, die für L1 sowie die Metalloproteinase kodieren.

In Ovarialkarzinomlinien wird eine verstärkte Spaltung von L1 nach Überexpression beobachtet. Dies wird sowohl in der Zunahme des zytoplasmatischen Spaltprodukts L1-32 wie auch des löslichen L1-200 im Überstand deutlich. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe hatten bereits die an der membranproximalen Abspaltung der Ektodomäne von L1 beteiligte Metalloproteinase auf Mitglieder der ADAM-Familie eingegrenzt (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000). S. Mechttersheimer konnte zeigen, dass in L1-exprimierenden HEK293- und CHO-Zellen die Metalloproteinase ADAM10 bei diesem Prozess beteiligt ist. Auch in Ovarialkarzinomlinien kann die Spaltung von L1 durch den Metalloproteinase-Inhibitor TAPI-0 teilweise inhibiert werden. FACS-Analysen zeigen, dass alle untersuchten Ovarialkarzinomlinien endogenes ADAM10 an ihrer Oberfläche exprimieren. Durch Blockade der ADAM10-Expression mit spezifischen antisense-Oligonukleotiden wird die Abgabe von löslichem L1 in OVM-Zellen nahezu vollständig inhibiert. Auch die

Überexpression einer katalytisch inaktiven Form von ADAM10 reduziert die Abspaltung der L1-Ektodomäne in diesen Zellen deutlich. Entsprechend wird nach Überexpression von ADAM10 eine erhöhte Abgabe von löslichem L1 beobachtet. Die Daten der Migrationsversuche zeigen, dass die Menge an freigesetztem L1 die Zellmigration beeinflusst. So kann sowohl durch Überexpression von L1 als auch ADAM10 neben der verstärkten L1-Spaltung eine verbesserte Migration auf Fibronectin erreicht werden. Durch Blockade der Aktivität der spaltenden Proteinase wird die Abgabe von L1 reduziert und damit das Migrationspotential der Tumorzellen beeinträchtigt. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch in Ovarialkarzinomlinien die ADAM10-vermittelte Spaltung von L1 den Migrationsprozess reguliert. Unveröffentlichte Daten von D. Gast aus unserem Labor weisen darauf hin, dass nicht nur die lösliche Ektodomäne, sondern auch das zytoplasmatische Fragment, das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst.

Lösliches L1 kann durch Bindung an Laminin oder Neurocan in die benachbarte EZM eingebaut werden, um den Zellen als Substrat für die Integrin-abhängige Adhäsion und Migration zu dienen (Montgomery et al., 1996, Oleszewski et al., 2000; Beer et al., 1999). Mechtersheimer et al. (2001) konnten den Mechanismus der durch die L1-Spaltung erhöhten Zellmigration aufklären. Nach der membranproximalen Spaltung durch ADAM10 bindet das RGD-Motiv in der 6. Ig-Domäne des löslichen L1 in autokriner oder parakriner Weise an das  $\alpha v \beta 5$ -Integrin. Dadurch werden noch unbekannte Integrin-vermittelte Signaltransduktionswege ausgelöst, die in einer verstärkten Migration der Zellen resultieren. Dies konnte für verschiedene Substrate, wie Fibronectin, Laminin und Vitronectin, gezeigt werden.

Übertragen auf die Situation im Tumorpatienten könnte dies bedeuten, dass vermehrt abgegebenes L1 die Migration der Tumorzellen auf Proteinen der EZM fördert und damit die Bildung von Metastasen begünstigt. Tatsächlich korreliert eine hohe Konzentration von löslichem L1 im Serum der Patientinnen mit besonders aggressiven Tumoren und einer schlechten Prognose (Fogel et al., 2003). Damit stellen sowohl L1 als auch ADAM10 mögliche neue Angriffspunkte für die Therapie von Ovarialkarzinomen dar.

Zahlreiche Studien hatten bereits eine Verbindung zwischen der Metalloproteinase-vermittelten Ektodomänenspaltung und dem Migrationsverhalten von Zellen hergestellt. So wird die Funktion von Netrin, einem Chemoattraktant für Axone, durch die Spaltung seines Rezeptors DCC (*deleted in colorectal cancer*) reguliert. Die Inhibition des proteolytischen Prozesses führt zur Stabilisierung von DCC und fördert das Auswachsen der Axone (Galko und Tessier-Lavigne, 2000). Die Spaltung von HB-EGF ist Voraussetzung für die Migration der Keratinozyten während der Wundheilung (Tokumaru et al.,



2000). Wie bereits erwähnt ist ADAM10, neben anderen Mitgliedern dieser Proteinasefamilie, in der als Transaktivierung bezeichneten Stimulation des EGFR über G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt. Bei diesem Prozess stimuliert die Bindung von Liganden, wie LPA, Bombesin und Amphiregulin an diese Rezeptoren die Aktivität der Metalloproteinasen. Nach membranproximaler Spaltung von pro-HB-EGF und pro-TGF $\alpha$  übermitteln die löslichen Moleküle Signale an den EGFR, die Zellmigration induzieren und Auswirkungen auf andere zelluläre Ereignisse haben (Yan et al., 2002). Schäfer et al. (2004) konnten zeigen, dass die LPA-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR durch dominant-negative ADAM-Mutanten zelltypspezifisch blockiert werden kann. So wird die LPA-induzierte Migration der Nierenkarzinomlinie A498 durch den Metalloproteinase-Inhibitor BB94 sowie eine dominant-negative Form von ADAM17 verhindert, während die Transaktivierung des EGFR in ACHN-Zellen durch ADAM10-DN inhibiert wird.

ADAM10 ist aber nicht nur für das Tumorgeschehen von Bedeutung, sondern spielt auch in vielen Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle. Die extrazelluläre Notch-Domäne kann durch ADAM10 und ADAM17 abgespalten werden. (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Nach anschließender Prozessierung durch eine  $\gamma$ -Sekretase wandert die zytoplasmatische Domäne von Notch in den Zellkern und aktiviert in Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor CSL (RBP-Jk/CBF1) das Notch-abhängige genetische Programm (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Blokzijl et al., 2003). ADAM10-knockout Mäuse sterben an Tag 9.5 nach Geburt an schweren Entwicklungsdefekten des Gehirns, der Somiten und des Herzkreislaufsystems (Hartmann et al., 2002).

#### **4 Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomlinien**

In L1-CHO-Zellen wird die Spaltung von L1 durch PMA um das etwa 5-fache erhöht. Diese induzierte Spaltung findet an der Zelloberfläche statt, da sowohl das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 wie auch die freigesetzte Ektodomäne L1-200 biotinylierbar sind. In Ovarialkarzinomlinien dagegen kann die L1-Spaltung durch PMA kaum stimuliert werden; gleichzeitig ist das zytoplasmatische Spaltfragment L1-32 auch nach PMA-Behandlung kaum biotinylierbar. Weiterhin wurde belegt, dass die aktive Form von ADAM10 an der Plasmamembran lokalisiert. Außerdem ist die Spaltung von L1 an der Oberfläche dieser Zellen grundsätzlich möglich, da das durch Plasmin-vermittelte Spaltung generierte L1-85 biotinyliert werden kann (Daten nicht gezeigt).

Unter der Voraussetzung, dass L1-32 in den Ovariallinien in gleichem Maße zugänglich für Biotin ist wie in den L1-CHO-Zellen, kann folgendes angenommen werden. Sowohl in

L1-CHO- wie auch in den Ovarialkarzinomzellen findet die *konstitutive* Spaltung von L1 nur zu einem geringen Anteil an der Plasmamembran statt, erst die Behandlung mit PMA induziert die Oberflächenspaltung. Diese *regulierte* L1-Spaltung ist in den Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 offensichtlich gestört. Für APP wurde beschrieben, dass PMA über den Proteinkinase C (PKC)-abhängigen Signalweg die enzymatische Aktivität einer  $\alpha$ -Sekretase, wahrscheinlich ADAM17, hochreguliert (Buxbaum et al., 1998; Black et al., 1997; Moss et al., 1997). In Analogie dazu kann spekuliert werden, dass in unstimulierten Zellen die Spaltung von L1 durch ADAM10 vermittelt wird, während die Behandlung mit PMA eine zweite Proteinase, ADAM17, aktiviert. Dafür sprechen die Befunde von Doedens et al. (2003), nach denen TGF $\alpha$  in unstimulierten Zellen nicht durch ADAM17 gespalten wird. Auch hier induziert erst die Behandlung mit PMA die enzymatische Aktivität dieser Metalloproteinase. Die Autoren hatten zudem beschrieben, dass in ADAM17<sup>-/-</sup>-Zellen keine induzierbare Spaltung möglich ist. Weiterhin zeigen die hier vorgestellten Daten der mit L1-Adenovirus infizierten ADAM10-knockout Fibroblasten, dass L1 neben ADAM10 durch eine weitere Proteinase gespalten werden kann. Diese spaltet die identische oder eine ähnliche Sequenz von L1, da keine Größenunterschiede zwischen den in ADAM10-knockout oder wildtyp Fibroblasten generierten Spaltfragmenten L1-32 festgestellt werden. Die Identität dieser Proteinase ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich um ADAM17 oder MT1-MMP. Für APP wurde bereits gezeigt, dass dieses Protein sowohl durch ADAM10 als auch ADAM17 in der  $\alpha$ -Spaltstelle prozessiert wird (Lammich et al., 1999; Black et al., 1997; Slack et al., 2001). Eventuell ermöglicht also erst die Beteiligung mehrerer Proteinasen die strenge Kontrolle proteolytischer Prozesse. Übertragen auf die Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 könnte dies bedeuten, dass die ADAM17-vermittelte Spaltung von L1 an der Zelloberfläche nicht aktiviert werden kann. Dies steht im Gegensatz zu den L1-CHO-Zellen, bei denen eine stark erhöhte Spaltung von L1 nach PMA-Behandlung auftritt. Sowohl OVM- als auch SKOV3-Zellen exprimieren ADAM17 (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise wird die spaltende Proteinase, ADAM10 oder ADAM17, an der Plasmamembran der Ovarialkarzinomlinien durch noch nicht identifizierte Proteine komplexiert und damit inaktiviert. Weiterhin ist denkbar, dass nicht die Proteinase inhibiert wird, sondern dass L1 in einer nicht zugänglichen Konformation vorliegt. Bennett et al. (2000) zeigten, dass L-Selektin durch Interaktion mit einer Protein-Disulfid-Isomerase in einer nicht-spaltbaren Konformation gehalten wird. Phenyl-Arsin-Oxid modifiziert die dabei ausgebildeten Disulfidbrücken und induziert die Spaltung von L-Selektin. Schließlich

könnten L1 und die PMA-induzierbare Proteinase durch Lokalisation in unterschiedlichen Lipid Rafts voneinander getrennt werden.

## 5 Die Abgabe von L1 und ADAM10 in Vesikeln

90 % der malignen Ovarialkarzinome entstehen durch Transformation des Oberflächenepithels des Ovars (Auersberg, 1998). Dabei wird der ständigen Ovulation besondere Bedeutung beigemessen, da die mit diesem Prozess einhergehende Beschädigung und Neubildung des Oberflächenepithels die Wahrscheinlichkeit genetischer Veränderungen stark erhöht. Werden die Oberflächenzellen in die Ovulationswunde eingeschlossen, bilden sich sog. Einschlusszysten im Ovarialstroma aus. Diese werden als Ausgangspunkt der neoplastischen Progression diskutiert, da hier die als *Müller'sche Metaplasie* bezeichnete bösartige Veränderung des Oberflächenepithels stattfinden kann (Murdoch et al., 1994; zusammengefasst in Auersberg et al., 2001). Kommt es, ähnlich dem Eisprung, zur Ruptur dieser Zysten, werden die malignen Zellen in den Bauchraum geschwemmt. Dort bilden sie Tumore aus und heften sich an das Mesothel an, welches die Bauchhöhle auskleidet. S. Schlich aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass L1 bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielt (Schlich et al., Cancer Res., zur Veröffentlichung eingereicht). Nachdem die Tumorzellen das Mesothel durchwandert haben, stoßen sie auf die darunterliegende extrazelluläre Matrix vor, um von dort durch die Lymphgefäße in verschiedene Organe zu metastasieren (Niedbala und Sartorelli, 1989; Hamilton, 1992; Cannistra, 1993). Um diese Hindernisse zu überwinden, müssen die migrierenden Zellen die EZM degradieren. Dabei kommt den MMPs sowie dem Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator (uPA) die bedeutendste Rolle zu (Wilhelm et al., 1995; Young et al., 1996; Basbaum und Werb, 1996; Stack et al., 1998).

