

Frauenklinik der Technischen Universität München  
Klinische Forschergruppe  
(AG: Priv.-Doz. Dr. U. Reuning)

**Humanes ADAM15 als potentieller natürlicher  
Integrin  $\alpha v \beta 3$ -Antagonist:  
Einfluß der ADAM15-Expression auf Migration und  
Zell/Zell-Adhäsion von humanen Ovarialkarzinomzellen**

Veronika Beck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. U. Reuning  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 25.08.2009 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.10.2009 angenommen.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Fachzeitschrift

Beck, V., Herold, H., Bengel, A., Lubber, B., Hutzler, P., Tschesche, H., Kessler, H., Schmitt, M., Geppert, H. G., Reuning, U. (2005). ADAM-15 decreases integrin  $\alpha v \beta 3$ /vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 590-603.

Reuning, U., Schmitt, M., Lubber, B., Beck, V., Magdolen, V. (2006). Methods to analyze the effects of the urokinase system on cancer cell adhesion, proliferation, migration and signal transduction events. *Methods Mol Med*, 120, 427-440.

Poster

Beck, V., Herold, H., Geppert, H., Bengel, A., Schmitt, M., Reuning, U. (2002). Effects of ADAM-15 overexpression on proliferation, migration, cell-cell and cell-matrix interaction of human ovarian cancer cells. International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, München.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite	
<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.2	Die Zelle und ihre Umgebung – ein strukturelles und kommunikatives Netzwerk	2
1.2.1	Vitronektin als Teil der extrazellulären Matrix	2
1.2.2	Integrine	3
1.2.2.1	Die Familie der Integrine	3
1.2.2.2	Das Integrin $\alpha v\beta 3$	7
1.2.2.3	Bedeutung von Vitronektin und Integrin $\alpha v\beta 3$ für die Ovarialkarzinom-Progression	8
1.2.2.4	Integrin $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten in onkologischen Therapieansätzen	9
1.3	ADAMs	11
1.3.1	Die ADAM-Proteinfamilie	11
1.3.2	ADAM15	15
1.3.2.1	Die Domänen von ADAM15	16
1.3.2.1.1	Die Pro-Domäne	16
1.3.2.1.2	Die Metalloproteinase-Domäne	17
1.3.2.1.3	Die Disintegrin-Domäne	19
1.3.2.1.4	Die Cystein-reiche und EGF-ähnliche Domäne	22
1.3.2.1.5	Die transmembrane und cytoplasmatische Domäne	23
1.3.2.2	Die Rolle von ADAM15 in verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen	24
1.3.2.2.1	ADAM15, Alterungs- und benigne Krankheitsprozesse	24
1.3.2.2.2	ADAM15, Neovaskularisation und Tumorprogression	25
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Material	29
2.1.1	Zelllinien	29
2.1.1.1	Humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6	29
2.1.1.2	<i>Chinese hamster ovary</i> -Zellen	29
2.1.2	Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien	29
2.1.2.1	Etablierung von stabil ADAM15-transfizierten Zelllinien	29
2.1.2.2	Etablierung von humanen Ovarialkarzinomzelllinien mit erhöhter Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expression	32
2.1.3	Materialien für die Zellkultur	33
2.1.4	Reagenzien zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit extrazellulären Matrixproteinen	34
2.1.5	Antikörper	34
2.1.6	Reagenzien für Polyacryl-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse	35
2.1.7	Sonstige Materialien und Reagenzien	35
2.1.8	Instrumente	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Zellkultur	37

2.2.1.1	Kultivierung von Zellen	37
2.2.1.2	Einfrieren von Zellen	37
2.2.1.3	Transiente Zelltransfektion	37
2.2.1.4	Herstellung von Zelllysaten	38
2.2.1.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	39
2.2.2	SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese	39
2.2.3	Westernblot-Analyse	39
2.2.4	Zellmigrationsstudien mittels <i>time-lapse</i> -Videomikroskopie	40
2.2.5	Zell/Zell-Adhäsionstests	42
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Charakterisierung der hADAM15-Expression in OV-MZ-6-Zellen	44
3.1.1	Nachweis des humanen ADAM15-Proteins in der Westernblot-Analyse	44
3.1.2	Zell/Zell-Adhäsionsexperimente	45
3.1.2.1	Etablierung der Methode	46
3.1.2.2	Einfluß von ADAM15 auf die Zell/Zell-Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen	47
3.1.2.3	Einsatz von löslichen RGD-Peptiden	49
3.1.3	Zellmigrationsstudien	50
3.1.3.1	Optimierung der Zellmigrationsstudien mittels <i>time-lapse</i> -Videomikroskopie	50
3.1.3.1.1	Variation der Inkubationszeit der ausgesäten OV-MZ-6-Zellen	50
3.1.3.1.2	Variation weiterer Versuchsparameter	51
3.1.3.1.3	Definition der Bedingungen zur Versuchsauswertung	51
3.1.3.2	Ergebnisse aus Zellmigrationsstudien mit OV-MZ-6-Zellen	52
3.1.3.2.1	ADAM15 beeinflusst die Morphologie von humanen Ovarialkarzinomzellen auf Vitronektin	52
3.1.3.2.2	ADAM15 reduziert die Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Vitronektin RGD-spezifisch	53
3.1.3.2.3	Einfluß von ADAM15 auf die Zellteilung von OV-MZ-6-Zellen	55
3.1.3.2.4	ADAM15 erhöht den Prozentsatz sich ablösender Zellen auf Vitronektin im Vergleich zu Kollagen Typ IV	56
3.2	Charakterisierung der hADAM15-Expression in CHO-Zellen	57
3.2.1	Ergebnisse aus Zellmigrationsstudien mit CHO-Zellen	57
3.2.1.1	Humanes ADAM15 hat keinen Einfluß auf die CHO-Zellmorphologie	57
3.2.1.2	Einfluß von hADAM15 auf die Motilität von CHO-Zellen auf Vitronektin	58
3.2.1.3	Einfluß von hADAM15 auf die Zellteilung und Adhärenz von CHO-Zellen	58
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1	Integrin $\alpha v \beta 3$ und hADAM15 – neue Therapieoptionen für das Ovarialkarzinom?	60
4.2	Die Integrin $\alpha v \beta 3$ /hADAM15-Interaktion – Überlegungen zum Studiendesign	62
4.2.1	Einfluß der hADAM15-Expression auf die Zell/Zell-Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen	64

4.2.2	Einfluß von hADAM15 auf die Migration humaner Ovarialkarzinomzellen	66
4.2.3	Einfluß von hADAM15 auf die Morphologie humaner Ovarialkarzinomzellen	69
4.2.4	Einfluß der hADAM15-Expression auf die Zell/EZM-Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen in der <i>time-lapse</i> -Videomikroskopie	69
4.2.5	Einfluß der hADAM15-Expression auf die Proliferation von OV-MZ-6-Zellen	71
4.2.6	Einfluß der hADAM15-Expression in CHO-Zellen	72
4.3	Zusammenfassung und Ausblick	73
<b>V.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ADAM	<i>A <u>d</u>isintegrin <u>a</u>nd <u>m</u>etalloproteinase</i>
A. dest.	Destilliertes Wasser
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	<i>C</i> hinese <i>h</i> amster <i>o</i> vary
(C)LSM	(Konfokale) Laser-Scanning-Mikroskopie
Col (-I/ -IV)	Kollagen (Typ I/ IV)
DiO	3,3'-Diocetadecyloxacarboxycyaninperchlorat
DMEM	<i>D</i> ulbecco's <i>M</i> odified <i>E</i> agle <i>M</i> edium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Extrazellulär = Ecto-
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor(rezeptor)
FCS	Fetales Kälberserum
FL-	Vollständiges Protein ( <i>full length</i> )
FN	Fibronektin
GAM	Wachstum arretierendes Medium ( <i>growth arrest medium</i> )
GF(s)	Wachstumsfaktor(en)
GFR	Wachstumsfaktorrezeptor
hADAM	Humanes ADAM
HB-EGF	Heparin-bindender, dem epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlicher Wachstumsfaktor
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LN	Laminin
mADAM	Murines ADAM
mAK	Monoklonaler Antikörper
MDC	<i>M</i> etalloproteinase/ <i>d</i> isintegrin/ <i>c</i> ysteine-rich
MMP(s)	Matrixmetalloprotease(n)
mRNA	Boten-RNA
OSE-(Zellen)	Ovarielle Oberflächenepithel-(zellen)
OVCA(s)	Ovarialkarzinom(e)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Wachstumsfaktor sezerniert von Thrombozyten ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGA	Serin-Glycin-Alanin
SVMP(s)	Metalloprotease(n) aus Schlangengift
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
üN	Über Nacht
VEC	Vektor
VEGF(R)	Wachstumsfaktor(rezeptor) des Gefäßendothels ( <i>vascular endothelial growth factor (receptor)</i> )
VN	Vitronektin
v/v	Volumen/ Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/ Volumen

# I. Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom (OVCA) ist in Europa und den USA nach dem Endometriumkarzinom das zweithäufigste genitale Malignom der Frau. Es steht jedoch an erster Stelle der krebssbedingten Mortalität bei weiblichen Genitaltumoren. Die Ätiologie des OVCA ist in den meisten Fällen unklar. Das Inzidenzgefälle von Industrieregionen wie den USA und Westeuropa hin zu weniger entwickelten Ländern in Afrika und Asien, läßt physikalische, chemische und nutritive Faktoren ätiologisch bedeutsam erscheinen. Es gelang bisher jedoch nicht, spezielle Karzinogene zu identifizieren. Ein bekannter Risikofaktor für OVCA ist eine hohe Anzahl von Ovulationen im Leben einer Frau und die damit einhergehenden Reparaturvorgänge am Ovar: Entsprechend erhöhen eine frühe Menarche, eine späte Menopause und Nulliparität das Risiko an OVCA zu erkranken. Die mehrjährige Einnahme von Ovulationshemmern wirkt protektiv. Ca. 5–10 % aller OVCA sind auf erbliche Gendefekte zurückzuführen, dabei spielen vor allem Mutationen im BRCA-1 und -2 Gen (Chromosom 17 bzw. 13) eine Rolle. Auch das autosomal-dominant vererbte Lynch-II-Syndrom geht mit einem erhöhten Risiko für OVCA einher. Im Frühstadium fehlen beim OVCA typischerweise jegliche Symptome und auch bei fortgeschrittener Erkrankung sind die Krankheitszeichen unspezifisch. Zudem gibt es keinen geeigneten *screening*-Parameter für die OVCA-Früherkennung, was dazu führt, dass die Diagnose OVCA meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt wird. Die Prognose ist infaust. Laut der *Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Ausgabe 2004)* sterben 61 % der an OVCA erkrankten Frauen innerhalb der ersten 5 Jahre. Standardtherapie des OVCA ist die möglichst komplette Entfernung des Tumors und anschließende Chemotherapie mit Carboplatin und Taxol. Auch wenn die Tumorentfernung nur unvollständig gelingt, ist die möglichst weitgehende Reduzierung des Tumorzvolumens als Prognosefaktor entscheidend. Trotz Etablierung tumorstadienabhängiger Therapieprotokolle und intensiver Forschung konnte allenfalls ein leichter Rückgang der Mortalität des OVCA in Deutschland und den USA über die letzten 20 Jahre erzielt werden (Engel et al., 2007). Daher ist die Suche nach neuen Behandlungsoptionen für das OVCA unerlässlich. Molekulare Mechanismen der Tumorprogression rücken hierbei ins

Interesse der Forscher: Eine zentrale Rolle bei der Ausbreitung des OVCA scheinen Veränderungen im Expressionsmuster bestimmter Integrine zu spielen, welche in der Folge die physiologischen strukturellen und signaltransduktiven Verbindungen zwischen der Zelle und ihrer jeweiligen Umgebung im Sinne der Tumorprogression modifizieren (Carreiras et al., 1996, Liapis et al., 1997, Kenny et al., 2008). Die Grundlagen dieser Vorgänge sollen im weiteren ausführlicher beschrieben werden.

## **1.2 Die Zelle und ihre Umgebung – ein strukturelles und kommunikatives Netzwerk**

### **1.2.1 Vitronektin als Teil der extrazellulären Matrix**

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus verschiedenen Glykoproteinen und Proteoglykanen. Darüber stellt sie den in ihr befindlichen Zellen ein enormes Angebot an potentiellen Signalen zur Verfügung (Damsky und Werb, 1992). Auf welche Reize eine Zelle wie reagiert, kann diese auf zwei verschiedene Arten partiell selbst modulieren: Zum einen sind es die in der EZM befindlichen Zellen, die diese sezernieren (van der Flier und Sonnenberg, 2001) und als Gebilde um sich formen (Giancotti und Ruoslahti, 1999), zum anderen haben die Zellen die Fähigkeit ihr Expressionsmuster an und den Aktivierungszustand von Rezeptoren unter anderem dynamisch zu verändern (Hynes, 1992). So entsteht ein strukturelles und informatives Netzwerk, in das einerseits die Zellen mit ihren Rezeptoren und andererseits die EZM über ihre Proteine wie Vitronektin (VN), Fibronektin (FN), Laminin (LN) oder Kollagene (Col) eingebunden sind. VN spielt durch seine Interaktion mit dem in Tumorprogression und Metastasierung involvierten Integrin  $\alpha v \beta 3$  eine besondere Rolle. Lange galt VN als ein reines Lebersyntheseprodukt, welches von dort über Sekretion ins Blut gelangt. Heute sind verschiedene Zellen bekannt, die in der Lage sind, VN zu synthetisieren und in ihre EZM einzubauen. Darunter fallen auch ovarielle Epithel- und OVCA-Zellen (Cruet et al., 1999, Heyman et al., 2008).

## 1.2.2 Integrine

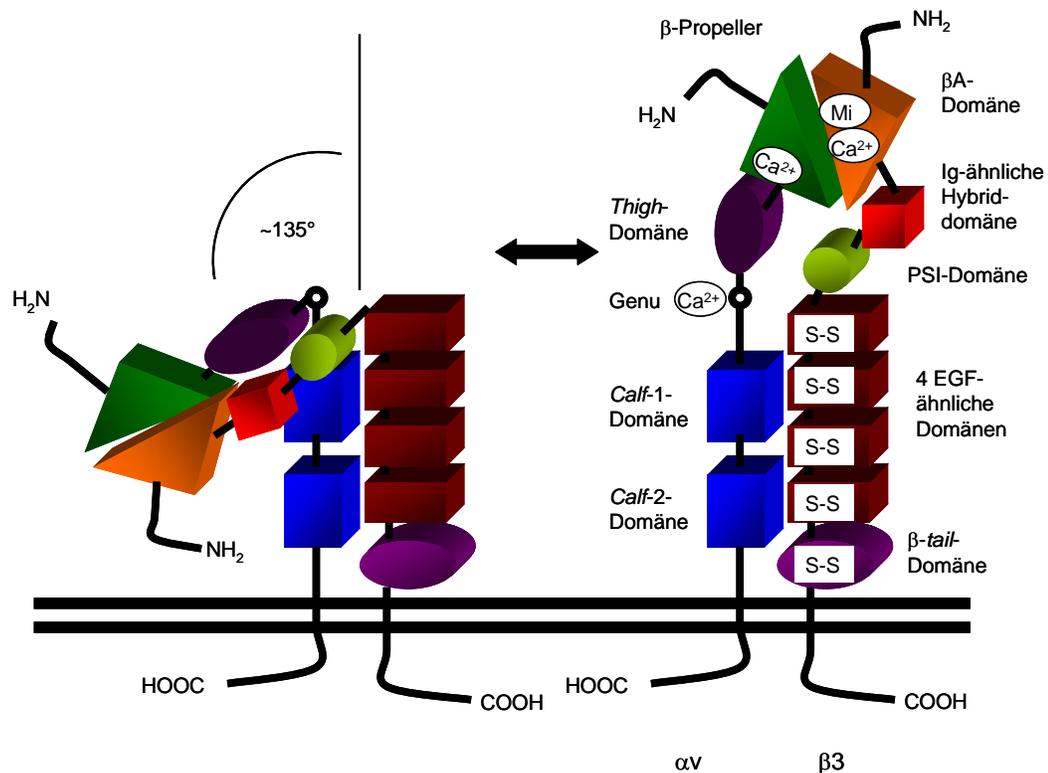
### 1.2.2.1 Die Familie der Integrine

Von den 4 großen Adhäsionsrezeptorfamilien (Cadherine, Selektine, Immunglobulin (Ig)-Superfamilie, Integrine) sind die Integrine im wesentlichen für die Interaktion zwischen Zellen und EZM-Proteinen verantwortlich (Hynes und Lander, 1992, Clark und Brugge, 1995). Integrine sind transmembrane, heterodimere Glykoproteine, die sich aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen (Abb. 1). Beim Menschen sind über 20 verschiedene dieser Adhäsionsrezeptoren bekannt. Neben dem jeweiligen Integrintyp – bestimmt durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit – wird der Aktivierungszustand und damit die Affinität der Integrine für spezifische Liganden wesentlich über die Bindung zweiwertiger Kationen im Bereich der extrazellulären Domäne reguliert. Kristallisiert zeigen Integrine einen knollenförmigen Kopf, in dem beide Untereinheiten zur Liganden-bindenden-Domäne beitragen (Xiong et al., 2001).

Ihre Liganden erkennen Integrine über kurze Peptidsequenzen wie das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv, welches unter anderem vom Integrin  $\alpha v \beta 3$  gebunden wird. Ein RGD-Motiv besitzen die EZM-Proteine VN, FN, LN und Col, wobei es bei den beiden letzteren meist durch Tertiär- und Quartärstruktur einer Integrinbindung primär nicht zugänglich ist (Ruoslahti und Pierschbacher, 1986, Zanetti et al., 1994, van der Flier und Sonnenberg, 2001).

Integrine sind auf Zellen weitverbreitet. Dabei besitzt eine Zelle meist verschiedene Integrine, die wiederum potentiell mit mehreren verschiedenen Liganden in Interaktion treten können. Auch die EZM-Proteine sind nicht auf einen Integrinrezeptor festgelegt. Diese Redundanz spezifisch einzuschränken gelingt über ein für bestimmte Zellen charakteristisches Expressionsmuster an Integrinen, spezifische die Zellen umgebende EZM-Liganden und den unterschiedlichen Aktivierungszustand der Integrine (Hynes, 1992, Hynes und Lander, 1992, Wei et al., 1996, Giancotti, 1997, Siletti und Cheresch, 1999, Vicente-Manzanares et al., 2009). Daneben werden häufig Kooperationen und Wechselwirkungen der Integrine untereinander und zwischen Integrinen und anderen Zellrezeptoren beobachtet (Blystone, 1994, Clark und Brugge, 1995, Wei et al., 1996, Diaz-Gonzalez, 1996, Chapman, 1997, Giancotti, 1997, Giancotti und Ruoslahti, 1999, van der Flier und

Sonnenberg, 2001, Schwartz und Ginsberg, 2002, Reuning et al., 2003, Streuli und Akhtar, 2009). Weiterhin sind zahlreiche *splice*-Varianten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten z. T. mit gewebespezifischer Verteilung bekannt (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Durch diese Mechanismen schafft es eine Zelle, aus der an sich nicht sehr selektiven Integrin/Liganden-Reaktion ein hochspezifisches Ereignis zu machen.



**Abb. 1. Die Integrinstruktur am Beispiel von Integrin  $\alpha v \beta 3$**

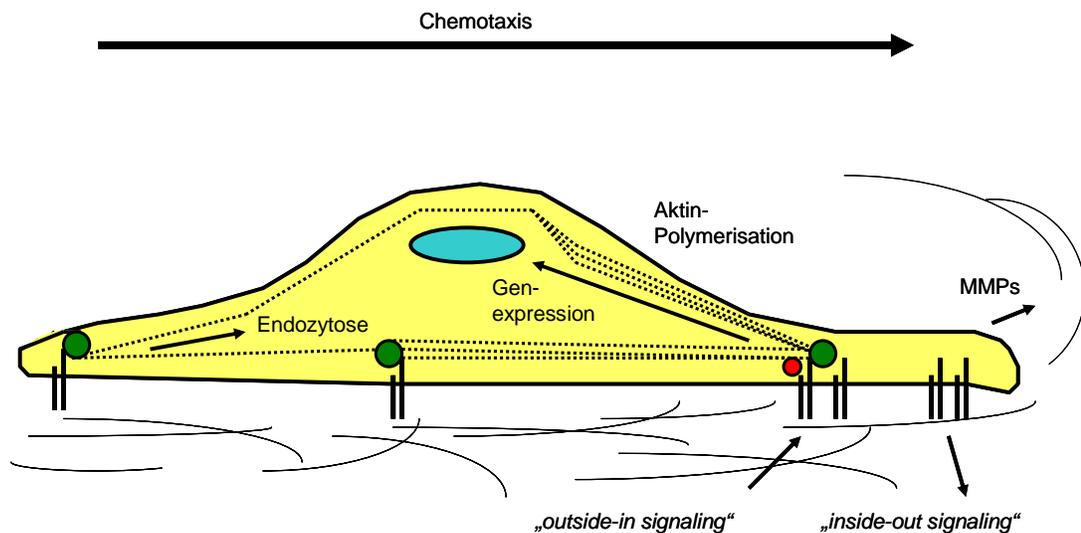
Integrine bestehen aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Beide Ketten besitzen eine kurze cytoplasmatische und transmembrane Domäne, während sich der Hauptteil des Proteins extrazellulär befindet. Dort tragen beide Untereinheiten innerhalb eines knollenförmigen Proteinkopfes (2 Dreiecke) zur Bildung der Liganden-bindenden Domäne (Innenseite der Dreiecke) bei. Der extrazelluläre Bereich der  $\beta 3$ -Kette setzt sich aus der  $\beta A$ -, einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Hybrid-, sowie einer PSI (Plexine, Semaphorine, Integrine)-Domäne, 4 EGF (epidermalen Wachstumsfaktor)-ähnlichen Domänen, sowie einer  $\beta$ -tail-Domäne zusammen. Der extrazelluläre Anteil der  $\alpha v$ -Kette besteht aus der  $\beta$ -Propeller-Einheit, sowie einem an ein Bein erinnernden Proteinrest: Dieser besitzt entsprechend eine *thigh*- sowie 2 *calf*-Domänen, die über ein *genu* genanntes Gelenk verbunden sind. Interessanterweise kann der extrazelluläre Anteil von Integrin  $\alpha v \beta 3$  *in vitro* an dieser Stelle in einem  $\sim 135^\circ$  Winkel zusammenklappen werden, was in der linken Bildhälfte dargestellt ist. Darüber könnte der Aktivierungszustand von Integrin  $\alpha v \beta 3$  gesteuert werden. Weitere flexible Strukturmerkmale, die über Konformationsänderungen an der Regulierung der Funktion von Integrin  $\alpha v \beta 3$  beteiligt sein könnten, finden sich im Bereich zwischen  $\beta$ -Propeller und *thigh*-Domäne, sowie innerhalb der  $\beta$ -tail-Domäne. Darüberhinaus sind Integrine in ihrer spezifischen Funktion von zweiwertigen Kationen abhängig. Bindungsstellen dafür sind mit  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  (für MIDAS-Motiv: *metal-ion-dependent adhesion site*) markiert. Disulfidbrücken stabilisieren die  $\beta 3$ -Kette und wurden in der Abbildung mit S-S gekennzeichnet (adaptiert von Xiong et al., 2001).

Adhäsion und Migration sind wichtige Integrinfunktionen: Der für koordinierte Zellbewegung notwendige, fein abgestimmte Wechsel zwischen EZM-Ablösung und EZM-Adhäsion unterliegt wesentlich den Integrinen. Sie stellen an der Spitze der sich in neue Umgebung vortastenden Filopodien Kontakt zwischen EZM und Zelle her und sorgen für die Ausbildung sogenannter fokaler Adhäsionsstellen. Bei diesen handelt es sich um weit mehr als nur Vernetzungspunkte zwischen Zelle und EZM: Hier findet ein Integrin-vermittelter Informationsaustausch zwischen Zelle und Umgebung statt. Integrine fungieren dabei charakteristischerweise als Signalmoleküle in beide Richtungen: Beim „*outside-in signaling*“ nimmt die Zelle Reize aus ihrer Umgebung auf: An den fokalen Adhäsionsstellen bewirkt die Integrin/Liganden-Bindung das *clustering* von Integrinen und die Akkumulierung von Signal- und cytoskeletalen Struktur molekülen (Damsky und Werb, 1992, van der Flier und Sonnenberg, 2001, Huveneers et al., 2007). Adapterproteine stellen die Verbindung zwischen den einzelnen Molekülen her. Über phosphorylierungsabhängige Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und Zusammenführung der Signale verschiedener Rezeptoren, kommt es zur Interaktion zwischen Integrinen und z. B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (GFs) und letztlich zu Integrin-abhängiger, differentieller Genexpression (Schwartz, 1992, Hynes, 1992, Clark und Brugge, 1995, Giancotti, 1997, Giancotti und Ruoslahti, 1999, van der Flier und Sonnenberg, 2001, Reuning et al., 2003, Huveneers et al., 2007). Beim „*inside-out signaling*“ wird vom Zellinneren aus die Affinität der Integrine gegenüber Liganden durch z. B. Konformationsänderung dynamisch reguliert (Schwartz und Ginsberg, 2002, Xiong et al., 2001, Huveneers et al., 2007). Die vielfältigen Integrinfunktionen werden anhand ihrer Bedeutung für die Zellmotilität in Abbildung 2 genauer erläutert.

Neben Adhäsion und Migration nehmen Integrine auf verschiedene andere zellbiologische Abläufe wichtigen Einfluß: Ob eine Zelle proliferiert oder sich differenziert, und wann Apoptose eintritt, wird Integrin-abhängig reguliert: So wird z. B. erst durch die Kopplung von Wachstumsrezeptor-Signalen an Integrine Zellwachstum von Adhäsion abhängig (Giancotti und Ruoslahti, 1999, Ramsay et al, 2007).

All diese Prozesse bestimmen die physiologischen Abläufe im Organismus, entscheidende Bedeutung haben sie jedoch auch bei pathologischen Vorgängen: Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose, Adhäsion und

Migration mit begrenzter EZM-Degradierung sowie eine Aufhebung von Regulationsmechanismen wie Kontakthinderung und Adhäsionsabhängigkeit von Zellwachstum oder Apoptoseinduzierung bei Zellablösung führt zu maligner unkontrollierter Proliferation, Tumordinvasion und Metastasierung (Ruoslahti und Reed, 1994, Clark und Brugge, 1995, Wei et al., 1996, Giancotti, 1997, Assoian, 1997, Silletti und Cheresch, 1999, van der Flier und Sonnenberg, 2001, Reuning et al., 2003, Ramsay et al., 2007).



**Abb. 2. Zellmigration als Funktion der Integrin/EZM-Interaktion**

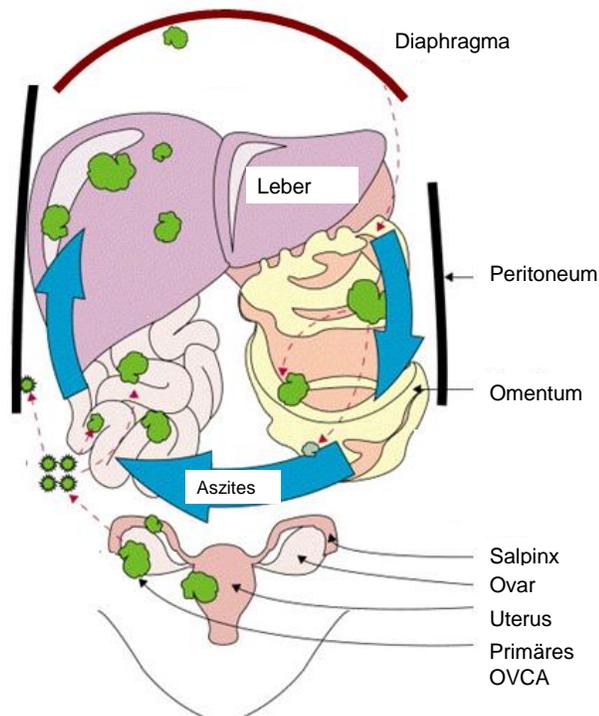
Anreiz für eine gerichtete Zellbewegung kann ein chemotaktisches Signal z. B. durch bestimmte Serumproteine sein. Die Zelle reagiert hierauf durch Polarisierung im Sinne einer Umverteilung ihrer EZM-Rezeptoren – wesentlich dabei der Integrine (hier als 2 parallele schwarze Balken dargestellt) - und ihres Cytoskeletts (gestrichelte Linien). Entscheidend für die Ausrichtung der Zelle auf ein bestimmtes Ziel hin scheinen endozytotische Vorgänge zu sein, bei denen die Integrinrezeptoren lokal vermehrt internalisiert werden, um so eine gesteigerte Motilität bestimmter Zellareale zu erreichen. Desweiteren scheint eine Umverteilung der Zell/EZM-Rezeptoren in Richtung der Zellspitze (im Bild rechte Zellende) stattzufinden. „*Inside-out signaling*“ sorgt für eine Akkumulation aktivierter Integrine im Bereich der Filopodien, die eine hohe Affinität für das jeweilige EZM-Protein (gebogene schwarze Linien) aufweisen. Die Integrin/EZM-Bindung führt dort zum *clustering* von Integrinen, welches im Zellinneren von der Akkumulation cytoplasmatischer Struktur- und Signalproteine begleitet wird (roter Kreis) (= fokale Adhäsionsstelle). Adapterproteine (grüner Kreis) stellen die Verbindung zwischen den einzelnen Molekülen her. Integrin/Aktin-*crosstalk* führt zur Aktin-Polymerisation (parallele gestrichelte Linien) und damit zur Ausbildung stabiler Bindungen zwischen dem Cytoskelett einerseits und den Integrinen bzw. der EZM andererseits, welche der Zelle in der Folge eine gerichtete Bewegung entlang dieser sogenannten *traction points* erlauben. Die Integrin/Aktin-Verbindungen unterliegen während der Migration einem raschen Wechsel von Auf- und Abbau gerade im Bereich der Filopodien. Über phosphorylierungsabhängige Signalkaskaden und die lokale Zusammenführung bestimmter Rezeptorsignale innerhalb der fokalen Adhäsionsstellen erfolgt eine Einflußnahme der Integrin/EZM-Bindung auf die Genexpression der Zelle („*outside-in signaling*“). Bestimmte Integrine wie Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  sind z. B. in die Regulierung der Aktivität von Matrixmetalloproteasen (MMPs) involviert. Über deren proteolytische Aktivität wird gerade Tumorzellen die Migration durch Gewebebarrieren erleichtert (rechter Bildrand) (adaptiert von Ramsay et al., 2007, Caswell und Norman, 2008 und Vicente-Manzanares et al., 2009).

### 1.2.2.2 Das Integrin $\alpha\beta3$

Innerhalb der Integrinfamilie besitzt das Integrin  $\alpha\beta3$  wegen seiner herausragenden Rolle bei der Tumorprogression besondere Bedeutung (Albelda et al., 1990, Liapis et al., 1997, Gasparini et al., 1998, Schnell et al., 2008, Lai et al., 2008). Sein spezifischer Aufbau wurde im Kapitel „Die Familie der Integrine“ bereits exemplarisch dargestellt (Abb. 1).

Integrin  $\alpha\beta3$  erkennt seine Liganden vornehmlich über das RGD-Motiv, worüber es z. B. die Adhäsion an VN herstellt, aber auch zahlreiche weitere EZM-Proteine bindet (Ruoslahti und Pierschbacher, 1986, van der Flier und Sonnenberg, 2001). In Verbindung mit seinen Liganden besitzt Integrin  $\alpha\beta3$  die Fähigkeit, die Zelladhäsion zu steuern und die Proliferation sowie Motilität insbesondere bei verschiedenen Krebszellen zu steigern (Stefansson und Lawrence, 1996, Eliceiri et al., 1998, Ria et al., 2002, Chellaiah und Hruska, 2002, Cruet-Hennequart et al., 2003, Leroy-Dudal et al., 2005, Heyman et al., 2008, Fong et al., 2008, Buommino et al., 2008). In Vorarbeiten der AG Reuning konnte dies eindrucksvoll für OVCA-Zellen gezeigt werden: Die Integrin  $\alpha\beta3$ -Überexpression steigert in der humanen OVCA-Zelllinie OV-MZ-6 über Bindung des Liganden VN die Motilität, Adhäsion und Proliferation und damit die Malignität der Tumorzellen vielfach. Eine Rolle scheint dabei die verstärkte Expression und Aktivierung des EGFR (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) zu spielen (Hapke et al., 2001 und 2003, Lössner et al., 2008). Die Tumorinvasivität fördert das Integrin  $\alpha\beta3$  weiterhin über eine erhöhte Expression von EZM-degradierenden Proteasen wie der Matrixmetalloproteasen (MMP) 2 und 9 und deren Lokalisierung an die „Invasionsfront“ (Marshall und Hart, 1996, Bafetti et al., 1998, Ria et al., 2002, Ahmed et al., 2002, Kim et al., 2008): So gelingt es Tumorzellen natürliche Barrieren zu überwinden, in angrenzendes Gewebe und Blutgefäße einzubrechen und Metastasen zu bilden (s. auch Abb. 2). Diese Form der Metastasierung ist für das OVCA im Gegensatz zu vielen anderen Malignomen allerdings von untergeordneter Bedeutung: Anstatt hämatogen oder lymphogen zu metastasieren, breiten sich Tumorzellen hier vornehmlich über die Peritonealflüssigkeit bzw. den charakteristischerweise vorhandenen Aszites im Bauchraum aus (Abb. 3).

