

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
des Klinikums rechts der Isar der  
Technischen Universität München  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger

## **Identifizierung und Charakterisierung von extrazellulären Fragmenten des Tumor-Endothel-Markers 5 (TEM5)**

**Philipp Oliver Aubele**

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. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. M. Essler
2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 06.04.2011 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 01.02.2012 angenommen.

---

**Identifizierung und Charakterisierung  
von extrazellulären Fragmenten des  
Tumor-Endothel-Markers 5 (TEM5)**

**Philipp Oliver Aubele**

---

**München**

[...] nam et prius quam incipias consulto, et ubi consulueris mature facto opus est. Ita utrumque per se indigens alterum alterius auxilio eget.

[...] denn bevor man beginnt, bedarf es der Überlegung und sobald man überlegt hat, rechtzeitiger Ausführung. So ist jedes allein unzureichend und eins bedarf der Ergänzung durch das andere.

(Sallust: De coniuratione Catilinae; I 6/7)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>- 7 -</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>- 8 -</b>
1.1. Die Bildung von Blutgefäßen .....	- 8 -
1.1.1. Physiologische Entstehung von Gefäßen.....	- 9 -
1.1.2. Die Tumorangio-genese .....	- 10 -
1.1.3. „The Angiogenic-Switch“ .....	- 10 -
1.1.4. Tumorgefäßmorphologie .....	- 13 -
1.1.5. Endothelzell-Überleben und -Apoptose in der Angiogenese .....	- 13 -
1.2. Tumorendothel und Therapie .....	- 14 -
1.2.1. Tumorendothelmarker: die TEMs .....	- 16 -
1.2.2. TEM 1, 7 und 8.....	- 17 -
1.2.3. TEM 5.....	- 18 -
1.2.4. Aktueller Stand der TEM5-Forschung .....	- 19 -
<b>2. Ziel der Arbeit und Fragestellung</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>3. Biologische Grundlagen dieser Arbeit</b> .....	<b>- 22 -</b>
3.1. Integrine und das RGD-Motiv im Rahmen der Angiogenese.....	- 22 -
3.1.1. Das RGD-Motiv .....	- 23 -
3.1.2. Krypitsche RGD-Motive.....	- 24 -
3.1.3. Demaskierung durch MMPs .....	- 24 -
3.1.4. Die Rolle der Integrine und der RGD-Motive in der Angiogenese ...	- 25 -
3.2. MMPs in der Angiogenese: Eine Übersicht .....	- 26 -
3.2.1. MMP14.....	- 27 -
3.3. Thrombin in Blutgerinnung und Angiogenese.....	- 28 -
3.3.1. Thrombin in der Rolle als Dekryptase .....	- 30 -
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>- 31 -</b>
4.1. Puffer und Medien .....	- 31 -
4.1.1. Verwendete Chemikalien .....	- 31 -
4.1.2. Verwendete Antikörper.....	- 33 -
4.1.3. Verwendete Proteasen.....	- 33 -
4.1.4. Sonstige verwendete Reagentien und DNA .....	- 34 -
4.2. Zellkultur.....	- 34 -
4.3. Expressionskonstrukte .....	- 35 -
4.3.1. TEM5.....	- 35 -

4.3.2.	Mutationen im TEM5-Expressionskonstrukt .....	- 35 -
4.3.3.	Agarosegel-Elektrophorese.....	- 36 -
4.3.4.	Transfektion nach der Kalzium-Phosphat-Methode .....	- 36 -
4.3.5.	Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten ..	- 37 -
4.3.6.	MMP14-stabil transfizierte HEK293 (HEK293-MMP14) .....	- 38 -
4.4.	SDS-Page, Coomassie-Färbung, Westernblot.....	- 38 -
4.4.1.	SDS-Page .....	- 38 -
4.4.2.	Blotting .....	- 39 -
4.4.3.	Coomassie-Färbung von Proteingelen und PVDF-Membranen .....	- 39 -
4.4.4.	Westernblotanalyse.....	- 40 -
4.4.5.	TCA-DOC-Präzipitation.....	- 40 -
4.5.	Proteinsequenzierung .....	- 41 -
4.6.	TEM5-Verdaue .....	- 41 -
4.6.1.	In-vitro-Verdaue .....	- 41 -
4.6.2.	In-situ-Verdaue.....	- 42 -
4.7.	Zelladhäsionsversuch.....	- 43 -
4.8.	Endothelzell-Migration: Wound-Healing-Assay .....	- 44 -
4.9.	Berechnungen, Abbildungen und statistische Signifikanz .....	- 44 -
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>- 45 -</b>
5.1.	Fragestellung.....	- 45 -
5.2.	Identifizierung von TEM5-Fragmenten .....	- 45 -
5.2.1.	Zwei TEM5-Fragmente: TEM5-N80 und TEM5-N60 .....	- 45 -
5.2.2.	Charakterisierung der TEM5-N60-Prozessierung .....	- 47 -
5.2.3.	Identifizierung der Spaltstellen von Thrombin und MMP14 .....	- 48 -
5.2.4.	Klonierung und Mutation der Thrombinspaltstelle .....	- 49 -
5.2.5.	Zwei verschiedene Prozessierungswege .....	- 51 -
5.2.6.	Lösliche Proteasen können TEM5-N60 von der Zelloberfläche abspalten.....	- 51 -
5.2.7.	Membranständige Proteasen können TEM5-N60 von der Zelloberfläche abspalten.....	- 51 -
5.3.	Funktionelle Charakterisierung der Fragmente .....	- 54 -
5.3.1.	Endothelzellen können auf immobilisiertem TEM5-N60 adhäreren -	54 -
5.3.2.	Konditioniertes Medium von TEM5 und MMP14 kotransfizierten Zellen vermittelt Endothelzelladhäsion .....	- 56 -

---

5.3.3.	Das RGD-Motiv ist verantwortlich für die TEM5-N60 vermittelte Endothelzell-Adhäsion an $\alpha\beta 3$ -Intergrin.....	- 57 -
5.3.4.	Lösliches TEM5-N60 wirkt antagonistisch gegenüber dem $\alpha\beta 3$ -Liganden Vitronectin und reduziert die Endothelzellmigration .....	- 58 -
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>- 59 -</b>
6.1.	Die Biologie der extrazellulären Anteile von TEM5.....	- 59 -
6.1.1.	TEM5 kann extrazellulär modifiziert werden.....	- 59 -
6.1.2.	TEM5-N60 ist funktionell aktiv .....	- 60 -
6.1.3.	Das RGD-Motiv wird in TEM5-N60 freigelegt und ist für die Endothelzellinteraktion verantwortlich .....	- 60 -
6.1.4.	TEM5-N60 erfüllt verschiedene Anforderungen an ein Protein mit funktionellem RGD-Motiv.....	- 62 -
6.1.5.	Verschiedene extrazelluläre Prozessierungswege von TEM5.....	- 63 -
6.2.	Bedeutung der Ergebnisse.....	- 66 -
6.2.1.	Bedeutung der Ergebnisse für die TEM5-Biologie .....	- 66 -
6.3.	Klinische Bedeutung.....	- 69 -
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>- 70 -</b>
7.1.	Abbildungen .....	- 70 -
7.2.	Abkürzungen .....	- 75 -
7.3.	Lizenzen.....	- 78 -
7.4.	Literaturverzeichnis .....	- 81 -
7.5.	Danksagung .....	- 86 -
7.6.	Lebenslauf.....	- 87 -

## Zusammenfassung

Der Tumor-Endothel-Marker 5 (TEM5) ist ein membranständiges Protein, das zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren gehört. Dieser Marker wird in Endothelzellen während der physiologischen, besonders aber auch während der tumorassoziierten Angiogenese hochreguliert. Um die Mechanismen der Gefäßentstehung zu verstehen, werden seit rund 40 Jahren Forschungsanstrengungen mit dem Ziel vorangetrieben, neue Möglichkeiten zu Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen zu finden. TEM5 ist eine mögliche neue Zielstruktur für antiangiogene Therapien.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der extrazellulären Anteile dieses Tumor-Endothel-Markers 5, wobei mehrere neue Fragmente identifiziert werden konnten. Unter diesen wurde ein n-terminales 60kDa großes Fragment gefunden, das durch Abspaltung („Shedding“) an der Zellmembran durch die membranständige Metallomatrixprotease 14 (MMP14) und durch die lösliche Serinprotease Thrombin entsteht. Dieses neue Fragment wurde TEM5-N60 genannt. Die Spaltstellen der genannten Proteasen im Volllängenprotein wurden identifiziert. Sie liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem kryptischen RGD-Motiv, dessen Freilegung zudem bewiesen werden konnte. Dieses TEM5-N60-Fragment kann über das dekryptierte RGD-Motiv - je nachdem, ob es in Lösung oder immobilisiert vorliegt - antagonistisch oder agonistisch auf das für proliferierendes Endothel spezifische Integrin  $\alpha\beta_3$  wirken. Es wird gezeigt, dass lösliches TEM5-N60 effektiv die Endothelzellmigration auf  $\alpha\beta_3$ -Liganden wie Vitronectin inhibiert, nicht aber auf Liganden anderer Integrine. In immobilisiertem Zustand jedoch vermittelt TEM5-N60 die Adhäsion von Endothelzellen. Ein monoklonaler Antikörper konnte die adhäsive Wirkung von TEM5-N60 auf Endothelzellen effektiv unterbinden.

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die extrazellulären Anteile von TEM5, die für die Konzeption von diagnostischen und therapeutischen Markern bedeutsam sein könnten. Darüber hinaus wurde ein interessantes lösliches Fragment (TEM5-N60) gefunden, das selbst Potenzial als molekularer Marker hat.

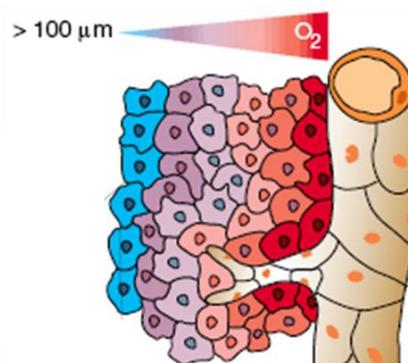
# 1. Einleitung

Als Angiogenese (griechisch ἄγγος „Gefäß“ und γένεσις „Entstehung“) bezeichnet man das Wachstum von kleinen Blutgefäßen durch Aussprossung aus vorbestehenden Kapillaren. Dieser Prozess wird reguliert durch eine Balance von pro- und antiangiogenen Systemen.

## 1.1. Die Bildung von Blutgefäßen

Zellen benötigen Sauerstoff und Nährstoffe zur dauerhaften Aufrechterhaltung ihrer Funktion. Die Versorgung mit diesen ist essenziell für ihr Überleben. Die Versorgung mit lebenswichtigen Substraten und der Abtransport von Abfallstoffen kann in Entfernung von ein bis zwei Millimeter „per diffusionem“ vonstatten gehen. Für Sauerstoff sind diese Strecken mit maximal 150µm (Abb. 1) noch bedeutend kleiner (Vaupel and Harrison 2004). In allen höher entwickelten Spezies, besonders aber der Spezies der Säugetiere ist es also essenziell, dass mindestens in diesem Abstand ein geeignetes System zur Gewährleistung eines suffizienten Stoffwechsels vorhanden ist. Diese Funktion des An- und Abtransports wird durch ein funktionsfähiges Gefäßbett und einen suffizienten Blutkreislauf erfüllt (Carmeliet and Jain 2000). Bei der Entstehung des Gefäßbettes sind drei wesentliche Vorgänge zu definieren und zu unterscheiden:

Zum Ersten: die Vaskulogenese, deren Rolle besonders in der Embryonalperiode von Bedeutung ist. Durch zirkulierende Gefäß-Stammzellen, Angioblasten, die sich zusammenlagern und zu Endothelzellen differenzieren, werden Gefäße „de novo“ gebildet.



**Abb. 1 \***

### **Abhängigkeit des Gewebes von adäquater Versorgung mit Sauerstoff.**

Zellen, die weiter als 100µm von einem versorgenden Gefäß entfernt liegen, sind hypoxischem Stress ausgesetzt. Dieser Stress führt unter anderem über die Hochregulation von hypoxie-induzierten-Faktoren (HIF- $\alpha$  und - $\beta$ ) zur Stimulation der Angiogenese.

Abbildung modifiziert nach: Carmeliet 2000 (Carmeliet and Jain 2000)

Reprinted by permission from Macmillan Ltd.: *Nature* 407(6801): 249-57; ©2000; Reuse and reprint are prohibited.

Zum Zweiten: die Angiogenese, in der durch Aussprossung und Verzweigung aus bereits vorbestehenden Gefäßen neue Gefäße entstehen. Die wesentliche Bedeutung der Angiogenese liegt physiologisch in der Versorgung von neuentstandenen Gewebe beispielsweise im Rahmen der Wundheilung oder des weiblichen Fortpflanzungsapparates. Aber auch „unplanmäßig“ neu entstandenes Gewebe im Rahmen von Tumoren greift auf diesen Mechanismus zurück. Dieser Vorgang wird als Tumorangiogenese bezeichnet. Beide, sowohl die Vaskulo- und als auch die Angiogenese, tragen vor allem zur Bildung der kleineren Gefäße, der Kapillaren bei (Carmeliet 2003).

Zum Dritten ist im Rahmen von größeren Gewebsumbauvorgängen die Arteriogenese zu nennen, also die Entwicklung größerer Gefäße mit vollständiger Architektur aus Endothel, Tunica media und Tunica adventitia (Carmeliet 2003).

### **1.1.1. Physiologische Entstehung von Gefäßen**

Während der embryonalen Phase müssen Blutgefäße de novo gebildet werden. Zu Beginn steht hier die Vaskulogenese aus endothelialen Vorläuferzellen. Diese Angioblasten lagern sich primär zu einem Kapillarplexus zusammen. Durch Ausdifferenzierung bilden sich erste funktionelle Gefäßstrukturen. Aus diesen Strukturen entsteht im Rahmen der Angiogenese durch Aussprossung und Verzweigung ein Kapillarnetzwerk. Während der frühen Phase der Angiogenese dilatieren Kapillaren und zeigen unter dem Einfluß von VEGF bereits erste Lecks. Reicht der angiogenetische Stimulus aus, werden gefäßabdichtende Faktoren wie VE-Cadherin und PECAM überwunden. Endothelzellen verlieren daraufhin ihren dichten Zusammenhalt und beginnen ihre Basalmembran lokal abzubauen. Durch verschiedene Proteasen, vor allem Metallomatrixproteasen (MMPs), wird die extrazelluläre Matrix (ECM) weiter abgebaut. Perizyten, die bisher die Gefäße umgeben und stabilisiert haben, weichen auseinander. Gleichzeitig entsteht durch Extravasation von Plasmaproteinen eine neue provisorische Matrix, die den nun auswandernden Endothelzellen gleichsam als „Kletterhilfe“ dient. Entlang verschiedener Gradienten von proangiogenen Stimuli beginnt nun eine säulenartige Migrationsbewegung der Endothelzellen durch den perivaskulären Raum ins umgebende Gewebe. Dieses Gewebe wird dabei lokal über Proteasen aufgelöst. Über Moleküle wie VEGF, Ang-1 und bFGF wird Proliferation, Migration und schließlich das Zusammenlagern der Endothelzellen vorangetrieben. Zell-Matrix-Rezeptoren aus der Gruppe der Integrine - darunter besonders  $\alpha\beta 3$  und  $\alpha 5$  - sind darüber hinaus an Ausbreitung („Spreading“) und Migration positiv wie negativ regulierend beteiligt (Carmeliet and Jain 2000). Aus diesen entstandenen Migrationssäulen formt sich eine Zone, in der Endothelzellen ihre Form ändern, sich zusammenlagern, wieder differenzieren und schließlich ein neues Lumen bilden. Über weitere Proliferation wird dieses Lumen vergrößert und durch Bildung einer neuen Basalmembran beginnen die neuentstandenen Gefäße auszureifen. Signale wie TGF- $\beta 1$

und Ang1/Tie2 sind dafür verantwortlich, dass diese frühen Kapillaren mit Perizyten und glatten Muskelzellen umgeben werden. Diese Stabilisierung bewirkt eine Reduktion der Proliferationsbereitschaft der Endothelzellen. Die Abhängigkeit der Endothelzellen von Wachstumsfaktoren geht zurück. Über Inhibitoren wie z.B. PAI-1 wird ein weiterer Abbau der ECM verhindert und die neuen Gefäße reifen vollständig aus (Carmeliet and Jain 2000).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Angiogenese einer strikten Regulierung durch eine fein abgestimmte Balance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren unterworfen. Endothelzellen gehören neben Nervenzellen zu den Zelltypen mit der längsten Lebensdauer. Somit hat das Gefäßsystem im erwachsenen Organismus unter physiologischen Bedingungen nur einen geringen Zellumsatz. Ausgedehnte Angiogenese ist deshalb beim erwachsenen Organismus nur in wenigen Organsystemen wie dem weiblichen Fortpflanzungsapparat oder bei Reparaturvorgängen notwendig.

### **1.1.2. Die Tumorangiogenese**

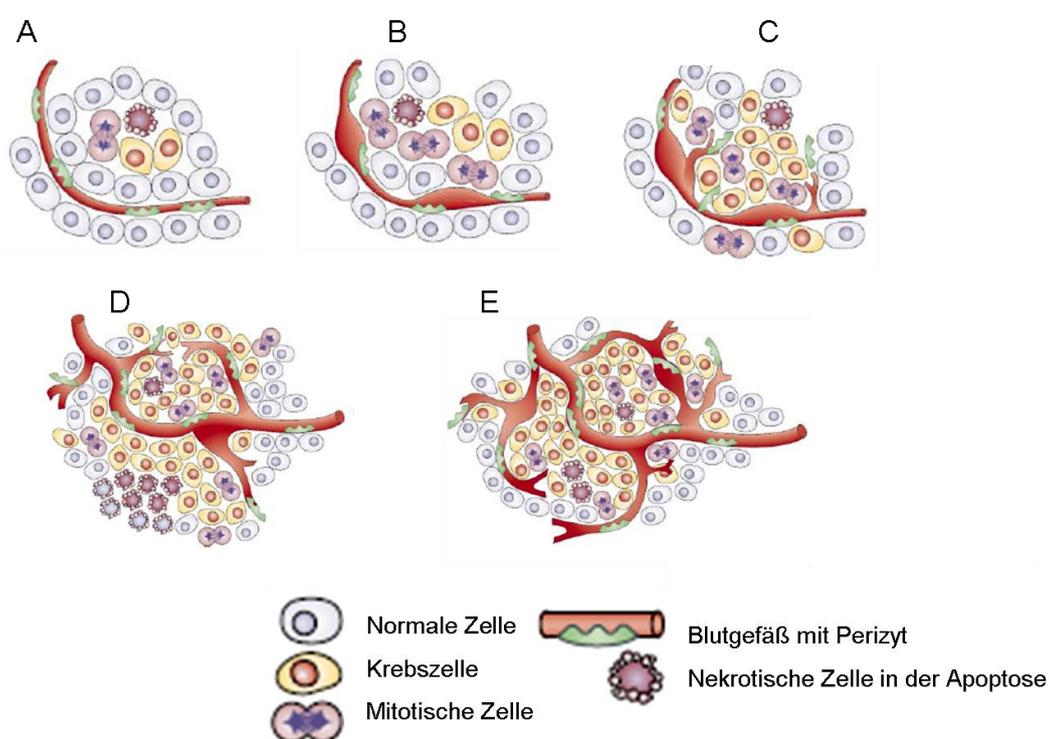
Wie normales Gewebe benötigen auch Tumore eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie einen effektiven Weg, ihre Stoffwechselmetabolite zu entsorgen (Abb. 2). Auch für Tumorzellen gilt die Grenze der Diffusionsfähigkeit dieser Moleküle von ein bis zwei Millimeter, bzw. 150 Mikrometer für Sauerstoff. Daher ist es für jeden soliden Tumor essenziell wichtig, diese Versorgung sicherzustellen (Hanahan and Weinberg 2000). Mit Ausnahme weniger solider Tumore, die kooptiv (Bergers and Benjamin 2003), also entlang vorbestehender Gefäße, wachsen können, ist tumorinduzierte Neoangiogenese ein wesentlicher Schritt für weiteres Größenwachstum. Ein Gefäßnetzwerk trägt außerdem im Falle von bösartigen Tumoren zur Fähigkeit der Metastasierung bei. Das Erlangen der Fähigkeit, durch den Tumor Angiogenese zu initiieren, wird „angiogenic-switch“ genannt.