Bereits 1969 zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen an invasiven Maus-Brustkarzinomzellen *in vivo* den proteolytischen Abbau von Bindegewebe durch Membranvesikel in unmittelbarer Nähe der einwandernden epithelialen Zellen (Tarin, 1969). Arbeiten von Dolo, Ginestra und Vittorelli bestätigen die Bedeutung von proteolytisch aktiven Vesikeln für die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen und damit den Verlauf der Tumorerkrankung. In Membranvesikeln, die aus dem Serum einer Ovarialtumorpatientin isoliert wurden, konnten gelatinolytisch aktives MMP-2, MMP-9, Plasmin sowie uPA detektiert werden (Dolo et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Rate der Vesikelfreisetzung sowie deren proteolytische Kapazität mit der Invasionsfähigkeit humaner Tumorlinien *in vitro* und der Malignität von Ovarialkarzinomen *in vivo* korreliert

(Ginestra et al., 1998, 1999). So setzt das hochinvasive klarzellige Karzinom sehr hohe Mengen an Vesikeln frei, während bei gutartigen Veränderungen des Ovars kaum Vesikel detektiert werden können. Neben Matrix-degradierenden Metalloproteinasen kann die  $\beta$ 1-Intergrinuntereinheit in Vesikeln detektiert werden (Dolo et al., 1998; Taraboletti et al., 2002). Da Integrine die wichtigste Klasse von Rezeptoren für Komponenten der EZM darstellen, können die Vesikel vermutlich mit der EZM interagieren. Dies ermöglicht den lokal begrenzten Abbau der EZM durch die Metalloproteinasen. Neueste Untersuchungen bestätigen den Zusammenhang zwischen der Abgabe von Vesikeln und dem Migrationsverhalten von Zellen. Durch Progesteron kann die Freisetzung von Vesikeln inhibiert und die Invasionsfähigkeit von SKOV3-Zellen im Matrigel drastisch reduziert werden (McDonnell et al., 2003).

Vesikel verbessern aber nicht nur das Invasionspotential von Tumorzellen, sie werden auch genutzt, um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen. Bereits zu Beginn der 70er Jahre wurde beobachtet, dass Lymphknoten in der Nähe wachsender Tumore hoch angereichert sind mit Membranvesikeln und offensichtlich funktionell beeinträchtigt sind (Alexander, 1974; Currie, 1976). Inzwischen belegten zahlreiche weitere Studien die Bedeutung von extrazellulären Vesikeln in der Ausbildung der Immuntoleranz gegenüber Tumoren (Taylor und Black, 1985; Dolo et al., 1998). Möglicherweise verändern auch Ovarialkarzinomzellen *in vivo* ihr Oberflächenprofil durch die Abgabe von L1 in Vesikeln, um einem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen.

Vesikel werden von der Plasmamembran lebender Tumorzellen abgeschnürt (Shinkai und Akedo, 1972; Dvorak et al., 1981; Taylor et al., 1983), unterscheiden sich aber in der Protein-Lipid-Komposition von der Plasmamembran. Van Blitterswijk et al. (1979; 1982) beschrieben, dass Vesikel angereichert sind mit Cholesterin und Sphingomyelin und einen geringeren Gehalt an Phospholipiden aufweisen. Die Bildung der Vesikel findet offensichtlich in bestimmten Bereichen der Tumorzelloberfläche statt, die angereichert sind mit Cholesterin und Tumorantigenen (van Blitterswijk et al., 1982; Dolo et al., 1998). Noch ist nicht geklärt, ob diese cholesterinreichen Membranbereiche mit den Lipid Rafts identisch sind.

Wie bereits erwähnt, ist die Abgabe von extrazellulären Vesikeln ein vitaler Prozess, der vor allem in Zellen des Immunsystems stimuliert werden kann (Dainiak, 1991). In neoplastischen Zellen wird dagegen eine kontinuierliche Vesikulierung beobachtet (Taylor

und Black, 1986). Die Mechanismen, die zur erhöhten Freisetzung von Vesikeln führen, sind trotz intensiver Forschung weitgehend unbekannt.

In Endothelzellen kann die Abgabe von Vesikeln durch Wachstumsfaktoren wie FGF-2 (*fibroblast growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder Serum erhöht werden (Taraboletti et al., 2002). In Tumorzellen wird die Vesikelproduktion ebenfalls durch Serumbestandteile wie EGF oder Insulin stimuliert. Außerdem scheint der Prozess der Vesikelabgabe von der Anwesenheit proteolytischer Enzyme abhängig zu sein, da der Metalloproteinase-Inhibitor Bathophenanthrolin die Vesikulierung reduziert (Cassara et al., 1998). 8-Cl-cAMP und Retinsäure inhibieren das Wachstum vieler Tumorlinien und induzieren deren Differenzierung. Da durch diese beiden Reagenzien auch die Abgabe von Vesikeln vermindert wird, kann angenommen werden, dass die verstärkte Proliferation sowie die fehlende Differenzierung von Tumorzellen die erhöhte Vesikulierung verursachen (Cassara et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit führt außerdem die Inkubation von L1-CHO-Zellen in Suspension zur massiven Freisetzung von Vesikeln, in denen zusätzlich L1-85 detektiert werden kann. Dieses Fragment entsteht nach Spaltung durch Plasmin in der dritten FNIII-Domäne. Da Plasmin an der Zelloberfläche aus Plasminogen entsteht, ist die Anwesenheit von L1-85 indikativ dafür, dass diese Vesikel von der Plasmamembran stammen. Möglicherweise geben Tumorzellen, die ihren Substratkontakt verloren haben und im Aszites schwimmen, vermehrt L1-haltige Vesikel ab. Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen der Fluidität der Plasmamembran und der Rate der Vesikelfreisetzung. Armstrong et al. (1988) zeigten an Lymphozyten, dass die erhöhte Fluidität der Plasmamembran nach Inkubation mit einer Lipidemulsion in einer verstärkten Vesikulierung resultiert. Wie bereits erwähnt, reduziert die Behandlung mit Progesteron die Abgabe von Vesikeln (McDonnel et al., 2003). Progesteron kann mit den Fettsäureketten der Phospholipide interagieren und diese immobilisieren. Dadurch wird die laterale Mobilität der Lipide und somit die Fluidität der Plasmamembran gesenkt. Diese Verhärtung erschwert die transmembrane Migration exozytotischer Vesikel und damit deren Ausschüttung. Andererseits wird die Fluidität der Membran durch einen verminderten Cholesteringehalt erhöht (Shinitzky, 1984; Van Blitterswijk et al., 1982), wodurch die Vesikulierung entsprechend erleichtert werden sollte. Tatsächlich kann ein Zusammenhang zwischen dem Cholesteringehalt und der Menge an abgegebenen Vesikeln hergestellt werden. In L1-CHO-Zellen wird durch die einstündige Behandlung mit MCD der Gehalt an Cholesterin auf etwa 45 % der Kontrollzellen gesenkt. Parallel dazu wird die Freisetzung von Vesikeln gegenüber unbehandelten Zellen um das etwa 3-fache verstärkt.

Kojro et al. (2001) hatten bereits gezeigt, dass die Cholesterinextraktion mittels MCD die Fluidität der Membran erhöht. Auch die Inhibition der Cholesterinbiosynthese mit Lovastatin verringert den zellulären Cholesterinspiegel nach 24 h um mehr als die Hälfte und führt zur vermehrten Vesikelbildung. In beiden Fällen enthalten die abgegebenen Vesikel sowohl ADAM10 als auch L1. Im Gegensatz zu den L1-CHO-Zellen setzen die Ovarialkarzinomlinien OVM und SKOV3 konstitutiv hohe Mengen an Vesikeln frei, in denen ebenfalls ADAM10 und L1 detektiert werden können. Falls diese Beobachtung mit der erhöhten Fluidität der Plasmamembran von Tumorzellen zusammenhängt (Inbar, 1976; Deliconstantinos; 1987; Sok et al., 1999), müsste die Produktion von L1- und ADAM10-haltigen Vesikeln in OVM- und SKOV3-Zellen durch Verhärtung der Membran blockiert werden können. Dies könnte z.B. durch Substitution mit Cholesterin mittels MCD-Cholesterin-Komplexen oder Behandlung mit Progesteron geschehen.

Der Vergleich von Tumor- mit gesundem Gewebe zeigt, dass auch *in vivo* die Membran transformierter Zellen deutlich fluider ist (Kier et al., 1988; Sentjurc et al., 1998; Sok et al., 1999). In vielen Tumorpatienten ist der Cholesteringehalt im Serum erniedrigt (Alexopoulos et al., 1987), wodurch es leicht zur Unterversorgung der sich schnell teilenden Tumorzellen mit Cholesterin kommen kann. Möglicherweise besteht also auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen dem Cholesteringehalt und der Abgabe von L1 und ADAM10 in Vesikeln.

Wie eine solche Kombination von migrationsfördernden mit proteolytischen Aktivitäten in den freigesetzten Vesikeln das Invasionsverhalten der Tumorzellen verstärken könnte, wird im Folgenden dargelegt.

Kleinman et al. (1986) beobachteten, dass die Invasionsfähigkeit maligner Zellen mit der Aktivität einer Typ IV-Kollagenase korreliert. Durch Kollagenase-Inhibitoren konnte der Abbau der EZM und die Invasion von Tumorzellen blockiert werden. Campo et al. (1992) beschrieben den lokalen Abbau von Laminin und Kollagen IV während der Invasion von epithelialen Ovarialkarzinomen. Neben MMP-2 kann ADAM10 *in vitro* Kollagen IV prozessieren (Millichip et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben MMPs auch ADAM10 in Vesikeln freigesetzt werden kann. ADAM10 könnte als vesikelassoziierte Proteinase nicht nur für das Tumorgeschehen, sondern auch für die Entwicklung von Alzheimer und Arthritis von Bedeutung sein. Kojro et al. (2001) belegten, dass die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 nach Cholesterindepletion hochreguliert wird. Dadurch wird die  $\alpha$ -Spaltung von APP forciert und somit die Bildung

des toxischen  $\beta$ -Fragment ( $A\beta$ ) reduziert. Möglicherweise ist in die APP-Spaltung ein ähnlicher vesikulärer Mechanismus wie hier für L1 beschrieben involviert. ADAM10 wird außerdem in humanen Gelenkknorpeln exprimiert und in krankhaften Veränderungen wie Osteoarthritis hochreguliert (Chubinskaya et al., 2001).