**Abb. 3. Ausbreitung von OVCA-Zellen im Bauchraum**



Modulierung der Zell/Zell-Adhäsion erlaubt der OVCA-Zelle sich aus dem soliden Primärtumor zu lösen. Eine gesteigerte Motilität und Proteolyse natürlicher Barrieren wie der Kapsel des Ovars ermöglichen ihr die Invasion in den Peritonealraum. Über die Peritonealflüssigkeit bzw. Aszites erreicht die Tumorzelle weitere Strukturen des Bauchraums.

Auf der Oberfläche von Peritoneum und anderen Bauchorganen wird die OVCA-Zelle wieder adhären. Es kommt zur Bildung solider Zweittumoren, den peritonealen Metastasen.

Integrin  $\alpha\beta 3$  ist maßgeblich an der Definition proteolytischer, adhäsiver sowie motiler Charakteristika von Tumorzellen beteiligt (adaptiert von Tan et al., 2006).

Weiterhin gewährleistet Integrin  $\alpha\beta 3$  den exprimierenden Zellen Apoptoseschutz (Strömblad et al., 1996, Eliceiri et al., 1998, Stupack et al., 2001, Grigoriou et al., 2005) und scheint darüberhinaus in Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika eingebunden zu sein (Brozovic et al., 2008). In der für Tumorwachstum und Metastasierung bedeutenden Neovaskularisierung kommt dem Integrin  $\alpha\beta 3$  eine Schlüsselrolle zu: Während das Endothel bestehender Blutgefäße wenig bis gar kein Integrin  $\alpha\beta 3$  exprimiert, wird dieses durch Angiogenese-stimulierende Cytokine und GFs (aus z. B. Tumorzellen) im jeweiligen Gefäßendothel stark heraufreguliert und ist für die daraufhin folgenden angiogenetischen Vorgänge entscheidend (Brooks et al., 1994a, Gasparini et al., 1998).

### **1.2.2.3 Bedeutung von Vitronektin und Integrin $\alpha\beta 3$ für die Ovarialkarzinom-Progression**

Histomorphologisch ist für das fortgeschrittene OVCA das Nebeneinander von adhären (Primärtumor, peritoneale Implantationsmetastase) und abgelösten, oft in

Aszites schwimmenden Tumorzellen und -zellverbänden charakteristisch (s. Abb. 3). Der Modulierung von Zelladhäsionseigenschaften kommt in der Tumorprogression also besondere Bedeutung zu. Daher nehmen Integrine als Adhäsionsrezeptoren und ihre Interaktion mit charakteristischem Tumor-umgebenden Mikromilieu eine zentrale Position in der OVCA-Forschung ein. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass OVCA-Zellen ihre Adhäsion, Proliferation und Migration – entscheidende Vorgänge während der Metastasierung – über spezifische EZM-Protein/Integrin-Signalwege regulieren. Besondere Bedeutung dabei haben das Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  und sein Ligand VN (Carreiras et al., 1999a und b, Hapke et al., 2003, Leroy-Dudal et al., 2005, Heyman et al., 2008, Landen et al., 2008, Lössner et al., 2008). So induziert Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  in OVCA-Zellen zum Beispiel die verstärkte Expression von MMP 2. Diese wiederum scheint über die Freilegung bestimmter VN-Bindungsstellen für das Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  eine Rolle bei bereits der frühen Ausbreitung der Tumorzellen im Peritonealraum zu spielen (Kenny et al., 2008).

Sowohl normale OSE (ovarielle Oberflächenepithel)-Zellen als auch OVCA-Zellen sind in der Lage Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  und VN zu synthetisieren und damit ihre Adhäsion zu organisieren (Cannistra et al., 1995, Cruet et al., 1999, Carreiras et al., 1999a, Heyman et al., 2008, Landen et al., 2008). Verglichen mit den OSE-Vorläuferzellen ist die Fähigkeit der OVCA-Zellen zur VN- und Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Synthese jedoch nicht ein gleichbleibendes Merkmal, sie erfährt vielmehr entscheidende Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression: Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  wird in signifikant höherem Ausmaß von OVCA-Zellen als ovariellen *borderline*-Tumoren exprimiert (Carreiras et al., 1996, Liapis et al., 1997).

#### **1.2.2.4 Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antagonisten in onkologischen Therapieansätzen**

Die Suche nach Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antagonisten zur Therapie humaner Krebserkrankungen ist inzwischen ein Kernstück onkologischer Forschung. Dabei steht die tumorabhängige Angiogenese im Mittelpunkt der Untersuchungen. Zum Einsatz kommen Substanzen wie Antikörper (AK), Peptide, Peptidmimetika, *small molecules*, *small interfering RNA* (Ribonukleinsäure) aber auch Kombinationstherapien mit herkömmlichen Methoden (Belvisi et al., 2005, Cai und Chen, 2006, Xiao et al., 2008). Für das weitere Verständnis dieser Arbeit sind in erster

Linie zyklische RGD-Peptide sowie AK gegen Integrin  $\alpha v \beta 3$  von Bedeutung: RGD-Peptide dienen der gezielten Blockade der RGD-Bindungsstelle. Durch die kompetitive Bindung des Peptids an (in diesem Fall) Integrin  $\alpha v \beta 3$  wird eine Ligandenbindung dort verhindert. Am häufigsten verwendet werden zyklische Pentapeptide. Die Ringstruktur hilft, die notwendige räumliche Ausrichtung für die Integrinbindung zu stabilisieren und den Peptidabbau zu reduzieren. Präklinische Studien zeigten eine Hemmung der Angiogenese und Tumorreduzierung durch die RGD-Peptide. In klinischen Studien wiesen die Peptide eine gute Verträglichkeit auf, abschließende Ergebnisse zur Wirksamkeit in der Tumorthherapie stehen aus (Gurrath et al., 1992, Brooks et al., 1994b, Friedlander et al., 1995, Kessler et al., 1995, Dechantsreiter et al., 1999, Allman et al., 2000, Taga et al., 2002, Thumshirn et al., 2003, Eskens et al., 2003, Hapke et al., 2001 und 2003, Belvisi et al., 2005, Cai und Chen, 2006, Reardon et al., 2008).

Der Einfluß von monoklonalen AK (mAK) gegen Integrin  $\alpha v \beta 3$  auf die humane Tumorangiogenese wurde in präklinischen Studien im Tier/Mensch-Chimären-Modell untersucht: Dabei wird z. B. einer SCID (*severe combined immunodeficiency disorder*) Maus ein Stück menschlicher Haut transplantiert, in welchem sich humane Tumorzellen befinden. Bei intravenöser Gabe von mAK gegen Integrin  $\alpha v \beta 3$  konnte unter diesen Bedingungen für verschiedene humane Malignome ein Abbruch der Angiogenese, eine Tumorregression sowie ein Rückgang der Invasivität gezeigt werden. Ein negativer Effekt auf bereits vorbestehende Blutgefäße wurde nicht beobachtet (Brooks et al., 1994b und 1995). *Vitaxin* war der erste humanisierte mAK gegen Integrin  $\alpha v \beta 3$ . Parallel zu den Ergebnissen aus dem Chimärenmodell zeigte sich in den klinischen Studien mit *Vitaxin* eine gute Verträglichkeit des Integrin  $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten. Die hohen Erwartungen aus den präklinischen Untersuchungen hinsichtlich des Tumoransprechens wurden jedoch nicht oder nur teilweise erfüllt: *Vitaxin* zeigte in der ersten Phase I Studie bei 7 von 17 Patienten mit einem progressiven, auf Standardtherapie refraktären Malignom eine vorübergehende Stabilisierung der Erkrankung, bei einem Patienten kam es zum temporären Tumorrückgang (Gutheil et al., 2000). In einer daraufhin folgenden Pilotstudie zu *Vitaxin* beim fortgeschrittenen Leiomyosarkom – dem Malignom, das in der Gutheil-Studie das beste Ansprechen gezeigt hatte – erbrachte es bei keinem der 15 Patienten einen klinischen Erfolg (Patel et al., 2001). Aktuell werden Studien zum Einsatz von *Vitaxin* beim metastasierten Melanom und Prostatakarzinom durchgeführt. Die

bisherigen Daten zeigen keinen Vorteil im Vergleich zur Standardtherapie (Cai und Chen, 2006). *Abegrin*, ein weiterer humanisierter mAK gegen das Integrin  $\alpha v \beta 3$  führte bei intraperitonealer (ip) Gabe in einem Mensch/Maus-Chimären-Modell, bei welchem immundefizienten Mäusen humane OVCA-Zellen ip injiziert wurden, je nach OVCA-Zelllinie zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Tumorgroße und des Ansprechens auf Paclitaxel. Resezierte Tumoren wiesen durchgängig eine Reduktion des Proliferationsmarkers *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) auf, jedoch keine Veränderung der Kapillardichte. Dies ist wohl damit zu erklären, dass *Abegrin* kein murines Integrin  $\alpha v \beta 3$  erkennt (Landen et al., 2008).

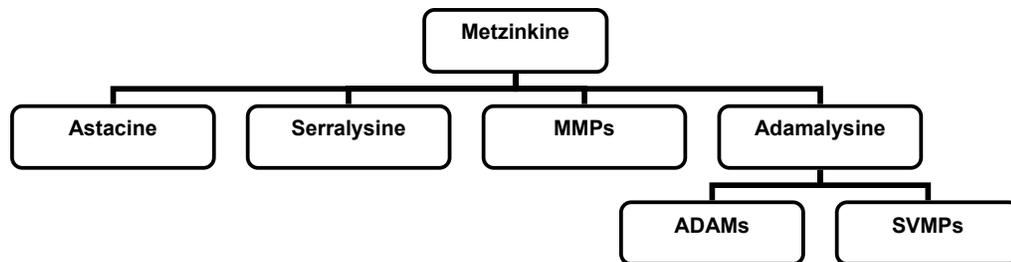
Es wird klar, dass die Forschung an Integrin  $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten zum Einsatz in der humanen Tumorthherapie erst am Anfang steht. Schon die Ergebnisse aus den Vorstudien lassen sich mitunter nur bedingt vergleichen, umso schwieriger wird die Übertragung auf den final erkrankten Malignompatienten. Auch im gesunden Organismus läßt sich nicht alleine eine Funktion für ein bestimmtes Integrin definieren. Im Gegenteil gerade im Bereich der Integrine herrscht ein komplexes Zusammenspiel innerhalb der Proteinfamilie. Es ist daher notwendig nach weiteren Integrin  $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten zu suchen und das Zusammenwirken der einzelnen Proteine genauer zu studieren. Dabei können sogenannte natürliche Integrin  $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten von Nutzen sein. Eine in dieser Hinsicht vielversprechende Familie an potentiellen Integrinantagonisten stellt die ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Proteinfamilie dar. Dabei kommt ADAM15 besondere Beachtung zu: Es verfügt in seiner humanen Form als bisher einziges ADAM über ein RGD-Motiv und ist somit ein potentieller natürlicher Interaktionspartner des Integrins  $\alpha v \beta 3$ .

### **1.3 ADAMs**

#### **1.3.1 Die ADAM-Proteinfamilie**

Die zuerst entdeckten ADAMs – ADAM1 und -2 (Fertilin  $\alpha$  und  $\beta$  bzw. PH-30  $\alpha$  und  $\beta$ ) – wurden 1993 von Wolfsberg und Mitarbeitern beschrieben (s. auch Primakoff et al., 1987, Blobel et al., 1990, Blobel et al., 1992). Bald darauf wurde klar, dass es sich bei diesen in ihrem Strukturaufbau einzigartigen Proteinen um Mitglieder einer neuen Proteinfamilie handelt (Weskamp und Blobel, 1994). ADAMs sind membranständige

Typ I Glykoproteine, die durchschnittlich ca. 750 Aminosäuren (AS) enthalten (Primakoff und Miles, 2000). Sie gehören zur Proteinsuperfamilie der Metzinkine, Zink-abhängige Metalloproteinasen, zu denen auch die Matrixmetalloproteasen (MMPs) und die *snake venom metalloproteinases* (SVMPs) gezählt werden (Black and White, 1998, Stone et al., 1999) (Abb. 4).



**Abb. 4. ADAMs sind Teil der Metzinkin-Metalloproteasen-Familie**

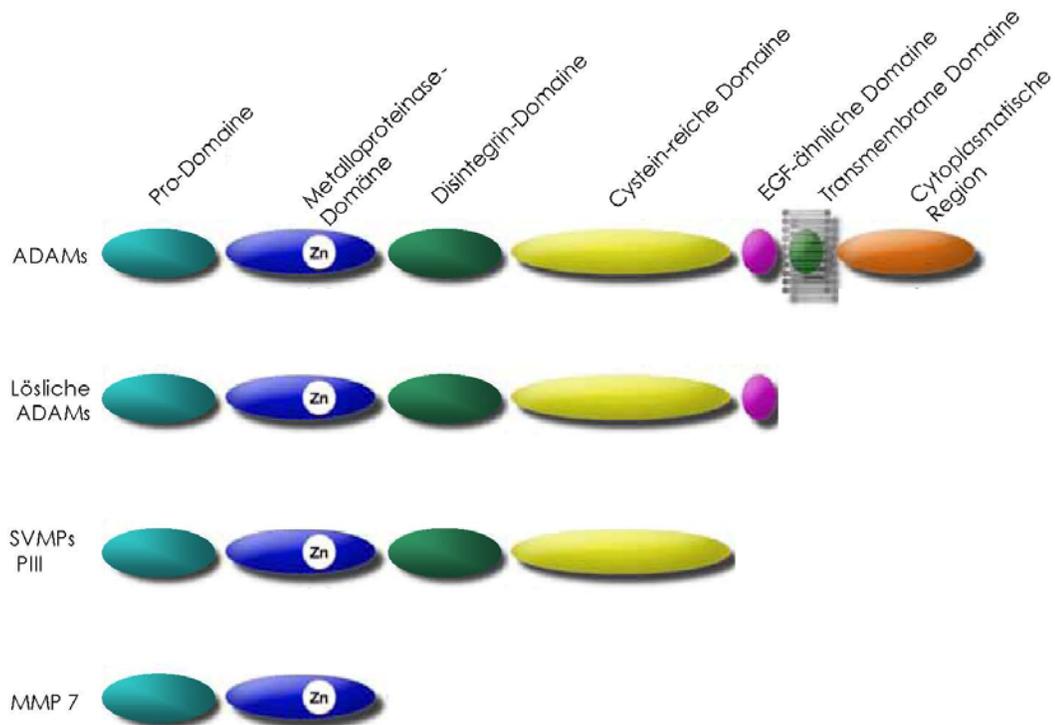
Metzinkine sind Zink-abhängige Metalloproteasen. Ihr gemeinsames Merkmal ist die HEXXHXXGXXH-AS-Sequenz: Darüber erfolgt die Koordinierung des Zinkions innerhalb des aktiven Zentrums der Proteasen. Zur Proteinsuperfamilie der Metzinkine gehören die im Flußkrebs vorkommenden Astacine, die bakteriellen Serralysine, die MMPs sowie die Adamalysine, wobei sich letztere in die ADAMs und die SVMPs untergliedern (Bode et al., 1993, Stone et al., 1999).

MMPs degradieren EZM-Komponenten wie Col, LN, FN und Proteoglykane und begünstigen durch dieses *remodeling* der Tumorumgebung invasives Tumorwachstum und Metastasierung (Liotta und Stetler-Stevenson, 1991, Sato et al., 1992, Kossakowska et al., 1996, Itoh und Nagase, 2002, Visse und Nagase, 2003).

SVMPs sind lösliche Komponenten von Schlangengift, die über eine Doppelwirkung im betroffenen Organismus zu schweren Hämorrhagien führen: Die Metalloproteinase degradiert Bestandteile der Basalmembran, die Disintegrin-Domäne bindet das Plättchenintegrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$  und verhindert damit Fibrinogenbindung und Thrombozyten-Agglutination (Niewiarowski et al., 1994, Wolfsberg et al., 1995a, Yamamoto et al., 1999).

ADAMs besitzen eine große Ähnlichkeit mit den in Schlangengift enthaltenen SVMPs (Wolfsberg et al., 1995b): Mit den SVMPs der Klasse PIII haben ADAMs die Pro-, die Metalloproteinase-, die Disintegrin- und die Cystein-reiche Domäne gemein (Wolfsberg und White, 1996, Black und White, 1998). Daneben verfügen ADAMs über weitere potentiell wichtige molekulare Domänen, denen bestimmte Funktionen zugeordnet werden, so dass sich folgender Aufbau ergibt (Abb. 5):

Auf die N-terminale Pro-Domäne folgt die Metalloproteinase-Domäne, die Disintegrin-Domäne, eine Cystein-reiche Domäne mit einer dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Sequenz, die transmembrane Domäne sowie eine C-terminale cytoplasmatische Region (Wolfsberg et al., 1993, 1995a und b). Auch lösliche ADAM-Formen wurden beschrieben, denen entsprechend transmembrane Domäne und cytoplasmatische Region fehlen (Stone et al., 1999).



**Abb. 5. Vergleich des Domänenaufbaus von ADAMs, SVMPs PIII und MMP 7**

ADAMs zeichnen sich durch einen charakteristischen Domänenaufbau aus. Neben den membrangebundenen existieren lösliche ADAM-Formen. Eine hohe Ähnlichkeit hinsichtlich ihres Aufbaus zeigen ADAMs im Vergleich mit den löslichen SVMPs der Klasse PIII. MMP 7, als einfachster Vertreter der MMPs, weist nur die Pro- und Metalloproteinase-Domäne auf (adaptiert von Stone et al., 1999).

Aufgrund ihres Domänen-Aufbaus werden ADAMs folgende potentielle Funktionen zugeschrieben (Wolfsberg et al., 1995b, Wolfsberg und White, 1996, Huovila et al., 1996, Bigler et al., 1997, Stone et al., 1999, Dong et al., 1999, Herren, 2002):

- i. Proteolyse und *shedding* (Abspaltung membrangebundener Proteine von der Zelloberfläche) (Metalloproteinase-Domäne)
- ii. Adhäsion (Disintegrin-Domäne, Cystein-reiche Domäne)
- iii. Zellfusion (Cystein-reiche Domäne)
- iv. Intrazelluläres *signaling* (cytoplasmatische Region)

Inzwischen wurden 40 Vertreter der auch als MDCs (*metalloproteinase/disintegrin/cysteine-rich*) bezeichneten ADAMs entdeckt (White und Wolfsberg, 2009). Diese sind bei Mensch und Tier weitverbreitet und werden in vielen Organen wie z. B. Nervengewebe, Muskel, Ovar, Herz, Leber, Lunge und Brustdrüse exprimiert (Wolfsberg et al., 1995b, Perry et al., 1995, McKie et al., 1997, Frayne et al., 1997, Black et al., 1997, Inoue et al., 1998, Jury et al., 1999, Stone et al., 1999, Ortiz et al., 2005, Lendeckel et al., 2005, Schütz et al., 2005, Kuefer et al., 2006, Yamada et al., 2007). Sie sind an Fertilisation (Wolfsberg et al., 1993, Almeida et al., 1995, Cho et al., 1998, Shamsadin et al., 1999, Evans, 2001, Pasten-Hidalgo et al., 2008), Neuro- (Fambrough et al., 1996, Pan und Rubin, 1997, Qi et al., 1999, Six et al., 2003) und Myogenese (Yagami-Hiromasa et al., 1995, Gilpin et al., 1998, Lafuste et al., 2005) sowie der Aktivierung von Cytokin-Vorstufen wie TNF (Tumornekrosefaktor)- $\alpha$  und der Freisetzung von GFs wie HB-EGF (Heparinbindender EGF-ähnlicher GF) (Black et al., 1997, Moss et al., 1997, Izumi et al., 1998, Yamamoto et al., 1999, Asakura et al., 2002, Seals et al., 2003, Huovila et al., 2005) beteiligt. Daher verwundert es nicht, dass ADAMs erhöhte Expressionsspiegel in entzündlich verändertem Gewebe wie bei Arthritis (Flannery et al., 1999, Böhm et al., 1999, Böhm et al., 2001) oder Gastritis (Yoshimura et al., 2002) aufweisen und darüberhinaus in verschiedenen Krebszellen entdeckt wurden (Howard et al., 1996, Wu et al., 1997, Gilpin et al., 1998, McCulloch et al., 2000, Yoshimura et al., 2002). Auch in Malignomen wie Kolon-, Mamma- (Iba et al., 1999, Blanchot-Jossic et al., 2005, Lendeckel et al., 2005, Mitsui et al., 2006), Lungen- (Ohtsuka et al., 2006), Prostata- (O'Shea et al., 2003), oralem Plattenepithel- (Ko et al., 2007) und – von besonderer Bedeutung für diese Arbeit - im OVCA (Tanaka et al., 2005) wird oft eine verstärkte Expression der ADAMs festgestellt, was dabei häufig mit einer erhöhten Malignität der Tumoren korreliert (Shintani et al., 2004, Kodama et al., 2004, Wildeboer et al., 2006, Ohtsuha et al., 2006, Mochizuki und Okada, 2007).

Die molekularen Mechanismen, die den aufgeführten Beteiligungen der ADAMs an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zugrunde liegen, sind oft noch unklar. Obwohl alle ADAMs eine Metalloproteinase-Domäne besitzen, wird diese aufgrund ihrer Sequenz nur in etwa der Hälfte der bekannten ADAMs für proteolytisch aktiv gehalten (White und Wolfsberg, 2009). *In vitro* wurden mehrere Substrate identifiziert, die jedoch *in vivo* bislang oft unbestätigt blieben (White, 2003).

Für die Disintegrin-Domäne konnten *in vitro* zahlreiche Interaktionen mit verschiedenen Integrinen – darunter Integrin  $\alpha v \beta 3$  – gezeigt werden, doch bedarf es weiterer Experimente, um zu klären, inwieweit es sich bei den identifizierten ADAMs auch um natürliche, *in vivo* relevante Integrinliganden handelt (Eto et al., 2002, White, 2003).

ADAMs sind aufgrund ihrer einmaligen Struktur, insbesondere der Verbindung von adhäsiven und proteolytischen Fähigkeiten in einem Protein, der Fähigkeit mit Integrinen zu interagieren, dem Potential auf die Signaltransduktion Einfluß zu nehmen und ihrer weiten Verbreitung - auch in Tumoren -, ein wichtiger Forschungsgegenstand gerade im Hinblick auf ihre Rolle im Krebsgeschehen. Das wirkliche Ausmaß ihrer Bedeutung in physiologischen aber auch pathophysiologischen Zusammenhängen wird jedoch erst in einigen Jahren deutlich werden.

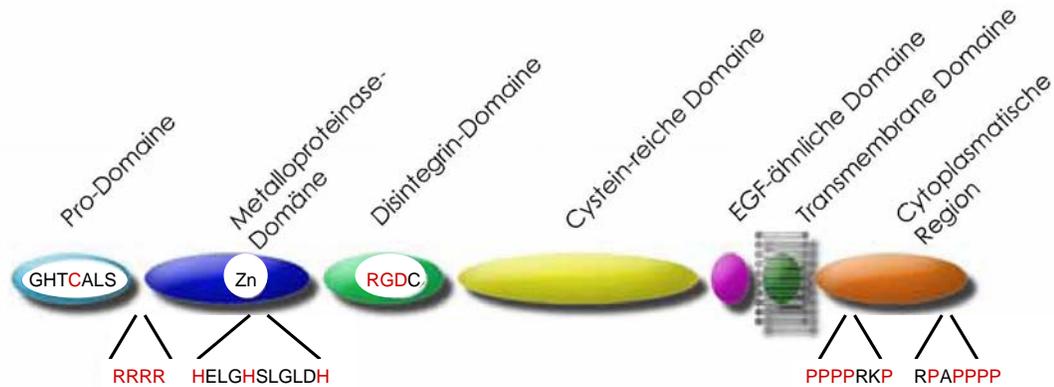
### 1.3.2 ADAM15

ADAM15 verdient innerhalb der ADAM-Familie besondere Beachtung: Es vereint nicht nur die AS-Sequenz einer potentiell aktiven Metalloproteinase mit mehreren denkbaren Bindestellen für cytoplasmatische Signalmoleküle, sondern besitzt in der hADAM15 Form als einziges bisher bekanntes ADAM ein RGD-Motiv innerhalb der Disintegrin-Domäne (Krätzschmar et al., 1996). Dieses Integrin-Bindemotiv ist in ADAM15 von Maus und Ratte nicht konserviert. Hier wurde stattdessen eine TDD (Thr-Asp-Asp)-Sequenz identifiziert (Lum et al., 1998, Bosse et al., 2000).

Um der Besonderheit von hADAM15 gerecht zu werden, wird dieses auch als Metargidin bezeichnet: *metalloprotease RGD disintegrin* (Abb. 6).

Entdeckt wurde das 814 AS umfassende hADAM15 in der epithelialen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 durch Krätzschmar et al. 1996. Transkripte wurden später in vielen anderen Geweben von Mensch, Ratte und Maus gefunden, so dass ADAM15 heute als ubiquitär exprimiert gilt (Krätzschmar et al., 1996, Frayne et al., 1997, Lum et al., 1998, Bosse et al., 2000, Bernstein et al., 2003, Lu et al., 2007).

Krätzschmar et al. (1996) identifizierten zudem ein 56 kDa Protein, welches mit ADAM15 koimmunpräzipitiert, so dass ADAM15 innerhalb eines Heterodimers an der Zelloberfläche vermutet werden kann.



**Abb. 6. Die Domänen von hADAM15**

hADAM15 weist folgende molekulare Merkmale auf: Die Pro-Domäne enthält eine ungerade Anzahl von Cystein-Resten. RRRR liegt als putative Furin-Spaltstelle zwischen Pro- und Metalloproteinase-Domäne. Die Metalloproteinase-Domäne enthält mit der AS-Sequenz HELGHSLGLDH das klassische Metzinkin-Zink-Bindemotiv. In der Disintegrin-Domäne wurde das Tripeptid RGD identifiziert. Es folgen die Cystein-reiche, die EGF-ähnliche, die transmembrane und die Prolin-reiche cytoplasmatische Domäne (adaptiert von Stone et al., 1999).

Interessant ist, dass maturiertes ADAM15 mehrheitlich nicht an der Zelloberfläche, sondern im Zellinneren vorkommt. Daher wird eine intrazelluläre Funktion von ADAM15 neben extrazellulären Aufgaben diskutiert (Lum et al., 1998, Arndt et al., 2002, Ham et al., 2002, Mosnier et al., 2006, Charrier-Hisamuddin et al., 2008). Genstruktur und 13 *splicing*-Varianten von hADAM15 in gesundem menschlichen Gewebe wurden 2007 von Kleino und Kollegen beschrieben.

### 1.3.2.1 Die Domänen von ADAM15

#### 1.3.2.1.1 Die Pro-Domäne

ADAM15 existiert in Zellen und Geweben sowohl in der Pro- (110-159 kDa) als auch in der maturierten Form (85 kDa) (Krätzschmar et al., 1996, Charrier et al., 2005, Kleino et al., 2007). Die ca. 200 AS lange Pro-Domäne verfügt bei ADAM15, wie auch bei den SVMPs und anderen potentiell katalytisch aktiven ADAMs, über eine ungerade Anzahl von Cystein-Resten, so dass ein *cysteine switch* als Regulationsmechanismus für die Metalloproteinase vermutet wird. Dabei wechselwirkt ein Cystein-Rest in der Pro-Domäne mit dem Zinkion im aktiven

Zentrum der Metalloprotease und sorgt so für deren Inaktivität (Wolfsberg et al., 1993, Wolfsberg und White, 1996, Krätzschmar et al., 1996, McKie et al., 1997, Black und White, 1998, Loechel et al., 1998 und 1999, Stone et al., 1999, Roghani et al., 1999, Roberts et al., 1999). Zur Aktivierung der Metalloprotease enthalten katalytisch aktive ADAMs eine Konsensus-Sequenz (Arg-X-Lys-Arg [RXKR] und Arg-Arg-Arg-Arg [RRRR]) für Furin-Proteasen im Übergang der Pro- in die Metalloproteinase-Domäne (Weskamp et al., 1996, Loechel et al., 1998, Roghani et al., 1999, Yamamoto et al., 1999, Stone et al., 1999). Innerhalb des ADAM15-Proteins wurde die potentielle Furinspaltstelle RRRR identifiziert und auch *in vitro* Ergebnisse legen eine Prozessierung von ADAM15 durch Furin oder eine ähnliche Pro-Protein-Konvertase nahe. Da ADAM15 sowohl in seiner maturierten als auch in seiner Pro-Form auf der Zelloberfläche vorgefunden wird, steht ein sekundärer Aktivierungsvorgang durch zum Beispiel Endozytose ebenfalls zur Diskussion (Krätzschmar et al., 1996, Lum et al., 1998).

#### **1.3.2.1.2 Die Metalloproteinase-Domäne**

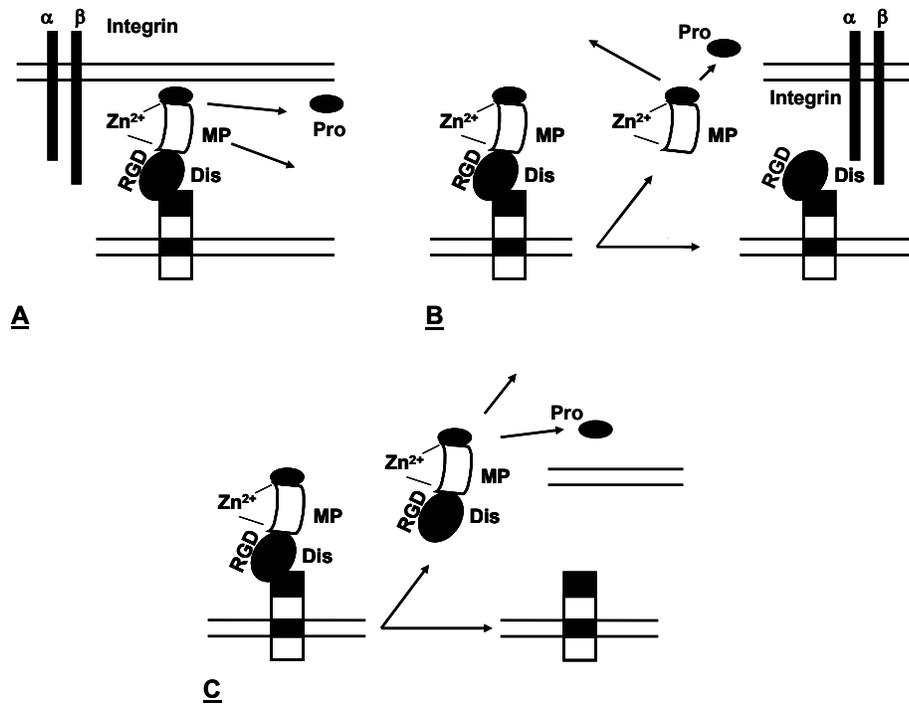
ADAMs sind Teil der Metzinkin Proteinsuperfamilie (Abb. 4). Metzinkine sind Zink-abhängige Metalloproteasen, die sich durch die konservierte AS-Sequenz HEXXHXXGXXH (His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His) innerhalb ihres aktiven Zentrums auszeichnen. Dabei koordinieren die 3 Histidin-Reste das Zink-Ion, Glutamat dient als katalytische Base und Glycin stellt ein wichtiges Strukturmerkmal dar. Ein weiter C-terminal gelegener Methionin-Rest hilft das aktive Zentrum zu stabilisieren (Bode et al., 1993, Stone et al., 1999). Von allen bekannten ADAMs ist nur bei etwa der Hälfte in der ca. 200 AS umfassenden Metalloproteinase-Domäne die Metzinkin-AS-Sequenz erhalten. Bei den restlichen ADAMs wird von katalytischer Inaktivität ausgegangen (White und Wolfsberg, 2009).