### **1.1.3. „The Angiogenic-Switch“**

Dieser entscheidende Schritt passiert abhängig vom Tumortyp und dessen Umgebung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Prämaligene Läsionen oder Präkanzerosen gewinnen durch die Fähigkeit zur Neovaskularisation deutlich an Malignität. Als Auslösefaktoren für eine eigenständige Gefäßbildung konnte eine Vielzahl von Faktoren identifiziert werden. Zu den bekanntesten und am besten untersuchten Faktoren zählen metabolische Stressfaktoren wie niedriger Sauerstoff-Partialdruck (Vaupel and Harrison 2004), ein niedriger pH-Wert oder lokale Hypoglykämie, aber auch mechanischer Stress durch die wachsende Tumormasse (Carmeliet 2003). Zu den entscheidenden Regulatoren der Antwort auf hypoxischen Stress zählt hier der Transkriptionsfaktor HIF-1. Die über HIF-1 vermittelte vermehrte Transkription proangiogener Faktoren trägt entscheidend zum „angiogenic-

switch“ bei. Nicht nur Hypoxie, sondern auch Mutationen in verschiedenen Onkogenen führen zur Aktivierung von HIF-1. Unter HIF-1-Einfluss wird über die Bindung von HRE die Transskription von VEGF und VEGFR-1 direkt aktiviert (Liao and Johnson 2007). Ebenso können Ereignisse im Zusammenhang mit Entzündungsvorgängen Angiogenese initiieren. Auch das Tumorgewebe selbst kann als möglicher Stimulus gesehen werden.

Über „gain-“ oder „loss-of-function“, die Aktivierung von Onkogenen oder die Deletion von Tumor-Suppressor-Genen kann die Bildung neuer Gefäße initiiert werden. Tumorzellen können selbst die Fähigkeit entwickeln, die ansonsten gut regulierte Balance der aktivierenden und inhibierenden Faktoren zu stören (Bergers and Benjamin 2003). Die im Vergleich zu den inhibierenden Molekülen vermehrte Expression aktivierender Stimuli wie



**Abb.2 \***

### **Tumorangio-genese und „angiogenic switch“**

Die meisten Tumore wachsen anfangs aus avaskulären kleinen Zellhaufen (A) heran. Wenn ein Gleichgewicht aus proliferierenden und apoptotischen Zellen erreicht ist, muss für weiteres Wachstum Neoangiognese, der sog. „angiogenic switch“, initiiert werden. Dieser Schritt beginnt mit dem Umbau der perizellulären Strukturen und einer Gefäßdilatation (B). Als nächstes folgt das Aussprossen von Endothelzellen (C) und die Formung und Ausreifung der neuen Gefäße (D). Der Reifeprozess ist abgeschlossen, sobald Perizyten und neugebildete perizelluläre Strukturen die Gefäße umgeben (E).

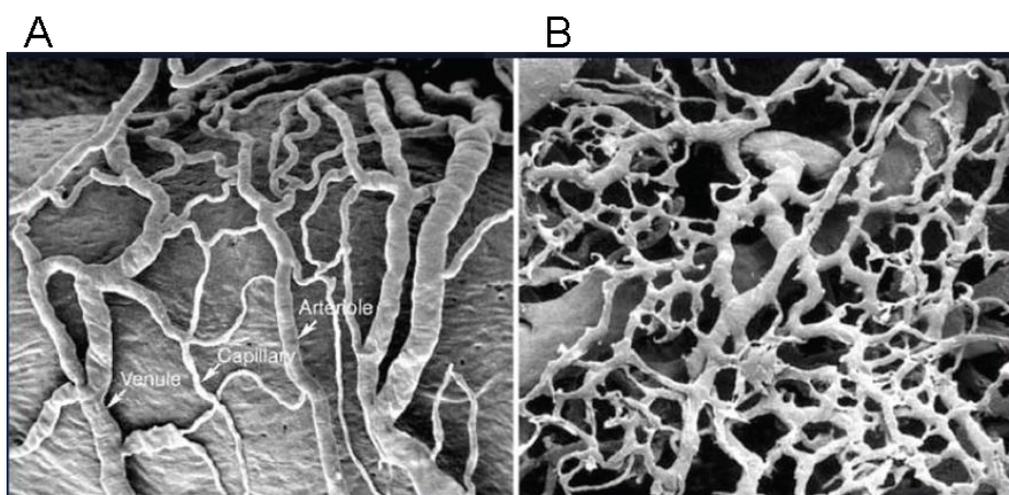
Abbildung modifiziert nach: Bergers et al. 2003 (Bergers and Benjamin 2003)

Reprinted by permission from Macmillan Ltd.: *Nat Rev Cancer* 3(6): 401-10 ; ©2003; Reuse and reprint are prohibited.

VEGF und FGF scheint in vielen Tumoren eine entscheidende Rolle zu spielen. In anderen Tumoren wiederum konnte eine unphysiologisch niedrige Expression von endogenen Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin-1 oder  $\beta$ -Interferon nachgewiesen werden. Hierzu sind zwei Beispiele für bekannte genetische Regulationsmechanismen anzuführen: Zum einen konnte gezeigt werden, dass Thrombospondin-1 über das Tumorsuppressorgen p53 reguliert wird. Der Verlust von p53, der mit der Entstehung von Tumorarten wie dem Kolonkarzinom assoziiert ist, führt zu einem ausgeprägten Angiogenesepotenzial (Teodoro, Evans et al. 2007). Zum anderen führt eine Aktivierung des bekannten ras-Onkogen zu einer vermehrten Expression des proangiogenen VEGF (Bergers and Benjamin 2003).

Die Regulation von Proteasen stellt eine andere wesentliche Dimension bei der Fähigkeit zur Angiogenese dar. Proteasen spielen nicht nur beim Abbau der extrazellulären Matrix als Voraussetzung der Invasionsfähigkeit, sondern auch für die Aktivierung und Modifikation von Wachstums- und Inhibierungsfaktoren eine Rolle. So können angiogene Stimuli wie das basische FGF, die sonst in der ECM gebunden sind, durch proteolytische Aktivität freigesetzt werden.

Die Störung der Balance und das Wachstum außerhalb physiologischer Kontrollmechanismen bedingen jedoch einige Besonderheiten der Tumorgefäße.



*Physiologische Gefäßarchitektur*

*Neovaskularisation im Tumor*

**Abb. 3 \***

**Physiologische Gefäße (A) unterscheiden sich strukturell von Tumorgefäßen (B).** Sie zeichnen sich durch unregelmäßige Lumina eine in sich verwundene, verdrehte und chaotische Architektur und eine erhöhte Dichte von qualitativ schlechten Gefäßen aus. Elektronenmikroskopische Aufnahme

Abbildung entnommen aus: McDonald DM 2003 (McDonald and Choyke 2003)

Reprinted by permission from Macmillan Ltd.: *Nat Med* 9(6): 713-25., ©2003; Reuse and reprint are prohibited.

#### **1.1.4. Tumorgefäßmorphologie**

Die Architektur von Tumorgefäßen unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell von der der physiologisch entstandenen Gefäße (Abb. 3). Tumorgefäße sind unregelmäßig geformt, sie sind zum Teil weit dilatiert oder haben wechselnde Durchmesser. Des Weiteren können sie in sich verdreht und abnormal gewunden sein. Einige Gefäße verzeigen sich in hohem Maße, bilden „shunts“ oder enden blind. Auch höhere Organisationsformen wie Venolen, Arteriolen und echte Kapillarstrukturen finden sich nur chaotisch verteilt oder fehlen teilweise ganz (McDonald and Choyke 2003). Aufgrund fehlender Kontrollmechanismen findet sich eine stark erhöhte Gefäßdichte. Tumorgefäße reichen jedoch qualitativ meist nicht an normale Gefäße heran. Oftmals finden sich Leckagen oder paravasale Hämorrhagien (McDonald and Choyke 2003). Diese Leckagen, die im Initialstadium der Angiogenese erwünscht sind, könnten auf der anhaltenden Überproduktion von VEGF im Tumor beruhen. Perizyten liegen in einem eher lockeren, unorganisierten Verband um die neuen Gefäßformationen und können somit ihre stabilisierende Funktion nur eingeschränkt wahrnehmen. Sogar primäre Tumorzellen können die Perizyten durchsetzen oder direkt in die gefäßauskleidende Endothelzellschicht eingelagert sein. Ein geordneter Blutfluss ist oftmals nicht nachzuweisen. Der Blutfluss in Tumorgefäßen kann stark verlangsamt oder gar oszillierend sein. Außerdem finden sich aber auch Zonen mit ausgeprägter Thrombosierung. Dieser insuffiziente Blutfluss führt wiederum zu Regionen mit Hypoxie oder niedrigen pH-Werten sowie erhöhter Apoptose- und Nekroserate. Hieraus erwächst ein erneuter Stimulus für Neoangiogenese, sodass ein Kreislauf entsteht (Carmeliet and Jain 2000; Bergers and Benjamin 2003; Carmeliet 2003).

#### **1.1.5. Endothelzell-Überleben und -Apoptose in der Angiogenese**

Während der Angiogenese wechselt das Gleichgewicht aus pro- und antiangiogenen Stimuli ständig. Besonders zum Abschluss hin bekommen die Gegenregulatoren ein Übergewicht. Diese letzte Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass vor allem Endothelzellen, die nicht vollständig ausreifen konnten oder keine Überlebensstimuli via Integrine und extrazellulärer Matrix bekommen, über Apoptose eliminiert werden. Diese Phase wird als „vascular pruning“ bezeichnet (Stupack and Cheresh 2003).

Endothelzellen sind im Allgemeinen während der Angiogenese deutlich anfälliger für Apoptose. Ihr Überleben ist strikt an das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren und Molekülen der extrazellulären Matrix gebunden (Brooks, Montgomery et al. 1994). Dafür bedarf es der ständigen de-novo-Synthese von Proteinen, der Umstrukturierung vorhandener Proteine mittels Proteasen oder Stimuli aus dem Plasma. Zu diesen Stimuli zählen Wachstumsfaktoren wie VEGF, Zell-Matrix-Kontakte, die von Integrinen vermittelt werden, und Zell-Zell-Kontakte, die von Rezeptoren wie dem vaskuloendothelialen (VE)-

Cadherin und dem „platelet endothelial cell adhesion molecule“ (PECAM)-1 / CD31 vermittelt werden (Pollman, Naumovski et al. 1999; Segura, Serrano et al. 2002). Fehlen diese Stimuli oder werden sie unterdrückt, erfolgt als Konsequenz Apoptose (Keshet and Ben-Sasson 1999).

Der Grund dieser Anfälligkeit für apoptotische Stimuli liegt in der Aktivierung einer Reihe von Genen, der sogenannten „homebox (Hox) master genes“. Zu Beginn der Angiogenese wird über Hox3D nachfolgend die Expression von unter anderem  $\alpha\text{v}\beta_3$ , MMPs und uPa verstärkt (Boudreau, Andrews et al. 1997). Via Hox3B werden die Entstehung von Lumina und das Ausreifen der Gefäße gesteuert. Gleichzeitig werden Endothelzellen als Reaktion auf die Hox-3B-Expression in dieser Phase aber auch besonders anfällig für Apoptose-Stimuli (Myers, Charboneau et al. 2000). Ruhende Endothelzellen exprimieren dagegen HoxD10, welches antagonistisch zu beiden, Hox3D und Hox3B, wirkt und so für die ausgeprägte Stabilität und Langlebigkeit von ruhenden Endothelzellen sorgt (Myers, Charboneau et al. 2002).

## **1.2. Tumorendothel und Therapie**

Mittels der bereits beschriebenen Gene werden Wachstum, Migration, Differenzierung und das Überleben über die Expression dafür nötiger Proteine geregelt. In ruhenden Endothelzellen hingegen werden diese Gene unterdrückt. Die Identifizierung und Charakterisierung von Genen und Proteinen, die selektiv in Bereichen mit Angiogenese zu finden sind, birgt eine Chance auf neue Diagnostik- und Therapieansätze für Erkrankungen, bei denen eine Unterdrückung der Angiogenese und Neovaskularisation wünschenswert ist. Neben chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), rheumatischen oder ophtalmologischen Erkrankungen wie der feuchten Makuladegeneration sind an erster Stelle bösartige Neoplasien zu nennen.

Tumorgefäße als Zielstrukturen für Diagnostik und Therapie eröffnen Möglichkeiten für neue selektive Therapieansätze. Eine Reihe von Schwierigkeiten in der onkologischen Therapie könnte umgangen werden, wenn Tumorendothel als Ziel anvisiert wird. Zum einen behindert ein hoher onkotischer Druck, der oftmals in Tumorphenchym zu finden ist, die Aufnahme von Tracern und Therapeutika ins Tumorgewebe. Zum anderen ist das Tumorphenchym oftmals genetisch heterogen oder instabil. Dadurch ändert sich häufig das biologische Profil, wodurch einzelne Subklone und erworbene Resistenzmechanismen selektiert werden (Molema 2002; Nanda and St Croix 2004).

Seit den 1970er Jahren wird versucht, Tumorgefäße und Neoangiogenese als Angriffspunkt im Kampf gegen Tumore auszunutzen (Molema 2002). Die Identifizierung von Molekülen und Markern, die spezifisch in der Tumor-Neovaskulatur exprimiert werden, könnte ein Spektrum an Möglichkeiten bieten, dieses fragile Fundament von Tumoren effektiv zu stören.

Die genetische Stabilität und die direkte Zugänglichkeit für Pharmaka - ohne das Problem des interstitiellen Drucks - machen Endothelzellen zu idealen Angriffspunkten (Rosen 2000). Jedoch ist, wie beschrieben, Tumorangio-genese ein höchst komplexes, heterogenes Geschehen, das in einem steten Wandel begriffen ist. Sie beinhaltet Endothelzellen, die in verschiedenen Aktivierungsgraden vorkommen - sowohl in gerade entstehenden wie auch in bereits vollständig ausgebildeten Gefäßen. Tumoren an sich stellen sich genauso heterogen dar. Hier wechseln Regionen mit ausgedehnter Apoptose und Nekrose mit ruhenden oder hochproliferierenden Arealen. Daneben finden sich Abschnitte mit hoher Gefäßdichte und Angiogenesefähigkeit ebenso wie Orte mit ausgeprägter Hypoxie (Molema 2002). Diese heterogenen und komplexen Verhältnisse verdeutlichen die Problematik, Tumore durch Angiogenesehemmung zu behandeln.

Zwei Ansätze zur antiangiogenen Therapie sind vorstellbar:

Erstens werden in der klinischen Routine Strategien eingesetzt, die direkt die Funktion von Endothelzellen während der Angiogenese hemmen und die Angiogenese damit an sich unterbinden sollen. Dazu zählen die Störung der zellulären Signalwege über den VEGF-Rezeptor oder den bFGF-Rezeptor (Rosen 2000). Greifbar klinische Fortschritte in größerem Umfang wurden bereits mit VEGF-Rezeptor-blockierendem Antikörpern sowohl in der Onkologie - wie im Falle des metastasierten Colon-Karzinoms (Bevacizumab; Avastin®) (Ruegg and Mutter 2007) - als auch in der Ophthalmologie bei der durch pathologische Neoangiogenese bedingten, feuchten Makuladegeneration nachgewiesen. Außerdem wird auf die Migration der Endothelzellen durch Hemmung von Proteasen eingewirkt. Die Interaktion mit der extrazellulären Matrix über z.B.  $\alpha v \beta 3$ -Inhibitoren dient als weiterer Angriffspunkt (Rosen 2000). Ziel all dieser Ansätze ist zum einen die Gefäßbildung zu blockieren. Zum anderen tragen solche Methoden dazu bei, neu entstandene Blutgefäße zu stabilisieren oder sie weiter auszureifen (Jain 2005). Dadurch werden Tumoren oftmals wieder sensibler für Chemo- und Radiotherapie, umso mehr, da Hypoxie einen wichtigen Faktor für das Ansprechen einer Radiotherapie darstellt (Vaupel and Harrison 2004; Artman, Schilling et al. 2010).

Um angiogenetische Vorgänge langfristig zu inhibieren, müssen antiangiogene Substanzen über einen sehr langen Zeitraum (z.T. auch metronomisch) verabreicht werden. Dies führt unweigerlich auch zu unerwünschten Wirkungen am „gesunden“ Endothel.

Ein zweiter Ansatz zielt direkt auf Tumorendothelzellen („vascular targeting“) ab. Diese sollen direkt angegriffen und vernichtet werden. Der kritische Punkt liegt dabei in der Identifizierung von geeigneten Zielstrukturen (Molema 2002; Nanda and St Croix 2004).

Verschiedene Vorgehensweisen sind dafür in Erprobung. Von bakteriellen Toxinen ist seit langem bekannt, dass sie Endothel angreifen. Auch Zytostatika wie Doxorubicin wirken auf

das Endothel. Diese Effekte sind jedoch unspezifisch und somit mit vielen unerwünschten Wirkungen behaftet.

Via „phage display“ wurde das RGD-Motiv als Ligand für Integrine und insbesondere für das nahezu selektiv in angiogenen Endothelzellen vorkommende  $\alpha v \beta 3$ -Integrin identifiziert. Dieser Ligand und sein Rezeptor bilden eine gute Grundlage für gezielte Diagnostik und Therapie. RGD-Peptide können mit toxischen Pharmaka (wie Doxorubicin) oder mit radioaktiven Stoffen gekoppelt werden und so ihre toxische Wirkung sehr gezielt erreichen (Molema 2002).

Zweck der verschiedenen Forschungsansätze ist es, weitere Zielstrukturen zu finden. Diese könnten mit monoklonalen Antikörpern, Peptiden oder kleinen organischen Molekülen, die an tumorendothel-spezifische Oberflächenmarker binden, interagieren. Hier könnten sie einerseits - wie bereits beschrieben - antagonistisch wirken. Andererseits können nichtantagonistische Liganden, an zytotoxische Substanzen oder Radionuklide gekoppelt, für die Therapie und Diagnostik von Tumoren eingesetzt werden. Die gezielte Zerstörung des Tumorendothels sollte die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen unterbrechen und zur Regression des Tumors führen.

#### **1.2.1. Tumorendothelmarker: die TEMs**

Viele Arbeitsgruppen haben sich dem Thema gewidmet, geeignete Zielstrukturen zu finden. Über in-vivo-Selektion von phagen-präsentierten Peptid- und cDNA-Banken, über proteomische Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese, DNA-Mikroarrays und „differential display“ und „serial analysis of gene expression (SAGE)“ konnten einige Strukturen identifiziert werden (St Croix, Rago et al. 2000; Ruoslahti 2002; Nanda and St Croix 2004). Eine Gruppe um St Croix, Kinzler und Vogelstein konnte im Jahre 2000 mittels SAGE 46 Gene in Endothelproben, die hochgradig rein aus Kolonkarzinomen isoliert wurden, identifizieren. Diese Gene wurden im Endothel des Tumors signifikant höher exprimiert als im zum Vergleich herangezogenen „Normalendothel“ (Carson-Walter, Watkins et al. 2001). Neun dieser Gene waren bisher nur über ihre Sequenz bekannt und wurden als Tumor Endothel Marker (TEM) 1 bis 9 bezeichnet. Weitere Analysen konnten zeigen, dass diese neun TEMs hoch charakteristisch für das Tumorendothel von Kolonkarzinom-Patienten waren. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich sowohl für diverse andere Tumore als auch für Lebermetastasen (Nanda and St Croix 2004). Die Expression von TEM7 wurde außerdem in primären Sarkomen und Pankreas- und Mammakarzinomen nachgewiesen (St Croix, Rago et al. 2000). Mit Ausnahme von TEM8 konnte für die anderen TEMs ebenfalls eine erhöhte Expression bei physiologischen Angiogenesevorgängen wie z.B. der Wundheilung oder der Gelbkörperreifung (Corpus luteum) im Ovar nachgewiesen werden.

Aus biologischer wie klinischer Sicht erscheinen TEMs, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, von besonderem Interesse. Aufgrund von Hydrophobie-Assays und

Antikörperfärbungen konnten die TEMs 1, 5, 7 und 8 als membranständig identifiziert werden (Nanda and St Croix 2004). Diese TEMs sollten am ehesten für diagnostische und pharmakologische Ansätze zugänglich sein und erscheinen daher theoretisch ideal geeignet.