Versuche an isolierten Vesikeln belegen, dass die ADAM10-vermittelte Spaltung von L1 über etwa 4 h andauert und lösliches L1 freisetzt. Es kann gezeigt werden, dass in Vesikeln generiertes L1-200 funktionell aktiv ist und die Migration von CHO-Zellen stimuliert. Dabei handelt es sich um einen L1-spezifischen Effekt, da nur der Vesikelüberstand der L1-CHO-Zellen die Migration verstärkt; der Überstand der CHO-Zellen hat keinen Einfluss. In den Asziten von Tumorpatienten kann neben vesikulärem L1 auch die lösliche Form detektiert werden. Weiterführende Untersuchung aus unserer Gruppe zeigen, dass aus Asziten aufgereinigtes lösliches L1 die Migration von HEK293-Zellen stimuliert (Schlich et al., cancer Research, zur Veröffentlichung eingereicht). Es kann also angenommen werden, dass aus Vesikeln abgegebenes L1 das Migrationsverhalten von Tumorzellen beeinflusst. Der Vorteil gegenüber der Abspaltung von der Zellmembran könnte, ähnlich wie für die MMPs beschrieben, in einer lokal erhöhten Konzentration von löslichem L1 liegen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Transfer von Proteinen von Zelle zu Zelle mit Hilfe von Vesikeln. Poste und Nicolson (1980) beschrieben, dass freigesetzte Membranvesikel eines stark metastasierenden murinen Melanomzellklons mit der Membran einer weniger aggressiven Variante fusionieren und dadurch deren invasives Potential erhöhen. Mononukleäre Blutzellen und CHO-Zellen setzen Vesikel frei, die den Chemokinrezeptor CCR5 enthalten. Die Vesikel übertragen den Rezeptor anschließend auf CCR5-negative Monozyten,  $CD4^+$ -T-Zellen und endotheliale Zellen und sensibilisieren diese so gegen das HIV-1 Virus (Mack et al., 2000). Taraboletti et al. (2002) spekulieren, dass die Inkorporation von MMP-2/-9-haltigen Vesikeln die Invasionsfähigkeit von Endothelzellen im Matrigel verstärkt. In Analogie dazu könnte sowohl L1 als auch ADAM10 in Vesikeln von Zelle zu Zelle übertragen werden.

In den letzten Jahren sind neben den Oberflächenvesikeln immer mehr die sog. Exosomen ins Blickfeld der Tumorforschung gerückt. Diese 30-100 nm großen Mikrovesikel werden von epithelialen und hämatopoetischen Zellen, wie zytotoxischen T-Lymphozyten, Mastozyten, und dendritischen Zellen abgegeben (Peters et al., 1989; Raposo et al., 1996;

Zitvogel et al., 1998; Thery et al., 1999). Exosomen entstehen durch Invagination der endosomalen Membran in das Lumen der Endosomen, die dann als *multivesicular bodies* (MVBs) bezeichnet werden. Nach Fusion der äußeren Membran der MVBs mit der Plasmamembran werden die Exosomen freigesetzt (Harding et al., 1985; Raposo et al., 1997). Welche zelluläre Maschinerie die Sekretion der Exosomen ermöglicht, ist noch nicht bekannt. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass Maustumorlinien ebenfalls MVBs enthalten und konstitutiv Exosomen in den Überstand abgegeben (Andre et al., 2002a). Im gleichen Jahr konnten Exosomen aus Asziten von Tumorpatientinnen (Ovarial-, Brust-, Hauttumore) isoliert werden, die neben MHC I, Tetraspans und ICAM auch tumorspezifische Antigene, wie Her2/Neu (Ovarial- und Brusttumore) oder MART1 (Melanom) exprimieren. Dendritische Zellen, die mit diesen Exosomen beladen wurden, induzierten die Differenzierung und Proliferation zytotoxischer T-Lymphocyten (CTL) *in vitro*. Die so aktivierten CTLs lysierten spezifisch die Tumorzellen, die aus dem gleichen Patienten wie die Exosomen isoliert worden waren. Ein Vergleich des T-Zellrezeptor-Repertoires dieser *ex vivo* stimulierten CTLs mit den tumorinfiltrierenden Lymphocyten zeigte, dass die Exosomen die Proliferation solcher CTLs auslösen, die im Tumor selbst nicht auftreten. Die Autoren schließen daraus, dass isolierte Exosomen neue Möglichkeiten in der Immuntherapie eröffnen, bei denen selbst in Patienten mit kaum immunogenen Tumoren (Brust-, Lungen-, und Ovarialtumor) eine tumorspezifische T-Zell-Antwort induziert werden kann (Andre et al., 2002b). In Tumoren der Ovarien und des Uterus korreliert die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 mit dem Stadium der Erkrankung, gutartige Veränderungen und gesundes Kontrollgewebe exprimieren kein L1 (Fogel et al., 2003). Interessanterweise können aus den Asziten einiger Tumorpatientinnen Vesikel isoliert werden, die L1 enthalten. Balaian et al. (2000) hatten bereits beschrieben, dass L1 als kostimulatorisches Molekül in der T-Zellaktivierung fungiert. Weitere Untersuchungen müssen jedoch zeigen, ob dendritische Zellen, die mit diesen Vesikeln beladen werden, ebenfalls die Proliferation tumorspezifischer CTLs auslösen können.

Im Gegensatz zu dem beschriebenen immunstimulatorischen Antigentransfer nutzen Tumorzellen Exosomen aber auch dazu, inhibitorische Signale auf immunkompetente Zellen zu übertragen. Riteau et al. (2003) konnten zeigen, dass Melanomzellen Exosomen freisetzen, die HLA-G I (*human leucocyte antigen G*) exprimieren. Dieser Ligand kann *in vitro* Melanom- und Gliomazellen vor der Lyse durch NK-Zellen (*natural killer*) bzw. aktivierte PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) schützen (Wiendl et al., 2002; Paul et al., 1998; Menier et al., 2002). Darüber hinaus induzieren Melanomzellen durch



Sekretion von Fas-Ligand-haltigen Mikrovesikeln den apoptotischen Zelltod von Lymphozyten (Andreola et al., 2002).

Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die *in vitro* bzw. *in vivo* freigesetzten L1-haltigen Vesikel von der Oberfläche abgeschnürt werden oder ob es sich dabei um Exosomen handelt. Des Weiteren hatte A. Stoeck aus unser Arbeitsgruppe beobachtet, dass Zellen, die in Apoptose gehen, ebenfalls hohe Mengen an Vesikeln abgeben, in denen L1 detektiert werden kann (A. Stoeck, Publikation in Vorbereitung). Dies könnte bedeuten, dass die aus den Asziten isolierten Vesikel von sterbenden Tumorzellen stammen und damit nur ein Nebenprodukt des Tumorgeschehens sind. Da die Abgabe von L1 in Vesikeln aber möglicherweise die Progression der Erkrankung beeinflusst, bedarf dieser Prozess weiterer intensiver Untersuchungen.

## **G ZUSAMMENFASSUNG**

L1 ist ein neuronales Adhäsionsmolekül, das neben Zellen des Nervensystems auf vielen humanen Tumorlinien exprimiert wird. Zusätzlich zu seiner Funktion als Oberflächenmolekül kann L1 durch membranproximale Spaltung in eine lösliche Form überführt werden. In L1-exprimierenden HEK293- und CHO-Zellen konnte bereits eine Beteiligung der Metalloproteinase ADAM10 bei diesem Prozess nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst die subzelluläre Lokalisation sowie der Mechanismus der L1-Spaltung näher charakterisiert. L1 und ADAM10 sind teilweise mit Lipid Rafts assoziiert, außerdem lokalisieren L1 und die Metalloproteinase im Golgi/TGN. Vergleichende Analysen nach PMA- und MCD-Behandlung machen deutlich, dass die beiden Stimuli die L1-Spaltung in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle verstärken. Die Behandlung mit MCD sowie die Inhibition der Cholesterinbiosynthese führen zudem zur Freisetzung von Membranvesikeln, die sowohl L1 als auch ADAM10 enthalten. Die ADAM10-vermittelte Spaltung von L1 hält in isolierten Vesikeln an und generiert lösliches L1, das die Migration von Zellen verstärken kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die L1-Spaltung in Ovarialkarzinomlinien analysiert. Auch hier wird die Abspaltung durch eine Metalloproteinase vermittelt, findet aber nicht an der Oberfläche statt. Durch Blockade der Expression mit antisense-Oligonukleotiden kann die Beteiligung von ADAM10 bei der membranproximalen Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomlinien belegt werden. Die Überexpression von L1, ADAM10 sowie einer katalytisch-inaktiven Form (ADAM10-DN) mit Hilfe von Adenoviren bestätigt den Zusammenhang zwischen ADAM10, der Abgabe von löslichem L1 und dem Migrationsverhalten von Zellen. Ovarialkarzinomlinien setzen konstitutiv hohe Mengen an Vesikeln frei, die proteolytisch aktiv sind und ebenfalls ADAM10 und L1 enthalten. In Asziten von Tumorpatientinnen kann sowohl vesikuläres als auch lösliches L1 nachgewiesen werden.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen einen bisher unbekanntem Mechanismus auf, durch den lösliches L1 generiert werden kann. Die funktionelle Bedeutung der ADAM10-vermittelten Spaltung von L1 für das Migrationsverhalten von Ovarialkarzinomzellen wird in Hinblick auf Tumorprogression sowie mögliche neue Therapieansätze diskutiert.

## H LITERATURVERZEICHNIS

- Alexander, P.** 1974. Proceedings: Escape from immune destruction by the host through shedding of surface antigens: is this a characteristic shared by malignant and embryonic cells? *Cancer Res.* 34:2077-2082.
- Alexopoulos, C.G.,** B.Blatsios, and A.Avgerinos. 1987. Serum lipids and lipoprotein disorders in cancer patients. *Cancer* 60:3065-3070.
- Amour, A.,** C.G.Knight, A.Webster, P.M.Slocombe, P.E.Stephens, V.Knauper, A.J.Docherty, and G.Murphy. 2000. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* 473:275-279.
- Anand-Apte, B.,** B.R.Zetter, A.Viswanathan, R.G.Qiu, J.Chen, R.Ruggieri, and M.Symons. 1997. Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 272:30688-30692.
- Anders A.,** S.Gilbert, W.Garten, R.Postina, and F.Fahrenholz. 2001. Regulation of the  $\alpha$ -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 15:1837-1839
- Anderson, R.G. and K.Jacobson.** 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296:1821-1825.
- Andre, F.,** N.E.Schartz, N.Chaput, C.Flament, G.Raposo, S.Amigorena, E.Angevin, and L.Zitvogel. 2002a. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20 Suppl 4:A28-A31.
- Andre, F.,** N.E.Schartz, M.Movassagh, C.Flament, P.Pautier, P.Morice, C.Pomel, C.Lhomme, B.Escudier, T.Le Chevalier, T.Tursz, S.Amigorena, G.Raposo, E.Angevin, and L.Zitvogel. 2002b. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360:295-305.
- Andreola, G.,** L.Rivoltini, C.Castelli, V.Huber, P.Perego, P.Deho, P.Squarcina, P.Accornero, F.Lozone, L.Lugini, A.Stringaro, A.Molinari, G.Arancia, M.Gentile, G.Parmiani, and S.Fais. 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195:1303-1316.
- Armstrong, M.J.,** J.Storch, and N.Dainiak. 1988. Structurally distinct plasma membrane regions give rise to extracellular membrane vesicles in normal and transformed lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 946:106-112.
- Artavanis-Tsakonas, S.,** M.D.Rand, and R.J.Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Asakura, M.,** M.Kitakaze, S.Takashima, Y.Liao, F.Ishikura, T.Yoshinaka, H.Ohmoto, K.Node, K.Yoshino, H.Ishiguro, H.Asanuma, S.Sanada, Y.Matsumura, H.Takeda, S.Beppu, M.Tada, M.Hori, and S.Higashiyama. 2002. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* 8:35-40.
- Auersberg N.,** M.I. Edelson, S.C. Mok, S.W. Johnson. 1998. The biology of ovarian cancer. *Semin. oncol.*25:281-304
- Auersberg N.,** A.S.T. Wong, K Choi, S.K. Kang, P.C.K. Leung. 2001. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocrine Reviews* 22(2):255-88

- Baird, B.**, E.D.Sheets, and D.Holowka. 1999. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys. Chem.* 82:109-119.
- Balaian, L.B.**, T.Moehler, and A.M.Montgomery. 2000. The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 30:938-943.
- Basbaum, C.B. and Z.Werb.** 1996. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:731-738.
- Beer, S.**, M.Oleszewski, P.Gutwein, C.Geiger, and P.Altevogt. 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 16):2667-2675.
- Bennett, T.A.**, B.S.Edwards, L.A.Sklar, and S.Rogelj. 2000. Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *J. Immunol.* 164:4120-4129.
- Benting, J.**, A.Rietveld, I.Ansorge, and K.Simons. 1999. Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. *FEBS Lett.* 462:47-50.
- Bergers, G.**, R.Brekken, G.McMahon, T.H.Vu, T.Itoh, K.Tamaki, K.Tanzawa, P.Thorpe, S.Itohara, Z.Werb, and D.Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2:737-744.
- Bieber, A.J.**, P.M.Snow, M.Hortsch, N.H.Patel, J.R.Jacobs, Z.R.Traquina, J.Schilling, and C.S.Goodman. 1989. Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59:447-460.
- Birkedal-Hansen, H.** 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:728-735.
- Black, R.A.**, C.T.Rauch, C.J.Kozlosky, J.J.Peschon, J.L.Slack, M.F.Wolfson, B.J.Castner, K.L.Stocking, P.Reddy, S.Srinivasan, N.Nelson, N.Boiani, K.A.Schooley, M.Gerhart, R.Davis, J.N.Fitzner, R.S.Johnson, R.J.Paxton, C.J.March, and D.P.Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
- Blobel, C.P.** 2000. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:606-612.
- Blobel, C.P.**, T.G.Wolfsberg, C.W.Turek, D.G.Myles, P.Primakoff, and J.M.White. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356:248-252.
- Blokzijl, A.**, C.Dahlqvist, E.Reissmann, A.Falk, A.Moliner, U.Lendahl, and C.F.Ibanez. 2003. Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J. Cell Biol.* 163:723-728.
- Borrell-Pages, M.**, F.Rojo, J.Albanell, J.Baselga, and J.Arribas. 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J.* 22:1114-1124.
- Bretscher, M.S.** 1992. Cells can use their transferrin receptors for locomotion. *EMBO J.* 11:383-389.
- Brew, K.**, D.Dinakarpanian, and H.Nagase. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1477:267-283.