ADAM15 enthält das HELGHSGLDHD (His-Glu-Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Leu-Asp-His-Asp)-Zink-Bindemotiv innerhalb seiner Metalloproteinase-Domäne und wird daher als potentiell katalytisch aktiv angesehen (Krätzschmar et al., 1996). *In vitro* spaltet es Col-IV und Gelatin (Martin et al., 2002). Darüberhinaus scheint ADAM15 als Sheddase von proHB-EGF, Amphiregulin und TGF (transformierender GF)- $\alpha$  an der indirekten Aktivierung von EGFR (EGFR-Transaktivierung) beteiligt zu sein

(Schäfer et al., 2004b, Hart et al., 2005). ADAM15 fungiert *in vitro* weiterhin als Sheddase des *low affinity* IgE-Rezeptors CD23 (Fourie et al., 2003) und des epidermalen Cadherins (E-Cadherin) (Najy et al., 2008b). Die Identifizierung von *in vivo* Substraten steht bislang jedoch aus.

Interessanterweise inhibieren nicht nur AK gegen die Disintegrin-, sondern auch gegen die Metalloproteinase-Domäne von hADAM15 in humanen Mesangiumzellen deren Migration. Der genaue Mechanismus dabei und insbesondere das Zusammenspiel zwischen Disintegrin- und Metalloproteinase-Domäne ist bisher noch unklar (Martin et al., 2002).

Neben dem vollständigen Protein wurden ADAM15 Formen beschrieben, bei denen die Metalloproteinase vom restlichen membrangebundenen Teilstück abgespalten ist. Damit wäre die ADAM15-Metalloproteinase – katalytische Aktivität vorausgesetzt - in weit größerem Rahmen als zellgebunden zur Aktivierung bestimmter Substrate, zur Lösung von Zell/Zell-Bindungen und zum EZM-*remodeling* fähig. Herren et al. (1997) entwickelten 3 Modelle, wie die Funktionen von hADAM15 aussehen könnten (Abb. 7): hADAM15 könnte erstens zellgebunden in Zell/Zell-Interaktionen aktiv werden: Dabei könnte es über seine Disintegrin-Domäne mit Integrinen auf Nachbarzellen interagieren. Die Metalloproteinase-Domäne könnte dann nach Abspaltung der Pro-Domäne lokal Proteine degradieren. Beides löst potentiell Signaltransduktionsvorgänge aus, die über den cytoplasmatischen hADAM15-Anteil vermittelt werden. Das zweite Modell einer Zell/Zell-Interaktion sieht eine Abspaltung der Metalloprotease vom restlichen hADAM15-Protein vor: Dabei wechselwirkt die Disintegrin-Domäne weiterhin mit Integrinen auf Nachbarzellen. Die Metalloprotease wäre nach Pro-Domänen-Abspaltung löslich aktiv. Im dritten Ansatz würde die Disintegrin-Domäne zusammen mit der Metalloproteinase-Domäne abgespalten. Damit könnte jetzt über die Disintegrin-Domäne eine Anbindung an Integrine erfolgen und dadurch benachbarte oder Integrin-gebundene EZM-Proteine gezielt degradiert werden. Der membrangebundene Rest des hADAM15 könnte weiterhin Zell/Zell-Interaktions- und Signaltransduktionsfunktion besitzen. Auch eine Wechselwirkung von Integrin und Disintegrin auf derselben Zelle ist prinzipiell in allen 3 Modellen vorstellbar.



**Abb. 7. Mögliche Formen der Prozessierung und Interaktion von hADAM15**

**A:** Die Disintegrin-Domäne interagiert mit Integrinen auf Nachbarzellen. Dadurch ist Zell/Zell-Interaktion und *signaling* vorstellbar. Die Metalloproteinase ist nach Pro-Domänen-Abspaltung lokal aktiv.

**B:** Nach Abspaltung der Metalloproteinase stellt die Disintegrin-Domäne Zell/Zell-Interaktion durch Bindung von Integrinen auf Nachbarzellen her. Signaltransduktion ist dabei möglich. Die Metalloproteinase ist nach Abspaltung der Pro-Domäne löslich aktiv.

**C:** Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne werden gemeinsam vom restlichen hADAM15-Protein getrennt. Die Disintegrin-Domäne übernimmt die Identifikation des Substrats, welches nach Aktivierung der Metalloproteinase durch diese gespalten wird. Der membrangebundene hADAM15-Proteinrest könnte weiterhin Zell/Zell-Interaktions- und Signaltransduktionsaufgaben besitzen (adaptiert von Herren et al., 1997).

Wegen des hohen Prozentsatzes an maturiertem ADAM15 innerhalb der Zelle, werden neben extrazellulären Funktionen auch intrazelluläre, den Furin-Proteasen ähnliche Aufgaben diskutiert (Lum et al., 1998, s. auch *review* Charrier-Hisamuddin et al., 2008).

### 1.3.2.1.3 Die Disintegrin-Domäne

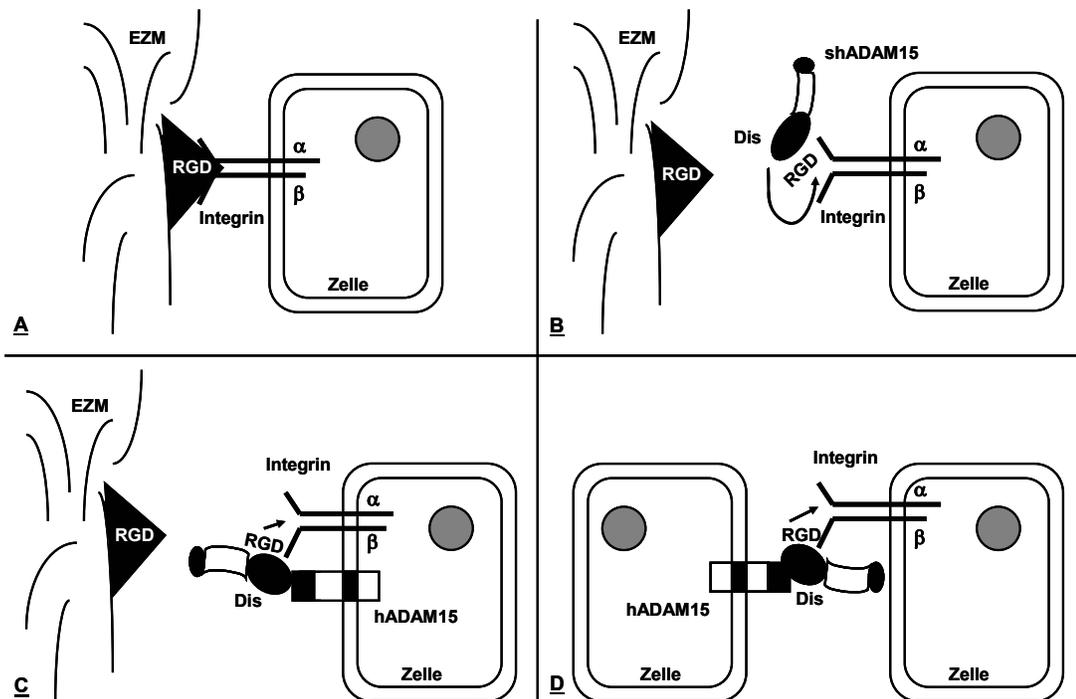
SVMPs besitzen in ihrer Disintegrin-Domäne eine durch Disulfidbrücken fixierte Schleife, an deren Spitze sich ein AS-Tripeptid-Motiv befindet. Über dieses AS-Triplet stellen SVMP-Disintegrine die Bindung zu Integrinen her. ADAMs teilen in ihrer ca. 60-90 AS enthaltenden Disintegrin-Domäne diese primären

Strukturmerkmale der SVMPs PIII. Jedoch ist aufgrund der AS-Sequenz nicht klar, ob alle ADAMs als Integrinliganden fungieren (Wolfsberg et al., 1993, Niewiarowski, 1994, Wolfsberg et al., 1995a, Wolfsberg und White, 1996, Huovila et al., 1996). Im Gegensatz zu den löslichen Disintegrinen der SVMPs, welche Zell/Zell-Interaktionen aufheben, könnten ADAMs als meist zelluläre Disintegrine, diese eher fördern (Blobel et al., 1992).

Das RGD-Motiv innerhalb der Disintegrin-Domäne von hADAM15 ist einzigartig innerhalb der ADAM-Proteinfamilie. ADAM15 von Maus und Ratte enthält ein TDD-Tripeptid anstelle des RGD. Durch dieses RGD-Tripeptid ergibt sich eine potentielle Wechselwirkung mit dem in pathophysiologischen Vorgängen wie Neovaskularisation, Tumorwachstum und Metastasierung so entscheidenden Integrin  $\alpha\beta3$  (Albelda et al., 1990, Brooks et al., 1994a, b und 1995, Marshall und Hart, 1996, Ria et al., 2002, Cruet-Hennequart et al., 2003).

Tatsächlich wurde *in vitro* die spezifische, RGD-abhängige Interaktion von hADAM15 mit Integrin  $\alpha\beta3$  gezeigt. Findet diese Interaktion *in vivo* statt, muß an eine Konkurrenzsituation von hADAM15 und anderen RGD-enthaltenden Integrinliganden wie dem EZM-Protein VN gedacht werden. Dabei könnte die hADAM15 Disintegrin-Domäne entweder zellgebunden oder in der löslichen Form über die Bindung von Integrin  $\alpha\beta3$  Einfluß auf adhäsive und motile Zelleigenschaften nehmen: Eine Bindung von zellgebundenem hADAM15 an auf derselben Zelle lokalisiertes Integrin  $\alpha\beta3$  würde Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte schwächen. Dies wäre ebenso bei Bindung der löslichen hADAM15-Form an Integrin  $\alpha\beta3$  der Fall. Umgekehrt wäre eine Verstärkung von Zell/Zell-Kontakten das Ergebnis einer Bindung von gebundenem hADAM15 der einen Zelle an das Integrin  $\alpha\beta3$  einer Nachbarzelle. Dabei kann nicht pauschal vorhergesagt werden, wie sich durch die beschriebenen potentiellen hADAM15/Integrin  $\alpha\beta3$ -Interaktionen die Zelleigenschaften hinsichtlich adhäsiver und motiler Charakteristika verändern würden: Zellbewegung benötigt ein fein abgestimmtes Maß aus Zell/Zell- und Zell/Matrix-Bindungen einerseits und deren Aufhebung andererseits. So kann ein hohes Maß an Zell/Zell- und Zell/Matrix-Bindungen eine Zelle ebenso immobilisieren, wie ein höhergradiger Verlust dieser Adhäsionskontakte die Zellmotilität einschränken kann. Insofern betrachtet man das Ergebnis der denkbaren hADAM15/Integrin  $\alpha\beta3$ -Interaktionen als potentielle Modulierung motiler

Zellcharakteristika (Abb. 8) (Blobel et al., 1992, Zhang et al., 1998, Nath et al., 1999, Iba et al., 1999, Eto et al., 2002, Al-Fakhri et al., 2003, Hapke et al., 2003).



**Abb. 8. Modelle zur RGD-abhängigen Integrinbindung durch hADAM15**

**A:** Über einen Integrinrezeptor adhärirt die Zelle z. B. RGD-abhängig an die EZM.

**B:** Lösliches (s)hADAM15 könnte mittels seiner Disintegrin-Domäne (Dis) Integrine RGD-abhängig binden und damit die Zell/EZM-Interaktion lockern.

**C:** RGD-abhängige Interaktion von Integrin und hADAM15 auf derselben Zelle könnte ebenfalls zur Abschwächung von Zell/EZM-Kontakten führen.

**D:** Eine Verstärkung von Zell/Zell-Kontakten ist über die RGD-abhängige Wechselwirkung von hADAM15 mit Integrinen auf Nachbarzellen vorstellbar (adaptiert von Wolfsberg und White, 1996 und Herren et al., 1997).

Neben der rein mechanischen Funktion der Integrin/EZM-Interaktion - Fixierung von Zellen an ein oder Loslösung dieser von einem bestimmten Umfeld -, kann die Integrin/Liganden-Bindung auch die Transduktion intrazellulärer Signale bewirken, wodurch Proliferation, Migration und Zellüberleben reguliert werden. Da hADAM15 ebenso wie VN, RGD-abhängig Integrin  $\alpha\beta_3$  zu binden vermag, muß davon ausgegangen werden, dass hADAM15 innerhalb der Zellregulation ebenfalls große Bedeutung besitzt (Giancotti, 1997, Chapmann, 1997, Hapke et al., 2001 und 2003, Martin et al., 2002).

In der Tat zeigen mesenchymale ADAM15-überexprimierende Zellen *in vitro* vermehrt Zell/Zell-Kontakte (Herren et al., 2001). In Endothelzellen wurde

hADAM15 in Zell/Zell-Verbindungsstrukturen, den sogenannten *adherens junctions*, kolokalisiert mit dem Adhäsionsmolekül *vascular endothelial*-Cadherin (VE-Cadherin) identifiziert. Interessant dabei ist, dass VE-Cadherin für eine erhöhte ADAM15 Oberflächenexpression und spezifische Lokalisierung innerhalb der Zell/Zell-Kontakte sorgt. Der genaue Bindungspartner von hADAM15 in diesen Kontaktstellen ist bislang nicht identifiziert, doch befinden sich Integrine weit oben auf der Liste möglicher Kandidaten (Ham et al., 2002). Auch Najy und Mitarbeiter (2008b) beschreiben eine Kolokalisierung von hADAM15 und E-Cadherin in Zell/Zell-Verbindungsstellen von Mammakarzinomzellen. Hier scheint hADAM15 aber primär als spezifische Sheddase des E-Cadherin zu fungieren und darüber Zell/Zell-Kontakte zu lösen. Charrier und Kollegen (2007) berichten über eine RGD-abhängige Zell/Zell-Adhäsion zwischen Integrin  $\alpha\beta3$ -exprimierenden T-Lymphozyten einerseits und ADAM15-exprimierenden intestinalen Epithelzellen andererseits. Diese wird durch die Überexpression von hADAM15 in der Epithelzelllinie verstärkt und durch AK gegen die Ektodomäne von hADAM15 reduziert. Eine hADAM15-Überexpression in der T-Lymphozyten-Zelllinie führt zu einer verstärkten RGD-abhängigen Aggregation dieser Zellen. Bei Herren et al. (2001) führten die erhöhten Zell/Zell-Kontakte durch hADAM15 zu einer Migrationsinhibierung mesenchymaler Zellen. Gegenteilige Beobachtungen machten Najy und Kollegen (2008a) mit Prostatakarzinomzellen: Sie stellten bei verringerter hADAM15-Expression durch RNA-Interferenz eine reduzierte Migration sowie Adhäsion auf EZM-Proteinen wie VN fest. Ähnliche Ergebnisse werden von der Forschungsgruppe Martin et al. (2002) beschrieben: Hier verstärkt hADAM15 die Migration von Mesangiumzellen, welche über AK gegen die Disintegrin-Domäne gehemmt werden kann. Diese unterschiedlichen Resultate hinsichtlich Zell/Zell-Adhäsion und Migration deuten auf eine zellspezifische Funktion von hADAM15 hin.

#### **1.3.2.1.4 Die Cystein-reiche und EGF-ähnliche Domäne**

Die Funktionen der Cystein-reichen und EGF-ähnlichen Domäne der ADAMs sind weitgehend unklar. Vermutet werden für die ca. 160 AS (davon 10-14 Cystein-Reste) enthaltende Cystein-reiche Domäne adhäsive Funktionen (Iba et al., 1999, Iba et al., 2000, Wong et al., 2001, White, 2003). Bei einem Teil der ADAMs wurde weiterhin

ein putatives Fusionspeptid innerhalb dieser Region entdeckt. Dabei handelt es sich um hydrophobe AS-Sequenzen mit großer Ähnlichkeit zu viralen Fusionspeptiden (Blobel et al., 1992, Weskamp et al., 1993, Wolfsberg et al., 1995a, Stone et al., 1999). Da die Cystein-reiche Domäne des ADAM15 keine hydrophobe AS-Sequenz aufweist, gilt ein Mitwirken von ADAM15 bei Zell/Zell-Fusionsvorgängen als unwahrscheinlich (Krätzschar et al., 1996).

Ein ca. 40 AS umfassender EGF-ähnlicher *repeat* findet sich im Anschluß an die Cystein-reiche Domäne. Zusammen mit der cytoplasmatischen Domäne deutet er auf eine mögliche Rolle der ADAMs in Signaltransduktionsvorgängen (Stone, et al., 1999).

#### **1.3.2.1.5 Die transmembrane und cytoplasmatische Domäne**

ADAMs sind größtenteils membranständige Typ I Glykoproteine. Daneben existieren auch lösliche Formen, denen die im folgenden beschriebenen Domänen fehlen (Emi et al., 1993, Katagiri et al., 1995, Gilpin et al., 1998, Cerretti et al., 1999, Roberts et al., 1999). Zelluläre ADAMs werden über eine hydrophobe transmembrane Domäne in der Zellmembran verankert (Stone et al., 1999). Diese Domäne endet in einer cytoplasmatischen Region von 40 bis 250 AS Länge. Hinsichtlich der C-terminalen Domäne besteht weder große Ähnlichkeit der einzelnen ADAMs untereinander noch mit anderen Proteinen (Wolfsberg et al., 1995a). Bei einigen ADAMs finden sich Prolin-reiche Abfolgen (z. B. Arg-Pro-X-Pro-X-X-Pro (RPXPXXP)), die auf Bindungsstellen für cytoskeletale Proteine oder Signalmoleküle mit SH (Src-Homologie) 3-Domänen deuten (Weskamp et al., 1996, Black und White, 1998, Inoue et al., 1998, Yamamoto et al., 1999, Stone et al., 1999). Dies ist bei ADAM15 der Fall, hier wurden die Prolin-reichen Sequenzen: PPPPRKP (Pro-Pro-Pro-Pro-Arg-Lys-Pro) und RPAPPPP (Arg-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Pro) innerhalb der cytoplasmatischen Domäne identifiziert (Krätzschar et al., 1996). Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen bestätigen eine Interaktion mit SH3-Domänen-tragenden Proteinen und deuten auf eine *in vivo* Funktion von hADAM15 bei subzellulärer Proteinlokalisierung, -maturierung und -transportvorgängen (Howard et al., 1999) sowie eine Mitwirkung bei immunologischen Prozessen (Poghosyan et al., 2002).

Interessanterweise scheint die cytoplasmatische Domäne Einfluß auf Zell/Zell- und Zell/EZM-Kontakte zu nehmen und darüber Adhäsion, Migration und Invasionseigenschaften zu modulieren (Charrier et al., 2007, Böhm et al., 2008, Zhong et al., 2008). Zahlreiche *splice*-Varianten legen unterschiedliche Funktionen je nach Gewebe nahe (Kleino et al., 2007, Charrier-Hisamuddin et al., 2008).

### **1.3.2.2 Die Rolle von ADAM15 in verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen**

#### **1.3.2.2.1 ADAM15, Alterungs- und benigne Krankheitsprozesse**

ADAM15 scheint innerhalb vieler verschiedener Krankheitsprozesse eine wichtige Funktion zu besitzen. Gemeinsames Kennzeichen dieser Erkrankungen ist deren chronische, oft entzündliche Natur sowie ein ausgeprägtes *remodeling* der betroffenen Strukturen. So wird hADAM15 mit Vorhofdilatation bei mehrmonatiger atrialer Fibrillation (Arndt et al., 2002) ebenso in Verbindung gebracht, wie mit den Umbauprozessen innerhalb chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) (Mosnier et al., 2006) oder dem Knorpel-*remodeling* bei Osteo- und rheumatoider Arthritis (RA) (Flannery et al., 1999, Böhm et al., 1999, 2001 und 2005). Humanes ADAM15 könnte dabei als Protease direkt für den Gewebeumbau verantwortlich sein oder aber indirekt als Sheddase für eine vermehrte Freisetzung von Entzündungsmediatoren sorgen (Herren et al., 1997 und 2002, Flannery et al., 1999, Böhm et al., 1999 und 2001). Diese Botenstoffe spielen eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Immunzellen, wobei hADAM15 auch als direkter Bindungspartner von Entzündungszellen bei zum Beispiel Atherosklerose (Herren et al., 1997 und 2002, Al-Fakhri et al., 2003), RA (Böhm et al., 1999 und 2001) oder CED (Mosnier et al., 2006) diskutiert wird. Tatsächlich bindet hADAM15 *in vitro* RGD-abhängig an Blutplättchen und Lymphozyten. Diese Bindung führt zur Aggregation der entsprechenden Zellen sowie einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  (Langer et al., 2005, Lu et al., 2006, Jeon et al., 2007, Charrier et al., 2007).

### 1.3.2.2.2 ADAM15, Neovaskularisation und Tumorprogression

Humanes ADAM15 wurde dem Genlocus 1q21.3 (Kärkkäinen et al., 2000) bzw. 1q23-25 (Seldin et al., 2000) zugeordnet und befindet sich damit innerhalb eines Chromosomen-Abschnittes, der bei Malignomen häufig amplifiziert vorliegt. Allein diese Tatsache läßt vermuten, dass hADAM15 im Tumorgeschehen eine Rolle spielt (Gendler et al., 1990, Waltz et al., 1998, Kärkkäinen et al., 2000, Forus et al., 2001a und b). Weiterhin wurde hADAM15 in verschiedenen Leukämie-, Lymphom- (Wu et al., 1997), Prostatakarzinom- (McCulloch et al., 2000) und Lungenkarzinom-Zelllinien (Shintani et al., 2004) identifiziert und wird zudem in Magen-, Pankreas-, Lungen- und Mammakarzinomen verstärkt exprimiert. Gegen hADAM15 gerichtete AK hemmen in Magen- und Mammakarzinomzellen deren Proliferation (Ortiz et al., 2004, Carl-McGrath et al., 2005, Lendeckel et al., 2005, Schütz et al., 2005, Kuefer et al., 2006, Yamada et al., 2007). Im Prostatakarzinom ist die hADAM15-Expression mit Progression und negativen *outcome*-Parametern wie der Angioinvasion korreliert. Die hADAM15-Überexpression in Prostatakarzinom-Zelllinien führt zu einer verstärkten Sekretion von Proteasen, aber auch deren Inhibitoren (Kuefer et al., 2006). Dagegen führt die Reduktion der hADAM15-Expression durch RNA-Interferenz zu einem Rückgang der Malignität von Prostatakarzinomzellen, einer verminderten Expression von  $\alpha v$ -Integrin auf der Zelloberfläche, einem Aktivierungs- und Sekretionsrückgang von MMP 9 und in SCID-Mäusen zu einer Abnahme der Metastasierung. Ortiz et al. (2004) entdeckten 6 neue *splice*-Varianten von hADAM15 in Mammakarzinomzellen. Diese schienen nicht zufällig, sondern durch einen bestimmten Regulationsmechanismus im Tumor entstanden zu sein. Auch Zhong und Kollegen (2008) berichten über 4 *splice*-Varianten von hADAM15, welche in Brustkrebsgewebe anders als in der gesunden Mamma exprimiert werden. Diese Proteine unterschieden sich alleine im Aufbau der cytoplasmatischen Domäne und schienen über veränderte intrazelluläre Signalwege Einfluß auf die Tumoraggressivität zu nehmen. 2 der Isoformen waren mit einem schlechteren, 1 Isoform mit einem besseren *outcome* assoziiert. Erst kürzlich entdeckten Najy und Kollegen (2008b) einen möglichen Zusammenhang zwischen dem mit negativer Prognose assoziierten Her (humaner EGFR) 2 und der hADAM15-Expression im Mammakarzinom: Sie beobachteten eine besonders starke Expression von hADAM15 in Her2-positiven Tumoren. Dabei erwies sich hADAM15 als *in vitro*-Sheddase von

E-Cadherin, welches in seiner löslichen Form den prognostisch ungünstigen Komplex aus Her2 und 3 zu stabilisieren schien. Auch viele Lungenkarzinom-Zelllinien verfügen über Integrin  $\alpha\beta3$  und hADAM15 mRNA (Boten-RNA). Die beiden potentiellen Partner kolokalisieren dort an der Tumorzelloberfläche. Aufgrund eines hADAM15-Anstiegs bereits in Metaplasie-Arealen und dessen Lokalisierung an der „Invasionsfront“, gehen die Autoren davon aus, dass hADAM15 bereits früh und wesentlich in die pulmonale Kanzerogenese eingebunden ist (Schütz et al., 2005).

Eine Rolle von hADAM15 wird darüberhinaus bei pathologischer Angiogenese diskutiert: Hier könnte seine Fähigkeit das bei der Neovaskularisation in Endothelzellen exprimierte Integrin  $\alpha\beta3$  zu binden relevant werden (Brooks et al., 1994a): Beispielsweise könnte aussprossendes Endothel auf hADAM15 als Adhäsionsprotein angewiesen sein. Auch eine Funktion der Metalloprotease beim EZM-*remodeling* entlang der neuen Gefäßwege ist vorstellbar. Zudem könnte hADAM15 als Sheddase gebundene angiogenetische Faktoren freisetzen, Rezeptoren aktivieren oder inhibitorische Rezeptoren inaktivieren. Oder hADAM15 könnte durch seine Interaktion mit Kinasen der Src-Familie in die Angiogeneseregulierung über bestimmte GFs einbezogen sein (Zhang et al., 1998, Poghosyan et al., 2002, Horiuchi et al., 2003, Yasui et al., 2004, Charrier-Hisamuddin et al., 2008). Tatsächlich zeigen ADAM15-defiziente Mäuse eine reduzierte Neovaskularisation im Hypoxie-induzierten Retinopathie-Modell. In diesem Versuchsaufbau weisen Kontrollmäuse zudem eine gesteigerte ADAM15-Expression in neugebildetem Retinaendothel auf. Die Angiogenese im Rahmen der normalen Entwicklung war bei ADAM15-*knock-out* Mäusen dagegen nicht beeinträchtigt (Horiuchi et al., 2003, Sahin et al., 2004). Humanes ADAM15 läßt sich weiterhin durch VEGF (GF des Gefäßendothels) in humanen Endothelzellen induzieren und seine mRNA-Level korrelieren in RA-Synovia-Proben direkt mit der synovialen Gefäßdichte (Komiya et al., 2005). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Resultaten von Xie und Kollegen (2008): Sie fanden eine minimale Expression von ADAM15 in normalem Maus-Retinaendothel, dieses war jedoch auf Ischämie- oder VEGF-Stimulus deutlich induzierbar. 3 verschiedene Modelle zur okulären Neovaskularisation bestätigten die Ergebnisse von Horiuchi et al. (2003) in ADAM15-*knock-out* Mäusen. Weiterhin wiesen diese Tiere in ischämischer Retina reduzierte Spiegel von VEGF, VEGFR (GF-Rezeptor des Gefäßendothels) 1 und VEGFR 2 auf. Aus diesen Befunden leiten die Autoren

eine gegenseitige Verstärkerfunktion innerhalb der Neovaskularisationsprozesse für VEGF und dessen Rezeptoren einerseits sowie ADAM15 andererseits ab.

Trochon-Joseph et al. (2004) stellten bei Mäusen mit eingebrachten humanen Mammakarzinomzellen eine deutlich verringerte Tumorangiogenese fest, wenn den Mäusen die DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenz für die Disintegrin-Domäne von hADAM15 transferiert wurde. Diese wirkte sich direkt auf das Tumorstadium aus. In weiteren Versuchen fand diese AG eine reduzierte Proliferation, verringerte Adhäsion auf FN und VN, erniedrigte Migration und Kapillarformierung von Endothelzellen als Effekt rekombinanten hADAM15-Disintegrins. Zusätzlich war die Apoptoserate erhöht. Den additiven Effekt dieser Einzelwirkungen der hADAM15-Disintegrin-Domäne machen die Autoren für die Angiogenese-Inhibierung verantwortlich. Im Gegensatz dazu fanden Horiuchi und Mitarbeiter (2003) bei ADAM15-*knock-out* Mäusen mit murinem Melanom eine reduzierte Tumorstadium ohne Veränderung in Anzahl, Dichte und Verteilung der Tumorgefäße. Dies deutet auf eine weitere, Angiogenese-unabhängige Funktion von ADAM15 im Tumorstadium.

Chen et al. (2008) beobachteten signifikant weniger Lungenmetastasen, wenn Mäusen murine, mit hADAM15 transfizierte Melanomzellen in die Schwanzvene appliziert wurden. Die Gefäßdichte in den Tumoren wurde dabei allerdings nicht evaluiert. Der inhibitorische Effekt könnte über eine Disintegrin-abhängige Kinasenaktivierung vermittelt werden (Wu et al., 2008).

Die unterschiedlichen Mechanismen der Inhibierung des Tumorstadiums könnten neben zell- und tumorspezifischen Regulierungsvorgängen mit dem Fehlen eines RGD-Motivs in murinem ADAM15 (mADAM15) zu tun haben: Denkbar ist, dass RGD-unabhängige Mechanismen bei der Maus in den Vordergrund treten, da dort die RGD-abhängige Interaktion zwischen ADAM15 und Integrin  $\alpha v \beta 3$  nicht möglich ist. Die teilweise widersprüchlich erscheinenden ADAM15-Effekte lassen sich mit unterschiedlichen Funktionen von löslichem und gebundenem ADAM15 einerseits, sowie der Einzeldomänen im Vergleich zum ADAM15-Gesamtprotein andererseits erklären.

Die angeführten Forschungsergebnisse deuten stark auf eine Beteiligung von ADAM15 in der Tumorstadium und insbesondere bei der Neoangiogenese hin. Eine besondere Rolle kommt dabei der potentiellen RGD-abhängigen Interaktion von

hADAM15 mit dem Integrin  $\alpha v \beta 3$  zu. Weitere Untersuchungen sind nötig, um *in vivo* das – bislang theoretische - Zusammenspiel von hADAM15 und Integrin  $\alpha v \beta 3$  aufzuzeigen und gegebenenfalls im Anschluß Zielstrukturen für die Tumorthherapie zu definieren. Diese Arbeit widmet sich dem hADAM15 als potentiell natürlichem Antagonisten von Integrin  $\alpha v \beta 3$  im OVCA. Vorrangiges Ziel ist dabei, den Einfluß von hADAM15 auf Motilität und Adhäsion als Eckpfeiler der Tumorprogression in humanen OVCA-Zellen zu charakterisieren.

## **II. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zelllinien**

##### **2.1.1.1 Humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6**

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde basierend auf Tumorzellen aus dem Aszites einer an serös-papillärem Cystadenokarzinom des Ovars erkrankten Patientin gewonnen. Die Charakterisierung und Etablierung dieser Zellen hinsichtlich Morphologie sowie biochemischer und immunhistochemischer Eigenschaften erfolgte durch Möbus et al. (1992).

##### **2.1.1.2 *Chinese hamster ovary*-Zellen**

Im Gegensatz dazu stammt die Zelllinie *chinese hamster ovary* (CHO) aus nicht karzinomatös verändertem Ovar des Hamsters (Puck et al., 1958). Sie wurde von der Fa. ATTC, Rockville, MD, USA bezogen.

#### **2.1.2 Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien**

##### **2.1.2.1 Etablierung von stabil ADAM15-transfizierten Zelllinien**

In dieser Arbeit fanden OV-MZ-6- und CHO-Zellklone Verwendung, die ADAM15 und dessen Varianten stabil exprimieren. Die Transfektion und Isolierung dieser Zellklone erfolgte in Vorarbeiten der AG Reuning (Beck et al., 2005), sie wurden für diese Arbeit freundlicherweise bereitgestellt. Im folgenden sollen die Transfektanten daher nur kurz beschrieben werden:

Die Generierung der ADAM15-cDNA (komplementäre DNA)-Konstrukte erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie wurden uns von Dr. Harry Geppert, Department Chemie, Universität Bielefeld (Geppert, 2001) zur Verfügung gestellt.

Zum Einsatz kam ein cDNA-Konstrukt, welches für das vollständige hADAM15 (*full-length RGD* [FLRGD]) kodiert, sowie ein Konstrukt, welches nur die extrazelluläre Domäne des hADAM15 einschließt (ECRGD). Mit Hilfe der EC-Klone sollte das in der Literatur beschriebene *shedding* der ADAMs (Herren, 2002), also die Abspaltung der extrazellulären Domänen von der Zelloberfläche und damit die Entstehung löslicher ADAMs *in vitro* nachvollzogen werden. Um die RGD-Abhängigkeit bestimmter ADAM15-Zellfunktionen zu überprüfen, wurden mittels *in vitro*-Mutagenese cDNA-Varianten generiert, die zur Expression eines SGA (Ser-Gly-Ala)-Motivs anstelle des natürlichen RGD-Motivs innerhalb der Disintegrin-Domäne von hADAM15 führen. Von dieser Variante wurden ebenfalls sowohl cDNA-Konstrukte mit der Information für das vollständige hADAM15 (*full-length SGA* [FLSGA]) als auch Konstrukte mit der Information für dessen extrazelluläre Domäne (ECSGA) erzeugt. Diese cDNAs wurden über die Restriktionsstellen HindIII und BamHI in den Expressionsvektor pcDNA 3.1/ Myc-His kloniert (Beck et al., 2005). Die Fusion des hADAM15 an ein C-terminales c-myc-Epitop erfolgte aus Gründen der besseren Detektierbarkeit und Charakterisierung des exprimierten hADAM15-Proteins mit c-myc-spezifischen AK.