Bevor man jedoch einen Einsatz in der anwendungsorientierten Forschung oder gar in der Klinik erwägen kann, sind grundlegende Tatsachen zu klären.

Werden die TEMs tatsächlich nur im Tumorendothel hochgradig exprimiert oder gibt es weitere, bisher unbekannte physiologische Funktionen? Werden sie in allen vaskularisierten Tumoren exprimiert und werden sie dort in perfundierten Gefäßen exprimiert? Werden sie wirklich nur auf der Zelloberfläche exprimiert? Gibt es Modifikationen, die auf Proteinebene ablaufen? Sind lösliche TEMs oder Teile von ihnen in der Lage als Tumor-„homing“-Moleküle zu fungieren?

### **1.2.2. TEM 1, 7 und 8**

Ein Protein analog zu TEM1 wurde bereits 1990 gefunden und als Endosialin bezeichnet. Mittels eines Antikörpers gegen Endosialin konnte gezeigt werden, dass TEM1 selektiv in Tumorgefäßen exprimiert wurde (Christian, Ahorn et al. 2001). Bislang konnte zwar kein Ligand für TEM1 beschrieben werden, es weist jedoch einige strukturelle Ähnlichkeiten mit dem bekannten thrombin-bindenden Thrombomodulin auf. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass Antikörper, die an TEM1 binden, mit diesem zusammen endozytiert werden, was wiederum interessante therapeutische Möglichkeiten bieten könnte (Nanda and St Croix 2004).

Lange war die Rolle von TEM7 wie auch seine Bindungspartner unklar. Inzwischen konnte zumindest das zytoskelett-assoziierte Protein Cortactin als Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne von TEM7 identifiziert werden, wobei allerdings die Bedeutung der Interaktion nicht aufgeklärt ist. Auch Nidogen, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, kann als Bindungspartner fungieren. In diesem Falle wird zumindest ein vermehrtes Ausbreiten („spreading“) von Zellen beobachtet (Nanda and St Croix 2004).

TEM8 ist der am besten untersuchte Vertreter der TEMs. Bis heute wurde eine physiologische Expression außerhalb von Tumoren nicht nachgewiesen, jedoch konnte gezeigt werden, dass TEM8 als Rezeptor für Anthrax-Toxin fungiert (Duesbery, Resau et al. 2001). Diese Interaktion könnte die seit langem bekannte erstaunliche Wirkung von Anthrax-Toxin auf das Tumorstadium und insbesondere auf deren Angiogenesefähigkeit erklären. Man konnte zeigen, dass das maligne Melanom neben den weiter oben beschriebenen Tumorentitäten ebenfalls hoch expressiv für TEM8 ist (Koo, VanBrocklin et al. 2002; Nanda and St Croix 2004; Cullen, Seaman et al. 2009).

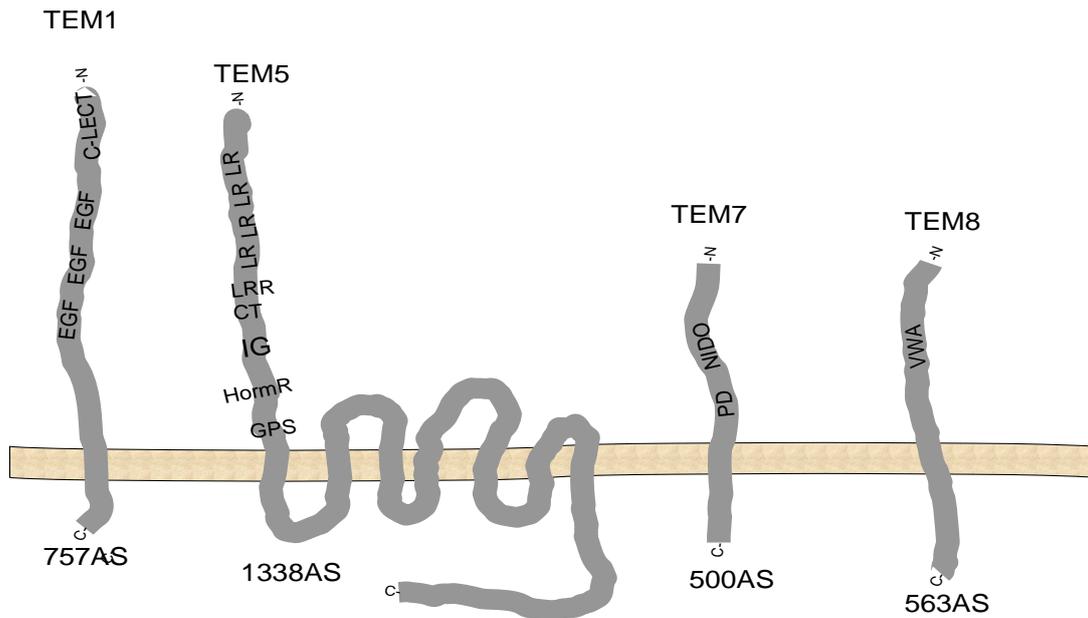


Abb.4

Schematische Darstellung von TEM1, 5, 7 und 8. Alle vier TEMs besitzen Transmembrandomänen, über die sie in der Zellmembran verankert sind. Im Gegensatz zu den drei übrigen TEMs durchspannt TEM5 jedoch die Zellmembran siebenmal („seven-pass-transmembrane-domain“). Am Beginn des extrazellulären Abschnitts von TEM5 befindet sich eine GPS, an der der extrazelluläre Anteil abgespalten werden kann. Das RGD-Motiv befindet sich in der Hormon-Rezeptor-Domäne (HormR).

Die weiteren Domänen der TEMs: C-LECT: C-Lectindomäne; EGF: „epidermal growth factor“-Domäne; LR: „leucin-rich repeat“; LRRCT: „leucin-rich-repeat“-C-Terminus; IG: Immunglobulindomäne; HormR: Hormonrezeptordomäne; GPS: „G-Protein-gekoppelter Rezeptor“-Proteolysestelle; NIDO: Nidogendomäne; PD: Plexindomäne; VWA: von-Willebrandfaktor-A-Domäne.

Abb. erstellt nach: Nanda 2004 (Nanda and St Croix 2004)

### 1.2.3. TEM 5

TEM5 gehört aufgrund von Sequenzanalysen zur Gruppe der Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren („G-protein-coupled receptors“, GPCRs). Diese große Familie von Rezeptoren ist gewöhnlich an der Signalübermittlung an die Zelle („cell signaling“) beteiligt. Ihre Mitglieder können mit einer großen Zahl von Liganden, darunter auch Peptiden, Lipiden und auch Photonen, interagieren (St Croix, Rago et al. 2000; Nanda and St Croix 2004). Bei nahezu der Hälfte aller aktuell auf dem Markt verfügbaren Medikamente spielen GPCRs im Wirkungsmechanismus eine Rolle (Im 2002). Als GPCR besitzt TEM5 eine alpha-helikale „Seven-Pass-Transmembrane-Domain (TMD)“. Da TEM5 des Weiteren einen ungewöhnlich langen extrazellulären N-Terminus aufweist, gehört es in die Untergruppe der „LNB-TM7-family“ der GPCRs. Der N-Terminus von TEM5 besitzt einige strukturelle Domänen, die eine Funktion als Liganden bindender Rezeptor mit Fähigkeit zur

Signaltransduktion wahrscheinlich machen. Diese speziellen extrazellulären Abschnitte von TEM5 bestehen aus mehreren konservierten Subdomänen: einer „leucine-rich-repeat“ (LRR)-Domäne mit vier LRRs und einem LRR-C-Terminus, einer Immunglobulindomäne (IG), einer Hormonrezeptordomäne (HormR) und einer GPCR-Proteolysestelle (GPS) nahe an der Zellmembran (Nanda and St Croix 2004). Diese konservierten Domänen sind typisch für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Bjarnadottir, Fredriksson et al. 2004). Die GPS kann dafür verantwortlich sein, dass der extrazelluläre Teil eines GPRC abgespalten werden kann. Dies konnte für den strukturell mit TEM5 verwandten Brain-angiogenesis-inhibitor 1 (BAI-1)“ gezeigt werden (Nanda and St Croix 2004). Unserer Arbeitsgruppe gelang es zudem, diese proteolytische Spaltung für TEM5 ebenfalls nachzuweisen (Vallon and Essler 2006). Intrazellulär besitzt TEM5 am C-Terminus eine PDZ-Domänen-Bindungsstelle mit der Sequenz ETTV. Über diese Domäne kann TEM5 an hDlg („human-homologue-of-the-Drosophila-disc-large) binden (Yamamoto, Irie et al. 2004). Über solche Bindungen werden Verbindungen zwischen Zytoskelett und Membranproteinen hergestellt.

#### **1.2.4. Aktueller Stand der TEM5-Forschung**

Im Folgenden werden die Ergebnisse meiner Arbeitsgruppe, die nicht Teil meines Projekts waren, vorgestellt. Sie wurden vor Beginn und auch noch während des Abfassens dieser Arbeit generiert und publiziert. Die Expression von TEM5 wird nicht durch die bekannten löslichen proangiogenen Faktoren wie VEGF oder bFGF positiv beeinflusst. Es kann jedoch experimentell in Endothelzellen während der „capillary-like network formation“ auf Matrigel, während der „capillary morphogenesis“ in einer dreidimensionalen Kollagen-I-Matrix oder bei Eintritt der Konfluenz in einer zweidimensionalen Matrix eine Hochregulation von TEM5 gesehen werden. Durch verschiedene Inhibitionsversuche wurde gezeigt, dass TEM5-Expression durch die GTPase Rac induziert wird (Vallon, Rohde et al. 2010).

Wie schon erwähnt, kann TEM5 in Endothelzellen während der In-Vitro-Angiogenese intrazellulär an GPS gespalten werden. Durch diese Proteolyse werden teilweise nicht-kovalent verbundene TEM5-Fragmente an die Zelloberfläche transloziert. Gleichzeitig werden auch lösliche Anteile von TEM5-ECD (=sTEM5) produziert (Vallon and Essler 2006).

Wird dieses TEM5-ECD-Fragment oder ein inhibierender monoklonaler Antikörper gegen TEM5 im Überschuss zu Endothelzellen gegeben, so verhindern sie die endogene Kontaktinhibition der Zellen. Hieraus resultieren mehrschichtige Zellinseln in ansonsten einschichtigen Zellverbänden. Die Gefäßdichte nimmt bei Kapillarformations-Assays außerdem signifikant zu (Vallon, Rohde et al. 2010). In Bindungsstudien konnte bewiesen werden, dass TEM5-ECD (sTEM5) mit verschiedenen Glykosaminoglykanen interagiert.

Abgleichende Sequenzanalysen und funktionelle Studien haben gezeigt, dass TEM5-ECD eine RGD-Bindungsstelle besitzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Integrin  $\alpha\beta 3$  mit diesem RGD-Motiv interagieren kann. Prozessierungsversuche lieferten erste Anhaltspunkte dafür, dass diese RGD-Bindungsstelle „kryptisch“ ist, d.h. dass sie erst durch proteolytische Spaltung aktiviert wird. Im Vergleich zu unprozessierter TEM5-ECD vermittelte das MMP9-prozessierte TEM5 (TEM5-N80=ppsTEM5) deutlich mehr Endothelzelladhäsion durch direkte Interaktion mit Integrin  $\alpha\beta 3$ . Die Interaktion des TEM5-N80-Fragments mit Integrin  $\alpha\beta 3$  vermittelte neben Adhäsion auch Überleben von wachstumsfaktordeprivierten Endothelzellen (Vallon and Essler 2006).

## 2. Ziel der Arbeit und Fragestellung

TEM5 könnte in der Bildgebung der Angiogenese, als Zielstruktur für selektive Therapien in vivo oder als prognostischer Tumormarker in der translationalen Forschung von Bedeutung sein. Es sind jedoch viele grundlegende einzelne Schritte nötig, um vom theoretischen Konzept zur praktisch, klinischen Anwendung zu kommen. Viele Aspekte zur Biologie von TEM5 wurden bereits geklärt. Die extrazellulären Strukturen jedoch, die primärer Ansatzpunkt einer gezielten Herangehensweise sein könnten, weisen jedoch noch viele Unklarheiten, aber auch Erfolg versprechende Möglichkeiten auf. Ziel dieser Arbeit ist es, Modifikationen der extrazellulären Anteile von TEM5 zu untersuchen und deren Funktion näher zu charakterisieren. Im Speziellen sollten vor allem mögliche Prozessierungen des extrazellulären N-Terminus und die Auswirkungen auf die Funktion des kryptischen RGD-Motivs in TEM5 näher beleuchtet werden.

Die Fragestellung dieser Arbeit gestaltete sich dabei dreigliedrig.

Zum Ersten sollten weitere mögliche Fragmente von TEM5 identifiziert werden und die dabei verantwortlichen Gruppen von Proteasen untersucht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, die Gruppe weiter zu spezifizieren und dadurch eine mögliche verantwortliche Protease einzugrenzen.

Als zweite Fragestellung ergab sich, abhängig von der gefundenen Protease, die Identifikation der exakten Schnittstelle innerhalb von TEM5. Bei dieser Fragestellung konzentrierte sich das Interesse - unter Berücksichtigung der bereits veröffentlichten Daten zu TEM5 (Vallon and Essler 2006) - besonders auf die Lage der Spaltstelle in Bezug auf das RGD-Motiv.

Zum Dritten sollte die Funktion der proteolytischen Modifikationen über mögliche biologische Funktionen der gefundenen Fragmente entschlüsselt werden. Auch hier sollte der Fokus besonders auf der Interaktion des RGD-Motivs mit Integrinen wie  $\alpha\beta 3$  liegen.

### 3. Biologische Grundlagen dieser Arbeit

#### 3.1. Integrine und das RGD-Motiv im Rahmen der Angiogenese

Integrine stellen eine Familie von membranständigen, dimeren Rezeptoren dar, die aus nicht-kovalent gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gebildet werden. Die extrazellulären Anteile der Integrine interagieren mit einem weiten Spektrum von Liganden. Dazu gehören die Glykoproteine der extrazellulären Matrix (ECM), Komplementfaktoren oder andere Zellen. Intrazellulär haben Integrine Kontakt zum Zytoskelett. Anders als die meisten anderen Rezeptoren besitzen Integrine aber keinerlei enzymatische Aktivität. Ihr intrazellulärer Anteil dient quasi als Anker zur Ansammlung von Proteinkomplexen. Über diese Anker können feste Verbindungen zum Zytoskelett bereitgestellt werden. Werden diese Integrine durch feste Bindung an Liganden der ECM aktiviert, so kommt es - vermittelt über G-Proteine wie Rho - zu festen fokalen Verbindungen, den „focal adhesions“. Nur diese so fixierten „focal

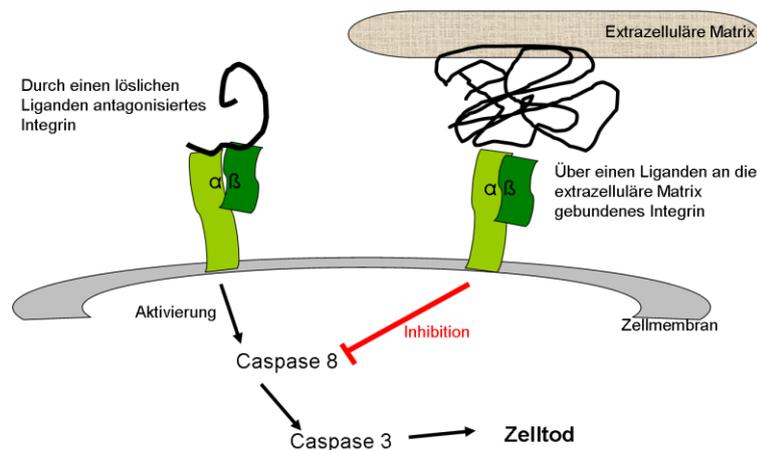


Abb. 4

Modell integrinvermittelter Apoptosemechanismen in Endothelzellen. Je nach Ligationsstatus von Integrinen wie  $\alpha v \beta 3$  kann Caspase 8 und dadurch untergeordnete Apoptosewege durch Integrine inhibiert oder aktiviert werden. Lösliche Liganden können die Integrinfunktion hemmen und den Caspase 8- Weg aktivieren. Binden Zellen jedoch über Integrine und Liganden an die extrazelluläre Matrix, so wird dieser Apoptose-Mechanismus effektiv unterbunden.

Abbildung erstellt nach: Stupack et al. 2003 (Stupack and Cheresch 2003)

adhesions“ besitzen Kinase-Aktivität („focal adhesion kinase“; FAK). Über deren Phosphorylierungsaktivität werden weitere Signaltransduktionswege angeschaltet. Beispielfhaft wird über den MAP-Kinase-Weg die Proliferation nichttransformierter Zellen vorangetrieben. Integrine bewirken weiterhin den Austritt aus dem Zellzyklus und somit die

Differenzierung der Zelle. Ferner ist die Aktivierung von Integrinen und ihrer Signalwege essenziell für das Überleben von adhärenenten Zellen (Löffler G 2003).

Zusammengefasst tragen Integrine, die durch adäquate Liganden aktiviert wurden, zu Migration, Proliferation, Zytoskelett- und Polaritätsorganisation sowie zur Differenzierung und ganz besonders zum Überleben der Zelle bei. Wichtig sind diese Funktionen vor allem für Wundheilung, embryonale Entwicklung, Angiogenese und Tumorwachstum, aber auch bei Blutgerinnung und Immunantwort (Hynes 1987). Ohne integrinvermittelten Kontakt zur ECM oder durch Integrinantagonisierung gehen Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose (Abb. 4), (Stupack and Cheresch 2003). Diese besondere Form der Apoptose wird Anoikis genannt. Entsprechend der wörtlichen Übersetzung aus dem Griechischen bedeutet das, dass sich Zellen anoikos - „nicht zuhause, heimatlos“ - fühlen. Wenn Integrine keinen passenden Liganden finden und somit das entsprechende Signal für „Heimat“ nicht vermittelt wird, so initiieren die unligierten Integrine selbst via Caspase-8-Aktivierung diese Anoikis (Frisch and Screaton 2001; Stupack, Puente et al. 2001)

### 3.1.1. Das RGD-Motiv

Das RGD-Motiv ist ein Peptidmotiv aus drei Aminosäuren: Arginin-Glycin-Aspartat. Es wird in unzähligen Proteinen gefunden. Seine Funktion besteht in der molekularen Interaktion mit seinen spezifischen Rezeptoren, den Integrinen, und zum Teil aus der resultierenden Zelladhäsion (Ruoslahti 1996).

Die Verankerung von Zellen in ihrer Umgebung ist von entscheidender Bedeutung für eine adäquate Zellfunktion und somit auch für die Integrität des gesamten Gewebes. Zellverankerungen, wie sie durch das RGD-Motiv vermittelt werden, tragen zu dieser Funktion bei und senden gleichzeitig Überlebenssignale an die so verankerte Zelle.

Viele Proteine in der ECM wie auch im Blut präsentieren das RGD-Motiv als Bindungsstelle. Zu diesen zählen Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Kollagene, Thrombospondin, Fibrinogen und der Von-Willebrand-Faktor. Integrine fungieren für jedes dieser Proteine als Rezeptoren. Zusammen mit diesen Rezeptoren bildet das RGD-Motiv ein vielseitiges System für Verankerung und gezielte Migrationsbewegung. Es werden dabei Zellpolarität, -position, -differenzierung und -wachstum beeinflusst.

Da viele Integrine potenziell mit RGD-Motiven allein interagieren können, nimmt man an, dass Proteinstrukturen außerhalb der RGD-Sequenz für die Spezifität verantwortlich sein müssen (Ruoslahti and Pierschbacher 1987). Diese Hypothesen gehen davon aus, dass diese sekundären Strukturen mit den  $\alpha$ -Untereinheiten interagieren, während die  $\beta$ -Untereinheit für die Interaktion mit dem RGD-Motiv selbst verantwortlich ist (Takagi 2004).

Experimentell lässt sich die Aktivität von RGD-haltigen Proteinen imitieren, indem mit synthetischen Peptiden gearbeitet wird, die die entsprechende Sequenz enthalten. Werden

in experimentellen Ansätzen diese Proteine auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert, so vermitteln sie Zelladhäsion und Zellüberleben. Werden dieselben Peptide jedoch in Lösung auf einer proteingeblockten Oberfläche präsentiert, so blockieren sie die Zelladhäsion an die Oberfläche durch kompetitive Inhibition.