- Brooks, P.C.**, S.Stromblad, L.C.Sanders, T.L.von Schalscha, R.T.Aimes, W.G.Stetler-Stevenson, J.P.Quigley, and D.A.Chersesh. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85:683-693.
- Brou, C.**, F.Logeat, N.Gupta, C.Bessia, O.LeBail, J.R.Doedens, A.Cumano, P.Roux, R.A.Black, and A.Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-Metalloproteinase TACE. *Mol. Cell* 5:207-216.
- Brown, D.A.** 1992. Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids. *Trends Cell Biol.* 2:338-343.
- Brown, D.A. and E.London.** 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
- Brummendorf, T.**, M.Hubert, U.Treubert, R.Leuschner, A.Tarnok, and F.G.Rathjen. 1993. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10:711-727.
- Brummendorf, T.**, S.Kenwrick, and F.G.Rathjen. 1998. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:87-97.
- Buxbaum, J.D.**, K.N.Liu, Y.Luo, J.L.Slack, K.L.Stocking, J.J.Peschon, R.S.Johnson, B.J.Castner, D.P.Cerretti, and R.A.Black. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273:27765-27767.
- Campo, E.**, M.J.Merino, F.A.Tavassoli, A.S.Charonis, W.G.Stetler-Stevenson, and L.A.Liotta. 1992. Evaluation of basement membrane components and the 72 kDa type IV collagenase in serous tumors of the ovary. *Am. J. Surg. Pathol.* 16:500-507.
- Cannistra, S.A.** 1993. Cancer of the ovary. *N. Engl. J. Med.* 329:1550-1559.
- Cao, X. and T.C.Sudhof.** 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Cary, L.A.**, D.C.Han, T.R.Polte, S.K.Hanks, and J.L.Guan. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Cell Biol.* 140:211-221.
- Cassara, D.**, A.Ginestra, V.Dolo, M.Miele, G.Caruso, G.Lucania, and M.L.Vittorelli. 1998. Modulation of vesicle shedding in 8701 BC human breast carcinoma cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30:45-53.
- Castellani, V.** 2002. The function of neuropilin/L1 complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515:91-102.
- Castellani, V.**, A.Chedotal, M.Schachner, C.Faivre-Sarrailh, and G.Rougon. 2000. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.
- Chang, S.**, F.G.Rathjen, and J.A.Raper. 1987. Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104:355-362.
- Chen, S.**, N.Mantei, L.Dong, and M.Schachner. 1999a. Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* 38:428-439.

- Chen M.S.**, K.S.Tung, S.A. Coonrod, Y.Takahashi, D.Bigler, A.Chang, Y.Yamashita, P.S.Kincade, J.C. Herr, and J.M.White. 1999b. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM12 and the egg integrin  $\alpha 6 \beta 1$ : implication for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:11830-11835
- Chubinskaya, S.**, R.Mikhail, A.Deutsch, and M.H.Tindal. 2001. ADAM-10 protein is present in human articular cartilage primarily in the membrane-bound form and is upregulated in osteoarthritis and in response to IL-1 $\alpha$  in bovine nasal cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 49:1165-1176.
- Cinek, T. and V.Horejssi.** 1992. The nature of large noncovalent complexes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J. Immunol.* 149:2262-2270.
- Claas, C.**, C.S.Stipp, and M.E.Hemler. 2001. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 276:7974-7984.
- Coussens, L.M.**, C.L.Tinkle, D.Hanahan, and Z.Werb. 2000. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103:481-490.
- Cox, E.A. and A.Huttenlocher.** 1998. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc. Res. Tech.* 43:412-419.
- Currie, G.** 1976. Immunological aspects of host resistance to the development and growth of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 458:135-165.
- Dahme, M.**, U.Bartsch, R.Martini, B.Anliker, M.Schachner, and N.Mantei. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet.* 17:346-349.
- Dainiak, N.** 1991. Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation, and growth. *Blood* 78:264-276.
- Dallas, D.J.**, P.G.Genever, A.J.Patton, M.I.Millichip, N.McKie, and T.M.Skerry. 1999. Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone. *Bone* 25:9-15.
- De Angelis, E.**, T.Brummendorf, L.Cheng, V.Lemmon, and S.Kenwrick. 2001. Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J. Biol. Chem.* 276:32738-32742.
- De Angelis, E.**, J.MacFarlane, J.S.Du, G.Yeo, R.Hicks, F.G.Rathjen, S.Kenwrick, and T.Brummendorf. 1999. Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J.* 18:4744-4753.
- De Strooper, B.**, L.Umans, F.Van Leuven, and B.H.Van den. 1993. Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J. Cell Biol.* 121:295-304.
- Debiec, H.**, E.I.Christensen, and P.M.Ronco. 1998. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* 143:2067-2079.
- Deliconstantinos, G.** 1987. Physiological aspects of membrane lipid fluidity in malignancy. *Anticancer Res.* 7:1011-1021.

- Demyanenko, G.P.**, A.Y.Tsai, and P.F.Maness. 1999. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J. Neurosci.* 19:4907-4920.
- Deryugina, E.I.**, B.I.Ratnikov, T.I.Postnova, D.V.Rozanov, and A.Y.Strongin. 2002. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 277:9749-9756.
- Di Sciuolo, G.**, T.Donahue, M.Schachner, and S.A.Bogen. 1998. L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo. *J. Exp. Med.* 187:1953-1963.
- Djabali, M.**, M.G.Mattei, C.Nguyen, D.Roux, J.Demengeot, F.Denizot, M.Moos, M.Schachner, C.Goridis, and B.R.Jordan. 1990. The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics* 7:587-593.
- Doedens, J.R.**, R.M.Mahimkar, and R.A.Black. 2003. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:331-338.
- Doherty, P. and F.S.Walsh.** 1996. CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol. Cell Neurosci.* 8:99-111.
- Doherty, P.**, E.Williams, and F.S.Walsh. 1995. A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron* 14:57-66.
- Dolo, V.**, S.D'Ascenzo, S.Violini, L.Pompucci, C.Festuccia, A.Ginestra, M.L.Vittorelli, S.Canevari, and A.Pavan. 1999. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin. Exp. Metastasis* 17:131-140.
- Dolo, V.**, A.Ginestra, D.Cassara, S.Violini, G.Lucania, M.R.Torrisi, H.Nagase, S.Canevari, A.Pavan, and M.L.Vittorelli. 1998. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 58:4468-4474.
- Dvorak, H.F.**, S.C.Quay, N.S.Orenstein, A.M.Dvorak, P.Hahn, A.M.Bitzer, and A.C.Carvalho. 1981. Tumor shedding and coagulation. *Science* 212:923-924.
- Ebeling, O.**, A.Duczmal, S.Aigner, C.Geiger, S.Schollhammer, J.T.Kemshead, P.Moller, R.Schwartz-Albiez, and P.Altevogt. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur. J. Immunol.* 26:2508-2516.
- Ebinu, J.O. and B.A.Yankner.** 2002. A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron* 34:499-502.
- Edwards D.R.** 2001. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Humana Press, Totowa, New Jersey.* 67-84
- Eehalt, R.**, P.Keller, C.Haass, C.Thiele, and K.Simons. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160:113-123.
- Ellis, V. and G.Murphy.** 2001. Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *FEBS Lett.* 506:1-5.

- Esch, F.S.**, P.S.Keim, E.C.Beattie, R.W.Blacher, A.R.Culwell, T.Oltersdorf, D.McClure, and P.J.Ward. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.
- Fassbender, K.**, M.Simons, C.Bergmann, M.Stroick, D.Lutjohann, P.Keller, H.Runz, S.Kuhl, T.Bertsch, K.von Bergmann, M.Hennerici, K.Beyreuther, and T.Hartmann. 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:5856-5861.
- Feehan, C.**, K.Darлак, J.Kahn, B.Walcheck, A.F.Spatola, and T.K.Kishimoto. 1996. Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J. Biol. Chem.* 271:7019-7024.
- Feizi, T.** 1994. Evidence for carbohydrate-mediated interactions between the neural-cell-adhesion molecules NCAM and L1. *Trends Biochem. Sci.* 19:233-234.
- Felding-Habermann, B.**, S.Silletti, F.Mei, C.H.Siu, P.M.Yip, P.C.Brooks, D.A.Chersch, T.E.O'Toole, M.H.Ginsberg, and A.M.Montgomery. 1997. A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J. Cell Biol.* 139:1567-1581.
- Fidler, I.J.** 2002. Critical determinants of metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 12:89-96.
- Field, K.A.**, D.Holowka, and B.Baird. 1999. Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes. *J. Biol. Chem.* 274:1753-1758.
- Fischer, G.**, V.Kunemund, and M.Schachner. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* 6:605-612.
- Fogel, M.**, P.Gutwein, S.Mechtersheimer, S.Riedle, A.Stoeck, A.Smirnov, L.Edler, A.Ben-Arie, M.Huszar, and P.Altevogt. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 363(9387):869-875
- Fransen, E.**, C.Schrander-Stumpel, L.Vits, P.Coucke, G.Van Camp, and P.J.Willems. 1994. X-linked hydrocephalus and MASA syndrome present in one family are due to a single missense mutation in exon 28 of the L1CAM gene. *Hum. Mol. Genet.* 3:2255-2256.
- Fransen, E.**, G.Van Camp, L.Vits, and P.J.Willems. 1997. L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum. Mol. Genet.* 6:1625-1632.
- Freigang, J.**, K.Proba, L.Leder, K.Diederichs, P.Sonderegger, and W.Welte. 2000. The crystal structure of the ligand binding module of axonin-1/TAG-1 suggests a zipper mechanism for neural cell adhesion. *Cell* 101:425-433.
- Friedl, P.**, K.S.Zanker, and E.B.Brocker. 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc. Res. Tech.* 43:369-378.
- Friedlander, D.R.**, P.Milev, L.Karthikeyan, R.K.Margolis, R.U.Margolis, and M.Grumet. 1994. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 125:669-680.