Die Transfektion der OV-MZ-6-Zellen mit den verschiedenen hADAM15-cDNA-Varianten und die Isolierung der transfizierten OV-MZ-6-Zellklone durch Genetecin-Selektion erfolgte wie bereits beschrieben (Hapke et al., 2001). Die Generierung der hADAM15-exprimierenden CHO-Zellklone wurde analog durchgeführt.

Im Einzelnen wurden folgende Zellklone der Zelllinien OV-MZ-6 und CHO erzeugt:

- **Vektor (VEC):** Transfektion mit Leervektor
- **FLRGD/ -SGA**
- **ECRGD/ -SGA**

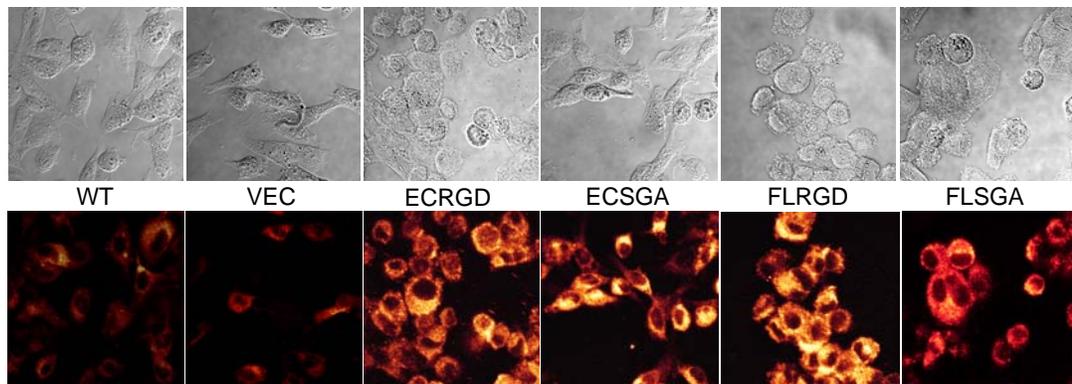
Der Nachweis des ADAM15 in den transfizierten OV-MZ-6- und CHO-Zellen erfolgte

- auf **mRNA-Ebene** mittels semi-quantitativer RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR). Hier zeigte sich in Vorarbeiten der AG Reuning eine signifikante Zunahme der ADAM15 mRNA (Beck et al., 2005).

- auf der **Proteinebene:**

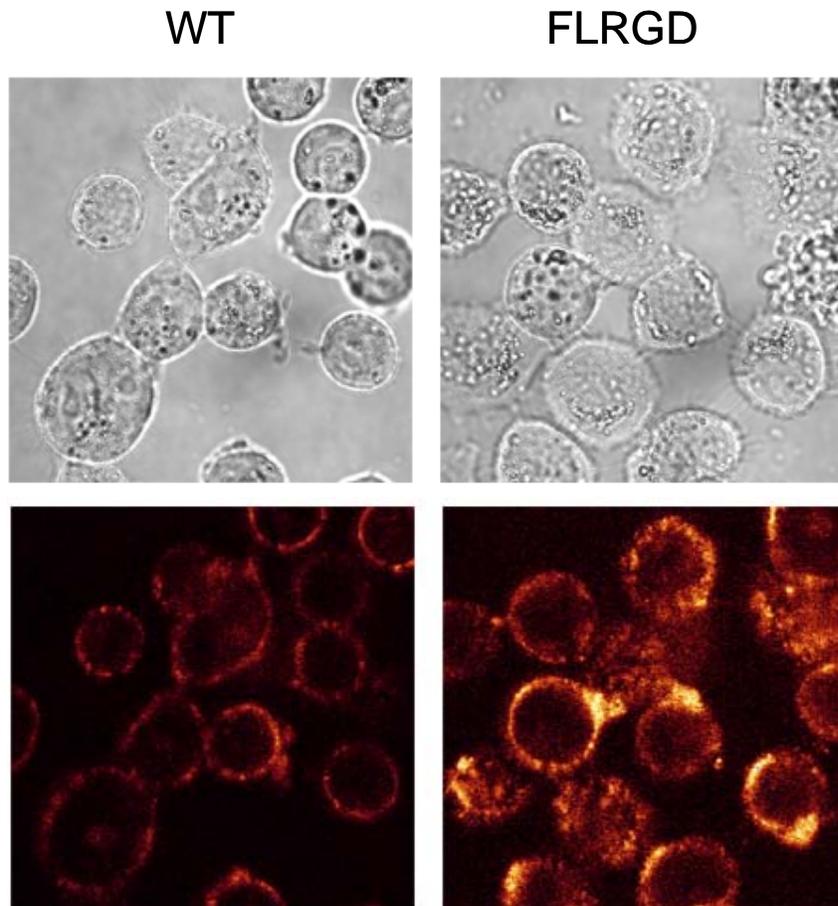
- a) mittels Westernblot-Analyse
- b) mittels immunocytochemischer Färbungen

Der immunocytochemische ADAM15-Nachweis erfolgte in Vorarbeiten der AG Reuning. ADAM15 wurde hierbei mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) nach AK-Markierung sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Zum Einsatz kam dabei als Primär-AK monoklonales Maus-Immunglobulin-G (IgG) gegen das humane c-myc-Epitop im ADAM15-Fusionsprotein, sowie alternativ, polyklonales Kaninchen-IgG gegen die Ektodomäne von hADAM15. Als Zweit-AK wurde Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG bzw. Ziege-anti-Kaninchen-IgG verwendet. Es zeigte sich ein deutlicher Intensitätsanstieg der Immunfluoreszenz bei den mit hADAM15-cDNA transfizierten OV-MZ-6-Zellen gegenüber der endogenen ADAM15-Expression in Wildtyp-Zellen (WT) bzw. den nur mit pcDNA transfizierten Zellen (VEC) (Abb. 9 und 10) (Beck et al., 2005).



**Abb. 9. Immunfluoreszenzmarkierung repräsentativer OV-MZ-6-Zellklone nach stabiler Transfektion mit ADAM15-cDNA**

Transmissions- und Fluoreszenzaufnahmen von OV-MZ-6-Zellen im CLSM nach Behandlung mit c-myc-AK als Primär-AK und Alexa-488-konjugiertem Zweit-AK. Fluoreszenzsignaldetektion bei 488 nm (Bilder freundlicherweise von PD Dr. U. Reuning zur Verfügung gestellt)



**Abb. 10. Immunfluoreszenzmarkierung repräsentativer OV-MZ-6-Zellklone nach stabiler Transfektion mit ADAM15-cDNA**

Transmissions- und Fluoreszenzaufnahmen von OV-MZ-6-Klonen im CLSM nach Behandlung mit polyklonalem AK (pAK) gegen die Ektodomäne von hADAM15 und Alexa-488-konjugiertem Zweit-AK. Fluoreszenzsignaldetektion bei 488 nm (Bilder freundlicherweise von PD Dr. U. Reuning zur Verfügung gestellt)

#### **2.1.2.2 Etablierung von humanen Ovarialkarzinomzelllinien mit erhöhter Integrin $\alpha\beta 3$ -Expression**

Neben den ADAM15-transfizierten Zellklonen kamen OV-MZ-6-Zellen zum Einsatz, die das Integrin  $\alpha\beta 3$  nach stabiler Transfektion bis zu 10-fach überexprimieren. Die Etablierung dieser Zellklone erfolgte analog zu den bereits für ADAM15-Transfektanten beschriebenen Methoden.

### 2.1.3 Materialien für die Zellkultur

#### Zellkulturmedien und -supplemente

DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ), MEM Alpha Medium, HEPES, L-Glutamin (200 mM, 100x), PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung), FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein
Penicillin/ Streptomycin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-1% (w/v)	Seromed Biochrom KG, Berlin
L-Arginin und L-Asparagin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
G418 Genetcin	Calbiochem Novabiochem, Bad Soden

#### Herstellung einzelner Zellkulturmedien

Medium für OV-MZ-6-Zellen:	DMEM mit Glutamax I (mit oder ohne Phenolrot) 10 mM HEPES 550 mM Arginin 272 mM Asparagin 1000 U Penicillin/ Streptomycin je 500 ml Medium 10 % (v/v) FCS
Medium für CHO-Zellen:	MEM Alpha Medium 2000 U Penicillin/ Streptomycin/ l 10 mM L-Glutamin 10 % (v/v) FCS
Selektionsmedium für stabil transfizierte Zellen mit einem Resistenzgen für G418:	Jeweiliges Komplettmedium mit G 418: 1g/l
Ablösung von Zellen:	0,02 % (w/v) EDTA in PBS

#### 2.1.4 Reagenzien zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit extrazellulären Matrix-Proteinen

	Finale Konzentration	
Vitronektin (VN)	10 µg/ml	Becton Dickinson, Heidelberg Promega, Madison, WI, USA
Kollagen Typ IV (Col-IV)	10 µg/ml	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	2 % (w/v)	Seromed Biochrom KG, Berlin

#### 2.1.5 Antikörper

	Finale Konzentration	
Polyklonales Kaninchen-IgG gegen die cytoplasmatische Domäne von hADAM15	2 µg/ml	Prof. Carl Blobel, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA
Polyklonales Ziege-anti-Kaninchen-IgG HRP (Meerrettichperoxidase)-konjugiert	0,13 µg/ml	Boehringer, Ingelheim
Polyklonales Ziege-IgG gegen Aktin	0,25 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Polyklonales Kaninchen-anti-Ziege-IgG HRP-konjugiert	0,1 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Monoklonales Maus-IgG gegen das humane c-myc-Epitop	1 µg/ml	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG bzw. Ziege-anti-Kaninchen-IgG	50 ng/ml	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

### 2.1.6 Reagenzien für Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse

Sammelgel	0,125 M 4 % (w/v) 0,11 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,054 % (w/v) 0,42 % (v/v)	Tris (Trishydroxymethylaminomethan)/ HCl; pH 6,8 Acrylamid Bisacrylamid Natriumdodecylsulfat (SDS) Ammoniumpersulfat (APS) Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Trenngel	0,4 M 12 % (w/v) 0,18 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,4 % (v/v)	Tris/ HCl pH 8,8 Acrylamid Bisacrylamid SDS APS TEMED
Proteinauftragspuffer- lösung	125 mM 10 mM 15 % (w/v) 4 % (w/v)	Tris/ HCl; pH 6,8 EDTA Sucrose SDS
Reduzierende Bedingungen:	10 mM	Dithiotreitol (DTT) A. dest. (destilliertes Wasser)
Proteingel- Laufpufferlösung (10fach)	0,25 M 1,92 M 1 % (w/v)	Tris/ HCl Glycin SDS
Protein- Transferpufferlösung ( <i>Semi-dry</i> -Methode)	50 mM 40 mM 4 % (w/v) 20 % (v/v)	Tris/ HCl Glycin SDS Methanol A. dest.

X-OMAT AR Filme	Kodak, Rochester, USA
Nitrocellulose Optitran BA-S85 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman 3 mm Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
<i>Benchmark prestained</i> Proteinmarker	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
<i>ECL-Western Blotting detection reagents</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA

### 2.1.7 Sonstige Materialien und Reagenzien

<i>Bicinchonine acid (BCA) Protein Reagent Kit</i> mit BSA für Standardkurve	Pierce, Rockford, USA
--	-----------------------

<i>Lipofectin Transfection Reagent</i>	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
„Complete“ Proteaseninhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer Mannheim, Penzberg
3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin-perchlorat (DiO)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Zyklische RGD-Peptide zyκλο-RGDfV und zyκλο-RADfV	Prof. Dr. H. Kessler, Department Chemie, TU München (Kessler et al., 1995)
Expressionsvektor pcDNA 3.1/ Myc-His	Invitrogen, San Diego, CA, USA
P45G-0-14-C-gm Kulturschälchen mit Glasboden	MatTek Corporation, Ashland, USA
96-Loch-Platte schwarz, mit durchsichtigem Boden	Nunc, Wiesbaden

### 2.1.8 Instrumente

Eppendorf Zentrifuge 5417 C und 5402	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Heraeus Laborfuge 400 R <i>Function Line</i>	Heraeus, Hanau
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Zeiss Axiovert 100, CLSM 510 mit angeschlossener Inkubationskammer (InkubatorS), Temperaturregulator (Tempcontrol 37-2 digital) und CTI Controller 3700 zur CO <sub>2</sub> -Regulation	Zeiss, Jena PeCon GmbH, Erlbach
Zeiss Axiovert 35 CLSM mit Laserscan Detektionseinheit	Zeiss, Jena und Leica, Bensheim
<i>SemiDry Blot</i> Apparatur „Fast Blot“	Biometra, Göttingen
<i>Serva Blue Power</i> 500 Netzgerät	Serva, Heidelberg
Gelapparatur Miniprotean II	Bio-Rad, München
<i>Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter</i>	PerkinElmer/ Wallac, Rodgau-Jügesheim
<i>Titertek Multiscan MCC/ 340 – ELISA Reader</i>	Labsystems, Egelsbach
Sicherheitswerkbank Hera <i>Safe</i> HS12	Kendro Laboratory Products, Hanau
Inkubator Heraeus <i>Function Line</i> BB16	Heraeus, Hanau
Labor-pH-Meter CG 842	Schott, Mainz
IKA-Magnetrührer RCT	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
IKA MS2 <i>Minishaker</i>	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
Heidolph Reax 3 Schüttler	Heidolph, Kehlheim
Sonorex TK 30 Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Zellen**

OV-MZ-6- und CHO-Zellen wurden bei 37°C/ 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> in Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert. Es erfolgte zunächst ein Waschschrift mit sterilem PBS, danach die Zellablösung. Die Zellen wurden bei 1500 x g 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Komplettmedium resuspendiert und die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt.

#### **2.2.1.2 Einfrieren von Zellen**

5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden nach Ablösung von der Kulturflasche, Abzentrifugation und Waschen in PBS im Verhältnis 1:3 in Einfriermedium (90 % (v/v) FCS; 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid [DMSO]) aufgenommen. Nach Überführung in Eppendorf-Gefäße wurde die Zellsuspension sofort auf Eis gestellt und nach 3 Tagen Lagerung bei – 80°C in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

#### **2.2.1.3 Transiente Zelltransfektion**

Für die transiente Transfektion von CHO WT-Zellen mit ADAM15 FLRGD-, ECRGD- und als Kontrolle mit pcDNA 3.1/ Myc-His wurden für diese Arbeit cDNA-Konstrukte von Dr. Harry Geppert, Universität Bielefeld (Geppert, 2001) bereitgestellt. Für die Transfektion wurden 150.000 Zellen/ Loch auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht (üN) bei 37°C/ 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 12 h wurden die CHO-Zellen mit MEM Alpha Medium ohne Penicillin/ Streptomycin und ohne FCS (= GAM = Wachstum arretierendes Medium) gewaschen. Je 7 µl des kationischen Transfektionsreagenz Lipofectin wurden mit 100 µl GAM verdünnt, anschließend mit 100 µl GAM/ DNA versetzt, auf dem Vortexer gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die ADAM15 FLRGD-,

ECRGD-cDNA bzw. der Leervektor wurden in einer Menge von 0,5 bis 10 µg je Loch verwendet. Das Lipofectin/cDNA/GAM-Gemisch wurde auf die gewaschenen CHO WT-Zellen gegeben und mit weiteren 500 µl GAM aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C/ 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> für 6 h. Nach einem Mediumwechsel mit Kompletmedium und weiteren 12 h Inkubation wurden die Zellkultur-Überstände geerntet. Diese wurden bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 min zentrifugiert und anschließend der geklärte Überstand für die Westernblot-Analyse gewonnen.

Parallel wurden die transfizierten CHO-Zellen für Westernblot-Analysen wie unter „Herstellung von Zelllysaten“ beschrieben lysiert und bei – 20°C gelagert.

Um den Proteingehalt der Zellkultur-Überstände (FCS) zu reduzieren erfolgten Transfektionen mit 2-fachem Mediumwechsel: Nach 6 h wurden die transfizierten Zellen in Kompletmedium 10 % (v/v) FCS, nach weiteren 12 h in Kompletmedium mit 1 % bzw. 0,5 % (v/v) FCS überführt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach weiteren 3 h geerntet.

#### 2.2.1.4 Herstellung von Zelllysaten

Nach Waschen der Zellen in kaltem PBS und 20 min Inkubation in Lysepuffer auf Eis, wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Zentrifugieren der Lysate erfolgte bei 13000 x g bei 4°C für 15 min. Danach wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt.

Lysepuffer:	50	mM	Tris, pH 7,4
	154	mM	NaCl
	1	mM	CaCl <sub>2</sub>
	1	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	% (v/v)	Nonidet p-40

frisch zugeben: 1 Tablette „Complete“-Proteaseninhibitoren pro 50 ml Lysepuffer

### **2.2.1.5 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Bestimmungen der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels „*BCA Protein Assay Reagent*“-Kit. Prinzip dieses Testverfahrens ist die Biuret-Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Protein im alkalischen Milieu zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert werden. Der Nachweis erfolgt über das BCA-Protein-Reagenz, mit dem sich dabei ein Farbkomplex bildet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde BSA in Konzentrationen von 20  $\mu\text{g/ml}$  bis 400  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Je 50  $\mu\text{l}$  Standard, Probe oder Puffer (Leerwert) wurden mit 200  $\mu\text{l}$  des BCA-Reagenz versetzt und nach 2 h Inkubation bei 37°C auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen. Anschließend wurde die Absorption (Abs.) bei 560 nm im *ELISA Reader* bestimmt.

### **2.2.2 SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese**

Bestehend aus einem 4 % (w/v) Polyacrylamid-Sammelgel und einem 12 % (w/v) Trenngel wurden Vertikalgele (Laemmli et al., 1970) angefertigt. Die Zellysate wurden in Probenpuffer aufgenommen und vor dem Aufbringen auf das Gel 5 min bei 100°C gekocht. In einer Minigelapparatur wurde die Elektrophorese bei 120 V bei RT durchgeführt.

### **2.2.3 Westernblot-Analyse**

Der spezifische Nachweis von ADAM15-Proteinen erfolgte nach Auftrennung mittels SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in der Westernblot-Analyse. Die Proteine wurden über 140 min bei 170 mA in einer *Semi-Dry-Blot*-Kammer vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mittels PBS, 3 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20  $\mu\text{N}$  bei 4°C. Anschließend wurde polyklonales Kaninchen-IgG gegen die cytoplasmatische Domäne von hADAM15 in PBS, 0,05 % (v/v) Tween-20, 1 % (w/v) BSA verdünnt (2  $\mu\text{g/ml}$ ), zur Membran gegeben und  $\mu\text{N}$  bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde polyklonales Ziege-anti-Kaninchen-IgG als Peroxidase-gekoppelter Zweit-AK (1: 8000) für 90 min bei RT auf die Membran gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation der Membran

mit dem Chemilumineszenzsubstrat für Westernblots *ECL TM-Western Blotting System* für 5 min. Für die Signaldetektion wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt. Zur Normalisierung der Proteinkonzentration und *blotting*-Effizienz der auf der Membran pro Gelspur befindlichen Proteinmenge wurde zusätzlich als *housekeeping protein*  $\beta$ -Aktin jeweils auf identischen Membranen detektiert. Dafür erfolgte nach dem ADAM15-Nachweis zunächst eine Entfernung der AK bei der die Nitrozellulosemembranen in 200 mM Glycin, pH 2,2, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween-20 für 60 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde dreimal in PBS gewaschen. Nach einer Absättigung freier Bindungsstellen durch PBS, 3 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20  $\mu$ N bei 4°C wurden die Membranen  $\mu$ N bei 4°C mit polyklonalem gegen  $\beta$ -Aktin gerichtetem Ziegen-IgG (0,25  $\mu$ g/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde polyklonales Kaninchen-anti-Ziege-IgG als Peroxidase-gekoppelter Zweit-AK (0,1  $\mu$ g/ml) für 2 h bei RT zugegeben. Reaktive Proteine wurden wiederum mittels ECL detektiert. Die Evaluierung der Signalintensität in den Westernblot-Analysen erfolgte durch Densitometrie mittels der *Scion Image Software*. Die Daten wurden als Verhältnis der ADAM15-Signalintensität zu  $\beta$ -Aktin-Signalintensität wiedergegeben.

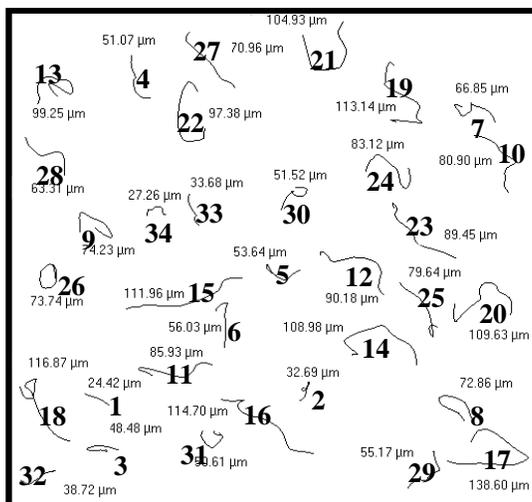
#### **2.2.4 Zellmigrationsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie**

Die Durchführung der Zellmigrationsstudien wurde wesentlich durch PD Dr. Birgit Luber, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, TU München unterstützt. Eine Hauptaufgabe bei den Motilitätsexperimenten stellte die Optimierung der Methode für die aktuelle Aufgabenstellung dar. Daher wird an dieser Stelle auch auf das Kapitel „Zellmigrationsstudien“ im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit verwiesen, in dem einzelne Optimierungsschritte dargestellt werden.

Spezielle Kulturschälchen mit Glasboden wurden für 2 h bei 37°C mit gereinigten EZM-Proteinen (10  $\mu$ g/ml PBS) beschichtet. Anschließend erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf den Zellkultur-Schälchen in PBS 2 % BSA für 2 h bei RT. Nach Waschen der Schälchen in PBS wurden 150.000 Zellen in 5 ml Kompletmedium ausgesät. Um einen optimalen Zustand der Zellen zu gewährleisten, waren diese jeweils 2 Tage zuvor passagiert und am Vortag mit frischem Medium versorgt worden. Die Zellen wurden sofort nach Aussaat in die Zellkultur-Schälchen

in die Inkubationskammer (mit Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Kontrolle: 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>; 37°C) des Mikroskopes Zeiss Axiovert 100M LSM 510 überführt. Nach 50 min waren die Zellen adhären, so dass im LSM ein geeigneter Bildausschnitt fokussiert werden konnte: Über 8 h wurde nun in dreiminütigem Abstand bei 543 nm ein Phasenkontrastbild (PlanNeofluar Linse 20x/ 0,5 Ph2 Objektiv; Helium-Neon Laser im Transmissionsmodus) aufgenommen und diese Bilderserie im Anschluß mittels *LSM 510 Software* (Zeiss, Jena) gespeichert. Geräte und Software wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Heinz Höfler bzw. Dr. Peter Hutzler, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, TU München an der Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF), München, zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung der Migrationsexperimente erfolgte mittels *AIM 3.0 Software* (Zeiss, Jena). Damit wurde für alle aufgezeichneten Bilderserien jede einzelne beobachtete Zelle nach Ein- und Ausschlusskriterien untersucht (siehe Kapitel „Zellmigrationsstudien“ im Ergebnisteil). Pro Bilderserie wurden mindestens 30 Zellen beurteilt. Um die zurückgelegte Wegstrecke zu ermitteln, wurde der Nukleolus bei Zellen mit nur einem Zellkern als Zellmittelpunkt festgelegt, bei Zellen mit mehreren Zellkernen wurde die Mitte zwischen diesen als Zentrum markiert und deren Bewegung als Maß für die zurückgelegte Wegstrecke der migrierenden Zellen im Verlauf über die aufgezeichneten 8 h verfolgt (Abb. 11).



**Abb. 11. Prinzip der Bestimmung der zellulären migratorischen Aktivität**

Im LSM wurde die Zellbewegung verschiedener Zellklone aufgezeichnet: Dabei wurde 50 min nach Aussaat damit begonnen, alle 3 min für insgesamt 8 h ein Phasenkontrast-Bild bei 543 nm aufzunehmen. Die Länge der zurückgelegten Wegstrecken der einzelnen Zellen wurde durch Nachvollziehen der Nukleoli bestimmt. Repräsentatives Ergebnis eines ADAM15-FLRGD-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellklons auf VN. Dargestellt sind die zurückgelegten Wegstrecken von 34 Zellen innerhalb von 8 h.

Die erhaltene Linie wurde mittels gespeichertem Maßstab durch das AIM 3.0 Programm in die Länge der zurückgelegten Wegstrecke einer Zelle pro Zeit umgerechnet. Nach Einspeisung der Datensätze in das Auswerteprogramm Microsoft Excel wurde aus allen Wegstrecken-Angaben einer Bilderserie der Median bestimmt und aus jeweils mindestens 3 gleichen Bilderserien die Mittelwerte der Mediane gebildet. Als solche sind die Daten im Ergebnisteil aufgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, wobei ein p-Wert  $<0,05$  einen statistisch signifikanten Unterschied definiert. Weiterhin wurde pro Bilderserie die Anzahl von Zellteilungen, Zellablösungen und die Zahl ungleichmäßig adhärenter Zellen erfasst (siehe Kapitel „Zellmigrationsstudien“ im Ergebnisteil), sowie die Morphologie der Zellen beurteilt.

### **2.2.5 Zell/Zell-Adhäsionstests**

Innerhalb der Zell/Zell-Adhäsionstests sollte die Hypothese einer verstärkten Zell/Zell-Adhäsion durch die potentielle Bindung von Integrin  $\alpha\beta3$  auf einer Zelle an hADAM15 auf der Nachbarzelle überprüft werden.

Dafür wurden am Tag 1 auf einer schwarzen 96-Loch-Zellkultur-Platte mit durchsichtigem Boden OV-MZ-6-Zellen als Bodenzellschicht ausgesät: VEC, WT und  $\alpha\beta3$ -überexprimierende Zellen kamen dafür in einer Konzentration von jeweils 80.000 Zellen/ Loch in 100  $\mu\text{l}$  phenolrotfreiem Medium zum Einsatz. Weiterhin wurden die OV-MZ-6-Zellen für die Deckzellschicht fluoreszenzmarkiert. Hierfür wurden adhärenente VEC, WT und ADAM15-FLRGD-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen mit dem Farbstoff 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyaninperchlorat (DiO) in einer finalen Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  phenolrotfreiem Medium für 12 h versetzt. DiO, ein lipophiles Pulver, wurde zuvor in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in DMSO gelöst. Hierfür wurde die Suspension 30 min bei 50°C und anschließend 30 min im Ultraschallbad inkubiert. DiO wird sowohl über passive Diffusion als auch aktiven Transport in die Zellmembran eingelagert. Dort bleibt der Farbstoff über mehrere Tage nachweisbar. Das Absorptionsmaximum von DiO liegt membrangebunden bei 484 nm, sein Fluoreszenz-Emissionsmaximum bei 501 nm.

Nach 24 h wurden die *Zell-monolayer* auf Dichte und Gleichmäßigkeit kontrolliert. Um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen wurden die *monolayer* zweimal mit

phenolrotfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen abgelöst und ebenfalls zweimal mit phenolrotfreiem Medium gewaschen. Die Lichtexposition der markierten Zellen wurde durch Arbeiten ohne künstliche Beleuchtung und Abdeckung der Zellkulturgefäße mit Aluminium-Folie minimiert. Die DiO-markierten Zellen wurden als Deckzellschicht in einer Konzentration von 100.000 Zellen/ Loch in 100 µl phenolrotfreiem Medium auf die bereits adhärenzte Bodenzellschicht ausgesät. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Zellen auf dem Schüttler bei RT. Nach dreimaligem vorsichtigem Waschen der Platten mit phenolrotfreiem Medium wurde die Fluoreszenzintensität für die einzelnen Kombinationen aus Deck- und Bodenzellschicht im *Wallac Victor 2, 1420 Multilabel-Counter* (Abs. 435 nm/ Em. 535 nm, 0,1 s) bestimmt. Im Anschluß erfolgte eine erneute mikroskopische Beurteilung der 96-Lochplatte: Bei den Waschschrinen teilweise oder vollständig zerstörte Zellrasen wurden nachträglich als Meßwerte ausgeschlossen. Die Korrelation von Fluoreszenz und Zellzahl erfolgte mittels Eichkurven (5000 – 100000 Zellen/ Loch).

Die Optimierung der Methode des Zell/Zell-Adhäsionsexperimentes ist im Kapitel „Zell/Zell-Adhäsionsexperimente“ im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit dargestellt.

In mehreren Ansätzen der Zell/Zell-Adhäsionstests wurde das zyklische RGD-Peptid zyκλο-RGDfV und als Kontrolle das zyκλο-RADfV verwendet. Diese Peptide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H. Kessler, Department Chemie, TU München, zur Verfügung gestellt (Kessler et al., 1995). Die zyklischen RGD-Peptide wurden in einer Konzentration von 60, 125 und 250 µg/ml Medium eingesetzt und auf den jeweiligen Zellrasen für 30 min bei 37°C/ 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **III. Ergebnisse**

Ziel der Arbeit war den Einfluß von hADAM15 auf motile und adhäsive Eigenschaften von humanen OVCA-Zellen zu untersuchen. Sowohl hADAM15 als auch VN besitzen ein RGD-Tripeptid. Aufgrund dessen ist eine Konkurrenz zwischen diesen beiden Proteinen um die RGD-abhängige Bindung an Integrin  $\alpha\beta3$  vorstellbar. Integrin  $\alpha\beta3$  besitzt eine Schlüsselfunktion innerhalb der Progression vieler Tumoren, darunter dem humanen OVCA (Kenny et al., 2008). In Vorarbeiten der AG Reuning wurde die spezifische Adhäsion an VN über das Integrin  $\alpha\beta3$  in der humanen OVCA-Zelllinie OV-MZ-6 gezeigt. Die Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung führte dabei RGD-abhängig zu einer starken Zelladhärenz und zu einer eindrucksvollen Steigerung der Zellmotilität (Hapke et al., 2003). Für diese Arbeit wurden nun OV-MZ-6-Zellen, die hADAM15 als potentiellen Antagonisten der Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung stabil überexprimierten, auf Veränderungen ihrer motilen und adhäsiven Eigenschaften hin untersucht.

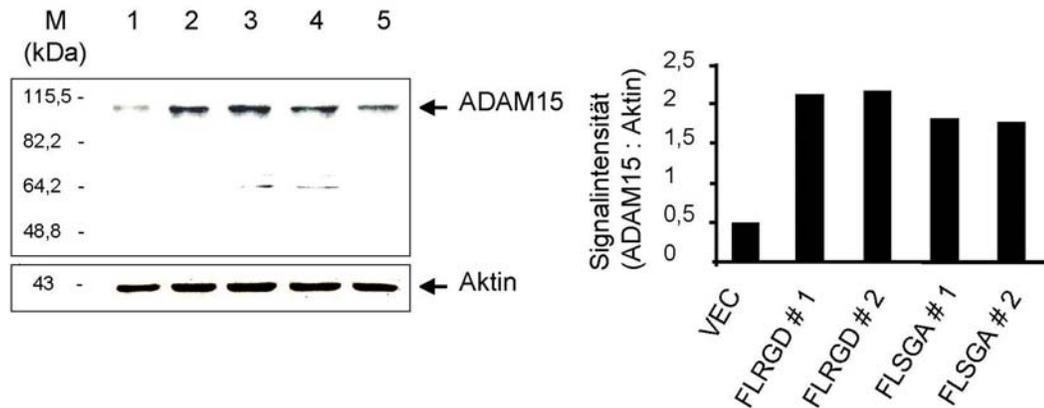
#### **3.1 Charakterisierung der hADAM15-Expression in OV-MZ-6-Zellen**

##### **3.1.1 Nachweis des hADAM15-Proteins in der Westernblot-Analyse**

Der Nachweis der hADAM15-Expression auf Proteinebene mittels Westernblot-Analyse war Bestandteil der vorliegenden Arbeit. In Vorversuchen der AG Reuning war die hADAM15-Expression bereits auf der mRNA-Ebene mittels semi-quantitativer RT-PCR sowie auf der Proteinebene mittels immunocytochemischer Färbungen gezeigt worden (vgl. Kapitel „Material und Methoden“).