Des Weiteren sind synthetische RGD-Derivate für Diagnostik und Therapie von Tumoren seit langem in experimenteller wie auch klinischer Erprobung (Ruoslahti 1996).

### 3.1.2. Kryptische RGD-Motive

Kryptisch, abgeleitet vom griechischen κρυπτός, bedeutet verborgen. Bei kryptischen RGD-Motiven handelt es sich um primär nicht offenliegende Proteinstrukturen. Für Proteine wie u.a. Vitronectin (Seiffert and Smith 1997), Thrombospondin (Hotchkiss, Matthias et al. 1998) oder Osteopontin (Senger, Perruzzi et al. 1994) sind kryptische RGD-Motive beschrieben. Durch Konformationsänderungen oder proteolytische Prozessierung können diese Bindungsstellen freigelegt und somit aktiviert werden. Verschiedene Proteasen aus unterschiedlichen Gruppen von Proteasen können diese Freilegung vermitteln. Trotz der Heterogenität dieser Proteasen werden sie in dieser Funktion als Dekryptasen zusammengefasst (Roy, Zhang et al. 2006).

Enzyme wie MMP2 und MMP14 (MT1-MMP) werden als die Haupt-Dekryptasen bei RGD-beinhaltenden Proteinen wie Kollagen IV, Elastin und besonders Laminin-5 beschrieben (Schenk and Quaranta 2003). Für Osteopontin konnte neben MMPs auch Thrombin als Dekryptase beschrieben werden (Smith, Cheung et al. 1996). Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen wie Cathepsin-B oder Aspartat-Proteasen wie Cathepsin-D/E, die an der Degradation der ECM beteiligt sind, werden ebenfalls als potenzielle Dekryptasen vermutet (Roy, Zhang et al. 2006).

Für viele kryptische RGD-Motive konnte gezeigt werden, dass unprozessierte Proteine keine Interaktion, Fragmente derselben Proteine jedoch eine starke Interaktion mit Integrinen eingehen können (Denda, Muller et al. 1998). Ähnliches gilt für kryptische RGD-Bindungsstellen in Kollagen. Während natives Kollagen keine Interaktion über das RGD-bindende Integrin  $\alpha\beta 3$  aufweist, konnte diese Reaktion für denaturiertes Kollagen mehrfach gezeigt werden (Davis, Bayless et al. 2000). Für den ebenfalls ein RGD-Motiv tragenden Tumor-Endothel-Marker 5 (TEM5) konnte nach proteolytischer Prozessierung mit MMP9 im Vergleich zu unbehandeltem TEM5 eine signifikant stärkere Interaktion mit Integrin  $\alpha\beta 3$  nachgewiesen werden (Vallon and Essler 2006).

### 3.1.3. Demaskierung durch MMPs

Die Demaskierung der kryptischen Bindungsstellen unterliegt einer strikten Kontrolle, wodurch besonders sowohl die Expression der Dekryptasen als auch ihre Inhibitoren betroffen sind. Die Familie der MMPs gilt, wie erwähnt, als Hauptgruppe der Dekryptasen.

Beispielhaft für das Zusammenspiel von Proteasen sei die Prozessierung von Laminin 5 genannt (Schenk, Hintermann et al. 2003). Hier führt sowohl die gemeinsame wie auch eine alleinige Prozessierung durch MMP2 und MMP14 (MT1-MMP) zur Freilegung der kryptischen Bindungsstellen. Andere Arbeitsgruppen konnten ein noch breiteres Spektrum an Proteasefamilien, die potenziell Laminin 5 prozessieren können, identifizieren (Veitch, Nokelainen et al. 2003). An diesem Beispiel wird deutlich, dass die Aktivierung von kryptischen Bindungsstellen ein hoch komplexes, mit vielen Redundanzen ausgestattetes System von Aktivierung und Deaktivierung ist. Diese vielseitigen Mechanismen sind noch nicht völlig verstanden (Ruoslahti and Pierschbacher 1987; Davis, Bayless et al. 2000).

#### **3.1.4. Die Rolle der Integrine und der RGD-Motive in der Angiogenese**

Viele Integrine wurden über ihre Fähigkeit an die ECM zu binden identifiziert. So wurde das RGD-Motiv, sei es zugänglich oder kryptisch, zwar nicht als einziger, doch als wichtigster Ligand vieler Integrine identifiziert.

Zu den RGD-bindenden Integrinen gehört  $\alpha\beta 3$ -Integrin. Dieses Integrin spielt eine entscheidende Rolle sowohl bei der physiologischen als auch bei der Tumorangio-genese. Im erwachsenen humanen Gewebe wird Integrin  $\alpha\beta 3$  so gut wie nicht exprimiert. In kleinen Mengen wird es nur im intestinalen Gefäßbett oder in der glatten Muskulatur des Uterus gefunden. Werden jedoch endotheliale Zellen proangiogenen Wachstumsfaktoren ausgesetzt oder im Rahmen von Wundheilung, Entzündung, physiologischer oder tumorbedingter Angiogenese stimuliert, so resultieren daraus hohe Expressionslevel für  $\alpha\beta 3$ . Bisher wurde eine Vielzahl von möglichen Liganden für dieses Integrin beschrieben.  $\alpha\beta 3$ -Integrin dient unter anderem als Rezeptor für Vitronectin, Fibronectin, Thrombospondin, proteolytisch gespaltene Kollagenfragmente, von-Willebrand-Factor und für Osteopontin (Hynes 2002). Auch für das in dieser Arbeit untersuchte Protein TEM5 dient  $\alpha\beta 3$  als Rezeptor (Vallon and Essler 2006).

Als Integrin spielt es, wie bereits erwähnt, eine entscheidende Rolle für Migration, Proliferation und Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese. Ob jedoch das  $\alpha\beta 3$ -Integrin diese essenziellen Funktionen als positiver oder negativer Regulator erfüllt, ist umstritten. Blockt man die  $\alpha$ -Integrine mit monoklonalen Antikörpern oder mit inhibierenden RGD-haltigen-Peptiden, so treten in verschiedenen Tiermodellen Störungen in der Blutgefäßbildung auf (Brooks, Clark et al. 1994). Diese Antagonisten stören Wachstum und Ausreifung neuer Blutgefäße, während schon bestehende Gefäße davon aber nicht berührt werden. Auch in verschiedenen Tumormodellen wurde eine Reduzierung der Tumorangio-genese und ein Rückgang der Tumormasse beobachtet (Brooks, Clark et al. 1994; Eliceiri and Cheresch 1999). Auf Basis dieser Beobachtungen wurden humanisierte Versionen der monoklonalen Antikörper (Vitaxin®) entwickelt, die sich in klinischen Tests befinden (Gutheil, Campbell et al. 2000).

Die Annahme, dass physiologische Angiogenese und Tumorangiogenese strikt an funktionierende  $\alpha\beta$ 3-Integrine gebunden sind, konnte jedoch widerlegt werden (Reynolds, Wyder et al. 2002).

Verschiedene Versuche mit Knock-out-Mäusen zeigten, dass das Ausschalten der  $\alpha$ -Integrine und auch verschiedener  $\beta$ -Untereinheiten entweder gar keinen Einfluss oder sogar noch verstärkende Wirkung auf die Angiogenese der Versuchstiere hatte. Tiere ohne  $\alpha$ -Integrine zeigten erstaunlicherweise eine sehr starke Angiogenese. Richard O. Hynes brachte 2002 (Hynes 2002) im Gedankenexperiment die Hypothese ins Spiel, dass die oben erwähnten, mit dem Ziel der Blockierung eingesetzten Antikörper und Peptide nicht antagonistisch, sondern eher agonistisch wirken könnten. Den  $\alpha$ -Integrinen könnte so eine negativ-regulierende Funktion in der Angiogenese zugeschrieben werden, womit die offensichtlich widersprüchlichen Ergebnisse erklärt werden könnten. Eine abschließende Beurteilung ist nach heutigem Wissenstand nicht möglich. Hynes selbst zieht im Schlusssatz seiner Arbeit die Möglichkeit in Betracht, dass die beschriebenen Integrine beide Rollen spielen könnten. Abhängig von Phase und Stufe der Angiogenese könnte die Bedeutung in der Balance zwischen positiver und negativer Regulation von Wachstumssignalen liegen (Wang, Ward et al. 2005).

### **3.2. *MMPs in der Angiogenese: Eine Übersicht***

Metallomatrixproteasen (MMPs) werden zur Gruppe der zinkabhängigen Endopeptidasen gezählt. Sie sind proteolytische Enzyme, deren Funktion in der Degradation und Modifikation von Proteinen besteht. Ihre Aufgabe ist zum einen Um- und Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix, zum anderen aber auch eine Modulation der Aktivität von Membran-Rezeptoren und löslichen Faktoren (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006). Die Veränderung von Proteinen ist mitunter entscheidend für die Regulierung des Verhaltens von Zellen und besonders für die Biologie von Tumorzellen. Zu diesen regulativen Aufgaben gehören unter anderem Eingriffe in das Apoptose-, Migrations- und Invasionsverhalten und Steuerungsfunktionen speziell der Angiogenese. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, bedarf es einer fein abgestimmten Regulation.

Während der Angiogenese werden bisher ruhende Endothelzellen aktiviert. Diese beginnen daraufhin zu wandern. Die Auflösung der basalen Membran bildet den Anfang dieser Wanderbewegung. Dies geschieht wieder mithilfe spezifischer Proteasen, insbesondere der MMPs. Während bei ruhenden Endothelzellen MMPs kaum exprimiert werden, konnte bei denjenigen Endothelzellen, die durch Prozesse wie Entzündungen, Wundheilungen oder Tumoren aktiviert wurden, dagegen eine starke Hochregulation der Expression in vitro nachgewiesen werden (Hanemaaijer, Koolwijk et al. 1993; Rajavashisth, Liao et al. 1999).

Wie schon erwähnt, ist das Einsprossen neuer Gefäße - aus bereits existierenden Gefäßen - im Tumorgewebe existenziell notwendig und die Basis für weiteres Wachstum. Um die Rolle und Funktion von MMPs in diesem Kontext zu belegen, wurden in der Vergangenheit großangelegte Inhibitionsversuche dieser Enzymgruppe unternommen (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen durch die proteolytische Aktivität der MMPs in der Lage waren, das Tumorstroma lokal aufzulösen und in dieses einzuwandern. Zudem wurde nachgewiesen, dass verschiedene Subtypen - exemplarisch MMP 2, 9 und 14 - eine direkte Rolle bei der Steuerung der Angiogenese übernehmen. So waren zum Beispiel Angiogenese und Tumorstroma in MMP2-defizienten Mäusen - verglichen mit dem Wildtyp - vermindert (Roy, Zhang et al. 2006). Darüber hinaus gelang es, durch die proteolytische Modifizierung von Kollagen IV, kryptische Bindungsstellen für das  $\alpha\beta 3$ -Integrin freizulegen (Egeblad and Werb 2002; Roy, Zhang et al. 2006). Aufgrund der MMP9-Aktivität konnte eine vermehrte Bioverfügbarkeit von proangiogenen Faktoren wie VEGF belegt werden. MMP14 (auch MT1-MMP genannt) kann die umgebenden ECM degradieren und somit das Einwachsen von Endothelzellen in die ECM ermöglichen.

Die vielfältigen, bisher bereits bekannten Funktionen der MMPs sollen an dieser Stelle nicht weiter explizit aufgeführt, hingegen soll auf MMP14 detailliert eingegangen werden. Die Forschung wird in Zukunft die Rolle der MMPs bei der Angiogenese noch besser zu verstehen lernen und noch weitere, differenziertere Funktionen aufzeigen.

### **3.2.1. MMP14**

Die große Gruppe der MMPs lässt sich in zwei wesentliche Subtypen unterteilen.

Die Typen MMP1-13 sind lösliche Enzyme, die vorwiegend in den perizellulären Raum sezerniert werden und dort ihre Wirkung entfalten. Neben diesen gibt es eine weitere Gruppe von MMPs, die in der Nomenklatur ab der Nummer 14 nummeriert oder als eigene Gruppe als MT-MMP bezeichnet werden (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006). Wie im Namen der MT-MMP - „membrane-type –metallomatrixprotease“ - bereits enthalten, handelt es sich bei diesen Proteasen um in der Zellmembran verankerte Enzyme, die im Gegensatz zu den löslichen MMPs ortständig sind.

Die MT-MMP-Familie umfasst nach aktuellem Wissensstand sechs Mitglieder. MT 1, 2, 3 und 5 (MMP14, 15, 16, 18) sind dabei über Transmembran-Domänen verankert, die Subtypen 4 und 6 (MMP17, 19) jedoch über GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. Ihre Aktivierung findet intrazellulär über „furin-like-enzymes“ statt. Anders als früher interpretiert, besteht ihre Aufgabe nicht allein in der Aktivierung der löslichen MMPs, sondern ebenso im Abbau von extrazellulären Matrixkomponenten in unmittelbarer Nähe zur Zellwand. Als Substrate sind u.a. Kollagene, Laminin 1 und 5, Aggrecan, Fibronectin und Vitronectin

bekannt. Als weitere wichtige Funktion rückt immer mehr die Freisetzung und Modifikation von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in den Fokus (Mott and Werb 2004).

Am besten untersucht und erforscht ist die MMP14 (MT1-MMP). Ihre Rolle als eines der Schlüsselenzyme der Angiogenese konnte durch verschiedene Knock-out-Modelle bestätigt werden. So konnten im MMP14-defizienten Mausmodell sowohl Defekte im Skelettsystem und eine unzureichende Gefäßdichte im Knorpel, als auch im Cornea-Modell eine unzureichende angiogene Reaktion auf FGF-2 nachgewiesen werden. In vitro konnten in Matrigel-Assays fehlerhafte kapillare Formationen auf Chemokinstimulation ebenso wie fehlerhaftes Gefäßeinsprossen in kollagener Matrix nachgewiesen werden (Genis, Galvez et al. 2006). Damit wird für MMP14 eine maßgebliche Rolle bei der endothelialen Migration auf diversen ECM-Komponenten wie Gelatin, Kollagen I, Fibronectin und Vitronectin bei „woundhealing- oder transwell-assays“ bestätigt. Des Weiteren wurde in einem Versuch mit inhibierenden monoklonalen Antikörpern gegen MMP14 in vitro eine gestörte „tube formation“ beobachtet (Genis, Gonzalo et al. 2007). Die Lokalisation der MMP14 in der Zellwand ist entscheidend für ihre proteolytische Aufgabe in Endothelzellen. In ruhenden, konfluenten Zellen ist MMP14 diffus über die Oberfläche verteilt. In migrierenden Endothelzellen jedoch verändert sie ihr Verteilungsmuster hin zu einer Akkumulation in den die Wanderbewegung anführenden Anteilen der Zellmembran. Daraus resultiert eine deutlich potentere proteolytische Aktivität in diesen Zellabschnitten (Galvez, Matias-Roman et al. 2001). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Assoziation der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  und des Integrins  $\alpha v\beta 3$  mit MMP14 an der Migrationsfront von Endothelzellen (Galvez, Matias-Roman et al. 2002).

MMP14 ist in der Lage, Membranproteine zu verändern. Zu den besonderen Substraten gehören die gerade erwähnten  $\alpha v$ -Integrine. Ebenso zählt das „shedding“ von Gewebs-Transglutaminase, Syndecan-1 und des Oberflächenmoleküls CD44 zu den Aufgaben (Belkin, Akimov et al. 2001; Kajita, Itoh et al. 2001; Deryugina, Ratnikov et al. 2002). Auch das Oberflächenprotein Semaphorin 4D (Basile, Holmbeck et al. 2007) konnte als Zielsubstrat für MT1-MMP-induziertes „Shedding“ identifiziert werden (Egeblad and Werb 2002; Genis, Galvez et al. 2006; Roy, Zhang et al. 2006).

### **3.3. *Thrombin in Blutgerinnung und Angiogenese***

Das Blutgerinnungssystem und insbesondere der finale Agonist Thrombin stellt ein wesentliches regulatorisches Element in der Blutgefäßentwicklung dar. Verletzungen von Blutgefäßen führen über die Freilegung von subendothelialen Strukturen wie Kollagenen und „Tissue factor“ (TF) zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, in deren Endstrecke Prothrombin zu Thrombin umgewandelt wird. Die Aktivierung von Thrombin führt durch

Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin schließlich zur Bildung eines Gerinnsels (Fibrin-Clot). Thrombin kann aber nicht nur mit Fibrinogen interagieren, sondern auch über spezielle Zelloberflächenrezeptoren an das Endothel binden und mit diesen Interaktionen eingehen (Moser 2008).

Seit mehr als 150 Jahren hat man Kenntnis von der ausgeprägten Neigung zu rezidivierenden thrombotischen und thromboembolischen Geschehen im Rahmen von malignen Grunderkrankungen. Dies ist unter dem Namen Trousseau-Syndrom (Rickles and Edwards 1983) allgemein bekannt. Nach aktuellem Kenntnisstand (MEGA-Studie; (Blom, Doggen et al. 2005)) liegt das Thromboserisiko um das siebenfache über dem der gesunden Normalbevölkerung. Thrombin trägt zum Fortschreiten maligner Erkrankungen bei, indem es Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen und damit deren Metastasierungspotenzial erhöht. Es verstärkt die von Tumorzellen induzierte Plättchenadhäsion und ebenfalls die Synthese von „Tissue factor“. Damit trägt Thrombin in einer sich selbst kontinuierlich verstärkenden Weise zur erhöhten Koagulabilität des Blutes bei. Auf Tumorzellen wirkt Thrombin zusätzlich promigratorisch und mitoseinduzierend (Wojtukiewicz, Sierko et al. 2001).

Neben den Effekten auf Tumorzellen hat Thrombin auch Auswirkungen auf die Angiogenese. Wie beschrieben sind Blutgefäßbildung und -sprossung abhängig von Abbau und Prozessierung der umliegenden Extrazellulärmatrix sowie der Steuerung der Endothelzellproliferation, -adhäsion und -permeabilität. Dabei nutzt Thrombin seine Fähigkeit auf Endothelzellen einzuwirken. Dies geschieht sowohl proteolytisch - vermittelt über seinen Endothelzell-Rezeptor PAR-1 (Moser 2008) - als auch nicht proteolytisch z.B. über ein RGD-Motiv (Papaconstantinou, Carrell et al. 2005). In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass Thrombin diese Prozesse unabhängig von seiner fibrinogenspaltenden Eigenschaft rezeptorvermittelt stimulieren kann (Tsopanoglou, Andriopoulou et al. 2002). Außerdem konnte demonstriert werden, dass dabei die klassischen proangiogenetischen Stoffwechsellaskaden wie das VEGF-System, Angiopoietine und Integrine wie  $\alpha\beta 3$  beteiligt sind.

Im Organismus ist es möglich, dass kleinere Thrombinmengen auch ohne Aktivierung der Gerinnungskaskade entstehen (Karparkin 2003). Knock-out-Versuche in Mäusen für verschiedene Gerinnungsfaktoren zeigten erwartungsgemäß eine hohe Sterblichkeit durch postpartale Blutungen, aber auch ein normal ausgebildetes Gefäßbett. Knockout-Versuche für Thrombin, seines Rezeptors PAR-1 oder PAR-1-nachgeordneter Signalwege zeigten jedoch neben den Blutungskomplikationen höchste pränatale Sterblichkeit. Histologisch wurden nur völlig unzureichend ausgebildete Gefäße gefunden (Bi, Lawler et al. 1995; Lin, Maeda et al. 1997; Moser 2008).

### 3.3.1. Thrombin in der Rolle als Dekryptase

PAR-1 ist ein zellulärer Rezeptor für Thrombin. Es handelt sich dabei um einen G-Proteingekoppelten-Rezeptor, der vornehmlich auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Für die Aktivierung von PAR-1 ist die proteolytische Fähigkeit von Thrombin nötig. Thrombin erkennt PAR-1 und spaltet (cleavage) einen n-terminalen Teil des Rezeptors ab. Durch diesen Vorgang werden kryptische Liganden in PAR-1 frei, die über eine Konformationsänderung mit dem Rezeptor selbst interagieren können und eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen (Macfarlane, Seatter et al. 2001; Leger, Covic et al. 2006; Moser 2008).