- Friedrichson, T. and T.V.Kurzchalia.** 1998. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394:802-805.
- Furuchi, T. and R.G.Anderson.** 1998. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* 273:21099-21104.
- Galko, M.J. and M.Tessier-Lavigne.** 2000. Function of an axonal chemoattractant modulated by Metalloproteinase activity. *Science* 289:1365-1367.
- Garver, T.D., Q.Ren, S.Tuvia, and V.Bennett.** 1997. Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J. Cell Biol.* 137:703-714.
- Gechtman, Z., J.L.Alonso, G.Raab, D.E.Ingber, and M.Klagsbrun.** 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.* 274:28828-28835.
- Giannelli, G., J.Falk-Marzillier, O.Schiraldi, W.G.Stetler-Stevenson, and V.Quaranta.** 1997. Induction of cell migration by matrix Metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277:225-228.
- Gil, O.D., T.Sakurai, A.E.Bradley, M.Y.Fink, M.R.Cassella, J.A.Kuo, and D.P.Felsenfeld.** 2003. Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J. Cell Biol.* 162:719-730.
- Ginestra, A., M.D.La Placa, F.Saladino, D.Cassara, H.Nagase, and M.L.Vittorelli.** 1998. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* 18:3433-3437.
- Ginestra, A., D.Miceli, V.Dolo, F.M.Romano, and M.L.Vittorelli.** 1999. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res.* 19:3439-3445.
- Gomez-Mouton, C., J.L.Abad, E.Mira, R.A.Lacalle, E.Gallardo, S.Jimenez-Baranda, I.Illa, A.Bernad, S.Manes, and A.Martinez.** 2001. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:9642-9647.
- Grumet, M., S.Hoffman, and G.M.Edelman.** 1984. Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81:267-271.
- Gutwein, P., S.Mechtersheimer, S.Riedle, A.Stoeck, D.Gast, S.Joumaa, H.Zentgraf, M.Fogel, and D.P.Altevogt.** 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17:292-294.
- Gutwein, P., M.Oleszewski, S.Mechtersheimer, N.Agmon-Levin, K.Krauss, and P.Altevogt.** 2000. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275:15490-15497.
- Hackel, P.O., E.Zwick, N.Prenzel, and A.Ullrich.** 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:184-189.

- Hall, R.J. and C.A.Erickson.** 2003. ADAM 10: an active Metalloproteinase expressed during avian epithelial morphogenesis. *Dev. Biol.* 256:146-159.
- Hamilton, T.C.** 1992. Ovarian cancer, Part I: Biology. *Curr. Probl. Cancer* 16:1-57.
- Hammache, D.,** N.Yahi, M.Maresca, G.Pieroni, and J.Fantini. 1999. Human erythrocyte glycosphingolipids as alternative cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry: evidence for CD4-induced interactions between HIV-1 gp120 and reconstituted membrane microdomains of glycosphingolipids (Gb3 and GM3). *J. Virol.* 73:5244-5248.
- Haney, C.A.,** Z.Sahenk, C.Li, V.P.Lemmon, J.Roder, and B.D.Trapp. 1999. Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J. Cell Biol.* 146:1173-1184.
- Hansen, G.H.,** L.Immerdal, E.Thorsen, L.L.Niels-Christiansen, B.T.Nystrom, E.J.Demant, and E.M.Danielsen. 2001. Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J. Biol. Chem.* 276:32338-32344.
- Harder, T. and K.Simons.** 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:534-542.
- Harding, C.,** M.A.Levy, and P.Stahl. 1985. Morphological analysis of ligand uptake and processing: the role of multivesicular endosomes and CURL in receptor-ligand processing. *Eur. J. Cell Biol.* 36:230-238.
- Harris, T.J. and C.H.Siu.** 2002. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. *Bioessays* 24:996-1003.
- Hartmann, D.,** B.De Strooper, L.Serneels, K.Craessaerts, A.Herreman, W.Annaert, L.Umans, T.Lubke, I.A.Lena, K.von Figura, and P.Saftig. 2002. The disintegrin/Metalloproteinase ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11:2615-2624.
- Haspel, J. and M.Grumet.** 2003. The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci.* 8:s1210-s1225.
- He, T.C.,** S.Zhou, L.T.da Costa, J.Yu, K.W.Kinzler, and B.Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:2509-2514.
- Heerklotz, H.** 2002. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys. J.* 83:2693-2701.
- Heldin, C.H. and J.Ericsson.** 2001. Signal transduction. RIPping tyrosine kinase receptors apart. *Science* 294:2111-2113.
- Hemler, M.E.** 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:397-422.
- Herbst, A.L.** 1994. The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170:1099-1105.
- Hidalgo, M. and S.G.Eckhardt.** 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:178-193.
- Hiraoka, N.,** E.Allen, I.J.Apel, M.R.Gyetko, and S.J.Weiss. 1998. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95:365-377.

- Holmbeck, K.**, P.Bianco, J.Caterina, S.Yamada, M.Kromer, S.A.Kuznetsov, M.Mankani, P.G.Robey, A.R.Poole, I.Pidoux, J.M.Ward, and H.Birkedal-Hansen. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99:81-92.
- Hooper, N.M.**, E.H.Karran, and A.J.Turner. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321 ( Pt 2):265-279.
- Hortsch, M.** 1996. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17:587-593.
- Hughes, P.E. and M.Pfaff.** 1998. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.* 8:359-364.
- Hurskainen, T.L.**, S.Hirohata, M.F.Seldin, and S.S.Apte. 1999. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc Metalloproteinases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J. Biol. Chem.* 274:25555-25563.
- Huttenlocher, A.**, M.H.Ginsberg, and A.F.Horwitz. 1996. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J. Cell. Biol.* 134:1551-1562
- Huttenlocher, A.**, R.R.Sandborg, and A.F.Horwitz. 1995. Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:697-706.
- Iba, K.**, R.Albrechtsen, B.Gilpin, C.Frohlich, F.Loebel, A.Zolkiewska, K.Ishiguro, T.Kojima, W.Liu, J.K.Langford, R.D.Sanderson, C.Brakebusch, R.Fassler, and U.M.Wewer. 2000. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J. Cell Biol.* 149:1143-1156.
- Ilangumaran, S.**, H.T.He, and D.C.Hoessli. 2000. Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins. *Immunol. Today* 21:2-7.
- Ilangumaran, S. and D.C.Hoessli.** 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335 ( Pt 2):433-440.
- Ilic, D.**, Y.Furuta, S.Kanazawa, N.Takeda, K.Sobue, N.Nakatsuji, S.Nomura, J.Fujimoto, M.Okada, and T.Yamamoto. 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377:539-544.
- Inbar, M.** 1976. Fluidity of membrane lipids: a single cell analysis of mouse normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *FEBS Lett.* 67:180-185.
- Irie, T.**, K.Fukunaga, M.K.Garwood, T.O.Carpenter, J.Pitha, and J.Pitha. 1992. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. II: Effects on transport and disposition of lipids in rabbit and humans. *J. Pharm. Sci.* 81:524-528.
- Ito, K.**, I.Okamoto, N.Araki, Y.Kawano, M.Nakao, S.Fujiyama, K.Tomita, T.Mimori, and H.Saya. 1999. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* 18:7080-7090.
- Izumi, Y.**, M.Hirata, H.Hasuwa, R.Iwamoto, T.Umata, K.Miyado, Y.Tamai, T.Kurisaki, A.Sehara-Fujisawa, S.Ohno, and E.Mekada. 1998. A Metalloproteinase-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.

**Izumoto, S.,** T.Ohnishi, N.Arita, S.Hiraga, T.Taki, and T.Hayakawa. 1996. Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Res.* 56:1440-1444.

**Jacobson, K. and C.Dietrich.** 1999. Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 9:87-91.

**Janes, P.W.,** S.C.Ley, A.I.Magee, and P.S.Kabouridis. 2000. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* 12:23-34.

**Jiang, W. and J.S.Bond.** 1992. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* 312:110-114.

**Jick, H.,** G.L.Zornberg, S.S.Jick, S.Seshadri, and D.A.Drachman. 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627-1631.

**Jolly-Tornetta, C. and B.A.Wolf.** 2000. Protein kinase C regulation of intracellular and cell surface amyloid precursor protein (APP) cleavage in CHO695 cells. *Biochemistry* 39:15282-15290.

**Jouet, M.,** A.Rosenthal, G.Armstrong, J.MacFarlane, R.Stevenson, J.Paterson, A.Metzenberg, V.Ionasescu, K.Temple, and S.Kenwick. 1994. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat. Genet.* 7:402-407.

**Jouet, M.,** A.Rosenthal, and S.Kenwick. 1995. Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30:378-380.

**Kabouridis, P.S.,** A.I.Magee, and S.C.Ley. 1997. S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* 16:4983-4998.

**Kadmon, G.,** H.F.Bohlen und, R.Horstkorte, M.Eckert, P.Altevogt, and M.Schachner. 1995. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7:993-1004.

**Kajita, M.,** Y.Itoh, T.Chiba, H.Mori, A.Okada, H.Kinoh, and M.Seiki. 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J. Cell Biol.* 153:893-904.

**Kalus, I.,** B.Schnegelsberg, N.G.Seidah, R.Kleene, and M.Schachner. 2003. The proprotein convertase PC5A and a Metalloproteinase are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 278:10381-10388.

**Kamiguchi, H., and V.Lemmon.** 2000. Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J. Neurosci.* 20(10):3676-3686

**Kamiguchi, H.,** K.E.Long, M.Pendergast, A.W.Schaefer, I.Rapoport, T.Kirchhausen, and V.Lemmon. 1998. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* 18:5311-5321.

**Kang, T.,** H.Nagase, and D.Pei. 2002. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res.* 62:675-681.

- Keilhauer, G.**, A.Faissner, and M.Schachner. 1985. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316:728-730.
- Keller, P. and K.Simons.** 1998. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 140:1357-1367.
- Kenworthy, A.K. and M.Edidin.** 1998. Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J. Cell Biol.* 142:69-84.
- Kier, A.B.**, M.T.Parker, and F.Schroeder. 1988. Local and metastatic tumor growth and membrane properties of LM fibroblasts in athymic (nude) mice. *Biochim. Biophys. Acta* 938:434-446.
- Kilsdonk, E.P.**, P.G.Yancey, G.W.Stoudt, F.W.Bangerter, W.J.Johnson, M.C.Phillips, and G.H.Rothblat. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270:17250-17256.
- Kim, T. and S.E.Pfeiffer.** 1999. Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J. Neurocytol.* 28:281-293.
- Kleinman, H.K.**, M.L.McGarvey, J.R.Hassell, V.L.Star, F.B.Cannon, G.W.Laurie, and G.R.Martin. 1986. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25:312-318.
- Klemke, R.L.**, S.Cai, A.L.Giannini, P.J.Gallagher, P.de Lanerolle, and D.A.Chersesh. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* 137:481-492.
- Klotz, U.** 2003. Pharmacological comparison of the statins. *Arzneimittelforschung.* 53(9):605-611
- Kojro, E.**, G.Gimpl, S.Lammich, W.Marz, and F.Fahrenholz. 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:5815-5820.
- Koshikawa, N.**, G.Giannelli, V.Cirulli, K.Miyazaki, and V.Quaranta. 2000. Role of cell surface Metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J. Cell Biol.* 148:615-624.
- Kottirsch, G.**, G.Koch, R.Feifel, and U.Neumann. 2002. Beta-aryl-succinic acid hydroxamates as dual inhibitors of matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *J. Med. Chem.* 45:2289-2293.
- Kouchi, Z.**, T.Kinouchi, H.Sorimachi, S.Ishiura, and K.Suzuki. 1998. The deletion of the C-terminal tail and addition of an endoplasmic reticulum targeting signal to Alzheimer's amyloid precursor protein change its localization, secretion, and intracellular proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 258:291-300.
- Kowitz, A.**, G.Kadmon, M.Eckert, V.Schirmacher, M.Schachner, and P.Altevogt. 1992. Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 22:1199-1205.
- Kowitz, A.**, G.Kadmon, H.Verschueren, L.Remels, P.De Baetselier, M.Hubbe, M.Schachner, V.Schirmacher, and P.Altevogt. 1993. Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 11:419-429.
- Kratzschmar, J.**, L.Lum, and C.P.Blobel. 1996. Metargidin, a membrane-anchored Metalloproteinase-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J. Biol. Chem.* 271:4593-4596.