In der Westernblot-Analyse fand sich eine spezifische Bande bei ca. 100 kDa, welche dem FL-ADAM15-Protein zuzuordnen ist. Hinsichtlich der Signalstärke war ADAM15 in beiden FLRGD-Zellklonen vergleichbar stark exprimiert und übertraf die ADAM15-Expression im VEC-transfizierten OV-MZ-6-Zellklon um mehr als das 4-fache. Auch die beiden FLSGA-Klone zeigten eine deutliche ADAM15-Expression: Hier lag das Signal in der Westernblot-Analyse jeweils knapp 4-fach über dem Signal des VEC-transfizierten Zellklons (Abb. 12).

Ein Nachweis der löslichen EC-ADAM15-Proteinvarianten mittels Westernblot-Analyse gelang weder aus den Zelllysaten noch aus dem Zellkulturüberstand transfizierter Zellen.



**Abb. 12. Nachweis der ADAM15-Expression in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Westernblot-Analyse**

Nach Inkubation mit einem polyklonalen AK gegen die cytoplasmatische Domäne von ADAM15 und „stripping“ wurden die Membranen, um unterschiedliche Proteinfüllmengen auszugleichen, mit einem AK gegen Aktin inkubiert. Wiedergabe eines repräsentativen Westernblots und der entsprechend densitometrisch erfassten Signalstärken. Diese sind als Verhältnis der ADAM15- zur Aktin-Signalstärke aufgeführt. (M: Marker; 1: VEC; 2: FLRGD # 1; 3: FLRGD # 2; 4: FLSGA # 1; 5: FLSGA # 2)

### 3.1.2 Zell/Zell-Adhäsionsexperimente

In vorhergehenden Zell/EZM-Adhäsionsversuchen unserer AG zeigte sich eine spezifische Bindung von OV-MZ-6-Zellen an VN über das  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin. Bei OV-MZ-6-Zellen, welche das ADAM15 FLRGD- oder ECRGD-Protein überexprimierten, war eine bis zu dreifach reduzierte Adhäsion auf VN zu beobachten. Dagegen blieb die Adhäsion auf Col-I, Col-IV oder unbeschichteten Zellkulturschälchen im Vergleich zu OV-MZ-6 VEC- oder WT-Zellen unverändert. OV-MZ-6 FLSGA- und ECSGA-Klone zeigten ein den VEC- und WT-Zellen entsprechendes Adhäsionsverhalten auch auf VN (Beck et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beeinflussung der RGD-abhängigen Adhäsionsregulation innerhalb des Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ /VN-Systems durch hADAM15 hin. Dabei könnte hADAM15 über sein RGD-Motiv mit dem Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  auf derselben Zelle oder auf Nachbarzellen interagieren

und damit für eine verminderte RGD-abhängige Bindung von Integrin  $\alpha\beta3$  an VN und damit eine reduzierte Zelladhäsion verantwortlich sein. Unserer Hypothese zufolge müßten demnach Zell/EZM-Kontakte geschwächt, Zell/Zell-Kontakte aber verstärkt werden, sofern sich die Integrin  $\alpha\beta3$ /hADAM15-Interaktion zwischen benachbarten Zellen abspielt. Die folgenden Zell/Zell-Adhäsionsexperimente sollten entsprechend überprüfen, ob das RGD-Motiv in hADAM15 eine verstärkte Zell/Zell-Adhäsion zwischen hADAM15- und Integrin  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden Zellklonen zur Folge hat.

### **3.1.2.1 Etablierung der Methode**

In den Zell/Zell-Adhäsionsexperimenten sollte untersucht werden, ob eine erhöhte hADAM15-Expression einen Einfluß auf die Zell/Zell-Adhäsion nimmt. Dazu wurden zunächst Zellen mit DiO fluoreszenzmarkiert, um so den Prozentsatz an adhärenenten bzw. nicht adhärenenten Zellen per Fluorimetrie bestimmen zu können. Auf einer 24-Loch-Platte wurden 90.000 OV-MZ-6-Zellen je Loch ausgesät, 12 h bei 37°C/ 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert, dann mit DiO in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml bis 50 µg/ml in Kompletmedium versetzt und nach je 2, 4, 6, 8 und 12 h auf cytotoxische Effekte und Fluoreszenzintensität im LSM kontrolliert.

In der Trypanblau-Färbung zeigte DiO bei keiner der verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten einen negativen Effekt auf die Zellen. Die Fluoreszenzintensität wies bei 12 h Inkubation mit einer finalen Konzentration von über 5 µg/ml keine für die Detektion wesentliche Steigerung der Markierungsintensität mehr auf. Daher wurde für weitere Experimente der Einsatz von 5 µg/ml in Medium gelöstem DiO mit einer Inkubationszeit von 12 h als optimal festgelegt.

Markierungsintensität und Verträglichkeit von DiO zeigten keinen Unterschied, wenn suspendierte oder adhärenente OV-MZ-6-Zellen markiert wurden. Daher wurden die OV-MZ-6-Zellen für die Adhäsionsexperimente in adhärenentem Zustand fluoreszenzmarkiert.

Fluoreszenzmessungen mit herkömmlichen transparenten 96-Loch-Zellkulturplatten erbrachten hohe Leerwerte. Deutlich besser schnitten in der Fluorimetrie schwarze 96-Loch-Platten ab. Sie kamen bei den Adhäsionstests fortan zum Einsatz. Ein durchsichtiger Boden war Voraussetzung, um die Zellen weiterhin mikroskopisch

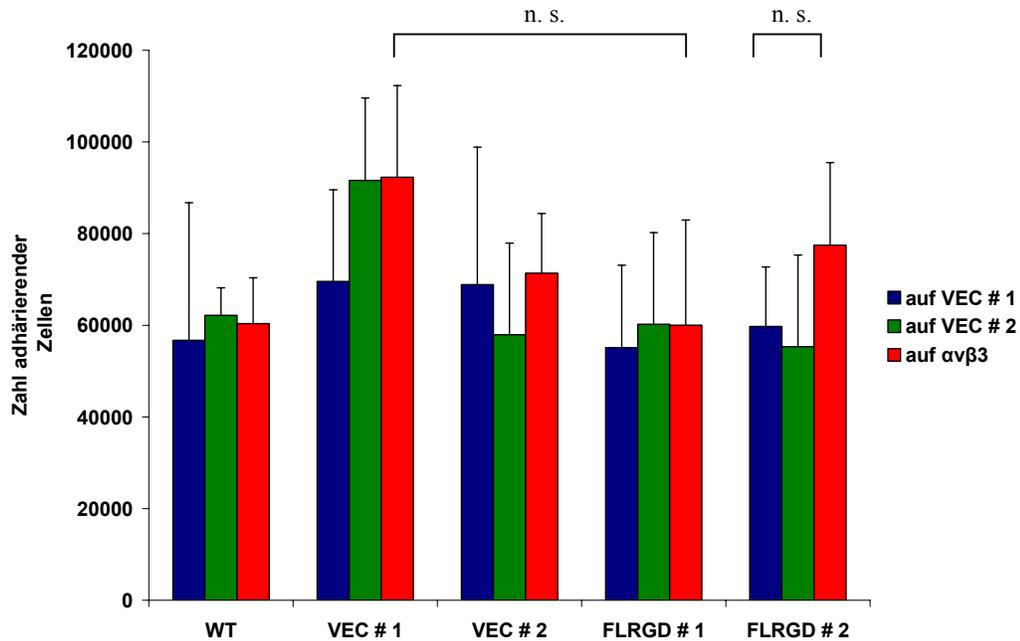
beurteilen zu können. Außerdem wurde zur Reduktion von Hintergrundsignalen phenolrotfreies Medium an Stelle des normalen Komplettmediums verwendet. Unmarkierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf dem Boden von 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Eine homogene 100%-konfluente Schicht dieser Zellen in den einzelnen *wells* einer 96-Loch-Zellkulturplatte war als vergleichbare Grundlage für die Untersuchung der Zell/Zell-Adhäsion von entscheidender Bedeutung. In Vorversuchen mit 30.000 bis 80.000 Zellen je *well* und Inkubationszeiten von 12 h bis zu 3 Tagen zeigte sich ein optimales Ergebnis bei einer Aussaat von 80.000 OV-MZ-6-Zellen je *well* und einer Inkubation von 12 h bis Versuchsbeginn. Nach Versuchsablauf wurden die einzelnen Zellrasen auf Vollständigkeit kontrolliert. Beschädigungen im Rahmen der Waschschrte traten in Einzelfällen auf, diese Werte wurden nachträglich von der Analyse ausgeschlossen.

Um die optimale Zell/Zell-Adhäsionszeit festzulegen, wurde die Inkubationszeit von 20 min bis 22 h variiert. Diese Veränderung der Inkubationszeit erbrachte keinen Unterschied im Adhäsionsverhalten der OV-MZ-6-Zellen. Auffällig war ein durchgehend hoher bis über 90 % reichender Prozentsatz adhärenter Zellen. Bereits bei 20-minütiger Inkubation zeigten sich nahezu 100 % der fluoreszenzmarkierten Zellen adhärent und konnten nicht mehr von der Zellschicht am Boden gelöst werden, ohne diese zu zerstören. Aus diesem Grund wurden die 96-Loch-Platten bei den folgenden Versuchen direkt nach Aussaat der fluoreszenzmarkierten Zellen auf einem Rüttler für nur 15 min bei RT inkubiert. Damit konnte ein Prozentsatz von durchschnittlich ca. 60 % an adhärenen Zellen nach Durchführung der Waschschrte erzielt werden.

### **3.1.2.2 Einfluß von ADAM15 auf die Zell/Zell-Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen**

In einem weiteren Versuchsansatz wurden zur Etablierung konfluenter *monolayer* diesmal Integrin  $\alpha\beta3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen auf 96-Loch-Platten ausgesät, um das Zell/Zell-Adhäsionsverhalten fluoreszenzmarkierter ADAM15-FLRGD-transfizierter OV-MZ-6-Zellen darauf zu untersuchen. Nach Zugabe der fluoreszenzmarkierten Zellen wurden die Zellkulturplatten 15 min auf dem Rüttler inkubiert und die Anzahl adhärrierender Zellen mittels Fluorimetriesignal bestimmt. Als Kontrolle für die  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen am Boden der *wells*

dienten VEC-transfizierte OV-MZ-6-Zellen, für die darübergeschichteten ADAM15-FLRGD-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen wurden alternativ fluoreszenzmarkierte WT- und VEC-transfizierte OV-MZ-6-Klone eingesetzt.



**Abb. 13. Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen auf Integrin  $\alpha\beta 3$ -überexprimierenden Zellen in Abhängigkeit von der ADAM15-Überexpression**

100.000 ADAM15-FLRGD-überexprimierende, fluoreszenzmarkierte OV-MZ-6-Zellen wurden für 15 min auf Integrin  $\alpha\beta 3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zell-*monolayern* inkubiert. Als Kontrolle für die  $\alpha\beta 3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen am Boden der *wells* dienten VEC-transfizierte OV-MZ-6-Zellen, für die darübergeschichteten ADAM15-FLRGD-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen wurden alternativ fluoreszenzmarkierte WT- und VEC-transfizierte OV-MZ-6-Klone eingesetzt. Nach mehreren Waschschritten wurde die Anzahl adhärennder Zellen mittels Fluoreszenzsignal bestimmt. Die Anzahl adhärennder Zellen in einem Experiment wurde jeweils aus 3 Einzelwerten ermittelt. Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um die Mittelwerte aus 5 Experimenten. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Zell/Zell-Adhäsion in Abhängigkeit von ADAM15. (n. s. = nicht signifikant)

WT-Zellen wiesen dabei einen konstanten Prozentsatz adhärennder Zellen von ca. 60 % auf, unabhängig davon, ob die Aussaat auf VEC- oder  $\alpha\beta 3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen erfolgte. Dasselbe Adhäsionsverhalten konnte bei den ADAM15-FLRGD-# 1-Zellen beobachtet werden. Dagegen zeigte der zweite ADAM15-FLRGD-überexprimierende Zellklon (# 2) eine gesteigerte Adhäsion auf  $\alpha\beta 3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen. Diese lag um ca. 20 % höher im Vergleich zu einer Zellaussaat auf einem der beiden VEC-transfizierten Zell-*monolayer*, welche sich wie schon bei den zwei zuvor beschriebenen Klonen im Bereich von 60 % befand. ADAM15 wurde in beiden FLRGD-Zellklonen in etwa gleich stark exprimiert

(Abb. 12) und scheidet daher als Ursache der verstärkten Zell/Zell-Adhäsion von FLRGD-# 2-Zellen aus. Weiterhin zeigten auch die beiden eingesetzten VEC-transfizierten Zellklone eine gesteigerte Adhäsion auf  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen im Vergleich zu jeweils einem der VEC-Zell-*monolayer*. Der jeweils andere VEC-Zellklon lieferte als *monolayer* ein den  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden Zellen vergleichbares Ergebnis: Bei den VEC-# 2-Zellen waren dabei ca. 70 %, bei den VEC-# 1-Zellen mehr als 90 % der ausgesäten Zellen auf dem unterliegenden Zellrasen adhärent (Abb. 13). Im Kruskal-Wallis Test zeigte sich kein signifikantes Ergebnis. Es konnte demnach bei diesen Experimenten keine signifikante Veränderung der Zell/Zell-Adhäsion zwischen OV-MZ-6-Zellen in Abhängigkeit von ADAM15 beobachtet werden.

### **3.1.2.3 Einsatz von löslichen RGD-Peptiden**

In unserer Hypothese sind wir von einer RGD-abhängigen Bindung zwischen dem hADAM15 der einen Zelle und dem Integrin  $\alpha\beta3$  der anderen Zelle ausgegangen, was zu einer erhöhten Zell/Zell-Adhäsion führen könnte. Lösliche RGD-Peptide würden entsprechend um die Bindungsstellen am Integrin  $\alpha\beta3$  konkurrieren und könnten so die Zell/Zell-Adhäsion reduzieren. Der Einfluß des zyklischen RGD-Peptides, zylo-RGDfV, bzw. als Kontrolle des zyklischen RAD-Peptides, zylo-RADfV (Kessler et al., 1995), wurde in einigen Zell/Zell-Adhäsionstests erprobt. Die Peptide wurden zu den Integrin  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden und im Vergleich zu den VEC-*monolayern* in einer Konzentration von 60-250  $\mu\text{g/ml}$  Medium gegeben und für 30 min bei 37°C/ 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Selbst in der niedrigsten Konzentration kam es zur Ablösung größerer Anteile der Bodenzellschicht. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse aus diesen Versuchen nicht verwendet werden.

Zusammenfassend konnte demnach in unseren Versuchen keine signifikante Veränderung der Zell/Zell-Adhäsion zwischen hADAM15- und Integrin  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden.

### **3.1.3 Zellmigrationsstudien**

In Vorarbeiten der AG Reuning wurde gezeigt, dass Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  die Adhäsion und Migration von OV-MZ-6-Zellen auf VN weitgehend bestimmt (Hapke et al., 2003). ADAM15 schien in unseren vorausgehenden Zell/EZM-Adhäsionstests diese Bindung RGD-abhängig zu stören und deshalb die Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen an VN zu schwächen (Beck et al., 2005). Da Adhäsion eine wichtige Grundlage für Zellmigration ist, sollte der Einfluß von hADAM15 auf die Zellmotilität von humanen OVCA-Zellen untersucht werden.

#### **3.1.3.1 Optimierung der Zellmigrationsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie**

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde für die Zellmigrationsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie die Motilität verschiedener Zellklone auf mit VN bzw. Col-IV beschichteten Zellkulturschälchen über 8 h im Phasenkontrastmikroskop aufgezeichnet und anschließend die zurückgelegte Wegstrecke der einzelnen Zellen ermittelt. Kritisch dabei war, Bedingungen zu definieren, die eine Vergleichbarkeit der einzelnen Bilderserien und eine möglichst objektive Auswertung des Bildmaterials gewährleisten, um auch kleine jedoch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen zu erfassen. Mindestens 30 Zellen wurden für die Auswertung herangezogen. Diese sollten einzeln oder in lockeren *clustern* liegen, um eine gegenseitige räumliche Behinderung möglichst gering zu halten. Weiterhin zeigte sich eine Differenz innerhalb der erfaßten motilen Zelleigenschaften in Abhängigkeit davon, wie spät nach Adhärenz der ausgesäten Zellen die Aufzeichnung gestartet wurde.

##### **3.1.3.1.1 Variation der Inkubationszeit der ausgesäten OV-MZ-6-Zellen**

In Vorversuchen wurde untersucht, inwieweit sich eine potentielle ADAM15-RGD-abhängige Beeinflussung der Motilität von OV-MZ-6-Zellen im Verlauf mehrerer Stunden nach Zellaussaat verhält. Dafür wurde die Migration verschiedener Zellklone

50 min, 5 und 12 h nach Aussaat in die Kulturschälchen des LSM über 8 h verfolgt. Nur nach 50 min zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen OV-MZ-6-Zellklonen in Abhängigkeit von der ADAM15-RGD-Überexpression. Dieser war nach 5 und 12 h nicht mehr zu beobachten. Entsprechend wurde die Inkubation nach Zellaussaat mit 50 min für die folgenden Zellmigrationsstudien festgelegt.

#### **3.1.3.1.2 Variation weiterer Versuchsparameter**

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellmotilität der einzelnen Klone in Abhängigkeit der ADAM15-RGD-Überexpression wurde nur unter folgenden Versuchsbedingungen festgestellt:

- a. Einsatz von 10 µg/ml anstelle von 5 µg/ml EZM-Protein zur Beschichtung der Kulturschälchen
- b. BSA-Blockierung der beschichteten Kulturschälchen anstelle von keiner BSA-Blockierung
- c. Passagieren der Zellen 48 h vor Versuchsbeginn
- d. Mediumwechsel der Zellen 24 h vor Versuchsbeginn

#### **3.1.3.1.3 Definition der Bedingungen zur Versuchsauswertung**

In Vorversuchen wurden verschiedene Methoden zur Auswertung der aufgezeichneten Zellmotilitätsexperimente erprobt. Um auch kleinere Unterschiede zwischen den einzelnen Zellklonen zu erfassen und den Einfluß Untersucher-abhängiger Variablen zu minimieren, wurden folgende Kriterien für die Versuchsauswertung definiert:

Jede der aufgenommenen Zellen wurde beurteilt, es sei denn,

1. sie wanderte aus dem Bild
2. sie wurde so lange von einer anderen Zelle überdeckt, dass ihre Zellbewegung nicht mehr eindeutig nachzuvollziehen war.

Bei der Beurteilung der Zellen hinsichtlich der Motilität erfolgte eine Zuordnung in eine der folgenden 4 Kategorien:

a. gleichmäßige Zellbewegung mit nachvollziehbarer zurückgelegter Wegstrecke

b. Zellteilung

Die Zelle teilte sich, damit war keine Aussage über die Zellmotilität möglich.

c. Ablösung

Die Zelle wurde nie adhären oder löste sich im Verlauf der 8 h ab und wurde danach nicht mehr adhären.

d. ungleichmäßige Adhärenz

Die Zelle löste sich im Laufe des Beobachtungszeitraumes ab, wurde danach jedoch wieder adhären oder befand sich durchgehend oder langfristig in einem Stadium zwischen Adhärenz und Ablösung, welches sich durch einen abgekugelten Zellkörper mit starker Podienbildung und eine ungleichmäßige, für die übrigen Zellen untypische Zellbewegung auszeichnet.

Zur Ermittlung der von den OV-MZ-6-Zellen zurückgelegten Wegstrecke wurden nur Zellen, die der Kategorie „a“ zugeordnet waren, für die Auswertung herangezogen. Eine Einteilung in die Kategorien „b“, „c“ oder „d“ bedeutete den Ausschluß der jeweiligen Zelle für die Bestimmung der zellmigratorischen Aktivität.

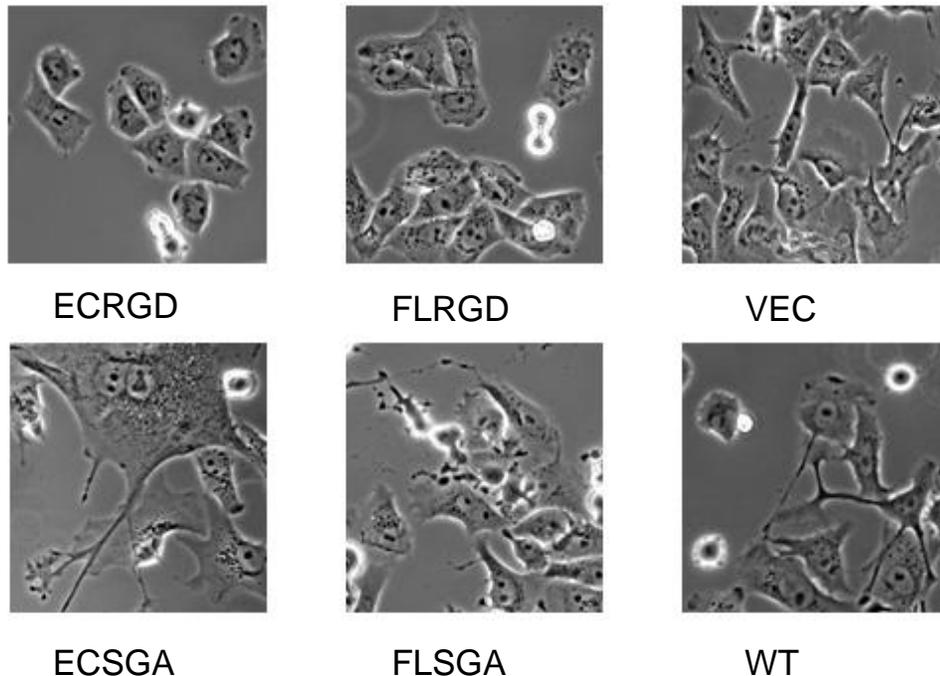
### **3.1.3.2 Ergebnisse aus Zellmigrationsstudien mit OV-MZ-6-Zellen**

#### **3.1.3.2.1 ADAM15 beeinflusst die Morphologie von humanen Ovarialkarzinomzellen auf Vitronektin**

Integrin  $\alpha\beta 3$  bestimmt die Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen auf VN vornehmlich (Hapke et al., 2003). In Vorversuchen unserer AG fanden wir Anhaltspunkte dafür, dass hADAM15 diese Bindung RGD-abhängig stört, was zu einer Abschwächung der Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen an VN zu führen schien (Beck et al., 2005). Durch die Veränderung der Zell/EZM-Protein-Adhäsion ist eine von der hADAM15-Überexpression abhängige Zellmorphologie ebenfalls vorstellbar. Dies wurde im Rahmen der *time-lapse*-Videomikroskopie untersucht.

ADAM15-RGD-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen zeigten auf VN eine Morphologie, die sich deutlich von der anderer Zellklone unterschied: Die Zellen, welche das ADAM15-Protein in seiner natürlichen Form überexprimierten oder mit

der ECRGD-Variante stabil transfiziert worden waren, wiesen im adhärenen Zustand auf VN eine kompaktere Zellform mit deutlich geringerer Lamelli- und Filopodienbildung auf, als dies bei WT-, VEC-, FLSGA- sowie ECSGA-Zellklonen zu beobachten war (Abb. 14). Auf den mit Col-IV beschichteten Kulturschälchen wurde dagegen kein Unterschied in der Zellmorphologie der eingesetzten Zellklone festgestellt.



**Abb. 14. ADAM15 verändert den Phänotyp von auf VN adhärenen OV-MZ-6-Zellen**

ADAM15-RGD-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen zeigten auf VN eine kompaktere Zellmorphologie mit geringerer Podienbildung als die übrigen Zellklone. Repräsentative Bildausschnitte nach 8 h Beobachtungszeit sind für ADAM15-FLRGD # 2, ECRGD, FLSGA, ECSGA, VEC und WT wiedergegeben.

### **3.1.3.2.2 ADAM15 reduziert die Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Vitronektin RGD-spezifisch**

hADAM15 scheint über seine RGD-abhängige Interaktion mit Integrin  $\alpha v \beta 3$  dessen Bindung an das EZM-Protein VN zu beeinflussen (Beck et al., 2005). Damit sind auch Effekte auf die Motilität von OV-MZ-6-Zellen vorstellbar. Dies wurde in *in vitro* Zellmotilitätsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie mit OV-MZ-6-Zellen in

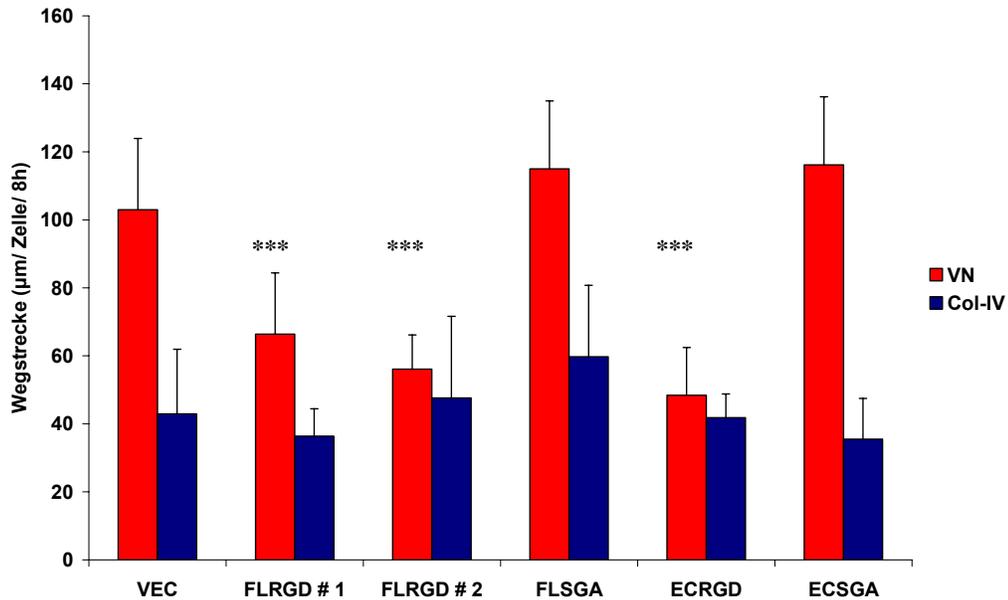
Abhängigkeit von der ADAM15-Überexpression untersucht. Dafür wurden OV-MZ-6-Zellen eingesetzt, welche das ADAM15-Protein stabil in seiner FL-Form überexprimieren oder aber dessen EC-Variante exprimierten. Im Vergleich wurden VEC-, sowie ADAM15-SGA-transfizierte FL- und EC-Klone der OV-MZ-6-Zellen untersucht. Somit konnten die Ergebnisse nicht nur hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von der ADAM15-Überexpression beurteilt, sondern auch ihre RGD-Abhängigkeit getestet werden.

Im LSM wurden die Zufallsbewegungen von OV-MZ-6-Zellen entweder auf VN- oder auf Col-IV-beschichteten Kulturschälchen für 8 h festgehalten und anschließend die zurückgelegten Wegstrecken der einzelnen Zellen bestimmt. Mindestens 30 Zellen wurden je Experiment untersucht. Jedes Experiment wurde für einen speziellen Zellklon auf VN oder Col-IV mindestens dreimal wiederholt.

Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Zellmotilität der ADAM15-RGD-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen auf VN. ADAM15-SGA-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wiesen dagegen keine reduzierte Motilität auf: Die von ihnen zurückgelegten Wegstrecken waren denen der VEC-transfizierten Zellen vergleichbar. Die Reduktion der Zellmotilität betraf interessanterweise gleichermaßen Zellen, die das zellgebundene FLRGD-ADAM15-Protein oder aber dessen lösliche ECRGD-Form exprimierten. Auf Col-IV als Adhäsionssubstrat zeigte keiner der OV-MZ-6-Zellklone, die mit ADAM15 und dessen Varianten transfiziert worden waren im Vergleich zu VEC-Zellen eine signifikante Veränderung hinsichtlich der Motilität (Abb. 15).

Im Einzelnen war die Motilität der ADAM15-FLRGD-Zellklone # 1 und # 2 im Vergleich zu VEC-transfizierten OV-MZ-6-Zellen auf VN um 35 % bzw. 45 %, im Vergleich zum FLSGA-Zellklon um 42 % bzw. 51 % und im Vergleich zur ECSGA-Variante um 43 % bzw. 52 % reduziert. Die Überexpression der ADAM15-EC-Domäne führte im Vergleich zu den VEC-transfizierten Zellen zu einer Reduzierung der Zellbewegung auf VN von 53 %. Im Vergleich zur ECSGA- und FLSGA-Variante kam es zu einer Reduktion um 59 % bzw. 58 %. FLSGA- und ECSGA-transfizierte Zellen zeigten hinsichtlich ihrer Motilität auf VN vergleichbare Ergebnisse wie VEC-transfizierte OV-MZ-6-Zellklone: Die Wegstrecken waren hier lediglich 12 % bzw. 14 % länger im Vergleich zu VEC-transfizierten Zellen. Ähnlich verhielt es sich mit ECRGD- sowie FLRGD # 1- bzw. # 2-Zellen: Auch die zurückgelegten Wegstrecken

dieser Klone unterschieden sich auf VN nicht signifikant: ECRGD-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wiesen auf VN im Vergleich zu FLRGD # 1 bzw. # 2 nur 27 % bzw. 14 % kürzere Wegstrecken auf.



**Abb. 15. Die migratorische Aktivität von OV-MZ-6-Zellen auf VN ist abhängig von der ADAM15-Expression**

Die ungerichtete Zellmotilität der einzelnen ADAM15-transfizierten OV-MZ-6-Klone wurde auf VN und zur Kontrolle auf Col-IV für 8 h beobachtet. Es wurden jeweils mindestens 30 Zellen eines Experimentes beurteilt. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt. Die angegebenen Daten entsprechen dem Mittelwert der Mediane der durch einzelne Zellen zurückgelegten Wegstrecken. (\*\*\*) =  $p < 0,0001$  im Vergleich mit VEC-, FLSGA- und ECSGA-Zellen)

Alle OV-MZ-6-Klone legten größere Wegstrecken auf VN im Vergleich zu Col-IV zurück. Bei den VEC-, FLSGA- sowie ECSGA-transfizierten Zellen betrug die über 8 h zurückgelegte Wegstrecke auf VN 143 %, 93 % bzw. 231 %, bei den ECRGD- sowie den FLRGD # 1-, # 2-transfizierten Klonen dagegen 17 %, 83 % bzw. 19 % mehr im Vergleich zu dem für Col-IV ermittelten Wert.

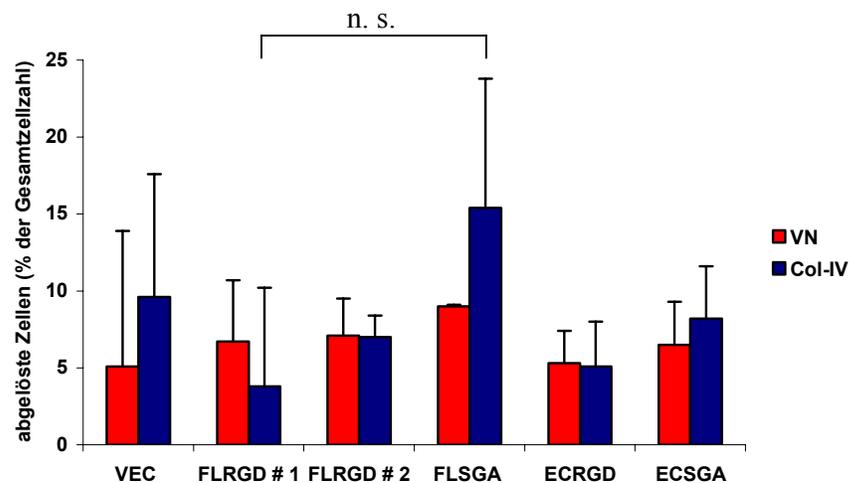
### 3.1.3.2.3 Einfluß von ADAM15 auf die Zellteilung von OV-MZ-6-Zellen

Neben den zurückgelegten Wegstrecken wurde für jedes Migrationsexperiment im Zeitverlauf der aufgezeichneten 8 h auch die Anzahl von Zellteilungen und die Zahl der vom EZM-Protein abgelösten Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl bestimmt.