Osteopontin (OPN) ist ein Glykoprotein, das in verschiedenen Geweben exprimiert wird und in zelladhäsiven Vorgängen, besonders im Knochenaufbau, aber auch bei Entzündungsvorgängen eine Rolle spielt (Smith, Cheung et al. 1996). Dieses Protein kann über posttranslationale und proteolytische Modifikationen verschiedene Funktionen wahrnehmen (Yokosaki and Higashikawa 2005). Es existieren neben Vollängen-Osteopontin sowohl lösliche (sOPN) als auch intrazelluläre Formen (iOPN) (Buback, Renkl et al. 2009). Wie das in dieser Arbeit untersuchte TEM5 enthält Osteopontin ein kryptisches RGD-Motiv (Senger, Perruzzi et al. 1994). Es konnte dargestellt werden, dass dieses RGD-Motiv durch Proteolyse mit Thrombin freigelegt werden kann (Denhardt and Guo 1993). Die Spaltstelle für diese Proteolyse liegt nur sieben Aminosäuren vom RGD-Motiv entfernt (Denhardt and Guo 1993). In vitro konnte außerdem gezeigt werden, dass dieselbe Prozessierung von endogenem Osteopontin auch nach Aktivierung der Gerinnungskaskade mittels Glasoberfläche in Plasma möglich ist (Senger, Perruzzi et al. 1988; Senger, Perruzzi et al. 1989). Funktionelle Daten zeigen, dass Osteopontin mit den Integrinen  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ , aber auch  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha 9\beta 1$  interagieren kann (Smith, Cheung et al. 1996; Smith and Giachelli 1998; Yokosaki, Tanaka et al. 2005). Das n-terminale von Thrombin prozessierte Osteopontin-Fragment vermittelte hier im Falle von  $\alpha 9\beta 1$  die Adhäsion von Melanomzellen weit stärker als das unprozessierte Vollängen-Osteopontin. Ähnliche Ergebnisse für die n-terminalen Fragmente liegen auch mit  $\alpha$ -Integrinen, besonders  $\alpha\beta 6$ , vor (Yokosaki, Tanaka et al. 2005).

Ergänzend muss erwähnt werden, dass auch Metallomatrixproteasen (MMPs) Osteopontin zu ähnlichen n-terminalen Fragmenten prozessieren können. Obwohl die Spaltstellen beispielsweise für MMP 3 und 9 in unmittelbarer Nähe zur Thrombinspaltstelle (Abstand zwei Aminosäuren) liegen, ändert sich dadurch das Spektrum der bindenden Integrine. Einzig die Bindung an  $\alpha\beta 3$  über das RGD-Motiv wurde durch den Einsatz verschiedener Proteasen nicht verändert (Yokosaki, Tanaka et al. 2005).

Osteopontin hat darüber hinaus auch Eingang in die Klinik gefunden. So wird es in klinischen Studien u. a. als Tumormarker beim Pleuramesotheliom (Grigoriu, Grigoriu et al. 2009) oder Prostata-Karzinom (Foorotan, Foster et al. 2006) eingesetzt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Puffer und Medien

#### 4.1.1. Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma Aldrich oder Merck bezogen. Für Puffer, Medien und Wasser wurde Millipore Q gereinigtes Wasser verwendet.

PBS:	Dulbecco PBS (Invitrogen)
PBS/BSA:	PBS + 1% BSA
PBST:	PBS + 0,05% Tween 20
PBDST:	PBST + 150 mM NaCl
PBST/BSA:	PBST + 1% BSA
Blockpuffer:	PBST + 5% fettfreies Trockenmilchpulver (Biomol)
TBS:	25 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl
Lysepuffer:	PBS 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton X-100 Proteaseinhibitoren (EDTA-frei, Roche Applied Science)
10x Laufpuffer:	29 g/l Tris 144 g/l Glyzin 10 g/l SDS
4x Probenpuffer:	200 mM Tris-HCl pH 6,8 400 mM DTT 8% SDS 20% Glyzerin 0,2% Bromphenolblau
10x Blotpuffer:	58 g/l Tris 29 g/l Glyzin XV 20% Methanol
Glyzin-freier Blotpuffer: Borat-Puffer	50 mM Borat (3,091 g/L) 20% Methanol pH 9,0

Coomassie-Entfärber:	40% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Färber:	Coomassie-Entfärber 0,25% Coomassie Blue R-250
Modifizierter Coomassie-Färber:	0,8 % Coomassie Blue R250 ddH <sub>2</sub> O 35mM HCL
LB-Amp-Medium:	LB-Medium (Sigma-Aldrich) 0,1 mg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar:	LB-Amp-Medium 2% Agar
MMP-Puffer:	1xTBS 10mM CaCl <sub>2</sub> 0,01% Brij®-35
Cathepsin B-Puffer:	0,6mM CaCl <sub>2</sub> 0,6mM MgCl <sub>2</sub> 2mM L-Cystein pH 7,4 / 6,0

**4.1.2. Verwendete Antikörper**

Klonalität	Klon-Nr./ Bezeichnung	Antigen	Wirtstier	Konjugat	Firma
Monoklonal	M2	FLAG-Tag	Maus	Peroxidase	Sigma-Aldrich
Polyklonal	-	FLAG-Tag	Kaninchen	-	Sigma-Aldrich
Monoklonal	ADI.I.I0	His-Tag	Maus	-	Serotech
Polyklonal	ab9106	Myc-Tag	Kaninchen	-	Abcam
Monoklonal	C4	Aktin	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	FB12	Integrin $\alpha$ 1	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1E6	Integrin $\alpha$ 2	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1B5	Integrin $\alpha$ 3	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1H4	Integrin $\alpha$ 4	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1D6	Integrin $\alpha$ 5	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P3G8	Integrin $\alpha$ v	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	LM609	Integrin $\alpha$ v $\beta$ 3	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1F6	Integrin $\alpha$ v $\beta$ 5	Maus	-	Chemicon
Polyklonal	-	Kaninchen IgG	Esel	Peroxidase	Amersham Biosciences
Polyklonal	-	Maus IgG	Schaf	Peroxidase	Amersham Biosciences
Monoklonal	EP1264Y	MMP14	Kaninchen	-	Epitomics
Monoklonal	AbD06669	TEM5	human	-	AbD Serotec

**4.1.3. Verwendete Proteasen**

MMP 1	Human	-	Calbiochem
MMP2	Human	-	Calbiochem
MMP8	Human	-	Calbiochem
MMP9	Human	-	Calbiochem
MMP14	Human	rhMT1-MMP catalytic domain	AbD Serotec
Plasmin	Human	-	Calbiochem
Thrombin	Human	-	Sigma Aldrich
Cathepsin B	Human	Humane Plazenta	Sigma Aldrich

**4.1.4. Sonstige verwendete Reagentien und DNA**

Human Vitronectin	human	Promega
Fibronectin	human	Calbiochem
Kollagen I	Ratte	BD Biosciences
Growth factor-reduced Matrigel	-	BD Biosciences
Cyclic RGD peptide (H-Gly-Pen-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-Ala-OH)	-	Bachem
MT1-MMP - cDNA	human	OriGene Technologies

**4.2. Zellkultur**

Gepoolte humane Nabelschnur-Venen-Endothelzellen („human umbilical vein endothelial cells“, HUVECs) wurden von PromoCell (Heidelberg) bezogen. HUVECs wurden in Zellkulturflaschen in Endothelzellmedium mit Wachstumsfaktorensupplement (PromoCell) kultiviert. Für funktionelle Versuche wurden nur HUVECs der Passagen 1 – 4 eingesetzt, ältere Passagen wurden verworfen.

„Human embryonic kidney“ (HEK) 293-Zellen wurden in „Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ (DMEM, Biochrom) mit 10% fötalem Kälberserum („fetal calf serum“, FCS, Biochrom) und 1% Antibiotikum-Antimykotikum (Invitrogen) kultiviert. HEK293-Zellen, die durch Transfektion (siehe unten) eine Geneticin-Resistenz erworben hatten, wurden in DMEM mit 10%FCS und 0,6mg/ml Geneticin (Invitrogen) kultiviert.

Konfluente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit kaltem Trypsin-EDTA (Biochrom) abgelöst. Das Trypsin wurde mit 5% FCS inaktiviert und die Zellen wurden 3 min bei 500xg abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen entweder in Kulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen ausgesät (Passagierung) oder jeweils  $10^6$  Zellen in 1 ml DMSO-Gefriermedium (BioVeris) resuspendiert und eingefroren (zuerst 2 –16 h bei -20°C, dann 2 – 16 h bei -80°C und anschließend zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert). Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, einmal in 10 ml Kulturmedium gewaschen und ausgesät.

Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zellzahlen wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 4.3. Expressionskonstrukte

#### 4.3.1. TEM5

Als Grundlage dieser Arbeit standen bereits verschiedene TEM5-Expressionskonstrukte unserer Arbeitsgruppe (Vallon and Essler 2006) zur Verfügung. Diese wurden aus dem cDNA Klon FLJ00170 (Kazusa DNA Research Institute) exprimiert, mit verschiedenen Epitopen versehen oder mutiert. Zusätzlich wurde eine Neomycin-Resistenz eingefügt.

Aus diesen TEM5-Konstrukten wurden zwei Konstrukte als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit verwendet: TEM5 (1360 Aminosäuren) und TEM5-ECD (778 Aminosäuren). Ein schematisches Modell findet sich im Anhang (Anhang Abb. 1). Mit beiden Konstrukten wurde sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene gearbeitet.

#### 4.3.2. Mutationen im TEM5-Expressionskonstrukt

Es wurden Punkt- und Deletionsmutanten von TEM5-ECD kloniert.

An Punktmutationen wurden kloniert:

- Klon: TEM5-ECD-R398G
  - Primerpaar:
    - Fwd: 5'- GCC CCG GGC ACC GGA GCC TCC CGC CGG TG -3'
    - Rev: 5' - CA CCG GCG GGA GGC TCC GGT GCC CGG GGC – 3'

An Deletionsmutationen wurden kloniert:

- Klon: TEM5-ECD-N60
  - Primerpaar
    - Fwd: 5'- GCC CCG GGC ACC CGA GGT TCT CAT CAT CAT C -3'
    - Rev: 5'- G ATG ATG ATG AGA ACC TCG GGT GCC CGG GGC -3'
  
- Klon TEM5-ECD-ΔR367R398
  - Primerpaar
    - Fwd: 5'- C AAC CGC GGG GAC TTC GCC TCC CGC CGG TGT G -3'
    - Rev: 5'- C ACA CCG GCG GGA GGC GAA GTC CCC GCG GTT G -3'

Alle Klone wurden nach der bekannten Sequenz „NCBI sequence NP\_116166“ benannt.

Für alle Mutations-Klonierungen wurde das PCR-basierte Verfahren: „QuickChange XL II site-directed mutagenesis kits“ der Firma Stratagene® benutzt. Die oben beschriebenen Primer wurden nach Herstellerangabe erstellt und berechnet. Nach Mutagenese-PCR und Dpn I-Verdau des unmutierten Mutterstranges wurden 10 µl des PCR-Ligationsansatzes eingesetzt, um chemisch kompetente E. coli „XL1-Blue Supercompetent Cells®“ nach Herstellerangabe (Stratagene®) zu transformieren. Die transformierten Zellen wurden auf

LB-Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 5 ml LB-Amp-Medium mit Einzelkolonien der Transformanten angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit Hilfe des „plasmid miniprep kits“ (Qiagen®) wurde die Plasmid-DNA der Klone isoliert und danach quantifiziert. Eine Restriktionsanalyse wurde mit je 200 ng der Plasmid-DNA durchgeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA für eine Stunde bei 37°C mit 10 U EcoR I und 10 U BamH I inkubiert und anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Je ein insert-positiver Klon wurde ausgewählt und die Richtigkeit der Insert-Sequenz mittels DNA-Sequenzierung (Firma: „MWG Biotech“, München) überprüft (Anhang Abb. 3).

#### **4.3.3. Agarosegel-Elektrophorese**

Das Agarosegel - bestehend aus 1% Agarose in TAE-Puffer (Invitrogen®) - wurde zunächst in der Mikrowelle verflüssigt und ein 50 ml-Aliquot wurde entnommen. Nachdem das Aliquot auf 40 – 50°C abgekühlt war, wurden 1,5 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt und gut vermischt. Das Gel wurde nun in einen abgedichteten und mit einem Kamm versehenen Gelschlitten gegossen. Zum Aushärten wurde es etwa 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt, wobei das Gel gerade mit Puffer bedeckt war. Die Proben wurden mit Ladepuffer (Fermentas®) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenmarker diente die „GeneRuler“ 1-kb-DNA-Leiter (Fermentas®). Die Elektrophorese wurde bei 100V solange durchgeführt, bis der Farbstoff des Ladepuffers bis über die Mitte des Gels gelaufen war. Schließlich wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera oder Digitalkamera fotografiert (Anhang Abb. 3)

#### **4.3.4. Transfektion nach der Kalzium-Phosphat-Methode**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wurden alle nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode (Graham and van der Eb 1973) durchgeführt. Es wurden sowohl transiente als auch stabile Transfektionen vollzogen. Für 6-Well-Platten wurden  $2 \times 10^5$ , für 24-Well-Platten  $3 \times 10^4$  und für 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen  $2 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Im Anschluss an die Aussaat folgte eine achtstündige Ruhephase im Inkubator.

Zur Transfektion wurden folgende Komponenten steril hergestellt und verwendet:

6-Well-Platte	24-Well-Platte	75cm <sup>2</sup> - Kulturflasche:	
pro Well:	pro Well:		
2,5µg	625ng	10µg	DNA
15,6 µl	3,9µl	62,5µl	2M CaCl <sub>2</sub>
ad 125µl	ad 31,2µl	ad 500µl	H <sub>2</sub> O
in 125µl	in 31,2µl	in 500µl	2xHBS: → unter ständigem Vortexen getropft

Die gesamte Lösung wurde langsam in ständiger Schwenkbewegung in die Wells bzw. Flaschen getropft, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Präzipitate zu erreichen. Die Zellen wurden daraufhin für 12 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen, um übrig gebliebene Präzipitate auszuwaschen, gründlich mit PBS gespült und mit frischem Medium versehen.

#### 4.3.5. Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten

Um lösliche TEM5-Expressionskonstrukte in größerer Menge und hoher Reinheit untersuchen zu können, wurden HEK293-Zellen mit verschiedenen, für lösliches TEM5-kodierenden Konstrukten stabil transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde dem Kulturmedium 10%FCS und zusätzlich 0,6 mg/ml Geneticin (Invitrogen®) zugesetzt. Der Geneticinzusatz diente dem Zweck, stabil transfizierte Zellen über ihre neu gewonnene Geneticinresistenz zu selektieren. Nach 14 bis 21 Tagen war die Selektion abgeschlossen. Die Zellen wurden auf mehrere 175cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen aliquotiert und bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium durch 1% FCS und 0,6 mg/ml Geneticin in DMEM ersetzt. Kurz darauf - nachdem der Farbumschlag (nach 48 bis 72 Stunden) des Mediums von rot auf orange stattgefunden hatte - wurden die Überstände abgenommen und gesammelt. Die Zellen wurden wiederum mit frischem Medium versorgt. Je nach Bedarf wurden 100ml bis 500ml Überstände gesammelt. Diese wurden 10 Minuten lang bei 5000xg abzentrifugiert und die Pellets verworfen. Die klaren Überstände wurden mit Centricon-Plus-20-Zentrifugierfiltern (Millipore®) 500fach aufkonzentriert und anschließend wieder 1:10 zum Ausgangsvolumen in PBDST verdünnt. Die aufkonzentrierten und in PBDST umgepufferten Überstände wurden nun für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 500µl Anti-FLAG M2-Agarose (Sigma-Aldrich®) im Rotator inkubiert. Die Agarose wurde dreimal mit 10ml PBST und anschließend mit 10ml PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in 1 ml-Fractionen mit 0,1 M Glyzin-HCl pH 3,5 eluiert und die Eluate mit 0,02 Vol. (=20µl) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Daraufhin wurde mit jedem Eluat eine Schäumprobe durchgeführt. Proteinhaltige Fractionen wurden zusammengeführt

und in Centricon-Plus- 20-Zentrifugierfiltern (Millipore®) aufkonzentriert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des „Protein dotMetric Assays“ (Geno Technology®) bestimmt. Das Zentrifugat wurde mit TBS auf eine Arbeitskonzentration von 1µg/µl verdünnt, in 50µl aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Der Reinheitsgrad des so gewonnenen Konstrukts wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft.

#### 4.3.6. MMP14-stabil transfizierte HEK293 (HEK293-MMP14)

Für Transfektionen mit MMP14 wurde ein kommerziell erhältliches cDNA-Konstrukt (OriGene-Technologies®) verwendet. Mittels Kalzium-Phosphat-Transfektions-Methode wurden stabile HEK293-MMP14-Zellen hergestellt. Hierzu wurde MMP14-cDNA im Verhältnis 10:1 mit p3xFLAG-Vektor mit Neomycin-Resistenz eingesetzt. 48 Stunden nach Transfektion wurde dem Kulturmedium 0,6mg/ml Geneticin und 10% FCS zugesetzt. Stabil transfizierte Zellen wurden über ihre neu gewonnene Resistenz selektiert. Nach 21 Tagen war die Selektion abgeschlossen. Die Zellen wurden auf mehrere 175-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen aliquotiert und bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Westernblot gegen MMP-14 aus Zelllysaten von MMP14-transfizierten im Vergleich mit vektor-transfizierten Zellen bestätigt.

### 4.4. SDS-Page, Coomassie-Färbung, Westernblot

#### 4.4.1. SDS-Page

Zur Auftrennung von Proteinproben wurde die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierzu wurden Gele nach Laemmli (Laemmli 1970) in kommerziell erhältlichen Kammern mit der Stärke 1mm gegossen. Je nach Fragestellung wurden 8%-, 10%- oder 12%-Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Für je vier Gele wurden verwendet:

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	8%, 10%, 12%	4%
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	6,25ml	-
2 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,75ml
10 % SDS	250µl	125µl
TEMED	25µl	25µl
1 0 % APS	250µl	125µl
ddH <sub>2</sub> O ad	25ml	12,5ml

Bevor das Trenngel polymerisieren konnte, wurde es zwischen die aufrecht stehenden Platten der Kammern gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel

vollständig polymerisiert war, wurde das Isopropanol mit H<sub>2</sub>O ausgewaschen und das Sammelgel über das Trenngel zwischen die Platten gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Taschen von 20µl oder 60µl Volumen auszusparen. Sobald auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Gele in die dafür vorgesehene Gelkammer gesetzt. Die Gelkammer wurde bis zum Überlauf mit Laufpuffer gefüllt. Entsprechend der zu untersuchenden Probe wurde unterschiedlich vorgegangen. Zellen wurden zuerst in Probenpuffer lysiert. Reine Proteinproben oder aufgereinigte Proteine wurden mit Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden fünf Minuten bei 95°C inkubiert. In der Regel wurden Proben von 20µl Volumen in das Sammelgel geladen. Zu jedem Gel wurde als Größenmarker entweder der „full-range rainbow molecular weight marker“ (Amersham Biosciences®) oder der „color-burst“-Marker“ (Sigma-Aldrich®) verwendet. Zur Auftrennung wurde Gleichstrom angelegt. Zum Einlaufen in das Sammelgel wurde eine Spannung von 100V benutzt. Sobald der Farbstoff vollständig ins Trenngel übergegangen war, wurde die Spannung auf 200V erhöht. Der Stromfluss wurde erst beendet, wenn der Farbstoff das Gel vollständig durchwandert hatte und aus dem Gel auszutreten begann. Anschließend wurden die Gele entweder mittels Coomassiefärbung analysiert oder mittels Blottechnik weiterbearbeitet.

#### **4.4.2. Blotting**

Zur weiteren Analyse - einerseits mittels Westernblot, andererseits zur Proteinsequenzierung - wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Amersham Biosciences®) transferiert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol benetzt und mit entsprechendem Blotpuffer äquilibriert. Ein Gel wurde auf die Membran gelegt und Luftblasen sorgsam ausgestrichen. Je ein Filterpapier (BioRad®) wurde vor und hinter dem Gel-Membrankomplex platziert. Für das Blotverfahren wurde eine Tankblot-Apparatur verwendet. Das „Sandwich“ wurde zwischen zwei Schwämmen in einer Kassette platziert und in den Tank abgesenkt. Der Tank wurde mit gekühltem Blotpuffer aufgefüllt bis die Kassette ganz mit Puffer bedeckt war. Der Blotvorgang wurde mit 100V Gleichstrom gestartet und gleichzeitig eine kontinuierliche Kühlung von 10°C angeschlossen. Eine „Blottingzeit“ von 60 Minuten erwies sich für analytische Westernblots als ausreichend. Für größere Proteinmengen im Rahmen der Sequenzierung wurden 90 Minuten „Blottingzeit“ gewählt. Als Pufferlösung wurden entweder standardisierter Blotpuffer für Westernblotanalysen oder glyzinfreier Borat-Puffer für Sequenzierungsanalysen verwendet.