- Kuentzel, S.L.**, S.M.Ali, R.A.Altman, B.D.Greenberg, and T.J.Raub. 1993. The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem. J.* 295 ( Pt 2):367-378.
- Kuhn, T.B.**, E.T.Stoeckli, M.A.Condrau, F.G.Rathjen, and P.Sonderegger. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* 115:1113-1126.
- Kurzchalia, T.V.**, E.Hartmann, and P.Dupree. 1995. Guilty by insolubility--does a protein's detergent insolubility reflect a caveolar location? *Trends Cell Biol.* 5:187-189.
- Lai, C. and L.Feng.** 2004. Implication of gamma-secretase in neuregulin-induced maturation of oligodendrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314:535-542.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:280-285
- Lammich, S.**, E.Kojro, R.Postina, S.Gilbert, R.Pfeiffer, M.Jasionowski, C.Haass, and F.Fahrenholz. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin Metalloproteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:3922-3927.
- Lang, T.**, D.Bruns, D.Wenzel, D.Riedel, P.Holroyd, C.Thiele, and R.Jahn. 2001. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20:2202-2213.
- Lauffenburger, D.A. and A.F.Horwitz.** 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Lee, V.M.**, L.Greene, and M.L.Shelanski. 1981. Identification of neural and adrenal medullary surface membrane glycoproteins recognized by antisera to cultured rat sympathetic neurons and PC12 pheochromocytoma cells. *Neuroscience* 6:2773-2786.
- Leighton, M. and K.E.Kadler.** 2003. Paired basic/Furin-like proprotein convertase cleavage of Pro-BMP-1 in the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 278:18478-18484.
- Liao, Z.**, L.M.Cimakasky, R.Hampton, D.H.Nguyen, and J.E.Hildreth. 2001. Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17:1009-1019.
- Lindner, J.**, F.G.Rathjen, and M.Schachner. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305:427-430.
- Liscum, L. and N.J.Munn.** 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1438:19-37.
- Lo, S.H.**, E.Weisberg, and L.B.Chen. 1994. Tensin: a potential link between the cytoskeleton and signal transduction. *Bioessays* 16:817-823.
- Loechel, F.**, J.W.Fox, G.Murphy, R.Albrechtsen, and U.M.Wewer. 2000. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278:511-515.
- London, E. and D.A.Brown.** 2000. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta* 1508:182-195.
- Long, K.E.**, H.Asou, M.D.Snider, and V.Lemmon. 2001. The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276:1285-1290.

- Lopez-Perez, E.**, Y.Zhang, S.J.Frank, J.Creemers, N.Seidah, and F.Checler. 2001. Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin Metalloproteinase ADAM10. *J. Neurochem.* 76:1532-1539.
- Lum, L.**, M.S.Reid, and C.P.Blobel. 1998. Intracellular maturation of the mouse Metalloproteinase disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273:26236-26247.
- Mack, M.**, A.Kleinschmidt, H.Bruhl, C.Klier, P.J.Nelson, J.Cihak, J.Plachy, M.Stangassinger, V.Erfle, and D.Schlondorff. 2000. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* 6:769-775.
- Madge, L.A.**, M.R.Sierra-Honigmann, and J.S.Pober. 1999. Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation. *J. Biol. Chem.* 274:13643-13649.
- Maizel J.V. jr**, D.O. White, and M.D.Scharff. 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A and 12: *Virology* 36(1):115-125
- Mancini, P. and P.A.Santi.** 1993. Localization of the GM1 ganglioside in the vestibular system using cholera toxin. *Hear. Res.* 64:151-165.
- Manes, S.**, L.R.Ana, C.Gomez-Mouton, and A.Martinez. 2003. From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol.* 24:320-326.
- Manes, S.**, E.Mira, C.Gomez-Mouton, R.A.Lacalle, P.Keller, J.P.Labrador, and A.Martinez. 1999. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J.* 18:6211-6220.
- Maskos, K.**, C.Fernandez-Catalan, R.Huber, G.P.Bourenkov, H.Bartunik, G.A.Ellestad, P.Reddy, M.F.Wolfson, C.T.Rauch, B.J.Castner, R.Davis, H.R.Clarke, M.Petersen, J.N.Fitzner, D.P.Cerretti, C.J.March, R.J.Paxton, R.A.Black, and W.Bode. 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:3408-3412.
- Massague J. and A. Pandiella.** 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:515-541
- Mayor, S. and F.R.Maxfield.** 1995. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol. Biol. Cell* 6:929-944.
- McConville, M.J. and M.A.Ferguson.** 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294 ( Pt 2):305-324.
- McDonnell, A.C.**, E.A.Van Kirk, D.D.Isaak, and W.J.Murdoch. 2003. Inhibitory effects of progesterone on plasma membrane fluidity and tumorigenic potential of ovarian epithelial cancer cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 228:308-314.
- Mechtersheimer, S.**, P.Gutwein, N.Agmon-Levin, A.Stoeck, M.Oleszewski, S.Riedle, R.Postina, F.Fahrenholz, M.Fogel, V.Lemmon, and P.Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155:661-673.
- Melkonian, K.A.**, A.G.Ostermeyer, J.Z.Chen, M.G.Roth, and D.A.Brown. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* 274:3910-3917.

- Menier, C.**, B.Riteau, E.D.Carosella, and N.Rouas-Freiss. 2002. MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int. J. Cancer* 100:63-70.
- Merlos-Suarez, A.**, S.Ruiz-Paz, J.Baselga, and J.Arribas. 2001. Metalloproteinase-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 276:48510-48517.
- Millichip, M.I.**, D.J.Dallas, E.Wu, S.Dale, and N.McKie. 1998. The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:594-598.
- Miura, M.**, M.Kobayashi, H.Asou, and K.Uyemura. 1991. Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. *FEBS Lett.* 289:91-95.
- Montgomery, A.M.**, J.C.Becker, C.H.Siu, V.P.Lemmon, D.A.Cherness, J.D.Pancook, X.Zhao, and R.A.Reisfeld. 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J. Cell Biol.* 132:475-485.
- Moore, D.H.**, B.Allison, K.Y.Look, G.P.Sutton, and R.M.Bigsby. 1997. Collagenase expression in ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* 65:78-82.
- Moos, M.**, R.Tacke, H.Scherer, D.Teplov, K.Fruh, and M.Schachner. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703.
- Morales, G.**, M.Hubert, T.Brummendorf, U.Treubert, A.Tarnok, U.Schwarz, and F.G.Rathjen. 1993. Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 11:1113-1122.
- Moss, M.L.**, S.L.Jin, M.E.Milla, D.M.Bickett, W.Burkhart, H.L.Carter, W.J.Chen, W.C.Clay, J.R.Didsbury, D.Hassler, C.R.Hoffman, T.A.Kost, M.H.Lambert, M.A.Leesnitzer, P.McCauley, G.McGeehan, J.Mitchell, M.Moyer, G.Pahel, W.Rocque, L.K.Overton, F.Schoenen, T.Seaton, J.L.Su, J.D.Becherer, and . 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736.
- Mukherjee, S.**, T.T.Soe, and F.R.Maxfield. 1999. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J. Cell Biol.* 144:1271-1284.
- Mullberg, J.**, K.Althoff, T.Jostock, and S.Rose-John. 2000. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur. Cytokine Netw.* 11:27-38.
- Mumm, J.S.**, E.H.Schroeter, M.T.Saxena, A.Griesemer, X.Tian, D.J.Pan, W.J.Ray, and R.Kopan. 2000. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* 5:197-206.
- Murdoch, W.J.** 1994. Ovarian surface epithelium during ovulatory and anovulatory ovine estrous cycles. *Anat. Rec.* 240:322-326.
- Murphy, G. and J.Gavrilovic.** 1999. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:614-621.



- Nakai, Y. and H.Kamiguchi.** 2002. Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J. Cell Biol.* 159:1097-1108.
- Nakamura N., C.Rabouille, R.Watson, T.Nilsson, N.Hui, P.Slusarewicz, T.E.Kreis, and G.Warren.** 1995. Charakterization of a cis-golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* 131:1715-1725
- Nayeem, N., S.Silletti, X.Yang, V.P.Lemmon, R.A.Reisfeld, W.B.Stallcup, and A.M.Montgomery.** 1999. A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 24):4739-4749.
- Needham, L.K., K.Thelen, and P.F.Maness.** 2001. Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J. Neurosci.* 21:1490-1500.
- Niedbala, M.J. and A.C.Sartorelli.** 1989. Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix. *Cancer Res.* 49:3302-3309.
- Nishimura, K., F.Yoshihara, T.Tojima, N.Ooashi, W.Yoon, K.Mikoshiba, V.Bennett, and H.Kamiguchi.** 2003. L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J. Cell Biol.* 163:1077-1088.
- Noe, V., B.Fingleton, K.Jacobs, H.C.Crawford, S.Vermeulen, W.Steelant, E.Bruyneel, L.M.Matrisian, and M.Mareel.** 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J. Cell Sci.* 114:111-118.
- Nyberg-Hoffman C. and E. Aguilar-Cordova.** 1999. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat. Med.* 5(8):955-945
- Ohnishi, T., H.Matsumura, S.Izumoto, S.Hiraga, and T.Hayakawa.** 1998. A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res.* 58:2935-2940.
- Ohtani, Y., T.Irie, K.Uekama, K.Fukunaga, and J.Pitha.** 1989. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186:17-22.
- Oleszewski, M., S.Beer, S.Katich, C.Geiger, Y.Zeller, U.Rauch, and P.Altevogt.** 1999. Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J. Biol. Chem.* 274:24602-24610.
- Oleszewski, M., P.Gutwein, L.W.von der, U.Rauch, and P.Altevogt.** 2000. Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J. Biol. Chem.* 275:34478-34485.
- Olive, S., C.Dubois, M.Schachner, and G.Rougon.** 1995. The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. *J. Neurochem.* 65:2307-2317.
- Palecek, S.P., C.E.Schmidt, D.A. Lauffenburger, and A.F.Horwitz.** 1996. Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 109(Pt5):941-952
- Pancook, J.D., R.A.Reisfeld, N.Varki, A.Vitiello, R.I.Fox, and A.M.Montgomery.** 1997. Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J. Immunol.* 158:4413-4421.
- Parton, R.G. and K.Simons.** 1995. Digging into caveolae. *Science* 269:1398-1399.

- Paul, P.**, N.Rouas-Freiss, I.Khalil-Daher, P.Moreau, B.Riteau, F.A.Le Gal, M.F.Avril, J.Dausset, J.G.Guillet, and E.D.Carosella. 1998. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:4510-4515.
- Perschl, A.**, J.Lesley, N.English, R.Hyman, and I.S.Trowbridge. 1995. Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 3):1033-1041.
- Peters, P.J.**, H.J.Geuze, H.A.Van der Donk, J.W.Slot, J.M.Griffith, N.J.Stam, H.C.Clevers, and J.Borst. 1989. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19:1469-1475.
- Pierce S.K.** 2002. Lipid rafts and B cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2(2):96-105
- Pitha, J.**, T.Irie, P.B.Sklar, and J.S.Nye. 1988. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* 43:493-502.
- Poste, G. and G.L.Nicolson.** 1980. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77:399-403.
- Pralle, A.**, P.Keller, E.L.Florin, K.Simons, and J.K.Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148:997-1008.
- Raposo, G.**, H.W.Nijman, W.Stoorvogel, R.Liejendekker, C.V.Harding, C.J.Melief, and H.J.Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183:1161-1172.
- Raposo, G.**, D.Tenza, S.Mecheri, R.Peronet, C.Bonnerot, and C.Desaymard. 1997. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol. Biol. Cell* 8:2631-2645.
- Rauch, U.**, K.Feng, and X.H.Zhou. 2001. Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol. Life Sci.* 58:1842-1856.
- Regen, C.M. and A.F.Horwitz.** 1992. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J. Cell Biol.* 119:1347-1359.
- Reid, R.A. and J.J.Hemperly.** 1992. Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J. Mol. Neurosci.* 3:127-135.
- Ren, Q. and V.Bennett.** 1998. Palmitoylation of neurofascin at a site in the membrane-spanning domain highly conserved among the L1 family of cell adhesion molecules. *J. Neurochem.* 70:1839-1849.
- Rietveld, A. and K.Simons.** 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:467-479.
- Rio, C.**, J.D.Buxbaum, J.J.Peschon, and G.Corfias. 2000. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* 275:10379-10387.
- Riteau, B.**, F.Faure, C.Menier, S.Viel, E.D.Carosella, S.Amigorena, and N.Rouas-Freiss. 2003. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum. Immunol.* 64:1064-1072.
- Rodriguez, B.E.**, G.Kreibich, and D.D.Sabatini. 1978. Spatial orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rough microsomes. I. Localization of lectin-binding sites in microsomal membranes. *J. Cell Biol.* 78:874-893.