In den Migrationsexperimenten zeigte sich 50 min nach Aussaat der Zellen eine Zellteilungsrate von 10-25 % innerhalb von 8 h. Die einzelnen OV-MZ-6-Zellklone unterschieden sich dabei weder auf VN noch auf Col-IV signifikant voneinander, so dass während des Beobachtungszeitraums kein Einfluß der ADAM15-Expression auf die Proliferation festzustellen war (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3.2.4 ADAM15 erhöht den Prozentsatz sich ablösender Zellen auf Vitronektin im Vergleich zu Kollagen Typ IV

ADAM15 scheint über eine RGD-abhängige Interaktion mit dem Integrin  $\alpha\beta3$  die Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung von OV-MZ-6-Zellen zu stören. Darüber nimmt hADAM15 Einfluß auf das Adhäsionsverhalten der OV-MZ-6-Zellen auf VN, wie in Vorarbeiten unserer AG gezeigt werden konnte (Beck et al., 2005). Die Zell/EZM-Protein-Adhäsion sollte nun auch mittels *time-lapse*-Videomikroskopie untersucht werden. Dafür wurde der Prozentsatz sich ablösender Zellen innerhalb von 8 h für die einzelnen Klone ermittelt. Es ergab sich folgender Trend:



**Abb. 16. ADAM15-RGD erhöht die Zellablösung auf VN im Vergleich zu Col-IV**

150.000 Zellen wurden auf mit VN oder Col-IV beschichtete Kulturschälchen ausgesät. Über 8 h wurde die Zahl abgelöster Zellen ermittelt und als Prozent der Gesamtzellzahl wiedergegeben. Jedes Experiment wurde mit mindestens 30 Zellen durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Die angegebenen Daten entsprechen dem Mittelwert der jeweiligen Experimente. ADAM15-RGD-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen zeigten im Vergleich zu VEC- und ADAM15-SGA-überexprimierenden Zellen eine erhöhte Ablöserate auf VN im Vergleich zu Col-IV. (n. s. = nicht signifikant)

ADAM15-transfizierte OV-MZ-6-Zellen zeigten eine erhöhte Rate an Zellablösungen auf VN im Vergleich zu Col-IV. Dieser Effekt wurde in Abhängigkeit des RGD-Motivs beobachtet: ECSGA-, FLSGA- bzw. VEC-Zellen wiesen auf VN eine Zellablösungsrate von 79 %, 58 % und 53 % des für Col-IV ermittelten Wertes auf. Mit einer Ablöserate von 7,1 und 7 % bzw. 5,3 und 5,1 % unterschied sich dagegen die Adhärenz des FLRGD # 2-Zellklons sowie des ECRGD-Zellklons auf VN nicht von der Adhärenz an Col-IV. Der FLRGD # 1-Zellklon zeigte auf VN im Vergleich zu Col-IV eine um 76 % höhere Zellablöserate (Abb. 16).

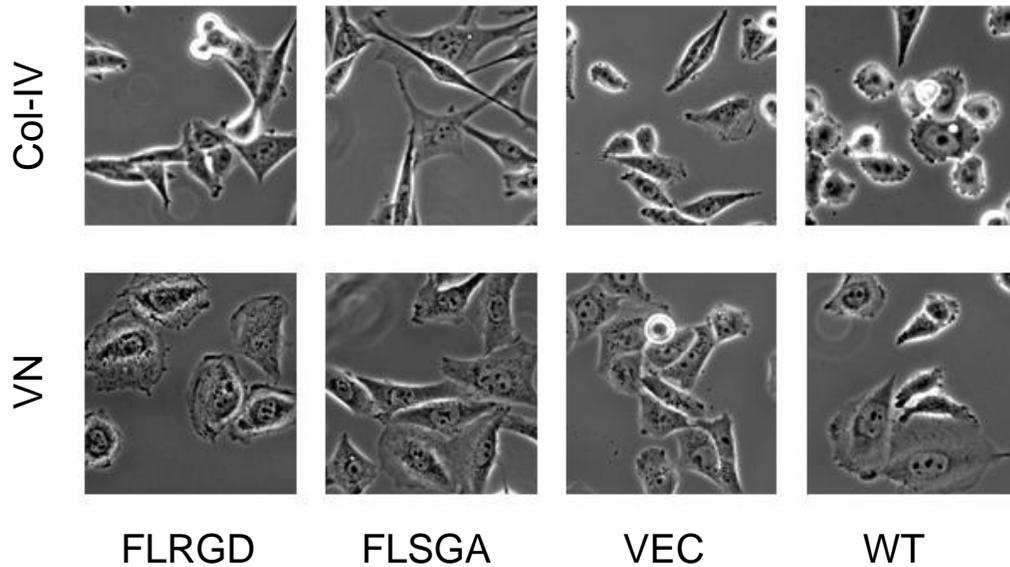
### **3.2 Charakterisierung der hADAM15-Expression in CHO-Zellen**

#### **3.2.1 Ergebnisse aus Zellmigrationsstudien mit CHO-Zellen**

Von der Existenz eines Hamster-ADAM15 ist auszugehen, da ADAM15 als ubiquitär exprimiert gilt und auch Ratte und Maus über ADAM15 verfügen. Analog zu den beschriebenen Nagetier-ADAM15-Formen muß allerdings angenommen werden, dass Hamster-ADAM15 über kein RGD-Motiv verfügt. Um einen möglichen hADAM15 Einfluß auf die Zellmotilität unabhängig von der OV-MZ-6-Zelllinie nachzuweisen, wurden die Migrationsexperimente wie beschrieben ebenfalls mit stabil hADAM15-transfizierten CHO-Zellen durchgeführt.

##### **3.2.1.1 Humanes ADAM15 hat keinen Einfluß auf die CHO-Zellmorphologie**

Die Expression von hADAM15 zeigte keinen Einfluß auf die Morphologie von CHO-Zellen. Allerdings wiesen alle CHO-Zellklone eine deutlich unterschiedliche Morphologie auf VN im Vergleich zu Col-IV auf: Auf VN zeigten CHO-Zellen einen adhärennten Phänotyp mit eher ausgebreiteter, runder Zellform und kleinen Filopodien. Im Gegensatz dazu wiesen CHO-Zellen auf Col-IV eine eher reduzierte Adhärenz auf: Eine runde bis spindelförmige Zellform mit ausgeprägten Filopodien war typisch hierfür. Die beschriebene Zellmorphologie zeigte sich in allen Transfektanten unabhängig vom jeweiligen transferten cDNA-Konstrukt (Abb. 17).



**Abb. 17. Die Zellmorphologie von CHO-Zellen variiert auf VN bzw. Col-IV**

CHO-Zellen zeigten nach 8 h Stunden auf VN eine flächig ausgebreitete, adhärenente Morphologie. Auf Col-IV waren CHO-Zellen rund bis spindelförmig und zeigen ausgeprägte Filopodien. Der Phänotyp war unabhängig von der hADAM15-Expression. Abgebildet sind repräsentative Bildausschnitte nach 8 h Adhäsion auf VN bzw. Col-IV.

### **3.2.1.2 Einfluß von hADAM15 auf die Motilität von CHO-Zellen auf Vitronektin**

Hinsichtlich der Motilität der verschiedenen ADAM15-transfizierten CHO-Zellen auf VN zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu VEC- und WT-Zellen. Interessanterweise steigerten alle verwendeten CHO-Zellen ihre Motilität auf Col-IV im Vergleich zu VN: In allen Fällen wurde die zurückgelegte Wegstrecke in 8 h auf Col-IV im Vergleich zu VN mehr als verdoppelt (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.1.3 Einfluß von hADAM15 auf die Zellteilung und Adhärenz von CHO-Zellen**

Analog zu den OV-MZ-6-Zellen wurde die Zellbewegung von CHO-Zellen auf entweder VN oder Col-IV beschichteten Zellkulturschälchen über 8 h im LSM aufgezeichnet. Dabei wurden ebenfalls Daten zur Zellteilung und dem Anteil abgelöster Zellen erfaßt. Die Proliferation der untersuchten CHO-Zellen wurde durch die Expression der verschiedenen hADAM15 cDNA-Konstrukte im Kruskal-Wallis

Test nicht signifikant beeinflusst. Auch die Beschichtung der Zellkulturschälchen mit entweder VN oder Col-IV veränderte die Zellteilungsrate nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Bezüglich der Rate an abgelösten Zellen, ließ sich für die CHO-Klone keine sichere Aussage treffen: Aufgrund der auf Col-IV im Gegensatz zu VN extrem veränderten Zellmorphologie der CHO-Zellen konnten die zuvor für OV-MZ-6-Zellen definierten Kriterien der Zelladhärenz nicht sicher angewendet werden. Anhand der Zellmorphologie muß allerdings von einer reduzierten Adhäsion im Sinne eines geringeren *spreadings* ausgegangen werden. Dies war für alle untersuchten Zellklone auf Col-IV der Fall. Ein Einfluß von hADAM15 auf die Adhärenz von CHO-Zellen war nicht zu beobachten.

Faßt man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen, dann ergibt sich für die humane OVCA-Zelllinie OV-MZ-6 folgendes Bild: OV-MZ-6-Zellen zeigten in Abhängigkeit von einer stabilen Überexpression des ADAM15-RGD-Proteins ein vermindertes *spreading* sowie eine im Vergleich zu VEC- und ADAM15-SGA-transfizierten Klonen signifikant verringerte Motilität auf VN. Interessant dabei ist, dass diese Effekte nicht nur nach Transfektion mit der zellgebundenen Form des ADAM15-Proteins, sondern auch bei Expression von dessen löslicher EC-Variante zu beobachten waren. Signifikante Veränderungen der Proliferation oder Zell/Zell-Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen konnten in Abhängigkeit von hADAM15 in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. CHO-Zellen zeigten weiterhin keinen signifikanten Effekt der hADAM15-Expression auf die untersuchten Zellfunktionen. Frühere Ergebnisse unserer AG identifizierten eine spezifisch durch das Integrin  $\alpha\beta3$ -vermittelte Bindung von OV-MZ-6-Zellen an VN. Weiterhin legen unsere Vorversuche eine Störung der Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung und damit eine Schwächung der Adhäsion durch hADAM15 in OV-MZ-6-Zellen nahe. Unsere Vorversuche geben damit einerseits Hinweise darauf, wie die vorliegenden Ergebnisse zu interpretieren sind, stehen andererseits jedoch zum Teil auch im Widerspruch mit Resultaten dieser Arbeit. Dies soll im weiteren diskutiert werden.

## IV. Diskussion

### 4.1 Integrin $\alpha\beta3$ und hADAM15 – neue Therapieoptionen für das Ovarialkarzinom?

Unter den Tumoren, die Frauen der westlichen Welt betreffen, besitzt das OVCA einen besonders ungünstigen Verlauf. Eine möglichst vollständige chirurgische Entfernung des Tumors ist einer der wichtigsten Prognosefaktoren. Da jedoch die peritoneale Ausbreitung des OVCA klassischerweise früh, die Diagnosestellung dagegen spät erfolgt, sind zum Operationszeitpunkt häufig bereits ungezählte Implantationsmetastasen im Bauchraum vorhanden und eine vollständige Resektion ist nicht mehr durchführbar. Auch die klassische Chemotherapie erzielt beim OVCA nur wenig zufriedenstellende Langzeitergebnisse. Dies verwundert nicht, da sich Cytostatika in erster Linie gegen stark proliferative Zellverbände richten, jedoch die komplexen zusätzlichen Zellfehlfunktionen, die die Ausbreitung des Tumors und damit maßgeblich dessen Malignität definieren, weitgehend unbeeinflusst lassen. Molekulare Grundlage der Ausbreitung von Tumorzellen - und damit Hauptursache für krebserkrankte Morbidität und Mortalität - sind substantielle Veränderungen des adhäsiven, motilen und proteolytisch-invasiven Profils der Zellen, welche diese im Laufe der Tumorprogression erfahren. Viele dieser Funktionen sind Integrin vermittelt, was sich in einem veränderten Expressionsmuster bestimmter Integrine in Tumorzellen im Vergleich zu benignen Zellen widerspiegelt. Innerhalb der Integrinfamilie zeichnet sich dabei vor allem das Integrin  $\alpha\beta3$  aus: Integrin  $\alpha\beta3$  ist nicht nur wesentlich in die für Tumorwachstum und Metastasierung kritische Neovaskularisierung involviert (Brooks et al., 1994b und 1995), sondern nimmt darüberhinaus progressionsfördernd Einfluß auf proliferative, adhäsive und motile Tumorzellcharakteristika (Albelda et al., 1990, Montgomery et al., 1994, Gasparini et al., 1998, Ria et al., 2002, Hapke et al., 2003). Von besonderer Bedeutung hierbei ist die RGD-abhängige Interaktion zwischen Integrin  $\alpha\beta3$  und seinem EZM-Liganden VN, welche beim OVCA schon für dessen frühe Ausbreitung entscheidend zu sein scheint (Hapke et al., 2003, Leroy-Dudal et al., 2005, Kenny et al., 2008, Heymann et al., 2008). Die Suche nach therapeutischen Substanzen, die diese für den Tumor so wichtige Schnittstelle am Integrin  $\alpha\beta3$  blockieren, stellt einen Schwerpunkt in der onkologischen Forschung dar: Lösliche, synthetische RGD-Peptide, AK gegen

Integrin  $\alpha\beta3$  oder die Disintegrine der SVMPs wurden als Therapeutika vorgeschlagen und viele zeigten eindrucksvolle Erfolge hinsichtlich Tumorwachstum und Metastasierung in Tiermodellen (Kessler et al., 1995, Beviglia et al., 1995, Yeh et al., 1998, Kang et al., 1999, Kang et al., 2000, Gutheil et al., 2000, Yeh et al., 2001, Thumshirn et al., 2003, Landen et al., 2008). Die hohen Erwartungen aus den präklinischen Untersuchungen konnten in klinischen Tests bisher jedoch nicht oder nur teilweise bestätigt werden (Gutheil et al., 2000, Patel et al., 2001, Chai und Chen, 2006, Reardon et al., 2008). Seit einigen Jahren ist neben den synthetisch-peptidischen  $\alpha\beta3$ -Liganden und xenogenen Integrinantagonisten auch eine Familie natürlich im menschlichen Organismus vorkommender Integrinliganden, die ADAMs, ins Interesse der Forscher gerückt (Primakoff et al., 1987, Blobel et al., 1990 und 1992, Wolfsberg et al., 1993). Aufgrund ihrer besonderen Domänenstruktur – dabei in erster Linie der Kombination von adhäsiver und proteolytischer Domäne - und ihrer weiten Verbreitung werden für ADAMs multiple Funktionen innerhalb von physiologischen und pathophysiologischen Abläufen postuliert. ADAMs scheinen dabei vielfach ins Tumorgeschehen involviert zu sein (Emi et al., 1993, Iba et al., 1999, Grutzmann et al., 2003, O’Shea et al., 2003, Tannapfel et al., 2003, Shintani et al., 2004, Tanaka et al., 2005, Mitsui et al., 2006, Ko et al., 2007). Für die Integrinbindung verfügen ADAMs - ähnlich den SVMPs – über kurze Peptid-Erkennungssequenzen innerhalb ihrer Disintegrin-Domäne. Humanes ADAM15 besitzt dabei als bisher einziger Vertreter seiner Proteinfamilie ein RGD-Motiv und ist somit theoretisch in der Lage RGD-abhängig mit dem tumorbiologisch relevanten Integrin  $\alpha\beta3$  zu interagieren (Krätzschmar et al., 1996). Diese Interaktion wurde *in vitro* mit Hilfe von rekombinanten hADAM15-Fragmenten sowie Fusionsproteinen bestätigt (Zhang et al., 1998, Nath et al., 1999, Iba et al., 1999), ist für die *in vivo* Situation bisher aber nicht belegt. Ebenso steht die Identifikation von *in vivo* Substraten für die hADAM15-Metalloprotease noch aus. *In vitro* spaltet hADAM15 Col-IV und Gelatine (Martin et al., 2002). Weiterhin fungiert es unter anderem als Sheddase des E-Cadherin (Najy et al., 2008b) und scheint in EGFR-Transaktivierungsprozesse eingebunden zu sein (Schäfer et al., 2004b, Hart et al., 2005). Die Auswahl der Substrate deutet ebenso wie die *in vitro* gezeigte Interaktion von hADAM15 mit dem Integrin  $\alpha\beta3$  auf eine Funktion von hADAM15 im Tumorgeschehen hin. Humanes ADAM15 könnte dabei sowohl als Agonist als auch Antagonist der Tumorprogression eine Rolle spielen: Von besonderer Bedeutung für diese mögliche Ambivalenz ist das Nebeneinander von

membrangebundenen und löslichen Formen des hADAM15-Proteins (Herren et al., 1997). Diese Varianten könnten sich ebenso wie bei anderen Integrinliganden gegenteilig verhalten: Ein lösliches Disintegrin wird beispielsweise Zell/Zell- und Zell/EZM-Protein-Bindungen eher schwächen, während ein zellgebundenes Disintegrin diese eher fördert (Rehn et al., 2001, Horiuchi et al., 2003, Trochon-Joseph et al., 2004). Auch die einzelnen Domänen könnten unterschiedliche Effekte auf den Tumor haben: Während die Metalloprotease Tumorwachstum und -ausbreitung über die Aktivierung von GFs und den Abbau von EZM begünstigen könnte, könnte die Disintegrin-Domäne für die anti-Tumor-Eigenschaften von hADAM15 verantwortlich sein: Durch das RGD-abhängige Unterbrechen der Integrin  $\alpha v \beta 3$ /EZM-Interaktion im Tumor könnte die hADAM15-Disintegrin-Domäne den Tumorzellen essentielle Proliferations-, Adhäsions- und Migrationssignale entziehen und so Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung inhibieren (Trochon-Joseph et al., 2004, Charrier-Hisamuddin et al., 2008). Zu diesem Zeitpunkt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich hADAM15 als Integrinligand gänzlich agonistisch innerhalb der Tumorprogression verhält. Daher bedarf es weiterer Forschung, um die Interaktion zwischen hADAM15 und dem Integrin  $\alpha v \beta 3$  genauer zu charakterisieren - im Hinblick auf neue Therapieperspektiven für das OVCA sowie weitere von Integrin  $\alpha v \beta 3$  abhängige Malignome.

#### **4.2 Die Integrin $\alpha v \beta 3$ /hADAM15-Interaktion – Überlegungen zum Studiendesign**

Die Interaktion von hADAM15 mit Integrin  $\alpha v \beta 3$  wurde *in vitro* mehrfach gezeigt: Zum Einsatz kamen dabei rekombinantes, lösliches hADAM15-Protein oder dessen Disintegrin-Domäne sowie hADAM15-Fragmente enthaltende Hybridmoleküle (Zhang et al., 1998, Nath et al., 1999, Iba et al., 1999, Eto et al., 2000 und 2002, Jeon et al., 2007): Zhang et al. (1998) exprimierten die rekombinante hADAM15 Disintegrin-Domäne als Glutathion-S-Transferase-Fusionprotein in Bakterien und zeigten darüber die spezifische Interaktion mit Integrin  $\alpha v \beta 3$ . Nath et al. (1999) führten Adhäsionsversuche mit hämatopoetischen Zellen durch. Dabei verwendeten sie ein immobilisiertes Chimärenprotein bestehend aus der EC-Domäne von hADAM15 fusioniert an die Fc-Region von humanem Ig. Hierüber wiesen sie die

spezifische Bindung von hADAM15 an Integrin  $\alpha\beta3$  auf der Monozyten-Zelllinie U937 nach.

Anhand dieser Studien können jedoch nur bedingt Aussagen über die Bindungseigenschaften von membrangebundenem hADAM15 gemacht werden: Es ist gut vorstellbar, dass sich die native Konformation des hADAM15-Proteins innerhalb der verwendeten rekombinanten Fragmente und Peptide nicht aufrechterhalten läßt (Lum et al., 1998, Nath et al., 1999, Eto et al., 2000). Auch die zum Teil widersprüchlichen Bindungsprofile in den einzelnen Studien nähren Zweifel an der Übertragbarkeit der so gewonnenen Ergebnisse auf die *in vivo* Situation (Zhang et al., 1998, Jeon et al., 2007). Daher muß das bisher *in vitro* erstellte hADAM15/Integrin-Interaktionsprofil unter möglichst physiologischen Bedingungen überprüft werden.

Ziel dieser Arbeit war daher, die spezifische Interaktion von hADAM15 mit Integrin  $\alpha\beta3$  sowie deren Einfluß auf adhäsive und migratorische Zellfunktionen innerhalb eines Systems zu untersuchen, in dem natürlicherweise beide potentiellen Partner exprimiert werden. Nur so kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer korrekten Proteinfaltung und einer der physiologischen Situation entsprechenden Stabilität, Lokalisation und Interaktion ausgegangen werden.

Sowohl Integrin  $\alpha\beta3$  als auch ADAM15 werden in der humanen OVCA-Zelllinie OV-MZ-6 exprimiert. Weiterhin konnte in Vorarbeiten der AG Reuning gezeigt werden, dass OV-MZ-6-Zellen ihre Adhäsion an VN vornehmlich über das Integrin  $\alpha\beta3$  organisieren, was zu einer starken Zell/EZM-Protein-Bindung und einer signifikanten Steigerung von Proliferation und Migration dieser Zellen führt (Hapke et al., 2003). Die OV-MZ-6-Zelllinie weist somit wesentliche Charakteristika auf, um ausgehend davon den Einfluß von hADAM15 auf die Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung und davon abhängige motile und adhäsive Zelleigenschaften untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurden in Vorarbeiten unserer AG stabil hADAM15-überexprimierende Transfektanten der Zelllinie OV-MZ-6 generiert. Um auch den Einfluß möglicher löslicher hADAM15-Varianten (Herren et al., 1997) evaluieren zu können - diese entstehen durch die Freisetzung der Ektodomäne -, wurden neben OVCA-Zellen, die das vollständige hADAM15-Protein exprimieren auch Transfektionskonstrukte verwendet, die zur Expression eines hADAM15-Moleküls ohne transmembrane und cytoplasmatische Domäne führen. Die RGD-Abhängigkeit sollte mittels einer für FL- und EC-Klone generierten SGA-Mutante überprüft werden,

in denen das Integrin-bindende RGD-Motiv durch das Tripeptid SGA ersetzt wurde (Beck et al., 2005).

Der Nachweis der stabilen Transfektion der OV-MZ-6-Zellen mit hADAM15 cDNA und die Expression des entsprechenden Genprodukts war in Vorarbeiten der AG Reuning bereits auf der mRNA- und Protein-Ebene mittels RT-PCR bzw. Immunocytochemie erfolgt (Beck et al., 2005). Ziel dieser Arbeit war der zusätzliche Nachweis von hADAM15-Protein in den Transfektanten mittels Westernblot-Analyse. Dabei wurde ein polyklonaler AK (pAK) gegen die cytoplasmatische Domäne von hADAM15 verwendet und die densitometrisch erfassten Signalstärken für Aktin normalisiert. Es zeigte sich eine spezifische Bande bei ca. 100 kDa, die in den FLRGD- und FLSGA-Klonen bis zu vierfach stärker war im Vergleich zu VEC-transfizierten Zellen. Die Identifikation der reinen EC-Domäne von hADAM15 in der Westernblot-Analyse gelang nicht. Dies war bei erfolgreichem Nachweis des FL-Proteins für die lösliche Variante von ADAM28 ebenfalls nicht möglich (Roberts et al., 1999). Denkbare Ursachen sind eine zu geringe Konzentration oder Stabilität des in den Zellkulturüberstand sezernierten Proteins.

#### **4.2.1 Einfluß der hADAM15-Expression auf die Zell/Zell-Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen**

Humanes ADAM15 interagiert in nicht-zellgebundener Form spezifisch mit Integrin  $\alpha v \beta 3$  (Zhang et al., 1998, Nath et al., 1999). In dieser Arbeit sollte eine mögliche Bindung dieser beiden Proteine innerhalb des OV-MZ-6-Zellsystems überprüft werden. Weiterhin stellte sich die Frage, ob aus der potentiellen hADAM15/Integrin  $\alpha v \beta 3$ -Interaktion auf benachbarten Zellen eine verstärkte Zell/Zell-Adhäsion resultiert. In unseren im Kapitel „Zell/Zell-Adhäsionsexperimente“ beschriebenen Zell/Zell-Adhäsionstests, fand sich trotz Variation zahlreicher Versuchsparameter keine von der hADAM15-Expression abhängige Veränderung der Zell/Zell-Adhäsion bei OV-MZ-6-Zellen. Dies war bei Herren et al. (2001) für mesenchymale NIH3T3-Zellen der Fall: Diese zeigten eine Zunahme von Zell/Zell-Kontakten als Folge der hADAM15-Überexpression. Eine Kolokalisierung von VE-Cadherin und hADAM15 in Zellkontaktstellen wurde zudem von Ham und Kollegen (2002) beschrieben. Es ist jedoch bisher unklar, mit welchem Protein hADAM15 dabei wechselwirkt.

Zellspezifische Besonderheiten könnten für diese unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der hADAM15-abhängigen Zell/Zell-Adhäsion verantwortlich sein.

Integrine können sich in einem sogenannten „*high affinity*“- oder „*low affinity*“-Zustand bezüglich der Bindung bestimmter Liganden befinden. Die jeweilige aktive oder inaktive Form wird durch Konformationsänderungen sowie die Bindung zweiwertiger Kationen erreicht. In der Literatur wurden Integrin-Aktivierungszustände auch für die Interaktion mit bestimmten ADAM-Proteinen beschrieben. Integrin  $\alpha\beta3$  wird durch zweiwertige Calcium-, Magnesium- und Manganionen aktiviert (Chen et al., 1999, Eto et al., 2000, Xiong et al., 2001). Der Zusatz von Calciumionen veränderte in dieser Arbeit die Zell/Zell-Adhäsion nicht. Eine mangelnde Integrin  $\alpha\beta3$ -Aktivierung ist somit unwahrscheinlich.

Immunhistochemische Doppelmarkierungen von hADAM15 einerseits und Integrin  $\alpha\beta3$  andererseits zeigten in Vorarbeiten der AG Reuning eine ähnliche Verteilung der beiden Proteine auf der Zelloberfläche von OV-MZ-6-Zellen (Beck et al., 2005). Dies deutet auf eine mögliche Interaktion der potentiellen Partner auf der Tumorzelloberfläche hin. Eine vorrangige Wechselwirkung von hADAM15 mit Integrin  $\alpha\beta3$  auf derselben Zelle würde erklären, warum im vorliegenden Versuch keine von hADAM15 abhängige erhöhte Zell/Zell-Adhäsion gefunden wurde. Desweiteren könnten zwar vermehrt Zell/Zell-Kontakte zwischen hADAM-15- und Integrin  $\alpha\beta3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen bestehen, diese könnten jedoch in erster Linie Bedeutung bei z. B. Signaltransduktionsvorgängen besitzen, ohne dabei Einfluß auf die Stärke der Zell/Zell-Adhäsion zu nehmen. In dieser Form wäre eine vermehrte Zell/Zell-Interaktion in unseren Tests nicht nachweisbar.

Die Inkubationszeit von 15 min bei den von uns durchgeführten Zell/Zell-Adhäsionstests war vergleichbar mit Bedingungen anderer Studien zur von hADAM15-Expression-abhängiger Zell/Zell-Adhäsion: In der Literatur finden sich hierzu Inkubationszeiten von 15 min für die NIH3T3-Zell/Zell-Bindung (Herren et al., 2001) bis hin zu 90 min für die ADAM15/Integrin  $\alpha\beta1$ -abhängige Zell/Zell-Adhäsion (Eto et al., 2000). Außerdem erbrachten längere Inkubationszeiten in dieser Arbeit keine Veränderung des Ergebnisses. Vielmehr lag der Prozentsatz adhätierender Zellen regelmäßig nach 15 min schon über 80 %, so dass unspezifische Bindungen eine Rolle spielen könnten. Der in anderen Studien beschriebene Einsatz von BSA zur Blockierung unspezifischer Bindungen (Zhang et al., 1998, Nath et al., 1999, Eto et al., 2000), zeigte hier jedoch keine Veränderung des Zell/Zell-

Adhäsionsverhaltens. Insofern muß in Erwägung gezogen werden, dass bereits endogen vorhandenes hADAM15 bzw. Integrin  $\alpha\beta3$  für starke Zell/Zell-Interaktionen sorgen, so dass ein eventuell vorhandener Zuwachs dieser Wechselwirkungen trotz der 4-fachen Überexpression im Test nicht erfaßt wurde. Kenny und Kollegen (2007) studierten die Adhäsion von OVCA-Zellen in einer 3D-Omentum-Kultur. Dabei stellten sie eine signifikant erhöhte Adhäsion der malignen Zellen im Vergleich zu benignen Ovarialzellen innerhalb der ersten 8 Stunden fest. Insofern wäre es interessant, in den von uns durchgeführten Adhäsionstests anstelle der OVCA-Zellen z. B. transfizierte OSE-Zellen einzusetzen. Aufgrund eines geringeren initialen Adhäsionsvermögens wäre damit vielleicht eher ein Unterschied zwischen den einzelnen Zellklonen feststellbar. Aufschlußreich könnte auch der Einsatz von zwei verschiedenen, *in vivo* interagierenden Zelltypen – wie Tumorzelle und Mesothelzelle – sein, da Adhäsionsprofile mitunter zellspezifische Unterschiede bezüglich einer bevorzugten Bindung an Zellen des eigenen Zelltyps oder Vertreter eines weiteren Zelltyps zeigen (Charrier et al., 2007).

#### **4.2.2 Einfluß von hADAM15 auf die Migration humaner Ovarialkarzinomzellen**

Die Zellmotilität ist entscheidend für die Invasion von Tumorzellen. Sie ist wesentlich vom Ausmaß der Zell/EZM-Adhäsion abhängig und wird zum größten Teil Integrin-abhängig reguliert. In Vorarbeiten unserer AG wurde gezeigt, dass Integrin  $\alpha\beta3$  in OV-MZ-6-Zellen wesentlich für deren Adhäsion und Migration auf VN verantwortlich ist (Hapke et al., 2003). Da ADAM15 über sein RGD-Motiv durch Bindung von Integrin  $\alpha\beta3$  auf benachbarten Zellen oder derselben Zelle Interaktionen zwischen VN und Integrin  $\alpha\beta3$  potentiell schwächen kann, wurde der Einfluß von ADAM15 auf die Integrin  $\alpha\beta3$ -abhängige Zellmotilität in hADAM15-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen mittels *time-lapse*-Videomikroskopie untersucht.

In dieser Arbeit wurde eine signifikant reduzierte Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf VN als Folge der hADAM15-Überexpression beobachtet. Dabei zeigten nur RGD-transfizierte EC- und FL-Klone eine verminderte Motilität, was auf eine RGD-Abhängigkeit dieses hADAM15-Effekts schließen läßt. Es ist daher naheliegend eine RGD-abhängige hADAM15/Integrin  $\alpha\beta3$ -Interaktion als Ursache der reduzierten

Migration anzunehmen: Grundlage von Zellmotilität ist ein Wechsel von Adhäsion an und Ablösung von der umgebenden Matrix. Da VN und hADAM15 mit ihren RGD-Motiven theoretisch um die Bindung an Integrin  $\alpha\beta3$  konkurrieren, ist von einer Schwächung der Zell/EZM-Bindungen durch die hADAM15-Überexpression auszugehen. Dies kann sowohl zu einer erhöhten als auch zu einer verminderten Zellmotilität führen. In der vorliegenden Arbeit resultierte die Überexpression von hADAM15 in einer verminderten Migrationsfähigkeit der OV-MZ-6-Zellen. Es kann daher also eine Schwächung der Zell/EZM-Bindungen bis zu einem Punkt angenommen werden, der zu langsamerer Zellbewegung führt. In humanen OVCA-Zellen, die nur die EC-Domäne des ADAM15-RGD-Proteins exprimierten, wurde eine Reduktion der Zellmigration auf VN in gleichem Maße wie für die ADAM15-FLRGD-transfizierten Zellklone beobachtet. Die EC-Domäne von hADAM15 könnte dabei mit der Zelloberfläche assoziiert bleiben und so auf der ursprünglichen Zelle antagonistisch wirken. Dies wäre in Einklang mit Beobachtungen von Herren et al. (1997). Auf der anderen Seite könnte die EC-Untereinheit des hADAM15-Proteins auch als löslicher Antagonist der Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung fungieren. Diese Hypothese unterstützen Versuchsergebnisse von Trochon-Joseph und Kollegen (2004), die eine verminderte Migration humaner Endothelzellen in Abhängigkeit von der Zugabe der löslichen Disintegrin-Domäne von hADAM15 feststellten.