#### **4.4.3. Coomassie-Färbung von Proteingelen und PVDF-Membranen**

Zur Coomassie-Färbung wurden „klassische“ und modifizierte Färbelösungen verwendet. Die Gele wurden in geeigneten Schalen mit modifizierter Coomassie-Färbelösung bedeckt, für zehn Sekunden in der Mikrowelle erhitzt und danach für weitere fünf Minuten bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit inkubiert. Zum Entfärben wurden die Gele mindestens drei- bis fünfmal für fünf Minuten in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Gele zwischen nasser Cellophanfolie eingespannt und bei Raumtemperatur zum Trocknen aufgestellt.

PVDF-Membranen wurden nach dem Blotting mit klassischer Coomassie-Lösung für 30 bis 60 Minuten gefärbt und anschließend mehrmals - jeweils fünf bis zehn Minuten - mit Coomassie-Entfärber gewaschen.

#### 4.4.4. Westernblotanalyse

Nach dem Blotting wurden die Membranen in PBST gewaschen und anschließend mit Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschwenkt. Im Anschluss wurden die PVDF-Membranen mit primären Antikörpern über Nacht im Kühlraum (4°C) in einem Rotator bei langsamer Geschwindigkeit inkubiert. Die primären Antikörper wurden entsprechend der jeweiligen Herstelleranweisung verschieden verdünnt:

Anti-FLAG (Peroxidase-konjugiert):	1:1000 in Blockpuffer
Anti-His:	1:1000 in PBST/BSA
Anti-Myc:	1:5000 in PBST/BSA
Anti-β-Aktin:	1:10000 in Blockpuffer
Anti-MMP14:	1:10000 in PBST/BSA

Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal in PBST für 5 Minuten gewaschen. Im Falle von nicht-peroxidase-konjugierten Antikörpern wurden die Membranen nochmals für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen sekundären, peroxidase-konjugierten Antikörper bei einer Verdünnung von 1 : 5000 in Blockpuffer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal fünf Minuten mit PBST gewaschen.

Die Membranen wurden nach Herstellerangabe mit ein bis zwei Milliliter ECL-Substrat (Amersham®) überschichtet und für 60 Sekunden inkubiert. Zur Detektion des biolumineszenten Signals wurden die Membranen in eine lichtdichte Kassette verpackt. Diese wurde in einer Dunkelkammer mit Kodak-BioMax-XAR-Filmen (Sigma-Aldrich®) bestückt. Die Filme wurden entsprechend des Signals unterschiedlich lange belichtet und daraufhin entwickelt.

#### 4.4.5. TCA-DOC-Präzipitation

Die Zellüberstände wurden bei 5000xg für zehn Minuten zentrifugiert und die Zellpellets verworfen. Die gereinigten Überstände wurden mit 0,02% Na-Deoxycholat (DOC) versetzt und fünf Minuten inkubiert. Daraufhin wurde 10% Trichloressigsäure (TCA) zugeführt und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte für 15 Minuten bei 4°C eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation. Die entstandenen Pellets wurden mit eiskaltem Azeton

gewaschen und an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in Probenpuffer resuspendiert und im Westernblot analysiert.

#### **4.5. Proteinsequenzierung**

Zur sicheren n-terminalen Sequenzierung mittels Edman-Abbau wurden laut Angaben der Firma Proteome Factory® etwa 3-5µg des zu sequenzierenden Proteins benötigt. Der Prozessierungsvorgang wurde bezüglich Proteasemenge und Prozessierungsdauer zuvor im kleineren Maßstab optimiert. Aus diesen Vorversuchen ergab sich, dass für die Prozessierung von TEM5-N60 und TEM5-ΔN60 (=TEM5-C50) 20µg TEM5-ECD mit jeweils 10µg/ml Protease für 36 Stunden bei 37°C inkubiert werden musste. Der Proteinverdau wurde, wie beschrieben, über SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wurde der Ansatz zuerst fünf Minuten in Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Die Volumenreduktion von 120µl auf 60µl erfolgte anschließend mittels einer Speed-Vac-Zentrifuge bei mittlerer Geschwindigkeit („medium speed“) und mittlerer Temperatur („medium heat“). Daraufhin wurde die Probe in eine spezielle 60µl fassende Tasche im Sammelgel pipettiert. Nach der Auftrennung wurden die Proteine aus dem Trenngel auf eine PVDF-Membran „geblottet“. Als Blotpuffer musste glyzin-freier Borat-Puffer verwendet werden. Die „Blotting-Zeit“ wurde mit 90 Minuten gewählt. In diesem Ansatz erreichte die „Bloteffizienz“ über 80%. Die PVDF-Membran wurde mit Coomassie-Färber behandelt, daraufhin entfärbt und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Gemäß dem Größenmarker wurde die Bande bei 50kDa ausgeschnitten und zur Sequenzierung an die Firma: „Proteome Factory®“ (Berlin) verschickt. Mit einem kleinen Teil der Proteinproben wurden als zusätzliche Kontrolle Westernblotanalysen zur bestätigenden Charakterisierung der Banden durchgeführt.

#### **4.6. TEM5-Verdaue**

##### **4.6.1. In-vitro-Verdaue**

Lösliches TEM5-ECD (sTEM5) in einer Konzentration 0,2mg/ml wurde mit diversen Proteasen für 18 bis 24 Stunden bei 37°C in 1 ml Eppendorfgefäßen inkubiert. Die Konzentrationen wurden aufsteigend in Zehnerpotenzen gewählt. Dabei wurden Konzentrationen von 0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10µg/ml Protease verwendet. Für Verdaue mit Metallmatrixproteasen (MMP) wurde ein universeller MMP-Puffer (1xTBS, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01% Brij®-35) benutzt. Zum Einsatz kamen die löslichen Metallmatrixproteasen 1, 2, 8, und 9 und in löslicher Form die katalytische Domäne der membranständigen MMP14. Als Vertreter der Cathepsine wurde Cathepsin B ausgewählt. Die Cathepsin-Puffer (0,6mM CaCl<sub>2</sub>, 0,6mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM D-L-Cystein in TBS) wurden mit HCL/NaOH auf die pH-Optima

von 6,0 und 7,4 titriert. Ferner wurden die Proteasen Thrombin und Plasmin verwendet. Als Pufferlösung diente hier jeweils TBS.

Für Thrombin und MMP14 wurden zur weiteren Charakterisierung der Prozessierung differenziertere Graduierungsschritte bezüglich der Protease-Konzentration und des Zeitverlaufs durchgeführt. Dies diente im Besonderen zur Optimierung der Bedingungen für die anschließende Proteinsequenzierung. Dafür wurden Proteasekonzentrationen von 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 und 20µg/ml Protease eingesetzt und Zeitverläufe von 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 24, 48, 149 Stunden gewählt.

Sämtliche Verdauansätze wurden sofort nach Ablauf der Inkubationszeit mittels Westernblot gegen n- und c-terminale Epitope untersucht oder unmittelbar tiefgefroren. Sollten die Ansätze für funktionelle Versuche verwendet werden, so wurden jeweils Aliquots mittels Westernblot analysiert. Nichtverwendete Verdauansätze wurden sofort bei -20°C tiefgefroren und später nur auf Eis weiter verwendet.

#### **4.6.2. In-situ-Verdaue**

##### MMP14:

HEK293, die entweder mit MMP14 oder Vektor stabil transfiziert waren, wurden mit FLAG-TEM5-Myc-DNA oder Vektor-DNA nach der Kalzium-Phosphat-Methode (s.o.) in 6-Well-Platten transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium (DMEM) gewechselt und durch frisches Medium ohne Supplement ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde dieses Medium abgenommen und die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Die Überstände wurden nach TCA-DOC-Präzipitation aufgereinigt, die Zellen hingegen in Probenpuffer lysiert. Die aufgereinigten Proteinproben und Lysate der Zellen wurden in der Westernblotanalyse untersucht.

##### Thrombin:

HEK293-TEM5-transfizierte oder HEK293-Vektor-transfizierte Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde gewechselt und durch frisches, serumfreies Medium ersetzt. Entweder 10µg/ml Thrombin wurde ins Medium pipettiert oder die Zellen wurden unbehandelt gelassen. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Die Überstände wurden nach TCA-DOC-Präzipitation aufgereinigt und die Zellen in Probenpuffer lysiert. Die aufgereinigten Proteinproben und Lysate der Zellen wurden in der Westernblotanalyse untersucht.

#### **4.7. Zelladhäsionsversuch**

##### Vorbereitung der Wells:

Unter Zellkulturbedingungen wurden 96-Well-ELISA-Polystyrolplatten mit Antikörpern (10µg/ml in 50µl PBS; die optimale Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt; Anhang Abb. 4) über Nacht bei 4°C beschichtet und am nächsten Tag nach Absaugen der primären Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 1% BSA in PBS geblockt. Als Antikörper wurden anti-FLAG, anti-His und anti-Vitronectin verwendet. Die Blocklösung wurde wiederum abgesaugt und die Wells wurden mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Wells mit 1,2µg Probe (Vitronectin, sowie aus verschiedenen Verdauansätzen: sTEM5, TEM5-N80, TEM5-N60, TEM5-ΔN80, TEM5-ΔN60) pro 50µl PBS befüllt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Diese Lösungen wurden am darauffolgenden Tag wiederum abgesaugt und die Wells wurden dreifach mit PBS sorgfältig gewaschen.

##### Vorbereitung der Endothelzellen:

Semikonfluente bis konfluente HUVECs wurden mit Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst und in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur bei gleichzeitigem leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurden die HUVECs in Endothelzell-Basalmedium (PromoCell®) mit 0,1% BSA resuspendiert. HUVECs wurden aliquotiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert oder nicht behandelt.

##### Adhäsion:

$3 \times 10^4$  Zellen pro Well wurden ausgesät und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden zweimal mit 37°C warmen PBS ausgewaschen. Die Wells wurden mit vorgewärmtem Medium und 0,1 Vol. AlamarBlue® (Serotech®) gefüllt und acht Stunden inkubiert. Die Zellüberstände wurden in frische 96 Well-Platten überführt und die Absorption von AlamarBlue® in den Wells bei 570 und 600 nm gemessen. Die Anzahl der adhärenent gebliebenen Zellen entsprach der Reduktion des AlamarBlue®. Sie wurde nach den Angaben des Herstellers berechnet.

##### Konditioniertes Medium

Um Adhäsionsversuche mit konditioniertem Medium durchzuführen, wurden Überstände von 293-MMP14-TEM5-Zellen und 293-MMP14-Vektor-Zellen gesammelt und über Agarose-Beats aufgereinigt (zur Methode siehe: Aufreinigung von TEM5-Expressionsprodukten). Diese aufgereinigten, eluierten und neutralisierten Überstände wurden auf den mit anti-FLAG vorbehandelten ELISA-Platten über Nacht inkubiert. Die Adhäsions-Versuche wurden, wie oben beschrieben, weiter durchgeführt und ausgewertet.

#### **4.8. Endothelzell-Migration: Wound-Healing-Assay**

Unter Zellkulturbedingungen wurden „24-Well-suspend-culture“-Platten mit Vitronectin, Kollagen-I, Fibronectin und Matrigel (groth-factor-reduced) jeweils in einer Konzentration von 10µg/ml in eiskaltem PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells mit PBS gewaschen und für vier Stunden bei Raumtemperatur mit 1% BSA in PBS geblockt. Es wurde daraufhin wiederum zweimal mit PBS gewaschen.

10<sup>5</sup> HUVECs pro Well wurden in OptiMEM-I-Medium unter Zusatz von 50ng/ml VEGF ausgesät und erneut über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der homogene Endothelzell-Monolayer wurde am nächsten Morgen mit exakt senkrecht aufgesetzter Spitze einer 1ml Pipette (=blaue Spitze) über die gesamte Länge des Durchmesser des Wells in einem Zug verletzt. Die Wells wurden mit 37°C warmen PBS zweifach gründlich gewaschen und wieder mit Opti-MEM-I-Medium mit Addition von 50ng/ml VEGF befüllt. Die Zellüberstände wurden entweder mit je 10µg/ml löslichem TEM5-ECD oder TEM5-N60 versetzt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Im Abstand von jeweils zwei Stunden wurden mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie Photos mit einer Digitalkamera aufgenommen. Auf diesen Photos wurde mit Microsoft Power Point 2003® quantitativ die Migrationsgeschwindigkeit ermittelt.

#### **4.9. Berechnungen, Abbildungen und statistische Signifikanz**

Die erhobenen quantitativen Daten wurden mit Hilfe des PC-Programms Microsoft Excel 2003® verwaltet und berechnet. Für die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde der Student's T-Test verwendet. Dabei wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson angewandt. Als Signifikanzniveaus wurden folgende Werte definiert: Ein Wert von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen, Werte von  $p > 0,05$  hingegen als nicht signifikant.

Die Abbildungen wurden mittels Word 2003®, Excel 2003® und PowerPoint 2003® (Microsoft Corporation) erstellt.

Alle Abbildungen, die modifiziert von fremden Autoren übernommen wurden, sind gekennzeichnet.

Alle Abbildungen im Ergebnisteil und Abbildungen ohne Angaben zu Fremdautoren wurden vom Verfasser erstellt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Fragestellung

Vor der Darstellung der Ergebnisse soll hier nochmals kurz die Fragestellung thematisiert werden. Drei wesentliche Punkte zu Biologie und Funktion von TEM5 waren zu klären. Gibt es neben den bereits bekannten noch weitere funktionelle Fragmente von TEM5? Durch welche Proteasen werden diese prozessiert? In welchem Bereich liegen potenzielle Schnittstellen dieser Proteasen? Haben diese Modifikationen eine biologische Funktion im Bezug auf das kryptische RGD-Motiv?

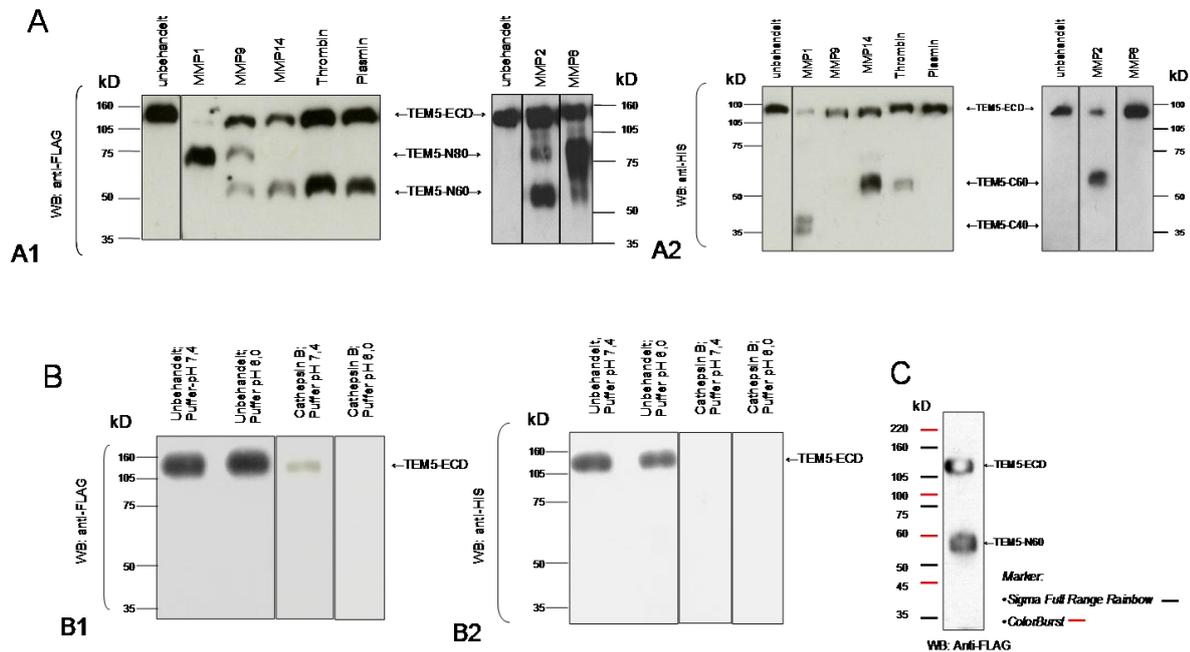
### 5.2. Identifizierung von TEM5-Fragmenten

#### 5.2.1. Zwei TEM5-Fragmente: TEM5-N80 und TEM5-N60

Vor Beginn dieser Arbeit war bekannt (Vallon and Essler 2006), dass lösliches TEM5 (sTEM5=TEM5-ECD) von MMP9 in vitro erkannt und gespalten werden kann. Westernblotanalysen dieses Verdauansatzes zeigten, dass neben den Banden für unverdautes TEM5-ECD zwei weitere Banden bei 80kDa und bei 60kDa entstehen. Die Bande bei 80kDa war dabei dominierend. Ebenfalls war bekannt, dass dieses 80kDa-Fragment (genannt ppsTEM5 oder TEM5-N80) via RGD-Motiv funktionell über  $\alpha\beta 3$ -Integrin wirken kann (Vallon and Essler 2006). Um die Frage zu beantworten, welche Proteasen theoretisch in vivo eine Rolle bei der Prozessierung von TEM5 spielen könnten und über welche Mechanismen diese Prozessierung stattfinden könnte, wurden zunächst empirisch aus der Literatur (Egeblad and Werb 2002; Genis, Galvez et al. 2006; Roy, Zhang et al. 2006) bekannte Vertreter von Dekryptasen getestet. Aus der Gruppe der löslichen Metalloproteinasen wurden hierfür MMP 1, 2, 8 und 9 und als primär membranständige MMP 14 getestet (Anm.: Für diese Versuche wurde jedoch nur die katalytische Domäne der MMP14 in Lösung verwendet). Zusätzlich wurden Thrombin, dessen Rolle nicht nur bei der Blutgerinnung, sondern auch bei der Metastasierung und Tumorinvasion bekannt ist und Plasmin, das als potente Protease ebenfalls neben antagonistischer Wirkung in der Blutgerinnung auch Stromainvasion von Tumorzellen vermittelt (Andreasen, Kjoller et al. 1997), getestet.

In der Westernblotanalyse mit Detektierung des N-Terminus via FLAG-Tag (Abb. 1) zeigte sich, dass abhängig von der gewählten Protease zwei Fragmente bei 60kDa (TEM5-N60) und bei 80kDa (TEM5-N80) in unterschiedlicher Menge entstehen. Besonders fiel aber die überraschend stark ausgeprägte Prozessierung zu einem 60kDa großen Fragment durch einige Proteasen auf. Diese Ergebnisse bestätigten einerseits die bereits bekannten

Beobachtungen zur Prozessierung zu TEM5-N80 mit MMP9, rückten aber auch das so entstandene TEM5-N60-Fragment in den Fokus des Interesses.



**Abb. 1**

**(A) TEM5-ECD wird von MMPs, Plasmin und Thrombin zu TEM5-N80 und TEM5-N60 prozessiert.** Westernblotanalyse von *in vitro* TEM5-ECD-Verdauansätzen mit verschiedenen Proteasen; für die dargestellten Prozessierungen wurden jeweils 10µg/ml Protease bei 0,2mg/ml Probe (TEM5-ECD) verwendet. Es wurden jeweils Analysen gegen n-terminale FLAG-Epitope und c-terminale HIS-Epitope durchgeführt. **(A1)** Die Prozessierung mit MMP1 resultiert besonders in der Bildung von TEM5-N80. MMP14 und Thrombin prozessieren TEM5-ECD effektiv zu TEM5-N60. **(A2)** Bei MMP1, MMP14 und Thrombin finden sich c-terminale Gegenstücke zu den N60- und N80-Fragmenten. **(B)** Cathepsin B degradiert bei den beschriebenen pH-Optima TEM5-ECD lediglich, eine selektive Prozessierung kann nicht nachgewiesen werden. Weder n-terminal **(B1)** noch c-terminal **(B2)** finden sich adäquat TEM5-Fragmente. **(C)** Exaktere n-terminale Größenbestimmung des TEM5-N60-Fragments unter Verwendung verschiedener Größenmarker.