- Rodriguez-Boulan, E. and A.Gonzalez.** 1999. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol.* 9:291-294.
- Roghani, M.,** J.D.Becherer, M.L.Moss, R.E.Atherton, H.Erdjument-Bromage, J.Arribas, R.K.Blackburn, G.Weskamp, P.Tempst, and C.P.Blobel. 1999. Metalloproteinase-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274:3531-3540.
- Roonprapunt, C.,** W.Huang, R.Grill, D.Friedlander, M.Grumet, S.Chen, M.Schachner, and W.Young. 2003. Soluble cell adhesion molecule L1-Fc promotes locomotor recovery in rats after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 20:871-882.
- Rosenthal, A.,** M.Jouet, and S.Kenwrick. 1992. Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nat. Genet.* 2:107-112.
- Rozanov, D.V.,** E.I.Deryugina, E.Z.Monosov, N.D.Marchenko, and A.Y.Strongin. 2004. Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells. *Exp. Cell Res.* 293:81-95.
- Sadoul, K.,** R.Sadoul, A.Faissner, and M.Schachner. 1988. Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 50:510-521.
- Salzer, U. and R.Prohaska.** 2001. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 97:1141-1143.
- Sambamurthi, K.,** L.M.Refolo, J.Shioi, M.A.Pappolla, and N.K.Robakis. 1992. The Alzheimer's amyloid precursor is cleaved intracellularly in the trans-Golgi network or in a post-Golgi compartment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 674:118-128.
- Samuel, B.U.,** N.Mohandas, T.Harrison, H.McManus, W.Rosse, M.Reid, and K.Haldar. 2001. The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J. Biol. Chem.* 276:29319-29329.
- Saugier-Veber, P.,** C.Martin, N.Le Meur, S.Lyonnet, A.Munnich, A.David, A.Henocq, D.Heron, P.Jonveaux, S.Odent, S.Manouvrier, A.Moncla, N.Morichon, N.Philip, D.Satge, M.Tosi, and T.Frebourg. 1998. Identification of novel L1CAM mutations using fluorescence-assisted mismatch analysis. *Hum. Mutat.* 12:259-266.
- Sawa, M.,** T.Kiyoi, K.Kurokawa, H.Kumihara, M.Yamamoto, T.Miyasaka, Y.Ito, R.Hirayama, T.Inoue, Y.Kirii, E.Nishiwaki, H.Ohmoto, Y.Maeda, E.Ishibushi, Y.Inoue, K.Yoshino, and H.Kondo. 2002. New type of metalloproteinase inhibitor: design and synthesis of new phosphonamide-based hydroxamic acids. *J. Med. Chem.* 45:919-929.
- Schaefer, A.W.,** H.Kamiguchi, E.V.Wong, C.M.Beach, G.Landreth, and V.Lemmon. 1999. Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* 274:37965-37973.
- Schäfer, B.,** A.Gschwind, and A.Ullrich. 2004. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23:991-999.
- Schaller, M.D. and J.T.Parsons.** 1994. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:705-710.

- Scheiffele, P.,** M.G.Roth, and K.Simons. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 16:5501-5508.
- Schmidt, C.,** V.Kunemund, E.S.Wintergerst, B.Schmitz, and M.Schachner. 1996. CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J. Neurosci. Res.* 43:12-31.
- Schmidt, K.,** M.Schrader, H.F.Kern, and R.Kleene. 2001. Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas. Involvement of the glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p, and cholesterol-glycosphingolipid-enriched microdomains. *J. Biol. Chem.* 276:14315-14323.
- Schmitz, G. and W. Drobnik.** 2003. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of cholesterol lowering therapie. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41:581-589
- Scotland, P.,** D.Zhou, H.Benveniste, and V.Bennett. 1998. Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *J. Cell Biol.* 143:1305-1315.
- Seals, D.F. and S.A.Courtneidge.** 2003. The ADAMs family of Metalloproteinases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7-30.
- Selkoe, D.J.** 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8:447-453.
- Sentjurc, M.,** M.Zorec, M.Cemazar, M.Auersperg, and G.Sersa. 1998. Effect of vinblastine on cell membrane fluidity in vinblastine-sensitive and -resistant HeLa cells. *Cancer Lett.* 130:183-190.
- Shaul, P.W. and R.G.Anderson.** 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol* 275:L843-L851.
- Sheets, E.D.,** G.M.Lee, R.Simson, and K.Jacobson. 1997. Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry* 36:12449-12458.
- Shinitzky M.** 1984. Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative. *Biochim. Biophys. Acta.* 738(4):251-261
- Shinkai, K. and H.Akedo.** 1972. A multienzyme complex in serum of hepatic cancer. *Cancer Res.* 32:2307-2313.
- Simons, K. and E.Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons, K. and D.Toomre.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.
- Simons, M.,** P.Keller, B.De Strooper, K.Beyreuther, C.G.Dotti, and K.Simons. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:6460-6464.
- Simons, M.,** E.M.Kramer, C.Thiele, W.Stoffel, and J.Trotter. 2000. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J. Cell Biol.* 151:143-154.
- Singer S.J., and G.L.Nicolson.** 1972. The fluid mosaic modell of the structure of cell membranes. *Science* 175(23):720-731

- Sisodia, S.S.** 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:6075-6079.
- Skovronsky, D.M.,** D.B.Moore, M.E.Milla, R.W.Doms, and V.M.Lee. 2000. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* 275:2568-2575.
- Slack, B.E.,** L.K.Ma, and C.C.Seah. 2001. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem. J.* 357:787-794.
- Sok, M.,** M.Sentjurs, and M.Schara. 1999. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett.* 139:215-220.
- Sonderegger, P. and F.G.Rathjen.** 1992. Regulation of axonal growth in the vertebrate nervous system by interactions between glycoproteins belonging to two subgroups of the immunoglobulin superfamily. *J. Cell Biol.* 119:1387-1394.
- Sottrup-Jensen, L. and H.Birkedal-Hansen.** 1989. Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J. Biol. Chem.* 264:393-401.
- Srour, N.,** A.Lebel, S.McMahon, I.Fournier, M.Fugere, R.Day, and C.M.Dubois. 2003. TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* 554:275-283.
- Stack, M.S.,** S.M.Ellerbroek, and D.A.Fishman. 1998. The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Oncol.* 12:569-576.
- Steinhusen, U.,** J.Weiske, V.Badock, R.Tauber, K.Bommert, and O.Huber. 2001. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:4972-4980.
- Sternlicht, M.D. and Z.Werb.** 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:463-516.
- Streuli, C.** 1999. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:634-640.
- Su, X.D.,** L.N.Gastinel, D.E.Vaughn, I.Faye, P.Poon, and P.J.Bjorkman. 1998. Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science* 281:991-995.
- Subczynski, W.K. and A.Kusumi.** 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1610:231-243.
- Subramanian, S.V.,** M.L.Fitzgerald, and M.Bernfield. 1997. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 272:14713-14720.
- Sunnarborg, S.W.,** C.L.Hinkle, M.Stevenson, W.E.Russell, C.S.Raska, J.J.Peschon, B.J.Castner, M.J.Gerhart, R.J.Paxton, R.A.Black, and D.C.Lee. 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J. Biol. Chem.* 277:12838-12845.

- Takeda, Y.**, H.Asou, Y.Murakami, M.Miura, M.Kobayashi, and K.Uyemura. 1996. A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J. Neurochem.* 66:2338-2349.
- Taraboletti, G.**, S.D'Ascenzo, P.Borsotti, R.Giavazzi, A.Pavan, and V.Dolo. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 160:673-680.
- Tarin, D.** 1969. Fine structure of murine mammary tumours: the relationship between epithelium and connective tissue in neoplasms induced by various agents. *Br. J. Cancer* 23:417-425.
- Taylor, C.M.**, T.Coetzee, and S.E.Pfeiffer. 2002. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J. Neurochem.* 81:993-1004.
- Taylor, D.D. and P.H. Black.** 1985. Inhibition of macrophage Ia antigen expression by shed plasma membrane vesicles from metastatic murine melanoma lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 74(4):859-867
- Taylor, D.D. and P.H.Black.** 1986. Shedding of plasma membrane fragments: Neoplastic and developmental importance. *Dev. Biol.* 3: 33-57.
- Taylor, D.D.**, I.N.Chou, and P.H.Black. 1983. Isolation of plasma membrane fragments from cultured murine melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113:470-476.
- They, C.**, A.Regault, J.Garin, J.Wolfers, L.Zitvogel, P.Ricciardi-Castagnoli, G.Raposo, and S.Amigorena. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* 147:599-610.
- Thies, A.**, M.Schachner, I.Moll, J.Berger, H.J.Schulze, G.Brunner, and U.Schumacher. 2002. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* 38:1708-1716.
- Tokumaru, S.**, S.Higashiyama, T.Endo, T.Nakagawa, J.I.Miyagawa, K.Yamamori, Y.Hanakawa, H.Ohmoto, K.Yoshino, Y.Shirakata, Y.Matsuzawa, K.Hashimoto, and N.Taniguchi. 2000. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J. Cell Biol.* 151:209-220.
- Turner, C.E.** 1994. Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosine kinases. *Bioessays* 16:47-52.
- Van Blitterswijk, W.J.**, G.De Veer, J.H.Krol, and P.Emmelot. 1982. Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochim. Biophys. Acta* 688:495-504.
- Van Blitterswijk, W.J.**, P.Emmelot, H.A.Hilkman, J.Hilgers, and C.A.Feltkamp. 1979. Rigid plasma-membrane-derived vesicles, enriched in tumour-associated surface antigens (MLr), occurring in the ascites fluid of a murine leukaemia (GRSL). *Int. J. Cancer* 23:62-70.
- Van Camp, G.**, L.Vits, P.Coucke, S.Lyonnet, C.Schrander-Stumpel, J.Darby, J.Holden, A.Munnich, and P.J.Willems. 1993. A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nat. Genet.* 4:421-425.

- Van Meer, G. and J.C.Holthuis.** 2000. Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1486:145-170.
- Van Meer, G. and K.Simons.** 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 36:51-58.
- Van Wart, H.E. and H.Birkedal-Hansen.** 1990. 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.
- Varma, R. and S.Mayor.** 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394:798-801.
- Vecchi, M. and G.Carpenter.** 1997. Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *J. Cell Biol.* 139:995-1003.
- Vincent, B., E.Paitel, P.Saftig, Y.Frobert, D.Hartmann, B.De Strooper, J.Grassi, E.Lopez-Perez, and F.Checler.** 2001. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* 276:37743-37746.
- Visconti, P.E., X.Ning, M.W.Fornes, J.G.Alvarez, P.Stein, S.A.Connors, and G.S.Kopf.** 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 214:429-443.
- Vits, L., G.Van Camp, P.Coucke, E.Fransen, K.De Boulle, E.Reyniers, B.Korn, A.Poustka, G.Wilson, C.Schrander-Stumpel, and .** 1994. MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM. *Nat. Genet.* 7:408-413.
- Wang, S.L., M.Kutsche, G.DiSciullo, M.Schachner, and S.A.Bogen.** 2000. Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. *J. Immunol.* 165:2465-2473.
- Weskamp, G., H.Cai, T.A.Brodie, S.Higashyama, K.Manova, T.Ludwig, and C.P.Blobel.** 2002. Mice lacking the Metalloproteinase-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol. Cell Biol.* 22:1537-1544.
- Wiendl, H., M.Mitsdoerffer, V.Hofmeister, J.Wischhusen, A.Bornemann, R.Meyermann, E.H.Weiss, A.Melms, and M.Weller.** 2002. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.* 168:4772-4780.
- Wilhelm, O., M.Schmitt, S.Hohl, R.Senekowitsch, and H.Graeff.** 1995. Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clin. Exp. Metastasis* 13:296-302.
- Wolf, K., I.Mazo, H.Leung, K.Engelke, U.H.von Andrian, E.I.Deryugina, A.Y.Strongin, E.B.Brocker, and P.Friedl.** 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 160:267-277.
- Wolff, J.M., R.Frank, K.Mujoo, R.C.Spiro, R.A.Reisfeld, and F.G.Rathjen.** 1988. A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 263:11943-11947.
- Wolozin, B., W.Kellman, P.Ruosseau, G.G.Celesia, and G.Siegel.** 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57:1439-1443.