Unsere Ergebnisse sind weiterhin in Einklang mit der von Herren et al. für NIH3T3-Zellen auf FN beschriebenen Motilitätsreduzierung bei hADAM15-Überexpression. Die Autoren machen allerdings die Verstärkung von Zell/Zell-Kontakten unter den NIH3T3-Zellen für die Migrationsinhibierung verantwortlich (Herren et al., 2001, Ham et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem einzelne Zellen beobachtet, so dass Zell/Zell-Wechselwirkungen als Ursache einer verminderten Motilität unwahrscheinlich sind. Humanes ADAM15 interagiert RGD-abhängig auch mit Integrin  $\alpha5\beta1$ , dem Haupt-FN-Rezeptor (Ruoslahti und Pierschbacher, 1986, van der Flier und Sonnenberg, 2001, Chen et al., 2008). Daher kommt auch die RGD-abhängige Verdrängung von FN aus der Integrin  $\alpha5\beta1$ -Bindung durch die hADAM15-Überexpression als Ursache der verminderten Zellmotilität bei Herren und Kollegen (2001) in Frage. Neben FN beschichteten Zellkulturgefäßen verwendeten Herren et al. (2001) unbeschichtete Zellkulturbehälter, um die Motilität von NIH3T3-Zellen zu studieren. Sie fanden dabei ebenso wie Charrier et al. (2005) in humanen intestinalen Epithelzellen eine reduzierte Zellmotilität in Abhängigkeit von

der hADAM15-Überexpression. Hierbei könnte hADAM15 neben einer erhöhten Zell/Zell-Interaktion zu einer verminderten Integrin/Serumprotein-Interaktion mit nachfolgend reduzierter Zellbewegung geführt haben, was im Einklang mit unseren Daten wäre. Diese werden weiterhin durch Ergebnisse von Trochon-Joseph et al. (2004) gestützt: Hier bewirkte die lösliche Disintegrin-Domäne von hADAM15 eine verminderte Migration von humanen Endothelzellen, deren Adhäsion an VN ebenfalls reduziert wurde. Diesen Beobachtungen zugrundeliegen könnte wiederum das Verdrängen des VN durch das hADAM15-Disintegrin aus der RGD-abhängigen Bindung an zelluläre Integrine. In ASMC (*airway smooth muscle cells*) inhibiert das hADAM15-Disintegrin RGD- und Integrin  $\beta 1$ -abhängig die PDGF (von Thrombozyten sezernierter GF)-induzierte Migration der Zellen durch Kollagenbeschichtete permeable Membranen (Lu et al., 2007). Auch diese Daten unterstützen unsere Hypothese einer RGD-abhängigen Verdrängung von EZM-Proteinen aus der Integrinbindung durch hADAM15. Die Rekrutierung verschiedener EZM-Protein/Integrinrezeptor-Systeme wie in diesem Fall wohl dem Integrin  $\alpha 2\beta 1$  oder  $\alpha 1\beta 1$  als Kollagenrezeptor spricht für spezifische Integrin- bzw. hADAM15-Funktionen je nach Zelltyp. Zellspezifische Funktionen können auch die Ergebnisse von Martin et al. (2002) sowie Najy und Kollegen (2008a) erklären: Hier resultierte die hADAM15-Expression – im Gegensatz zu allen anderen vorgestellten Daten und auch den Ergebnissen dieser Arbeit - in einer verstärkten Motilität der humanen Mesangium- bzw. Prostatakarzinomzellen. Bei Martin et al. wirkten AK sowohl gegen die Disintegrin- als auch gegen die Metalloproteinase-Domäne inhibitorisch. Die Autoren gehen von einer die Migration fördernden Degradation von Serumproteinen bzw. Zell/Zell-Adhäsionsmolekülen durch die putative hADAM15-Metalloproteinase aus. Dieser Erklärungsansatz ist trotz der konträren Ergebnisse auch für die Beobachtungen in unserer Arbeit interessant: Je nach Ausmaß des Abbaus von zellulären, Serum- oder EZM-Proteinen und je nach Ausgangssituation kann die Metalloproteinase von hADAM15 theoretisch inhibierend oder fördernd auf die Zellmotilität Einfluß nehmen: Sehr viele EZM-Protein/Zell- bzw. Zell/Zell-Kontakte erschweren die Zellmotilität. Daher kann die Metalloproteinase durch die Spaltung dieser Bindungen Migration begünstigen. Auf der anderen Seite benötigt die Zelle Adhäsionsstellen im umgebenden Raum als Grundlage ihrer Fortbewegung (Abb. 2). Werden diese Proteine durch die Metalloproteinase abgebaut, kann sie der Zelle damit die Motilität erschweren. Insofern ist theoretisch ein Einfluß der Metalloproteinase auf

die hADAM15-abhängige Inhibierung der Migration von OV-MZ-6-Zellen in dieser Arbeit vorstellbar. Jedoch würde das nicht die RGD-Abhängigkeit unserer Beobachtungen erklären und ist damit als Ursache eher unwahrscheinlich.

Aktuelle Studien legen eine Beteiligung von sowohl hADAM15 als auch Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  bei EGFR-Aktivierungsprozessen nahe. Da der EGFR gerade auf die Migration von Tumorzellen Einfluß nimmt, muß auch dieser Signalweg als Ursache für hADAM15-abhängige Motilitätsveränderungen in Betracht gezogen werden (Schäfer et al., 2004b, Hart et al, 2005, Lössner et al., 2008). Weiterhin nimmt neben der Disintegrin-Domäne die cytoplasmatische Domäne Einfluß auf Ligandenbindung und Migration. Daher könnten den unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des Effektes von hADAM15 auf die Zellmigration in den diskutierten Studien neben zelltypspezifischen Funktionen und *splice*-Varianten auch unterschiedliche Aktivierungszustände des hADAM15-Proteins sowie übergeordnete Zellsteuerungsmechanismen zugrunde liegen (Kleino et al, 2007, Zhong et al., 2008, Najy et al., 2008a).

#### **4.2.3 Einfluß von hADAM15 auf die Morphologie humaner Ovarialkarzinomzellen**

OV-MZ-6-Zellen, die mit der cDNA für das ADAM15-FLRGD-Protein oder aber dessen EC-Variante transfiziert worden waren, zeigten auf VN einen weniger ausgebreiteten Phänotyp sowie eine reduzierte Filopodienbildung. Grundlage dieser Beobachtung ist wahrscheinlich die Verdrängung des VN aus der RGD-abhängigen Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Bindung durch das RGD-Motiv des hADAM15-Proteins.

#### **4.2.4 Einfluß der hADAM15-Expression auf die Zell/EZM-Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen in der *time-lapse*-Videomikroskopie**

Die Veränderung adhäsiver Charakteristika ist essentiell für die Ausbreitung von Tumorzellen. Sie wird wesentlich über Integrin/EZM-Protein-Bindungen gesteuert. Dabei ist das Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  in OV-MZ-6-Zellen hauptsächlich für deren Adhäsion an VN verantwortlich, wie in Vorarbeiten unserer AG gezeigt wurde (Hapke et al.,

2003). Über eine RGD-abhängige Bindung von hADAM15 an das Integrin  $\alpha\beta3$  und damit der Verdrängung des Liganden VN aus dieser Position, ist eine Veränderung adhäsiver Zellcharakteristika vorstellbar. Tatsächlich konnten wir in vorangehenden Studien für OV-MZ-6-Zellen eine Reduktion der Adhäsion auf VN in Abhängigkeit von der ADAM15-RGD-Expression feststellen. Die beschriebenen Experimente waren als *endpoint*-Bestimmungen mittels Zellzählung nach einer Inkubationszeit von 60-90 min erfolgt (Beck et al., 2005). Die Migrationsexperimente für die vorliegende Arbeit gaben uns nun Gelegenheit auch die Zell/EZM-Protein-Adhäsion in Echtzeit über einen Zeitraum von 8 h zu beobachten. Dabei zeigten OV-MZ-6-Zellen, die mit dem FLRGD-hADAM15-Protein transfiziert wurden, nach 50 min Inkubation auf VN eine im Vergleich zu Col-IV gleich starke bis verringerte Adhäsion. Dagegen wiesen OV-MZ-6 VEC- und FLSGA-Zellen eine deutlich erhöhte Adhäsion an VN im Vergleich zu Col-IV auf. Der Anteil sich ablösender Zellen an der Gesamtzellzahl war zwischen FLRGD- und VEC- bzw. FLSGA-Klonen jedoch nicht verschieden.

Vorstellbar ist, dass hADAM15 über sein RGD-Motiv die Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Interaktion soweit behindert, dass die Migration der hADAM15-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen auf VN signifikant verlangsamt wird, doch die Zell/EZM-Interaktionen noch ausreichen, um den Anteil sich ablösender Zellen stabil zu halten. Auch Herren et al. (2001) fanden bei reduzierter Migration von NIH3T3-Zellen infolge hADAM15-Überexpression keine veränderte Adhäsion auf VN, FN und Col-IV. Dagegen berichten Najy et al. (2008a) über eine Abnahme der Adhäsion von Prostatakarzinomzellen an VN, wenn in diesen die hADAM15-Expression über RNA-Interferenz reduziert wurde. Die Adhäsion an Col-IV war unverändert.

In den eingangs beschriebenen *endpoint*-Bestimmungen zur Zell/EZM-Adhäsion unserer AG hatten hADAM15-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen eine RGD-abhängige Reduzierung ihrer Adhäsion auf VN im Vergleich zu VEC- oder SGA-transfizierten Zellen gezeigt. Die Adhäsion auf Col-IV unterschied sich nicht (Beck et al., 2005). Es muß davon ausgegangen werden, dass Veränderungen in der Zell/EZM-Adhäsion auch in der vorliegenden Arbeit vorhanden waren, jedoch aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht erfaßt wurden. Dies würde übereinstimmen mit Beobachtungen von Trochon-Joseph et al. (2004), wonach die Disintegrin-Domäne von hADAM15 inhibitorische Wirkung gegenüber der Endothelzelladhäsion auf VN zeigt. Unterstützung findet diese These auch in der Studie von Jeon et al. (2007),

welche eine Blockierung der Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Bindung durch lösliches hADAM15-Disintegrin beschreiben.

Wie bereits für die Migrationsexperimente diskutiert, könnten Veränderungen adhäsiver Zellcharakteristika neben rein mechanischen Interaktionen auf der Zelloberfläche jedoch auch auf Regulierungsprozessen im Zellinneren beruhen. Die unterschiedlichen Aktivierungszustände der beteiligten Proteine könnten so die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Experimente erklären (Xiong et al., 2001, Kleino et al., 2007, Zhong et al., 2008).

#### **4.2.5 Einfluß der hADAM15-Expression auf die Proliferation von OV-MZ-6-Zellen**

In Vorarbeiten der AG Reuning konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von OV-MZ-6-Zellen adhäsionsabhängig ist und durch die Integrin  $\alpha\beta3$ /VN-Interaktion induziert wird (Hapke et al., 2003). Im Verlauf von 4 Tagen wiesen hADAM15-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen eine RGD-abhängige verminderte Proliferation auf VN im Vergleich zu WT, VEC- oder SGA-transfizierten Zellen auf. Dafür schien in erster Linie die Adhäsionsminderung verantwortlich zu sein, eine Veränderung der DNA-Syntheserate wurde mittels Thymidin-Inkorporationstest ausgeschlossen (Beck et al., 2005). Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, im Rahmen der Migrationsstudien auch die Zellteilung der OV-MZ-6-Zellen mittels *time-lapse*-Videomikroskopie in Echtzeit zu untersuchen. Wir beobachteten dabei eine Proliferationsrate von 10-25 % der Gesamtzellzahl innerhalb von 8 h. Es zeigte sich kein Unterschied für RGD-Klone im Vergleich mit VEC- oder SGA-Klonen. Auch die Inkubation der Zellen auf VN- oder Col-IV-beschichteten Schälchen erbrachte ähnliche Ergebnisse. Dies ist in Einklang mit den bereits erwähnten früheren Ergebnissen unserer AG, bei der eine verminderte Proliferation von ADAM15-RGD-transfizierten OV-MZ-6-Zellen erst nach Ablauf von 4 Tagen nachgewiesen werden konnte (Beck et al., 2005).

Trochon-Joseph et al. (2004) führten Proliferationsstudien für Endothelzellen in Abwesenheit eines EZM-Proteins über 30 h durch. Dabei stellten sie mittels Thymidin-Inkorporationstest eine reduzierte Proliferation fest, wenn sie die Zellen mit der löslichen Disintegrin-Domäne von hADAM15 behandelten. Die Reduzierung der

proliferativen Zelleigenschaften war dabei direkt mit der Konzentration des zugegebenen Disintegrins assoziiert. Einen ähnlichen Versuchsaufbau wählten Lendeckel et al. (2005): Sie inkubierten humane Mammakarzinomzellen über 78 h. Im Thymidin-Inkorporationstest fanden sie eine signifikant reduzierte Proliferation, wenn sie dem Medium AK gegen ADAM15 zusetzten, was übereinstimmt mit Ergebnissen zu Magenkarzinomzellen (Carl-McGrath et al., 2005). Diese Daten deuten zusammenfassend auf einen Effekt von hADAM15 innerhalb der Zellproliferation, welcher erst nach längerer Inkubationszeit beobachtet werden kann. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Widersprüchliche Resultate der zitierten Studien im Hinblick auf Vorarbeiten unserer AG könnten mit einer unterschiedlichen Wirkung von löslichem und membrangebundenem hADAM15 sowie zelltypspezifischen Effekten zusammenhängen.

#### **4.2.6 Einfluß der hADAM15-Expression in CHO-Zellen**

Die Effekte von hADAM15 wurden in der vorliegenden Arbeit parallel zu den OV-MZ-6-Zellen in einem weiteren Zellkulturmodell überprüft. Dafür wählten wir die benigne Hamster-Ovarialzelllinie, CHO. Bislang wurde für den Hamster kein ADAM15-Protein beschrieben, von seiner Existenz ist analog zu Maus und Ratte jedoch auszugehen. Allerdings besitzt das ADAM15-Protein in diesen Spezies im Gegensatz zur humanen Form kein RGD-Motiv innerhalb der Disintegrin-Domäne. Stattdessen wurde hier eine TDD-Sequenz identifiziert (Lum et al., 1998, Bosse et al., 2000). Die Transfektion von CHO-Zellen erfolgte analog zu den OV-MZ-6-Zellen mit den hADAM15-FL- bzw. EC-Varianten sowie RGD- bzw. SGA-Konstrukten. Unsere Experimente erbrachten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Motilität, Proliferation oder Adhäsion auf VN oder Col-IV in Abhängigkeit von der hADAM15-Expression. Es stellt sich die Frage, ob hADAM15 überhaupt in der Lage ist, Einfluß auf CHO-Integrine zu nehmen. Dafür spricht, dass Mäuse mit murinen Tumoren in ihrem Krankheitsverlauf günstig durch hADAM15 beeinflusst werden können (Trochon-Joseph et al., 2004). Auch Vorarbeiten unserer AG zeigten für CHO-Zellen eine den OV-MZ-6-Zellen ähnliche Inhibierung der Adhäsion auf VN in Abhängigkeit von der hADAM15-Expression (Beck et al., 2005). Diese könnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht erfaßt worden sein.

Weiterhin könnten - vorausgesetzt das Hamster-ADAM15 über das TDD - anstelle des RGD-Motivs verfügt, RGD-unabhängige Interaktionen im Vordergrund stehen. Eine weitere Ursache für die Unterschiede zwischen hADAM15-transfizierten OV-MZ-6- und CHO-Zellen könnte die zelltypspezifische Verwendung bestimmter Integrinrezeptoren für definierte Zellfunktionen sein: Für CHO-Zellfunktionen scheint der Integrinrezeptor  $\alpha 5\beta 1$  und sein Ligand FN große Bedeutung zu besitzen. Der Einfluß von hADAM15 auf die Integrin  $\alpha 5\beta 1$ /FN-Interaktion wurde erst kürzlich charakterisiert: Die Überexpression von hADAM15 in CHO-Zellen führte dabei zu einer RGD-abhängigen Steigerung der Adhäsion sowie zu einem Rückgang der Migration auf FN, die Proliferation der CHO-Zellen wurde nicht beeinflusst (Chen et al., 2008).

#### **4.3 Zusammenfassung und Ausblick**

Die Mehrzahl solider Tumoren zeigt im fortgeschrittenen Stadium eine lokale und systemische Aussaat von Tumorzellen. Der Ausbruch aus dem Primärtumor ist dabei ein aktiver Vorgang, der auf den adhäsiven, migratorischen und proteolytisch-invasiven Fähigkeiten der neoplastischen Zellen beruht. So weisen ca. 70 % der Patientinnen mit OVCA bei Diagnosestellung bereits peritoneale Implantationsmetastasen auf. Die Metastasierung ist die Hauptursache krebsbedingter Morbidität und Mortalität gerade auch beim OVCA. Insofern ist der Ansatz konventioneller Tumorthherapie mit einer Fokussierung auf die gesteigerte Proliferation neoplastischer Zellen in seinen Erfolgsaussichten fragwürdig. Dies wird untermauert durch die nahezu unverändert schlechte Prognose von Patientinnen mit OVCA über die letzten Jahrzehnte. Aus diesem Grund sollte Tumorentstehung und -progression als komplexe Störung der Zellphysiologie begriffen werden, wobei dysfunktionale Integrinsysteme eine zentrale Rolle einnehmen (Tan et al., 2006, Ramsay et al., 2007). Integrin  $\alpha v\beta 3$  hat sich dabei als entscheidender Mediator der Neovaskularisation und Progression verschiedenster Malignome herauskristallisiert. Auch die adhäsiven, proliferativen, migratorischen und proteolytischen Eigenschaften von OVCA-Zellen werden wesentlich durch die Integrin  $\alpha v\beta 3$ -Expression definiert (Hapke et al., 2001 und 2003, Kenny et al., 2008). Integrin  $\alpha v\beta 3$  könnte somit eine Zielstruktur darstellen, um korrigierend Einfluß auf Fehlfunktionen innerhalb der

Tumorzellen zu nehmen und damit deren fatale unkontrollierte Ausbreitung einzugrenzen. Wesentlich für von Integrin  $\alpha\beta3$ -abhängige Zelleigenschaften ist dessen RGD-abhängige Interaktion mit Liganden wie VN. Aus diesem Grund wurden verschiedene Integrin  $\alpha\beta3$ -Antagonisten entwickelt, mit dem Ziel tumorfördernde Signale an genau dieser Schnittstelle zu unterbrechen. Tatsächlich erbrachten die verwendeten AK, künstliche RGD-Peptide oder aus Schlangengift isolierte Disintegrine eindrucksvolle Ergebnisse hinsichtlich Neoangiogenese-Hemmung und Tumorregression in Tiermodellen, was Forscher und Ärzte auf einen Durchbruch in der Behandlung unterschiedlicher Krebserkrankungen hoffen ließ. Die Erwartungen wurden in klinischen Versuchen mit den Integrin  $\alpha\beta3$ -Antagonisten bisher jedoch nicht oder nur teilweise erfüllt (Brooks et al., 1994b und 1995, Gutheil et al., 2000, Patel et al., 2001, Cai und Chen, 2006, Landen et al., 2008). Die Suche nach potentiellen Integrin  $\alpha\beta3$ -Antagonisten geht daher weiter und ein Kandidat dabei ist hADAM15: Humanes ADAM15 verfügt über das zentrale RGD-Motiv für die Bindung an das Integrin  $\alpha\beta3$ . Weiterhin scheint hADAM15 ebenso wie Integrin  $\alpha\beta3$  in das komplexe Regulierungssystem von Zelleigenschaften wie Migration (Herren et al., 2001, Martin et al., 2002, Charrier et al., 2005, Lu et al., 2007, Charrier et al., 2007, Chen et al., 2008, Zhong et al., 2008, Najy et al., 2008a), Adhäsion (Beck et al., 2005, Charrier et al., 2007, Jeon et al., 2007, Najy et al., 2008a, Zhong et al., 2008, Chen et al., 2008), Proliferation (Trochon-Joseph et al., 2004, Carl-McGrath et al., 2005, Lendeckel et al., 2005), Neovaskularisation und Tumorwachstum (Horiuchi et al., 2003, Trochon-Joseph et al., 2004, Komiya et al., 2005, Xie et al., 2008) eingebunden zu sein. Erste Ergebnisse zur Rolle von hADAM15 im Krebsgeschehen lassen eine zumindest partiell antagonistische Funktion gegenüber Integrin  $\alpha\beta3$  vermuten: Trochon-Joseph et al. (2004) konnten Tumorwachstum und -angiogenese von humanen Mammakarzinomzellen in einem Mausmodell günstig beeinflussen, wenn sie die Tiere mit der genetischen Information für die hADAM15-Disintegrin-Domäne versorgten. Ebenso zeigten Mäuse signifikant weniger Lungenmetastasen, wenn die in die Schwanzvene applizierten murinen Melanomzellen zuvor mit hADAM15 transfiziert worden waren (Chen et al., 2008). Die genauen Mechanismen sind dabei jedoch oft unklar und die Ergebnisse verschiedener Arbeiten zum Teil widersprüchlich. Vieles deutet auf eine zelltypspezifische Funktion von hADAM15 und auch die Wirkung löslicher Domänen scheint sich von der des zellgebundenen Gesamtproteins zu unterscheiden (vgl. Kapitel „ADAM15, Neovaskularisation und

Tumorprogression“). Weitere intensive Forschung ist daher nötig, um die Wirkungsweise von hADAM15 in bestimmten Zellen, Organen und Tumoren näher zu charakterisieren und die komplexen Regelwerke innerhalb der Tumorprogression besser zu verstehen. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die gesteigerte Expression von hADAM15 zu einer signifikanten Reduzierung der Zellmotilität bei humanen OVCA-Zellen führt. Die inhibitorische Wirkung von hADAM15 scheint dabei auf der RGD-abhängigen Verdrängung des EZM-Liganden VN aus der Integrin  $\alpha\beta3$ -Bindung zu basieren und war für die zellgebundene hADAM15-Form ebenso nachzuweisen wie für dessen lösliche EC-Domäne. Humanes ADAM15 könnte somit regulierend auf von Integrin  $\alpha\beta3$ -abhängige Tumorzelleigenschaften einwirken, was gerade im Hinblick auf die gesteigerte Motilität dieser Zellen von großer Bedeutung ist. Humanes ADAM15 kommt natürlich im menschlichen Körper vor. Dadurch weist hADAM15 sicherlich ein immunologisch günstigeres Nebenwirkungsprofil auf, zeichnet sich mitunter durch eine bessere Bioverfügbarkeit aus und greift möglicherweise spezifischer in Regulationsvorgänge ein als dies bei den bisher getesteten Integrin  $\alpha\beta3$ -Antagonisten der Fall war. Unsere Ergebnisse unterstreichen daher die Bedeutung weiterer Forschung im Interaktionsbereich zwischen hADAM15 einerseits und dem Integrin  $\alpha\beta3$  andererseits. Nur ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen von Tumorentstehung und -progression erlaubt es, therapeutisch insbesondere auf die unkontrollierte Ausbreitung der malignen Zellen Einfluß zu nehmen und so die Prognose zukünftiger Patientinnen nachhaltig zu verbessern.

## V. Literaturverzeichnis

Albelda, S. M., Mette, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C. A. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res*, 50, 6757-6764.

Al-Fakhri, N., Wilhelm, J., Hahn, M., Heidt, M., Hehrlein, F. W., Endisch, A. M., Hupp, T., Cherian, S. M., Bobryshev, Y. V., Lord, R. S. A., Katz, N. (2003). Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM15 and ADAM9 following upregulation of integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  in atherosclerosis. *J Cell Biochem*, 89, 808-823.

Allman, R., Cowburn, P., Mason, M. (2000). In vitro and in vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the alpha(nu)beta3 integrin in human melanoma cells. *Eur J Cancer*, 36, 410-422.

Almeida, E. A., Huovila, A. P., Sutherland, A. E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D. T. (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*, 81, 1095-1104.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland, 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe (2004). Saarbrücken.

Arndt, M., Lendeckel, U., Rocken, C., Nepple, K., Wolke, C., Spiess, A., Huth, C., Ansoerge, S., Klein, H. U., Goette, A. (2002). Altered expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) in fibrillating human atria. *Circulation*, 105, 720-725.

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., Higashiyama, S. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, 8, 35-40.

Assoian, R. K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol*, 136, 1-4.

Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., Hynes, R. O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*, 95, 507-519.

Bafetti, L. M., Young, T. N., Itoh, Y., Stack, M. S. (1998). Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J Biol Chem*, 273, 143-149.

Beck, V., Herold, H., Benge, A., Lubber, B., Hutzler, P., Tschesche, H., Kessler, H., Schmitt, M., Geppert, H. G., Reuning, U. (2005). ADAM15 decreases integrin  $\alpha v\beta 3$ /vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 590-603.

Belvisi, L., Riccioni, T., Marcellini, M., Vesce, L., Chiarucci, I., Efrati, D., Potenza, D., Scolastico, C., Manzoni, L., Lombardo, K., Stasi, M. A., Orlandi, A., Ciucci, A., Nico, B., Ribatti, D., Giannini, G., Presta, M., Carminati, P., Pisano, C. (2005). Biological and molecular properties of a new  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$  integrin antagonist. *Mol Cancer Ther*, 4, 1670-1680.

Bernstein, H., Bukowska, A., Krell, D., Bogerts, B., Ansorge, S., Lendeckel, U. (2003). Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol*, 32, 153-160.

Beviglia, L., Stewart, G. J., Niewiarowski, S. (1995). Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. *Oncol Res*, 7, 7-20.

Bigler, D., Chen, M., Waters, S., White, J. M. (1997). A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trends Cell Biol*, 7, 220-225.

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, 385, 729-733.

Black, R. A. und White, J. M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 654-659.

Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., Bach-Ngohou, K., Paineau, J., Denis, M. G., Labois, C. L., Mosnier, J. F. (2005). Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol*, 207, 156-163.

Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P., White, J. M. (1990). Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J Cell Biol*, 111, 69-78.

Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D. G., Primakoff, P., White, J. M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, 356, 196-197.

Blystone, S. D., Graham, I. L., Lindberg, F. P., Brown, E. J. (1994). Integrin  $\alpha v\beta 3$  differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor  $\alpha 5\beta 1$ . *J Cell Biol*, 127, 1129-1137.

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

Böhm, B. B., Aigner, T., Gehrsitz, A., Blobel, C. P., Kalden J. R., Burkhardt, H. (1999). Up-regulation of MDC15 (metargidin) messenger RNA in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 42, 1946-1950.

- Böhm, B. B., Aigner, T., Blobel, C. P., Kalden, J. R., Burkhardt, H. (2001). Highly enhanced expression of the disintegrin metalloproteinase MDC15 (metargidin) in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 44, 2046-2054.
- Böhm, B. B., Aigner, T., Roy, B., Brodie, T. A., Blobel, C. P., Burkhardt, H. (2005). Homeostatic effects of the metalloproteinase disintegrin ADAM15 in degenerative cartilage remodeling. *Arthritis Rheum*, 52, 1100-1109.
- Böhm, B. B., Schirner, A., Burkhardt, H. (2008). ADAM15 modulates outside-in signaling in chondrocyte-matrix interactions. *J Cell Mol Med*, electronic publication ahead of print.
- Bosse, F., Petzold, G., Greiner-Petter, R., Pippirs, U., Gillen, C., Müller, H. (2000). Cellular localization of the disintegrin CR11-7/ rMDC15 mRNA in rat PNS and CNS and regulated expression in postnatal development and after nerve injury. *Glia*, 32, 313-327.
- Bridges, L. C., Hanson, K. R., Tani, P. H., Mather, T., Bowditch, R. D. (2003). Integrin  $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion to ADAM 28 (MDC-L) requires an extended surface of the disintegrin domain. *Biochemistry*, 42, 3734-3741.
- Brooks, P. C., Clark, R. A. F., Cheresh, D. A. (1994a). Requirement of vascular integrin  $\alpha v\beta 3$  for angiogenesis. *Science*, 264, 569-571.
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., Cheresh, D. A. (1994b). Integrin  $\alpha v\beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79, 1157-1164.
- Brooks, P. C., Strömblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., Cheresh, D. A. (1995). Antiintegrin  $\alpha v\beta 3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest*, 96, 1815-1822.
- Brozovic, A., Majhen, D., Roje, V., Mikac, N., Jakopec, S., Fritz, G., Osmak, M., Ambriovic-Ristov, A. (2008).  $\alpha v\beta 3$  Integrin-mediated drug resistance in human laryngeal carcinoma cells is caused by glutathione-dependent elimination of drug-induced reactive oxidative species. *Mol Pharmacol*, 74, 298-306.
- Buommino, E., Baroni, A., Canozo, N., Petrazzuolo, M., Nicoletti, R., Voza, A., Turano, M. A. (2008). Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating  $\alpha v\beta 3$  integrin and reducing metalloproteinase 2 production. *Invest New Drugs*, electronic publication ahead of print.
- Buxbaum, J. D., Liu, K., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., Black, R. A. (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.
- Cai, W., Chen, X. (2006). Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin  $\alpha v\beta 3$  antagonism. *Anticancer Agents Med Chem*, 6, 407-428.

Cannistra, S. A., Ottensmeier, C., Niloff, J., Orta, B., DiCarlo, J. (1995). Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 58, 216-225.

Carl-McGrath, S., Lendeckel, U., Ebert, M., Roessner, A., Röcken, C. (2005). The disintegrin-metalloproteases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol*, 26, 17-24.

Carreiras, F., Denoux, Y., Staedel, C., Lehmann, M., Sichel, F., Gauduchon, P. (1996). Expression and localization of  $\alpha v$  integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 62, 260-267.

Carreiras, F., Cruet, S., Staedel, C., Sichel, F., Gauduchon, P. (1999a). Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use it to organize their adhesion. *Gynecol Oncol*, 72, 312-322.

Carreiras, F., Rigot, V., Cruet, S., Andre, F., Gauduchon, P., Marvaldi, J. (1999b). Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: importance of  $\alpha v \beta 3$  integrins and vitronectin. *Int J Cancer*, 80, 285-294.

Caswell, P. und Norman, J. (2008). Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends Cell Biol*, 18, 257-263.

Cerretti, D. P., Poindexter, K., Castner, B. J., Means, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Black, R. A., Nelson, N. (1999). Characterization of the cDNA and gene for mouse tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ ADAM17) and its location to mouse chromosome 12 and human chromosome 2p25. *Cytokine*, 11, 541-551.

Chapman, H. A. (1997). Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 714-724.

Charrier, L., Yan, Y., Driss, A., Laboisse, C. L., Sitaraman, S. V., Merlin, D. (2005). ADAM15 inhibits wound healing in human intestinal epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288, G346-G353.

Charrier, L., Yan, Y., Nguyen, H. T. T., Dalmaso, G., Laboisse, C. L., Gewirtz, A. T., Sitaraman, S. V., Merlin, D. (2007). ADAM-15/Metargidin mediates homotypic aggregation of human T lymphocytes and heterotypic interactions of T lymphocytes with intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 282, 16948-16958.

Charrier-Hisamuddin, L., Laboisse, C. L., Merlin, D. (2008). ADAM-15: a metalloprotease that mediates inflammation. *FASEB J*, 22, 641-653.

Chellaiah, M. A. und Hruska, K. A. (2003). The integrin  $\alpha v \beta 3$  and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int*, 72, 197-205.

Chen, M. S., Almeida, E. A., Huovila, A. P., Takahashi, Y., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., White, J. M. (1999). Evidence that distinct states of the integrin  $\alpha 6 \beta 1$  interact with laminin and an ADAM. *J Cell Biol*, 144, 549-561.

Chen, Q., Meng, L., Zhu, C., Lin, L., Lu, H., Ding, J. (2008). ADAM15 suppresses cell motility by driving integrin  $\alpha 5 \beta 1$  cell surface expression via Erk inactivation. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2164-2173.

Cho, C., O'Dell Bunch, D., Faure, J., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P., Myles, D. G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin  $\beta$ . *Science*, 281, 1857-1859.

Clark, E. A. und Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 268, 233-239.

Cruet, S., Salamanca, C., Mitchell, G. W. E., Auersperg, N. (1999).  $\alpha v \beta 3$  and vitronectin expression by normal ovarian surface epithelial cells: role in cell adhesion and cell proliferation. *Gynecol Oncol*, 75, 254-260.

Cruet-Hennequart, S., Maubant, S., Luis, J., Gauduchon, P., Staedel, C., Dedhar, S. (2003). Alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 22, 1688-1702.

Damsky, C. H. und Werb, Z. (1992). Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol*, 4, 772-781.

Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., Kessler, H. (1999). N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(v)beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem*, 42, 3033-3040.

Diaz-Gonzalez, F., Forsyth, J., Steiner, B., Ginsberg, M. H. (1996). Trans-dominant inhibition of integrin function. *Mol Biol Cell*, 7, 1939-1951.