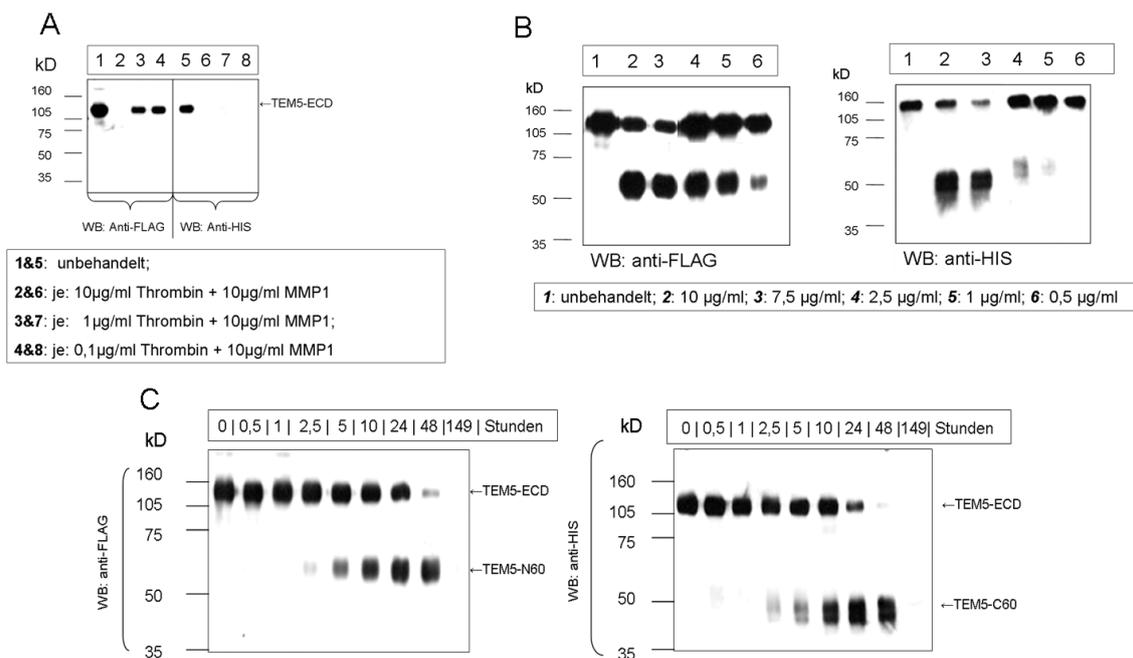
Die Prozessierung mit MMP1 resultiert fast ausschließlich im bereits vorher beschriebenen TEM5-N80-Fragment. Als Gegenstück wurde im Westernblot gegen den C-Terminus ein etwa 40kDa großes c-terminales Fragment (→TEM5-C40) gefunden. Die Prozessierung mit MMP 2, 8, 9 resultierte in einer weniger effektiven Prozessierung, bei der zwei Fragmente - ein N80- und ein N60- Fragment - gefunden wurden. Durch die Prozessierung mit Thrombin, Plasmin und MMP14 entstanden jedoch fast ausschließlich n-terminale Fragmente von 60kDa. Während die Prozessierung durch Plasmin jedoch schwächer (und nur bei Konzentrationen größer als 10µg/ml) stattfand, wurde TEM5-ECD durch Thrombin und MMP14 effektiv zu TEM5-N60 prozessiert. Im Kontroll-Westernblot gegen den His-

markierten C-Terminus fanden sich die entsprechenden Proteinfragmente bei etwa 60kDa (→TEM5-C60) als Gegenstücke.

Um den Kreis der Proteasen zu erweitern, wurde ein bedeutender Vertreter aus der Gruppe der Cathepsine (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006) getestet. Ein Verdau mit Cathepsin B bei dessen beschriebenen optimalen pH-Werten zeigte eine völlige Degradation (Abb. 1 B) von TEM5-ECD. Dies geschah auch bei sehr niedrigen Konzentrationen (bis zu Faktor 1/100; Daten nicht gezeigt). In der Westernblotanalyse gegen das c-terminale His-Tag wie auch gegen das n-terminale FLAG-Tag konnten weder Fragmente, noch unverdautes lösliches TEM5 (TEM5-ECD) gefunden werden. Dies spricht für eine völlige Degradation, nicht aber für eine selektive Prozessierung.

### 5.2.2. Charakterisierung der TEM5-N60-Prozessierung

Als nächstes sollen einzelne Schritte der Prozessierung näher betrachtet werden. Als Repräsentanten der Proteasen wurde MMP1 und Thrombin ausgewählt.



**Abb. 2**

**Westernblotanalyse zur Charakterisierung der TEM5-ECD-Prozessierung am Beispiel der Protease Thrombin. (A)** Die Prozessierung zu TEM5-N60 ist kein mehrstufiger Prozess über TEM5-N80 als Zwischenschritt. Werden MMP1 und Thrombin kombiniert, so erfolgt eine komplette Degradation. **(B)** Die Prozessierung von TEM5-ECD zu TEM5-N60 ist konzentrationsabhängig; bei niedrigeren Konzentrationen ist die Prozessierung noch immer effizient. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. **(C)** Die Prozessierung bei 10µg/ml (≈25U Thrombin) ist zeitabhängig, nach 24 bis 48 Stunden ist eine effektive Prozessierung erreicht.

Zunächst stellte sich die Frage, ob die Prozessierung von TEM5-ECD zu TEM5-N60 ein zweistufiger Prozess ist, bei dem eventuell TEM5-N80 als Zwischenstufe entsteht. Hierzu wurde TEM5-ECD sowohl mit MMP1 als auch Thrombin gleichzeitig inkubiert und die Thrombin-Konzentrationen in 10er Potenzen reduziert. Hypothetisch sollte MMP1 TEM5-ECD zuerst zu TEM5-N80 prozessieren, woraufhin Thrombin den Schnitt zu TEM5-N60 leichter vermitteln könnte. Durch diese kombinierte Vorgehensweise wurde TEM5-ECD lediglich degradiert. Nennenswerte TEM5-Fragmente konnten im Westernblot (Abb. 2A) nicht nachgewiesen werden.

Um die Prozessierungseffektivität von Thrombin weiter zu untersuchen, wurde anschließend die Konzentration von Thrombin schrittweise nach unten skaliert (Abb. 2B). Selbst bei 1/20 des Ausgangswertes von 10 µg/ml Protease konnte zumindest ein kleiner Anteil an prozessiertem TEM5-ECD festgestellt werden.

Um für weitere Verdauansätze optimale Bedingungen zu schaffen, wurde nun auch die Prozessierungszeit nach oben skaliert (Abb. 2C). Im Bereich von 24 bis 48 Stunden ergab sich eine hochgradige Prozessierungseffizienz.

### **5.2.3. Identifizierung der Spaltstellen von Thrombin und MMP14**

Da für das TEM5-N80-Fragment bereits eine Interaktion mit Integrinen über das RGD-Motiv gezeigt wurde (Vallon and Essler 2006), stellte sich die Frage, ob das RGD-Motiv im n-terminalen TEM5-N60 oder im c-terminalen TEM5-ΔN60 enthalten ist oder vielleicht gar bei der Spaltung zu TEM5-N60 verloren geht. Nicht nur für die Charakterisierung der Fragmente, sondern speziell auch für weitere funktionelle Fragestellungen war die Klärung dieser Frage essenziell.

Da sowohl durch Thrombin wie auch durch MMP14 ausreichend c-terminale Fragmente entstanden, konnte der Versuch einer n-terminalen Sequenzierung mittels Edman-Abbaus unternommen werden. Nachdem durch Optimierung der Verdaubedingungen ausreichend Material gewonnen werden konnte, ergab die n-terminale Sequenzierung durch die Firma „Proteome-Factory“ (Berlin) die Aminosäuresequenz: N'-LGGGAPG-C' für das durch MMP14 prozessierte Fragment und N'-RASRRC-C' für das mit Thrombin prozessierte Fragment.

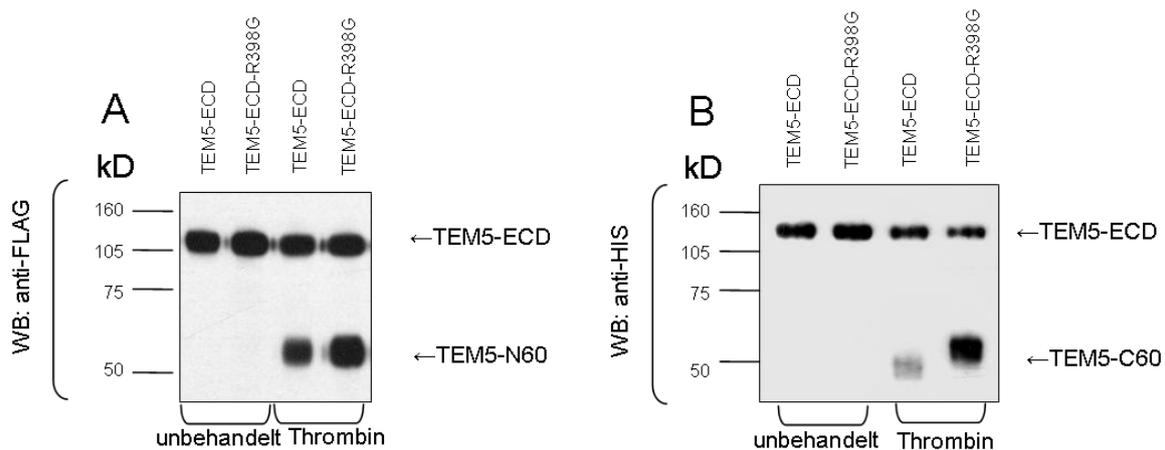
Sequenzanalysen mit der TEM5-Sequenz analog der „NCBI-sequence NP\_116166“ ergaben, dass beide Sequenzen nur einmalig vorkommen. Somit konnten die Sequenzen klar zugewiesen werden. Für MMP14 liegt diese Spaltstelle zwischen Prolin 389 und Leuzin 390, für Thrombin zwischen Threonin 397 und Arginin 398. Der Abgleich mit der bekannten Sequenz zeigte einen Abstand der Spaltstelle von 25 Aminosäuren für MMP14 bzw. von 32 Aminosäuren für Thrombin vom RGD-Motiv in c-terminaler Richtung.



Deletionsmutante - beginnend mit Arginin 398 bis einschließlich Arginin 369 - zu klonieren, um eventuelle sekundäre bzw. alternative Spaltstellen für Thrombin zu eliminieren.

Um weitere funktionelle Versuche mit einem hochreinen TEM5-N60-Fragment durchführen zu können, wurde versucht, dieses Fragment - beginnend mit Arginin 398 abwärts zum N-Terminus - zu klonieren. Diese Konstrukte sollten durch stabile Transfektion in HEK293-Zellen exprimiert werden. Nach Aufreinigung der Zellüberstände durch anti-FLAG-Agarose wurde durch SDS-Page mit anschließender Coomassie-Färbung und Westernblotanalyse gegen das FLAG-Epitop gezeigt, dass lediglich die Punktmutante TEM5-ECD-R398G im Zellüberstand detektierbar exprimiert wurde.

Zusätzlich wurden mit TEM5-ECD-R398G Prozessierungsversuche durchgeführt. Diese Verdauansätze wurden wiederum mit Hilfe von Westernblots (Abb. 4) untersucht. Die Analyse des N-Terminus mittels anti-FLAG-Antikörper zeigte, dass trotz Punktmutation die Prozessierung durch Thrombin nicht unterdrückt werden konnte. Es fanden sich annähernd identisch große Banden im Westernblot. Somit ergab sich für die n-terminalen Banden kein Unterschied zwischen Wildtyp (TEM5-ECD) und Mutante (TEM5-R398G) (Abb. 4A).



**Abb. 4**

**Westernblotanalyse: Die TEM5-ECD-R398G Mutante wird weiterhin von Thrombin erkannt und gespalten**

Es wurden 10µg/ml Thrombin (≈25U) bei 0,2mg/ml Probe eingesetzt. **(A)** Die TEM5-N60 Fragmente von Wildtyp TEM5-ECD und Mutante TEM5-ECD-R298G sind identisch groß. **(B)** Die c-terminalen Fragmente von TEM5-ECD und TEM5-ECD-R398G unterscheiden sich um etwa 5 kDa.

Außerdem konnten auch MMPs, die zur Prozessierung von unmutiertem TEM5-ECD fähig sind, dieses Mutationskonstrukt prozessieren (Daten nicht gezeigt). Eine interessante Beobachtung wurde allerdings im Westernblot (Abb. 4B) gegen das c-terminale His-Epitop gemacht: Das c-terminale Fragment der Mutationsvariante TEM5-ECD-R398G ist beim Thrombinverdau um etwa 5 kDa größer als das Wildtyp-Fragment. Dies deutet darauf hin,

dass es entweder eine zweite potenzielle Spaltstelle für Thrombin geben muss oder dass die identifizierte Spaltstelle durch sekundäre Modifizierung entsteht.

Im Fall, dass die identifizierte Spaltstelle durch sekundäre Modifizierung entsteht, müsste die primäre Spaltstelle näher am N-Terminus liegen. Da es jedoch in diesem Bereich mehrere verschiedene Arginine, sowie andere potenzielle Aminosäuresequenzen gibt, die theoretisch von Thrombin erkannt werden könnten, führten die Klonierungen nicht zur exakten Verifizierung der Spaltstelle. Eine Mutation aller denkbaren Spaltstellen erschien zu artifiziell, um zuverlässige Aussagen zu generieren. Dieses unerwartete Ergebnis führte dazu, dass von weiteren Klonierungen Abstand genommen wurde. Das Vorhandensein des RGD-Motivs im n-terminalen Fragment musste deshalb über funktionelle Daten untersucht werden.

#### **5.2.5. Zwei verschiedene Prozessierungswege**

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl lösliche als auch primär membranständige Proteasen die extrazelluläre Domäne von TEM5 prozessieren können, ergab sich eine weitere entscheidende Frage zur Charakterisierung der Prozessierung von TEM5. Findet die Prozessierung durch lösliche Proteasen statt oder wird das „shedding“ von membranständigem TEM5 auch durch membranständige Proteasen an der Zelloberfläche induziert?

#### **5.2.6. Lösliche Proteasen können TEM5-N60 von der Zelloberfläche abspalten**

Eine mögliche Hypothese bestand darin, dass lösliche Proteasen die Abspaltung von löslichen TEM5-Fragmenten direkt von der Zelloberfläche vermitteln. Als Vertreter löslicher Proteasen diente hier wiederum Thrombin. Es wurden zunächst HEK293-Zellen, die nach stabiler Transfektion TEM5 exprimieren, in 6-Loch-Platten zur Konfluenz gebracht. Das Medium wurde gewechselt und neues, serumfreies Medium mit Thrombin versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Überstände mittels Westernblot (Abb. 5B) gegen das n-terminale FLAG-Tag analysiert.

Hier zeigte sich, dass lösliches Thrombin - im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle - die Abspaltung von TEM5-N60 massiv verstärken konnte. Die Abspaltung von TEM5-ECD wurde nicht verstärkt, ebenso wurden keine n-terminalen Fragmente von 80kDa-Größe nachgewiesen.

#### **5.2.7. Membranständige Proteasen können TEM5-N60 von der Zelloberfläche abspalten**

Von Endothelzellen ist bekannt, dass sie membranständige Proteasen wie MMP14 exprimieren (Collen, Hanemaaijer et al. 2003; Genis, Galvez et al. 2006). Die Tatsache, dass MMP14 ebenso wie Thrombin die Prozessierung von löslichem TEM5-ECD zu TEM5-N60 effektiv induzierte, führte zur weiteren Hypothese, dass das „shedding“ von TEM5-N60 auch

durch membranständige Proteasen erfolgen kann. HEK293-Zellen wurden zunächst mit membranständiger MMP14-cDNA stabil transfiziert. Diese HEK293-MMP14-Zellen wurden transient mit Vollängen TEM5 oder als Kontrolle mit Vektor-DNA transfiziert und die Zellüberstände nach entsprechender Inkubationszeit mittels Westernblot analysiert (Abb. 5A). Im Vergleich zu den vektortransfizierten Zellen zeigte der Westernblot gegen n-terminales FLAG-Tag bei den MMP4-transfizierten Zellen signifikant mehr TEM5-N60-Fragmente. Somit konnte auch für die membranständige Protease MMP14 nicht nur *in vitro*, sondern auch *in situ* gezeigt werden, dass sie zur Prozessierung von TEM5 fähig ist.

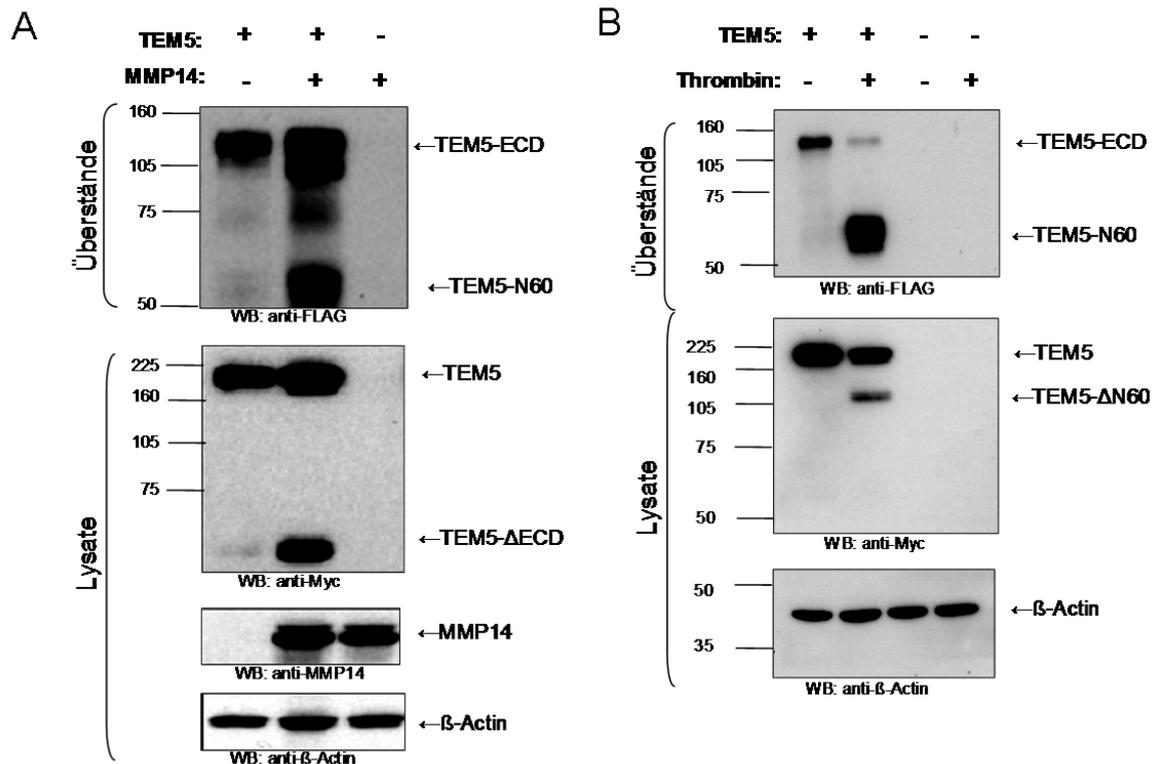


Abb. 5

**Lösliche wie membrangebundene Proteasen können membranständiges TEM5 prozessieren und TEM5-N60 abspalten.**

**(A) MMP14, als Vertreter von membranständigen Proteasen, vermittelt das Abspalten (shedding) von TEM5-N60 von der Zelloberfläche.** HEK293-Zellen wurden mit TEM5- und MMP14-Konstrukten kotransfiziert. Das Medium wurde durch supplementfreies Medium ersetzt und die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Die Zellüberstände wurden aufkonzentriert und die Zellen lysiert. Die Überstände und Lysate wurden mittels Westernblot gegen n-terminale (Flag-Tag) und c-terminale (Myc-Tag) Epitope analysiert. Die MMP14-Expression wurde in den Lysaten mittels MMP14-Antikörper im Westernblot nachgewiesen. Die in die Gele geladene Lysatmenge wurde mit anti-β-Actin-Antikörpern im Westernblot verifiziert.