- Wood, P.M.**, M.Schachner, and R.P.Bunge. 1990. Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.* 10:3635-3645.
- Wu, E.**, P.I.Croucher, and N.McKie. 1997. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:437-442.
- Xu, H.**, P.Greengard, and S.Gandy. 1995. Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270:23243-23245.
- Yan, R.**, P.Han, H.Miao, P.Greengard, and H.Xu. 2001. The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J. Biol. Chem.* 276:36788-36796.
- Yan, Y.**, K.Shirakabe, and Z.Werb. 2002. The Metalloproteinase Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J. Cell Biol.* 158:221-226.
- Yarden, Y. and M.X.Sliwkowski.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137.
- Yavari, R.**, C.Adida, P.Bray-Ward, M.Brines, and T.Xu. 1998. Human Metalloproteinase-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* 7:1161-1167.
- Yip, P.M. and C.H.Siu.** 2001. PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha5beta3 interaction for neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 76:1552-1564.
- Yip, P.M., X.Zhao, A.M.Montgomery, and C.H.Siu.** 1998. The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alpha5beta3 integrin. *Mol. Biol. Cell* 9:277-290.
- Young, T.N.**, G.C.Rodriguez, A.R.Rinehart, R.C.Bast, Jr., S.V.Pizzo, and M.S.Stack. 1996. Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecol. Oncol.* 62:89-99.
- Yu, Q. and I.Stamenkovic.** 1999. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* 13:35-48.
- Yu, W.H.**, J.F.Woessner, Jr., J.D.McNeish, and I.Stamenkovic. 2002. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* 16:307-323.
- Zhang, X.P.**, T.Kamata, K.Yokoyama, W.Puzon-McLaughlin, and Y.Takada. 1998. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alpha5beta3. *J. Biol. Chem.* 273:7345-7350.
- Zitvogel, L.**, A.Regnault, A.Lozier, J.Wolfers, C.Flament, D.Tenza, P.Ricciardi-Castagnoli, G.Raposo, and S.Amigorena. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4:594-600.



# I ANHANG

## 1 Abkürzungen

|          |           |   |
|----------|-----------|---|
| <b>A</b> | A         | Ampère  |
|          | A $\beta$ | $\beta$ -amyloides Peptid   |
|          | Abb       | Abbildung   |
|          | ABTS      | 2,2-Azino-di-[3-ethylbenzylthiazolinsulfat]                               |
|          | ADAM      | a disintegrin and metalloproteinase                                       |
|          | Ak        | Antikörper  |
|          | am        | anti-Maus   |
|          | AON       | antisense-Oligonukleotid  |
|          | APP       | alzheimer precursor protein, Alzheimer-Vorläufer-Protein                  |
|          | APS       | Ammoniumperoxidisulfat  |
|          | ar        | anti-rabbit, anti-Kaninchen   |
|          | AS        | Aminosäure  |
| <b>B</b> | BACE      | $\beta$ -site APP cleaving enzyme   |
|          | BOG       | N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid  |
|          | bp        | Basenpaar   |
|          | BSA       | bovine serum albumin; Albumin aus Rinderserum                             |
| <b>C</b> | CAM       | cell adhesion molecule, Zelladhäsionsmolekül                              |
|          | CHAPS     | (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propan)sulfonat               |
|          | CHO       | chinese hamster ovary   |
|          | CPE       | cytopathic effect   |
|          | CTL       | cytotoxic T-lymphocyte  |
| <b>D</b> | DAPI      | 2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2-5'-bi-1H<br>benzimidazol |
|          | DIG       | detergent-insoluble glycolipid-rich domain                                |
|          | DMEM      | Dulbecco's modified eagle medium  |
|          | DMSO      | Dimethylsulfoxid  |
|          | DNA       | Desoxyribonukleinsäure  |
|          | dNTP      | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat  |
|          | DRM       | detergent resistant membrane  |
| <b>E</b> | e.coli    | Escherichia coli  |
|          | EDTA      | Ethylendiamintetraacetat  |
|          | EGF       | epidermal growth factor   |
|          | ELISA     | enzyme linked immunosorbent assay   |
|          | Erk       | extracellular regulated kinase  |
|          | EZM       | extrazelluläre Matrix   |
| <b>F</b> | FACS      | fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometrie                  |
|          | FAK       | focal adhesion kinase   |
|          | FCS       | fetal calf serum, fötales Kälberserum                                     |
|          | FD        | farad   |
|          | FGF       | fibroblast growth factor  |
|          | FITC      | Fluoresceinthiocyanat   |
|          | FN        | Fibronectin   |
|          | FNIII     | Fibronectin Typ III   |
|          | fyn       | p95, src-like protein kinase  |

|          |             |  |
|----------|-------------|--|
| <b>G</b> | g           | Gramm  |
|          | GPCR        | G-protein coupled receptor                                   |
|          | GPI         | Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol                               |
| <b>H</b> | GTP         | Guanidin-Triphosphat   |
|          | h           | Stunde   |
|          | HA          | Hemagglutinin  |
|          | HB-EGF      | heparin binding-epidermal growth factor                      |
|          | HEK         | human embryonic kidney                                       |
|          | HEPES       | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethanol-sulfonsäure             |
|          | Her2        | human EGF-like receptor                                      |
|          | HMG-CoA     | Hydroxymethyl-glutaryl-CoenzymA                              |
| <b>I</b> | ICAM        | intercellular adhesion molecule                              |
|          | Ig          | Immunglobulin  |
| <b>K</b> | kb          | Kilobase(n)  |
|          | kDa         | Kilodalton   |
| <b>L</b> | l           | Liter  |
|          | LB          | Luria Broth  |
|          | LPA         | lysophosphatidic acid  |
| <b>M</b> | m           | milli  |
|          | M           | molar  |
|          | mAk         | monoklonaler Antikörper                                      |
|          | MAP         | mitogen activated protein                                    |
|          | MART-1      | melanoma antigen recognized by T-cells                       |
|          | MASA        | mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs |
|          | MCD         | Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin                                |
|          | $\beta$ -ME | $\beta$ -Mercaptoethanol                                     |
|          | MHC         | major histocompatibility complex                             |
|          | min         | Minute   |
|          | ml          | Milliliter   |
|          | mM          | Millimolar   |
|          | MMP         | matrix metalloproteinase                                     |
|          | mRNA        | messenger Ribonukleinsäure                                   |
|          | MT-MMP      | membrane type MMP  |
|          | MVBs        | multivesicular bodies  |
|          | <b>N</b>    | NCAM   |
| ng       |             | Nanogramm  |
| Ng-CAM   |             | neuronal-glia cell adhesion molecule                         |
| NILE     |             | nerve growth factor-inducible large external (glycoprotein)  |
| <b>O</b> | OD          | optische Dichte  |
|          | OPU         | optical particle unit  |
| <b>P</b> | PAGE        | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                              |
|          | PBS         | phosphate buffered saline                                    |
|          | PC          | protein-convertase   |
|          | PCR         | polymerase chain reaction                                    |
|          | PE          | Phycoerythrin  |
|          | pH          | $-\log [H^+]$  |
|          | PKC         | Protein Kinase C   |
|          | PMA         | Phorbol-Myristat-Acetat                                      |
|          | PMSF        | Phenylmethylsulfonylfluorid                                  |
|          | POX         | Peroxidase   |
| <b>R</b> | RNA         | Ribonukleinsäure   |
|          | RPMI        | Roswell Park Memorial Institute                              |

|     |                    |   |
|-----|--------------------|---|
| S   | RT                 | Raumtemperatur  |
|     | SDS                | Natriumdodecylsulfat  |
|     | SNARE              | soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor             |
|     | SPG-1              | Spastische Paraplegie Typ 1   |
| T   | Sulfo-NHS          | N-hydroxysulfosuccinimide   |
|     | TAE                | Tris-Acetat-EDTA  |
|     | TAPI-0             | N-(R)-[2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-naphthylalanyl-L-alanine Amide |
|     | TCA                | Trichlor-Essigsäure   |
|     | TEMED              | N,N,N',N',-Tetramethylendiamin  |
|     | TGN                | trans-Golgi Netzwerk  |
|     | TIMP               | tissue inhibitor of metalloproteinases  |
|     | TNF $\alpha$       | Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$  |
|     | Tris               | Tris (hydroxymethyl) amino-Methan   |
|     | U                  | uPA   |
| Upm |                    | Umdrehungen pro Minute  |
| V   | V                  | Volt  |
| W   | W                  | Watt  |
|     | %                  | Prozent   |
|     | $\alpha$           | anti  |
|     | $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius  |
|     | $\mu$              | mikro   |

### Abkürzungen für Aminosäuren

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

## 2 Lebenslauf

### Svenja Michaela Riedle

Im Gabelacker 27

69120 Heidelberg

Tel.: 06221-3264185

e-mail: s.riedle@dkfz.de

Persönliche Angaben:

Familienstand: ledig

Geboren: 20.01.75 in Landsberg/Lech

#### **Promotion**

---

01/01-12/03      Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für Tumorummunologie, unter Leitung von Prof. Dr. Peter Altevogt zum Thema: „Untersuchungen zur ADAM10-vermittelten Spaltung von L1 in Ovarialkarzinomzellen.“

#### **Studium**

---

06/99-03/00      Diplomarbeit an der Universität Konstanz unter Leitung von Prof. Dr. Claudia Stuermer zum Thema: „Charakterisierung neuer M802-ähnlicher Antikörper gegen GPI-verankerte Zelloberflächenmoleküle im Nervensystem des Fisches.“

10/94-05/99      Studium der Biologie an der Universität Konstanz  
Abschluss als Diplombiologin

#### **Schulbildung**

---

1985-1994      Mariengymnasium Kaufbeuren  
Abschluss: Abitur

1981-1985      Grundschule Germaringen

### 3 Publikationen

Mechtersheimer S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, M. Oleszewski, **S. Riedle**, R. Postina, F. Fahrenholz, M. Fogel, V. Lemmon and P. Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155:661-673

**Riedle S.**, P. Gutwein, S. Mechtersheimer, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel and P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB* 17: 292-294

Fogel M., P. Gutwein, S. Mechtersheimer, **S. Riedle**, A. Stoeck, A. Smirnov, I. Edler, A. Ben-Arie, M. Huszar and P. Altevogt. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362:869.875

**Riedle S.**, S. Schlich, D. Gast, M. Lindner, M. Fogel, S. Joumaa, A. Stoeck, T. P. Condon, A. Marmé, I. Herr, P. Gutwein and P. Altevogt. 2004. L1 and ADAM10 promote adhesion and migration of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* (zur Veröffentlichung eingereicht)

Gutwein P., A. Stoeck, **S. Riedle**, D. Gast, M.C. Phong, O. Linderkamp, A. Skorokhod and P. Altevogt. 2004. Hypoxia and apoptotic stimuli induce release and cleavage of L1 adhesion molecule from cancer cells in membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* (in Vorbereitung)

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg, den 22. März 2004

---

Svenja Riedle