Dong, J., Opresko, L. K., Dempsey, P. J., Lauffenburger, D. A., Coffey, R. J., Wiley, H. S. (1999). Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6235-6240.

Eliceiri, B. P., Klemke, R., Strömblad, S., Cheresh, D. A. (1998). Integrin  $\alpha v \beta 3$  requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol*, 140, 1255-1263.

Emi, M., Katagiri, T., Harada, Y., Saito, H., Inazawa, J., Ito, I., Kasumi, F., Nakamura, Y. (1993). A novel metalloprotease/ disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. *Nat Genet*, 5, 151-157.

Engel, J., Hölscher, G., Schubert-Fritschle, G. (2007). Kapitel Epidemiologie. Manual maligne Ovarialtumoren – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 8. Auflage. W. Zuckschwerdt Verlag München. Herausgeber: Schmalfeldt, B., Tumorzentrum München.

Eskens, F. A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Böttcher, S., Wynendaele, W., Dreves, J., Verweij, J., van Oosterom, A. T. (2003). Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of

Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer*, 39, 917-926.

Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X., Takada, Y. (2000). RGD-independent binding of integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 to the ADAM12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J Biol Chem*, 275, 34922-34930.

Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X., Sheppard, D., Engvall, E., Takada, Y. (2002). Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. *J Biol Chem*, 277, 17804-17810.

Evans, J. P. (2001). Fertilin b and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays*, 23, 628-639.

Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G. M., Goodman, C. S. (1996). The cell surface metalloprotease/ disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 13233-13238.

Flannery, C. R., Little, C. B., Caterson, B., Hughes, C. E. (1999). Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix Biol*, 18, 225-237.

Fong, Y., Liu, S., Huang, C., Li, T., Hsu, S., Kao, S., Tsai, F., Chen, W., Chen, C., Tang, C. (2008). Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin/FAK/Akt/ and NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Lung Cancer*, article in press.

Forus, A., D'Angelo, A., Henriksen, J., Merla, G., Maelandsmo, G. M., Florenes, V. A., Olivieri, S., Bjerkehagen, B., Meza-Zepeda, L. A., del Vecchio Blanco, F., Müller, C., Sanvito, F., Kononen, J., Nesland, J. M., Fodstad, O., Reymond, A., Kallioniemi, O. P., Arrighi, G., Ballabio, A., Myklebost, O., Zollo, M. (2001a). Amplification and overexpression of PRUNE in human sarcomas and breast carcinomas – a possible mechanism for altering the nm23-H1 activity. *Oncogene*, 20, 6881-6890.

Forus, A., Larramendy, M. L., Meza-Zepeda, L. A., Bjerkehagen, B., Godager, L. H., Dahlberg, A. B., Saeter, G., Knuutila, S., Myklebost, O. (2001b). Dedifferentiation of a well-differentiated liposarcoma to a highly malignant metastatic osteosarcoma: amplification of 12q14 at all stages and gain of 1q22-q24 associated with metastases. *Cancer Genet Cytogenet*, 125, 100-111.

Fourie, A. M., Coles, F., Moreno, V., Karlsson, L. (2003). Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *J Biol Chem*, 278, 30469-30477.

Frayne, J., Jury, J. A., Barker, H. L., Hall, L. (1997). Rat MDC family of proteins: sequence analysis, tissue distribution, and expression in prepubertal and adult rat testis. *Mol Reprod Dev*, 48, 159-167.

Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., Cheresch, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*, 270, 1500-1502.

Fuchs, M., Hutzler, P., Brunner, I., Schlegel, J., Mages, J., Reuning, U., Hapke, S., Duyster, J., Hirohashi, S., Genda, T., Sakamoto, M., Überall, F., Höfler, H., Becker, K., Lubber, B. (2002). Motility enhancement by tumor-derived mutant E-cadherin is sensitive to treatment with epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Exp Cell Res*, 276, 129-141.

Gasparini, G., Brooks, P. C., Biganzoli, E., Vermeulen, P. B., Bonoldi, E., Dirix, L. Y., Ranieri, G., Miceli, R., Cheresch, D. A. (1998). Vascular integrin  $\alpha v \beta 3$ : a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2625-2634.

Gendler, S. J., Cohen, E. P., Craston, A., Duhig, T., Johnstone, G., Barnes, D. (1990). The locus of the polymorphic epithelial mucin (PEM) tumour antigen on chromosome 1q21 shows a high frequency of alteration in primary human breast tumours. *Int J Cancer*, 45, 431-435.

Geppert, H. (2001). Klonierung, Expression und Charakterisierung der Metalloprotease-Domäne und der Disintegrin-Domäne von humanem ADAM15. Dissertation. AG Prof. Tschesche, Institut für Chemie und Biochemie I, Universität Bielefeld.

Giancotti, F. G. (1997). Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 691-700.

Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285, 1028-1032.

Gilpin, B. J., Loechel, F., Mattei, M., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. (1998). A novel, secreted form of human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) provokes myogenesis *in vivo*. *J Biol Chem*, 273, 157-166.

Grigoriou, V., Shapiro, I. M., Cavalcanti-Adam, E. A., Composto, R. J., Ducheyne, P., Adams, C. S. (2005). Apoptosis and survival of osteoblast-like cells is regulated by surface attachment. *J Biol Chem*, 280, 1733-1739.

Grutzmann, R., Foerder, M., Alldinger, I., Staub, E., Brummendorf, T., Ropcke, S., Li, X., Kristiansen, G., Jesnowski, R., Sipos, B., Lohr, M., Luttgies, J., Ockert, D., Kloppel, G., Saeger, H. D., Pilarsky, C. (2003). Gene expression profiles of microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 443, 508-517.

Gurrath, M., Müller, G., Kessler, H., Aumailley, M., Timpl, R. (1992). Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur J Biochem*, 210, 911-921.

Gutheil, J. C., Campbell, T. N., Pierce, P. R., Watkins, J. D., Huse, W. D., Bodkin, D. J., Cheresch, D. A. (2000). Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Clin Cancer Res*, 6, 3056-3061.

Haidl, I. D., Huber, G., Eichmann, K. (2002). An ADAM family member with expression in thymic epithelial cells and related tissues. *Gene*, 283, 163-170.

Ham, C., Levkau, B., Raines, E. W., Herren, B. (2002). ADAM15 is an adherens junction molecule whose surface expression can be driven by VE-Cadherin. *Exp Cell Res*, 279, 239-247.

Hapke, S., Kessler, H., Arroyo de Prada, N., Benge, A., Schmitt, M., Lengyel, E., Reuning, U. (2001). Integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ /vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, 276, 26340-26348.

Hapke, S., Kessler, H., Lubber, B., Benge, A., Hutzler, P., Höfler, H., Schmitt, M., Reuning, U. (2003). Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin  $\alpha v\beta 3$ /VN interaction. *Biol Chem*, 384, 1073-1083.

Hart, S., Fischer, O. M., Prenzel, N., Zwick-Wallasch, E., Schneider, M., Hennighausen, L., Ullrich, A. (2005). GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways. *Biol Chem*, 386, 845-855.

Herren, B., Raines, E. W., Ross, R. (1997). Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and *in vivo*. *FASEB J*, 11, 173-180.

Herren, B., Garton, K. J., Coats, S., Bowen-Pope, D. F., Ross, R., Raines, E. W. (2001). ADAM15 overexpression in NIH3T3 cells enhances cell-cell interactions. *Exp Cell Res*, 271, 152-160.

Herren, B. (2002). ADAM-mediated shedding and adhesion: a vascular perspective. *News Physiol Sci*, 17, 73-76.

Heyman, L., Kellouche, S., Fernandes, J., Dutoit, S., Poulain, L., Carreiras, F. (2008). Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium *in vitro*. *Tumour Biol*, 29, 231-244.

Horiuchi, K., Weskamp, G., Lum, L., Hammes, H., Cai, H., Brodie, T. A., Ludwig, T., Chiusaroli, R., Baron, R., Preissner, K. T., Manova, K., Blobel, C. P. (2003). Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol Cell Biol*, 23, 5614-5624.

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

Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A., Blobel, C. P. (1999). Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem*, 274, 31693-31699.

Huovila, A. J., Almeida, E. A. C., White, J. M. (1996). ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 692-699.

Huovila, A. P., Turner, A. J., Peltto-Huikko, M., Karkkainen, I., Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci*, 30, 413-422.

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

Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.

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

Hynes, R. O. (2002). A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*, 8, 918-921.

Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F., Wewer, U. M. (1999). Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol*, 154, 1489-1501.

Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Frohlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J. K., Sanderson, R. D., Brakebusch, C., Fassler, R., Wewer, U. M. (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.

Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Krätzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y. M., Baron, R., Blobel, C. P. (1998). Cloning and initial characterization of mouse meltrin  $\beta$  and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J Biol Chem*, 273, 4180-4187.

Itoh, Y., Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem*, 38, 21-36.

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., Mekada, E. (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/ meltrin- $\gamma$ / ADAM9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*, 17, 7260-7272.

Jeon, O., Kim, D., Choi, Y., Kim, S., Choi, W., Kim, D. (2007). Novel function of human ADAM15 disintegrin-like domain and its derivatives in platelet aggregation. *Throm Res*, 119, 609-619.

Jury, J. A., Frayne, J., Hall, L. (1997). The human fertilin alpha gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem J*, 321, 577-581.

Jury, J. A., Frayne, J., Hall, L. (1998). Sequence analysis of a variety of primate fertilin alpha genes: evidence for non-functional genes in the gorilla and man. *Mol Reprod Dev*, 51, 92-97.

Jury, J. A., Perry, A. C. F., Hall, L. (1999). Identification, sequence analysis and expression of transcripts encoding a putative metalloproteinase, eMDC II, in human and macaque epididymis. *Mol Hum Reprod*, 5, 1127-1134.

Kärkkäinen, I., Karhu, R., Huovila, A. J. (2000). Assignment of the ADAM15 gene to human chromosome band 1q21.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 88, 206-207.

Hodivala-Dilke, K. (2008).  $\alpha v \beta 3$  integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 514-519.

Kang, I. C., Lee, Y. D., Kim, D. S. (1999). A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 59, 3754-3760.

Kang, I. C., Kim, D. S., Jang, Y., Chung, K. H. (2000). Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 169-173.

Katagiri, T., Harada, Y., Emi, M., Nakamura, Y. (1995). Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. *Cytogenet Cell Genet*, 68, 39-44.

Kenny, H. A., Krausz, T., Yamada, S. D., Lengyel, E. (2007). Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *Int J Cancer*, 121, 1463-1472.

Kenny, H. A., Kaur, S., Coussens, L. M., Lengyel, E. (2008). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest*, 118, 1367-1379.

Kessler, H., Diefenbach, B., Finsinger, D., Geyer, A., Gurrath, M., Goodman, S. L., Hölzemann, G., Haubner, R., Jonczyk, A., Müller, G., Graf von Roedern, E., Wermuth, J. (1995). Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Lett Pept Sci*, 2, 155-160.

Kheradmand, F. und Werb, Z. (2002). Shedding light on sheddases: role in growth and development. *BioEssays*, 24, 8-12.

Killar, L., White, J., Black, R., Peschon, J. (1999). Adamalysins – A family of metzincins including TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci*, 878, 442-452.

Kim, D. S., Jeon, O., Lee, H. D., Yoo, K. H., Kim, D. (2008). Integrin  $\alpha v \beta 3$ -mediated transcriptional regulation of TIMP-1 in a human ovarian cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 479-483.

Kleino, I., Ortiz, R. M., Huovila, A. J. (2007). ADAM15 gene structure and differential alternative exon use in human tissues. *BMC Mol Biol*, 8, 90-109.

Ko, S. Y., Lin, S. C., Wong, Y. K., Liu, C. J., Chang, K. W., Liu, T. Y. (2007). Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, 245, 33-43.

Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., Yoshida, K., Nakada, M., Ohuchi, E., Okada, Y. (2004). ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*, 165, 1743-1753.

Komiya, K., Enomoto, H., Inoki, I., Okazaki, S., Fujita, Y., Ikeda, E., Ohuchi, E., Matsumoto, H., Toyama, Y., Okada, Y. (2005). Expression of ADAM15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis. *Arthritis Res Ther*, 7, R1158-R1173.

Kossakowska, A. E., Huchcroft, S. A., Urbanski, S. J., Edwards, D. R. (1996). Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br J Cancer*, 73, 1401-1408.

Krätzschmar, J., Lum, L., Blobel, C. P. (1996). Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem*, 271, 4593-4596.

Kuefer, R., Day, K. C., Kleer, C. G., Sabel, M. S., Hofer, M. D., Varambally, S., Zorn, C. S., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Day, M. L. (2006). ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease. *Neoplasia*, 8, 319-329.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lai, T., Fong, Y., Fu, W., Yang, R., Tang, C. (2008). Stromal cell-derived factor-1 increase  $\alpha\beta 3$  integrin expression and invasion in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol*, 218, 334-342.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeifer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F., (1999). Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 3922-3927.

Landen, C. N., Kim T., Lin, Y. G., Merritt, W. M., Kamat, A. A., Han, L. Y., Spanuth, W. A., Nick, A. M., Jennings, N. B., Kinch, M. S., Tice, D., Sood, A. K. (2008). Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of  $\alpha\beta 3$  integrin in ovarian cancer. *Neoplasia*, 10, 1259-1267.

Langer, H., May, A. E., Bültmann, A., Gawaz, M. (2005). ADAM 15 is an adhesion receptor for platelet GPIIb-IIIa and induces platelet activation. *Thromb Haemost*, 94, 555-561.

Lafuste, P., Sonnet, C., Chazaud, B., Dreyfus, P. A., Gherardi, R. K., Wewer, U. M., Authier, F. J. (2005). ADAM12 and  $\alpha 9\beta 1$  integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol Biol Cell*, 16, 861-870.

Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H., Röcken, C. (2005). Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131, 41-48.

Leroy-Dudal, J., Heyman, L., Gauduchon, P., Carreiras, F. (2005). Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the  $\alpha$  integrins-vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity. *Cell Biol Int*, 29, 482-488.

Liapis, H., Adler, L. M., Wick, M. R., Rader, J. S. (1997). Expression of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol*, 28, 443-449.

Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res*, 51, 5054s-5059s.

Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. (1998). Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J Biol Chem*, 273, 16993-16997.

Loechel, F., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. (1999). Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. *J Biol Chem*, 274, 13427-13433.

Lössner, D., Abou-Ajram, C., Benge, A., Reuning, U. (2008). Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 mediates upregulation of epidermal growth-factor receptor expression and activity in human ovarian cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2746-2761.

Lu, D., Chung, K. F., Xia, M., Lu, X., Scully, M., Kakkar, V. (2006). Integrin binding characteristics of the disintegrin-like domain of ADAM-15. *Thromb Haemost*, 96, 642-651.

Lu, D., Xie, S., Sukkar, M. B., Lu, X., Scully, M. F., Chung, K. F. (2007). Inhibition of airway smooth muscle adhesion and migration by the disintegrin domain of ADAM-15. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37, 494-500.

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

Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y., Blobel, C. P. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*, 274, 13613-13618.

Marshall, J. F. und Hart, I. R. (1996). The role of alpha v-integrins in tumour progression and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 7, 129-138.

Martin, J., Eynstone, L. V., Davies, M., Steadman, R. (2002). The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration. *J Biol Chem*, 277, 33683-33689.

- McCulloch, D. R., Harvey, M., Herington, A. C. (2000). The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. *Mol Cell Endocrinol*, 167, 11-21.
- McKie, N., Edwards, T., Dallas, D. J., Houghton, A., Stringer, B., Graham, R., Russell, G., Croucher, P. I. (1997). Expression of members of a novel membrane linked metalloproteinase family (ADAM) in human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 230, 335-339.
- Mitsui, Y., Mochizuki, S., Kodama, T., Shimoda, M., Ohtsuka, T., Shiomi, T., Chijiwa, M., Ikeda, T., Kitajima, M., Okada, Y. (2006). ADAM28 is overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res*, 66, 9913-9920.
- Mochizuki, S. und Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci*, 98, 621-628.
- Möbus, V., Gerharz, C. D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P. G., Kreienberg, R. (1992). Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 52, 76-84.
- Montgomery, A. M., Reisfeld, R. A., Cheresch, D. A. (1994). Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 8856-8860.
- Mosnier, J., Jarry, A., Bou-Hanna, C., Denis, M. G., Merlin, D., Laboisse, C. L. (2006). ADAM15 upregulation and interaction with multiple binding partners in inflammatory bowel disease. *Lab Invest*, 86, 1064-1073.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385, 733-736.
- Muga, A., Neugebauer, W., Hirama, T., Surewicz, W. K. (1994). Membrane interaction and conformational properties of the putative fusion peptide of PH-30, a protein active in sperm-egg fusion. *Biochemistry*, 33, 4444-4448.
- Najy, A. J., Day, K. C., Day, M. L. (2008a). ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res*, 68, 1092-1099.
- Najy, A. J., Day, K. C., Day, M. L. (2008b). The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem*, 283, 18393-18401.
- Nath, D., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Warn, A., Hutchinson, G. R., Yamada, K. M., Docherty, A. J. P., Murphy, G. (1999). Interaction of metargidin (ADAM15) with  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha 5 \beta 1$  integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci*, 112, 579-587.

Niewiarowski, S., McLane, M. A., Kloczewiak, M., Stewart, G. J. (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol*, 31, 289-300.

Ohtsuka, T., Shiomi, T., Shimoda, M., Kodama, T., Amour, A., Murphy, G., Ohuchi, E., Kobayashi, K., Okada, Y. (2006). ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. *Int J Cancer*, 118, 263-73.

Ortiz, R. M., Kärkkäinen, I., Huovila, A. J. (2004). Aberrant alternative exon use and increased copy number of human metalloprotease-disintegrin ADAM15 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 41, 366-378.

Ortiz, R. M., Kärkkäinen, I., Huovila, A. P., Honkaniemi, J. (2005). ADAM9, ADAM10, and ADAM15 mRNA levels in the rat brain after kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res Mol Brain Res*, 137, 272-275.

O'Shea, C., McKie, N., Buggy, Y., Duggan, C., Hill, A. D. K., McDermott, E., O'Higgins, N., Duffy, M. J. (2003). Expression of ADAM9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int J Cancer*, 105, 754-761.

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

Pasten-Hidalgo, K., Hernandez-Rivas, R., Roa-Espitia, A. L., Sanchez-Gutierrez, M., Martinez-Perez, F., Monroy, A. O., Hernandez-Gonzalez, E. O., Mujica, A. (2008). Presence, processing, and localization of mouse ADAM15 during sperm maturation and the role of its disintegrin domain during sperm-egg binding. *Reproduction*, 136, 41-51.

Patel, S. R., Jenkins, J., Papadopolous, N., Burgess, M. A., Plager, C., Gutterman, J., Benjamin, R. S. (2001). Pilot study of *Vitaxin* – an angiogenesis inhibitor – in patients with advanced leiomyosarcomas. *Cancer*, 92, 1347-1348.

Perry, A. C. F., Jones, R., Hall, L. (1995). Analysis of transcripts encoding novel members of the mammalian metalloprotease-like, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family and their expression in reproductive and non-reproductive monkey tissues. *Biochem J*, 312, 239-244.

Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russel, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282, 1281-1284.

Poghosyan, Z., Robbins, S. M., Houslay, M. D., Webster, A., Murphy, G., Edwards, D. R. (2002). Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 277, 4999-5007.

Primakoff, P., Hyatt, H., Tredick-Kline, J. (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol*, 104, 141-149.

Primakoff, P. und Myles, D. G. (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet*, 16, 83-87.

Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloproteinase Kuzbanian. *Science*, 283, 91-94.

Ramsay, A. G., Marshall, J. F., Hart, I. R. (2007). Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 567-578.

Reardon, D. A., Fink, K. L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T. F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J. J., Rich, K. M., Schiff, D., Shapiro, W. R., Burdette-Radoux, S., Dropcho, E. J., Wittmer, S. M., Nippgen, J., Picard, M., Nabors, L. B. (2008). Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 26, 5610-5617.

Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., Black, R. A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, 275, 14608-14614.

Reuning, U., Magdolen, V., Hapke, S., Schmitt, M. (2003). Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem*, 384, 1119-1131.

Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R. O., Hodivala-Dilke, K. M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med*, 8, 27-34.

Ria, R., Vacca, A., Ribatti, D., Di Raimondo F., Merchionne, F., Dammacco, F. (2002).  $\alpha v \beta 3$  integrin engagement enhances cell invasiveness in human multiple myeloma. *Haematologica*, 87, 836-845.

Roberts, C. M., Tani, P. H., Bridges, L. C., Laszik, Z., Bowditch, R. D. (1999). MDC-L, a novel metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein family member expressed by human lymphocytes. *J Biol Chem*, 274, 29251-29259.

Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P., Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*, 274, 3531-3540.

Rosendahl, M. S., Ko, S. C., Long, D. L., Brewer, M. T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S. M., Moreland, J., Meyers, M. A., Kohno, T., Lyons, D., Lichenstein, H. S. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis

factor- $\alpha$ -processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem*, 272, 24588-24593.

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

Ruoslahti, E. und Pierschbacher, M. D. (1986). Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. *Cell*, 44, 517-518.

Ruoslahti, E. und Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, 77, 477-478.

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

Sato, H., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, J., Seiki, M. (1992). Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, 7, 77-83.

Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A., Ullrich, A. (2004a). Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem*, 279, 47929-47938.

Schäfer, B., Gschwind, A., Ullrich, A. (2004b). Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*, 23, 991-999.

Schnell, O., Krebs, B., Wagner, E., Romagna, A., Beer, A. J., Grau, S. J., Thon, N., Goetz, C., Kretschmar, H. A., Tonn, J. C., Goldbrunner, R. H. (2008). Expression of integrin  $\alpha\beta3$  in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathology*, 18, 378-386.

Schwartz, M. A. (1992). Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol*, 2, 304-308.

Schwartz, M. A. und Ginsberg, M. H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*, 4, E65-E68.

Schütz, A., Härtig, W., Wobus, M., Grosche, J., Wittekind, C., Aust, G. (2005). Expression of ADAM15 in lung carcinomas. *Virchows Arch*, 446, 421-429.

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

Seldin, M. F., Hirohata, S., Apte, S. S. (2000). Chromosomal mapping of Adam9, Adam15 and Adam21. *Matrix Biol*, 19, 185-187.

- Shamsadin, R., Adham, I. M., Nayernia, K., Heinlein, U. A. O., Oberwinkler, H., Engel, W. (1999). Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod*, 61, 1445-1451.
- Shimizu, E., Yasui, A., Matsuura, K., Hijiya, N., Higuchi, Y., Yamamoto, S. (2003). Structure and expression of the murine ADAM 15 gene and its splice variants, and difference of interaction between their cytoplasmic domains and Src family proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 309, 779-785.
- Shintani, Y., Higashiyama, S., Ohta, M., Hirabayashi, H., Yamamoto, S., Yoshimasu, T., Matsuda, H., Matsuura, N. (2004). Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. *Cancer Res*, 64, 4190-4196.
- Silletti, S. und Cheresh, D. A. (1999). A link between integrins and MMPs in angiogenesis. *Fibrinolysis & Proteolysis*, 13, 226-238.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., Logeat, F. (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and  $\chi$ -secretase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 7638-7643.
- Stefansson, S., Lawrence, D. A. (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin  $\alpha\beta3$  binding to vitronectin. *Nature*, 383, 441-443.
- Stone, A. L., Kroeger, M., Sang, Q. X., A. (1999). Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. *J Protein Chem*, 18, 447-465.
- Streuli, C. H. und Akhtar, N. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J*, 418, 491-506.
- Strömblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C., Cheresh, D. A. (1996). Suppression of p53 activity and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression by vascular cell integrin  $\alpha\beta3$  during angiogenesis. *J Clin Invest*, 98, 426-433.
- Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., Cheresh, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*, 155, 459-470.
- Taga, T., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, I., Gille,s F. H., Stins, M., Shimada, H., Barsky, L., Weinberg, K. I., Laug, W. E. (2002). Alpha v-integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer*, 98, 690-697.
- Tan, D. S. P., Agarwal, R., Kaye, S. B. (2006). Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 7, 925-934.
- Tanaka, Y., Miyamoto, S., Suzuki, S. O., Oki, E., Yagi, H., Sonoda, K., Yamazaki, A., Mizushima, H., Maehara, Y., Mekada, E., Nakano, H. (2005). Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 4783-4792.

Tannapfel, A., Anhalt, K., Hausermann, P., Sommerer, F., Benicke, M., Uhlmann, D., Witzigmann, H., Hauss, J., Wittekind, C. (2003). Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol*, 201, 238-249.

Thumshirn, G., Hersel, U., Goodman, S. L., Kessler, H. (2003). Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry*, 9, 2717-2725.

Trochon-Joseph, V., Martel-Renoir, D., Mir, L. M., Thomaidis, A., Opolon, P., Cannault, E., Li, H., Grenet, C., Fauvel-Lafeve, F., Soria, J., Legrand, C., Soria, C., Perricaudet, M., Lu, H. (2004). Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res*, 64, 2062-2069.

Van der Flier, A. und Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305, 285-298.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., Horwitz, A. R. (2009). Integrins in cell migration – the actin connection. *J Cell Science*, 122, 199-206.

Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92, 827-839.

Waltz, M. R., Pandelidis, S. M., Pratt, W., Barnes, D., Swallow, D. M., Gendler, S. J., Cohen, E. P. (1998). A microsatellite within the MUC1 locus at 1q21 is altered in the neoplastic cells of breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 100, 63-67.

Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D. I., Bodary, S. C., Rosenberg, S., Doyle, M. V., Chapman, H. A. (1996). Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science*, 273, 1551-1555.

Weskamp, G. und Blobel, C. P. (1994) A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 2748-2751.

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

White, J. M. (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 598-606.

White, J. M. und Wolfsberg, T. G. (Stand 04.01.2009). Table of the ADAMs. University of Virginia, School of Medicine, Department of Cell Biology, Internetauftritt. [www.people.virginia.edu/~jw7g/Table\\_of\\_the\\_ADAMS.html](http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMS.html)

Wildeboer, D., Naus, S., Amy Sang, Q. X., Bartsch, J. W., Pagenstecher, A. (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 516-527.

Wolfsberg, T. G., Bazan, J. F., Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P., White, J. M. (1993). The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10783-10787.

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

Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. J., Primakoff, P., Myles, D. G., White, J. M. (1995). ADAM, a widely distributed and developmentally regulated family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol*, 169, 378-383.

Wolfsberg, T. G. und White, J. M. (1996). ADAMs in fertilization and development. *Dev Biol*, 180, 389-401.

Wong, G. E., Zhu, X., Prater, C. E., Oh, E., Evans, J. P. (2001). Analysis of fertilin alpha (ADAM1)-mediated sperm-egg cell adhesion during fertilization and identification of an adhesion-mediating sequence in the disintegrin-like domain. *J Biol Chem*, 276, 24937-24945.

Wu, E., Croucher, P. I., McKie, N. (1997). Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*, 235, 437-442.

Wu, J., Zhang, L., Ma, X., Zhang, X., Jin, J. (2008). Screening cellular proteins involved in the anti-proliferative effect of the ADAM15 disintegrin domain in murine melanoma cells. *Oncol Rep*, 20, 669-675.

Xiao, B., Li, W., Yang, J., Guo, G., Mao, X. H., Zou, Q. M. (2008). RGD-IL-24, a novel tumor-targeted fusion cytokine: expression, purification and functional evaluation. *Mol Biotechnol*, electronic publication ahead of print.

Xie, B., Shen, J., Dong, A., Swaim, M., Hackett, S. F., Wyder, L., Worpenberg, S., Barbieri, S., Campochiaro, P. A. (2008). An Adam15 amplification loop promotes vascular endothelial growth factor-induced ocular neovascularization. *FASEB J*, 22, 2775-2783.

Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha v beta 3. *Science*, 294, 339-345.

Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*, 377, 652-656.

Yamada, D., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ohhashi, S., Yu, J., Egami, T., Fujita, H., Nagai, E., Tanaka, M. (2007). Increased expression of ADAM 9 and ADAM 15 mRNA in pancreatic cancer. *Anticancer Res*, 27, 793-799.

Yamamoto, S., Higuchi, Y., Yoshiyama, K., Shimizu, E., Kataoka, M., Hijiya, N., Matsuura, K. (1999). ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today*, 20, 278-284.

Yasui, A., Matsuura, K., Shimizu, E., Hijiya, N., Higuchi, Y., Yamamoto, S. (2004). Expression of splice variants of the human ADAM15 gene and strong interaction between the cytoplasmic domain of one variant and Src family proteins Lck and Hck. *Pathobiology*, 71, 185-192.

Yeh, C. H., Peng, H. C., Huang, T. F. (1998). Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by acting as integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 antagonist and inducing apoptosis. *Blood*, 92, 3268-3276.

Yeh, C. H., Peng, H. C., Yang, R. S., Huang, T. F. (2001). Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective  $\alpha$ (v) $\beta$ (3) blockade of endothelial cells. *Mol Pharmacol*, 59, 1333-1342.

Yoshimura, T., Tomita, T., Dixon, M. F., Axon, A. T. R., Robinson, P. A., Crabtree, J. E. (2002). ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *J Infect Dis*, 185, 332-340.

Zanetti, A., Conforti, G., Hess, S., Martin-Padura, I., Ghibaudi, E., Preissner, K. T., Dejana, E. (1994). Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood*, 84, 1116-1123.

Zhang, X. P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y. (1998). Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM15) with integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *J Biol Chem*, 273, 7345-7350.

Zhao, J., Chen, H., Peschon, J. J., Shi, W., Zhang, Y., Frank, S. J., Warburton, D. (2001a). Pulmonary hypoplasia in mice lacking tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme indicates an indispensable role for cell surface protein shedding during embryonic lung branching morphogenesis. *Dev Biol*, 232, 204-218.

Zhao, J., Chen, H., Wang, Y. L., Warburton, D. (2001b). Abrogation of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme inhibits embryonic lung morphogenesis in culture. *Int J Dev Biol*, 45, 623-631.

Zhao, L., Shey, M., Farnsworth, M., Dailey, M. O. (2001c). Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD621) by the epidermal growth factor domain. *J Biol Chem*, 276, 30631-30640.

Zhong, J. L., Poghosyan, Z., Pennington, C. J., Scott, X., Handsley, M. M., Warn, A., Gavrilovic, J., Honert, K., Krüger, A., Span, P. N., Sweep, F. C., Edwards, D. R. (2008). Distinct function of natural ADAM-15 cytoplasmic domain variants in human mammary carcinoma. *Mol Cancer Res*, 6, 383-394.

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. M. Kiechle und Herrn Prof. Dr. M. Schmitt möchte ich für die Möglichkeit danken, innerhalb der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Nicht immer waren alle benötigten Geräte in unseren eigenen Laborräumen vorhanden, daher danke ich Herrn Prof. Dr. H. Höfler und Dr. P. Hutzler für die großzügige Erlaubnis insbesondere das CLSM an der GSF benutzen zu dürfen. Herrn Dr. P. Hutzler sei überdies für die umfangreichen auf CD gebrannten Daten gedankt. Frau PD Dr. B. Luber möchte ich ganz herzlich für die Einführung in die Arbeit mit Zellen am besagten CLSM danken und Dr. T. Meindl für seine Freundschaft. Weiterhin danke ich dem Team der Experimentellen Onkologie am Klinikum rechts der Isar für die Möglichkeit, meine Zell/Zell-Adhäsionsmessungen am dortigen Fluorimeter durchzuführen.

Für die Projektidee, die zahlreichen Anregungen, die jahrelange Begleitung sowie ihre fast durchgehende Erreichbarkeit für mich während des praktischen Teils dieser Arbeit danke ich ganz herzlich Frau PD Dr. Ute Reuning. Darüberhinaus sollte der vielfach als GSF-Fahrzeug zur Verfügung gestellte schwarze Renault nicht unerwähnt bleiben. Vielen Dank hierfür!

Die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor der Frauenklinik und die große Hilfsbereitschaft der Kollegen haben mir den Einstieg in die Laborarbeit sehr erleichtert. Dafür danke ich ganz lieb Frau A. Benge, Frau C. Abou-Ajram, Frau C. Schnelldorfer, Frau C. Jäger, Frau E. Sedlacek, Herrn Dr. M. Kugler sowie allen anderen Mitarbeitern.

Ich danke meiner Mutter dafür, dass sie immer an ein Ende dieser Arbeit geglaubt hat, sowie meiner Schwester, Judith, für Ihre Gelassenheit und Ihren Optimismus. Axel sei ganz herzlich gedankt für seine unerschütterliche Geduld, sowie ihm und der gesamten Familie Winter für die logistische Unterstützung in Form des Toyota-Yaris-Familienautos. Christopher, was wäre ich ohne Dich...