**(B) Auch Thrombin, als Vertreter löslicher Proteasen, kann TEM5-N60 von der Zelloberfläche abspalten.** TEM5 exprimierende HEK293-Zellen wurden in Kultur gebracht. Das Medium wurde durch supplementfreies (=serumfrei) Medium ersetzt, mit 10µg/ml Thrombin versetzt und die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Die Zellüberstände wurden aufkonzentriert und die Zellen lysiert. Die Überstände und Lysate wurden mittels Westernblot gegen c-terminale (FLAG-Tag) und c-terminale (Myc-Tag) Epitope analysiert. Die in die Gele geladene Lysatmenge wurde mit anti-β-Actin-Antikörpern im Westernblot verifiziert.

### **5.3. Funktionelle Charakterisierung der Fragmente**

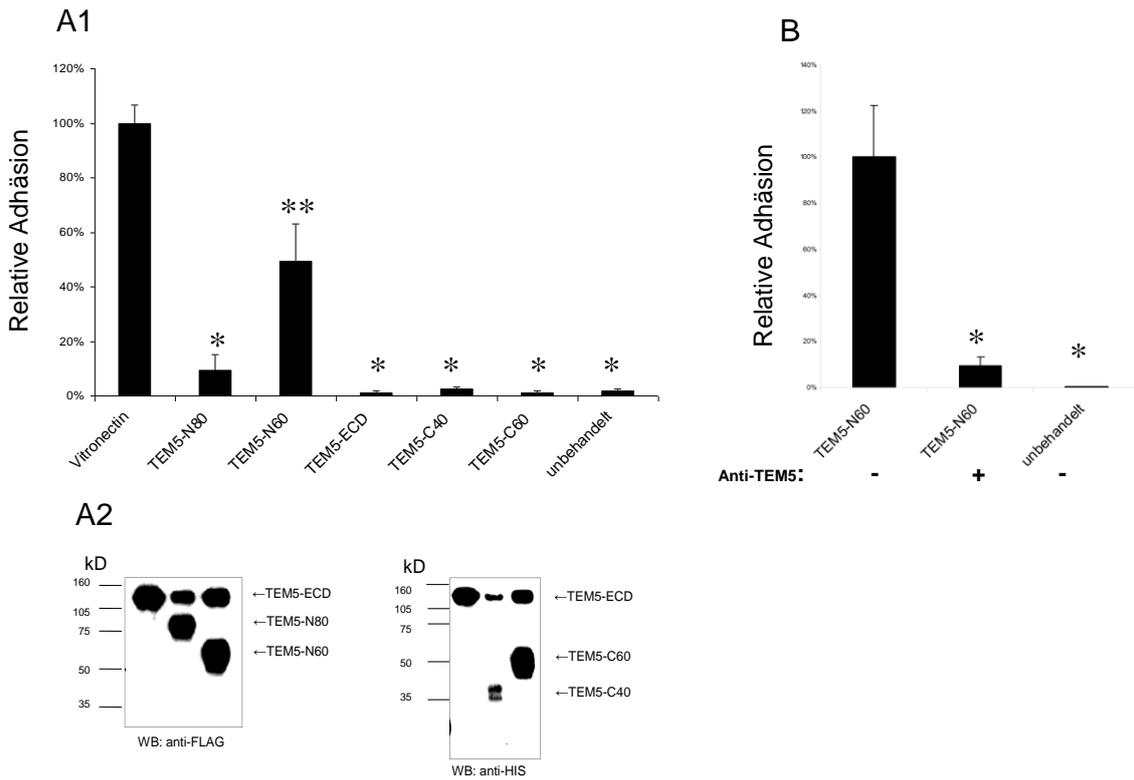
Von TEM5-N80 war bekannt, dass es mit Integrin  $\alpha\beta 3$  interagieren kann (Vallon and Essler 2006). Eine Reihe von funktionellen Versuchen sollte zur weiteren Charakterisierung der gefundenen Fragmente beitragen. Im Kern stellte sich die Frage, ob die gefundenen TEM5-Fragmente die geforderten Bedingungen eines funktionellen RGD-Motiv, die von Erkki Ruoslahti (Ruoslahti 1996) formuliert wurden, erfüllen und welches der gefundenen Fragmente dies in welchem Maße tut. Die erste Bedingung - die Vermittlung von Adhäsion und Zellausbreitung („spreading“) durch ein immobilisiertes, funktionelles RGD-Motiv - wurde mittels verschiedener Adhäsionsassays überprüft. Der Erfüllung der zweiten von Ruoslahti geforderten Bedingung wird in 5.3.4 nachgegangen.

#### **5.3.1. Endothelzellen können auf immobilisiertem TEM5-N60 adhäreren**

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Spaltung von TEM5 durch Proteasen im Falle von TEM5-N60 in unmittelbarer Nähe zum RGD-Motiv stattfindet. In der meiner Arbeit vorausgehenden Arbeit (Vallon and Essler 2006) wurde zudem gezeigt, dass TEM5-N80-Fragmente mit Integrin  $\alpha\beta 3$  interagieren können, und dass das RGD-Motiv dafür verantwortlich ist. Ich entschied mich deshalb, in HUVEC-Adhäsionsversuchen (Abb.6) alle bisher bekannten und die neu identifizierten löslichen TEM5-Fragmente (Abb. 6B) im direkten Vergleich zu untersuchen. Als Referenz diente der bekannte  $\alpha\beta 3$ -Ligand Vitronectin. Hierbei zeigte sich (Abb. 6A), dass das neu charakterisierte TEM5-N60 signifikant mehr HUVEC-Adhäsion (etwa um den Faktor fünf) vermittelte als das bisher beschriebene TEM5-N80. Die Endothelzell-Adhäsion gegen TEM5-N60 betrug dabei etwa 60% derer gegenüber dem Referenzwert der Adhäsion von Vitronectin. Die c-terminalen Fragmente und die löslichen TEM5-ECD-Fragmente (=sTEM5) zeigten keinen höheren Einfluss auf die Adhäsion als die Negativ-Kontrollen. Dies lieferte darüber hinaus den ersten entscheidenden Hinweis, dass das RGD-Motiv im TEM5-N60-Fragment enthalten sein muss.

Zur Bestätigung der Rolle von TEM5-N60 bei der Adhäsion von Endothelzellen wurde zusätzlich zu Negativkontrollen ein monoklonaler Antikörper gegen TEM5 zur Kontrolle der Spezifität der Adhäsion verwendet. Dieser Antikörper verminderte signifikant die Endothelzell-Adhäsion gegen TEM5-N60 (Abb. 6B).

Insgesamt legten diese Daten den Schluss nahe, dass das neu identifizierte TEM5-N60 das aktivste und biologisch funktionellste TEM5-Fragment sein muss. Aufgrund dessen wurde dieses Fragment in den Fokus der weiteren Untersuchungen gerückt.

**Abb. 6****Immobilisiertes TEM5-N60 vermittelt Endothelzelladhäsion**

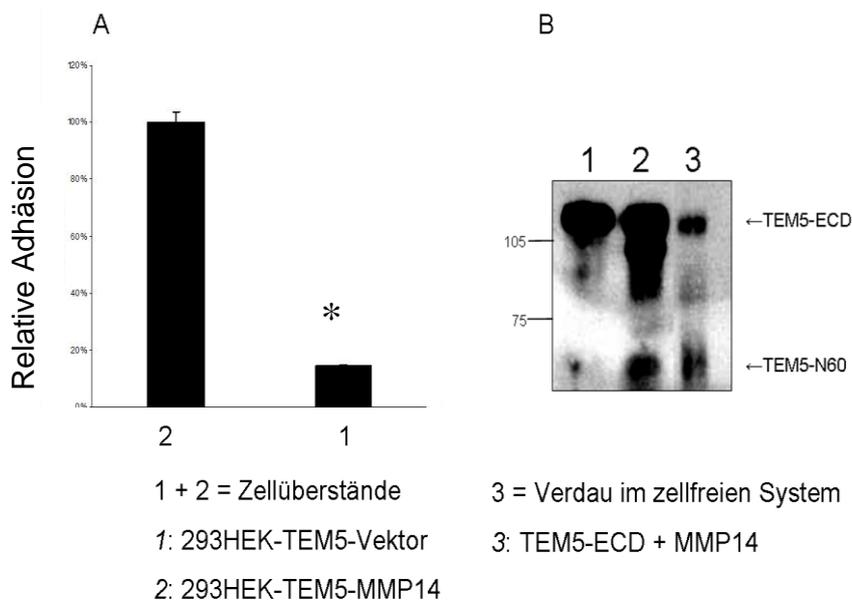
Jeweils  $n=3$ ; Mittelwerte: breite Balken; Standardabweichung: schmale Balken.

**(A)** HUVEC-Adhäsion (**A1**) gegen Vitronectin (Referenz), TEM5-Fragmente (Probe) und als Leerkontrolle FLAG-Antikörper (=unbehandelt); TEM5-Fragmente. **(A2)** Westernblot als Kontrolle der immobilisierten Lösungen. (\* $p<0,001$  versus Vitronectin; \*\* $p<0,01$  versus Vitronectin).

**(B)** HUVEC-Adhäsion gegen TEM5-N60 lässt sich mit einem monoklonalen Antikörper gegen TEM5 effektiv hemmen. (\* $p<0,001$  versus TEM5-N60 ohne Anti-TEM5).

### 5.3.2. Konditioniertes Medium von TEM5 und MMP14 kotransfizierten Zellen vermittelt Endothelzelladhäsion

Vorausgehend wurde gezeigt, dass TEM5-N60 auch in situ generiert werden kann (Abb. 5A). Zum Beweis, dass dieses in situ entstandene Fragment auch funktionell aktiv ist und sich somit funktionell identisch zum in vitro verdauten TEM5-N60-Fragment verhält, wurden die schon beschriebenen Adhäsionsassays durchgeführt.



**Abb.7**

**Konditioniertes Medium von TEM5-MMP14-kotransfizierten Zellen vermittelt Endothelzelladhäsion. In situ entstandenes TEM5-N60 entspricht dem in vitro entstandenen TEM5-N60-Fragment.**

Jeweils  $n=3$ ; Mittelwerte: breite Balken; Standardabweichung: schmale Balken;  $*p<0,001$  versus 293HEK-TEM5-MMP14

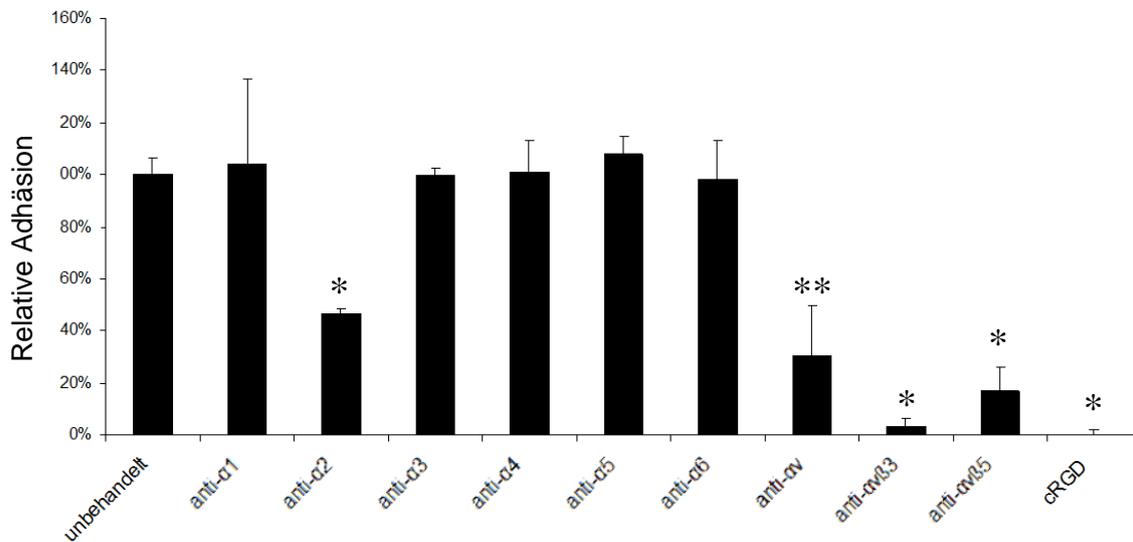
**(A)** HUVEC-Adhäsion gegen mit TEM5-MMP14-transfizierten (1) und TEM5-Vektor-transfizierten (2) Medien. Diese wurden mittels FLAG-Antikörper selektiv immobilisiert. HEK293 wurden mit TEM5 und wahlweise MMP14 oder Vektor transfiziert. Das Medium wurde gewechselt und nach 24 Stunden wurden die Überstände gesammelt. Die Überstände wurden über FLAG-Agarose aufgereinigt, eluiert und auf FLAG-beschichteten Kulturplatten immobilisiert. **(B)** Die Westernblotanalyse der konditionierten Medien ((1) und (2)) zeigt zur Kontrolle (3) in vitro mit MMP14 verdautes TEM5-ECD.

Anstelle von in vitro generiertem TEM5-N60 wurde mit konditioniertem Medium von TEM5-MMP14-kotransfizierten-HEK293-Zellen im Vergleich zu MMP14-vektorkotransfizierten-HEK293-Zellen Adhäsionsassays durchgeführt. Dabei (Abb.7) zeigte sich, dass die Adhäsion gegen das immobilisierte und von MMP14-TEM5-HEK293-Zellen konditionierte Medium fünffach höher war als gegen das immobilisierte Medium der Vektorkontrolle. Damit gelang der Beweis, dass dieses in situ generierte TEM5-N60 ebenfalls funktionell aktiv ist.

### 5.3.3. Das RGD-Motiv ist verantwortlich für die TEM5-N60 vermittelte Endothelzell-Adhäsion an $\alpha\beta 3$ -Integrin

Es musste nachgewiesen werden, dass das RGD-Motiv im TEM5-N60 enthalten ist. Zusätzlich sollte überprüft werden, welches Integrin die Adhäsion von Zellen an TEM5-N60 vermittelt. Hierzu wurden vor dem Adhäsionsversuch HUVECs mit zyklischem RGD-Peptid oder inhibierenden Integrin-Antikörpern inkubiert.

Die Ergebnisse (Abb. 8) zeigen, dass zyklisches RGD-Peptid und Antikörper gegen das Integrin  $\alpha\beta 3$  die Zelladhäsion vollständig inhibieren. Ebenso wurde die Adhäsion durch  $\alpha\beta 5$ -Integrin-Antikörper zu 80% gehemmt. Interessanterweise ergab sich auch eine signifikante Reduktion der Adhäsion um etwa 50% beim Einsatz von  $\alpha 2$ -Integrin-Antikörpern.



**Abb. 8**

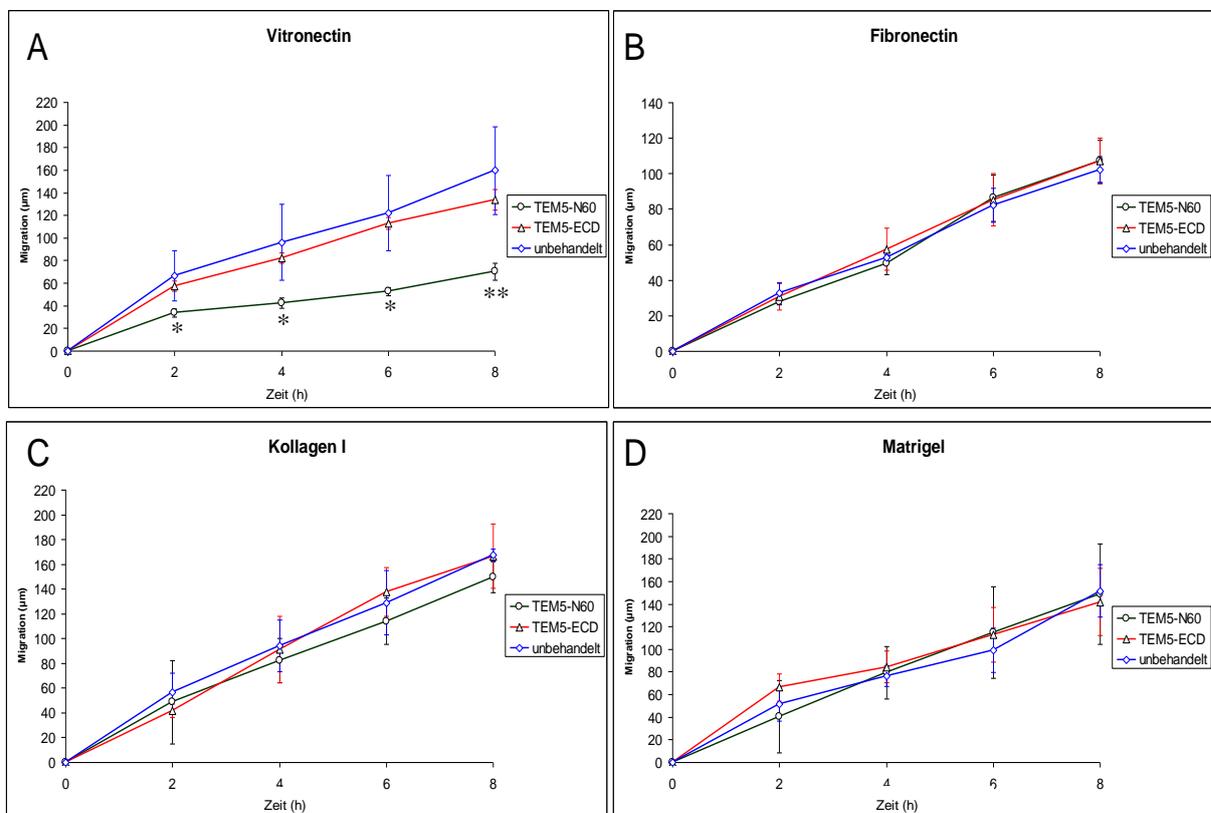
#### **Immobilisiertes TEM5-N60 vermittelt Endothelzelladhäsion vor allem via $\alpha\beta 3$ -Integrin**

Jeweils  $n=3$ ; Mittelwerte: breite Balken; Standardabweichung: schmale Balken; \* $p<0,001$  versus unbehandelt; \*\* $p<0,01$  versus unbehandelt

TEM5-N60 wurde mittels FLAG-Antikörper immobilisiert. HUVECs wurden mit funktionsblockierenden Integrin-Antikörpern ( $25\mu\text{g/ml}$ ), zyklischem RGD-Peptid (cRGD;  $50\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten inkubiert oder unbehandelt gelassen. Im Anschluss wurden die Zellen auf dem immobilisierten TEM5-N60 ausgesät und die Adhäsion quantifiziert.

### 5.3.4. Lösliches TEM5-N60 wirkt antagonistisch gegenüber dem $\alpha v\beta 3$ -Liganden Vitronectin und reduziert die Endothelzellmigration

Errki Ruoslahti (Ruoslahti 1996) stellt als zweite Bedingung an ein funktionelles RGD-Motiv, dass es in Lösung antagonistisch zu Integrin-Liganden wirken muss. Um diese Bedingung zu überprüfen, wurden „Wound-Healing-Assays“ (Abb.9) durchgeführt. Dazu wurden HUVECs auf verschiedenen Liganden ausgesät. Nachdem sich eine Endothelzellschicht gebildet hatte, wurde diese definiert verletzt. Auf dem  $\alpha v\beta 3$ -Liganden Vitronectin wird die HUVEC-Migration beim Wundverschluss durch lösliches TEM5-N60 deutlich vermindert (Abb. 9A). TEM5-ECD zeigt im direkten Vergleich zur unbehandelten Kontrolle jedoch keinen Effekt auf die Migration. Die Migration auf den Integrin-Liganden Kollagen I ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ) und Fibronectin ( $\alpha 5\beta 1$ ) wurde weder von TEM5-N60 noch TEM5-ECD beeinflusst (Abb. 9 B-D).



**Abb. 9**

**Lösliches TEM5-N60 inhibiert die Endothelzellmigration auf dem  $\alpha v\beta 3$ -Liganden Vitronectin (A).**

Jeweils  $n=3$ ; Mittelwerte: Datenpunkte; Standardabweichung: schmale Balken; \* $p<0,05$  versus unbehandelt; \*\* $p<0,02$  versus unbehandelt

HUVECs wurden in Opti-MEM I mit 50ng/ml VEGF versetzt und auf immobilisiertem Vitronectin (A), Fibronectin (B), Kollagen I (C) und Matrigel (D) ausgesät. Es folgte eine Inkubation von 16 Stunden bis zur Konfluenz. Die Endothelzellschicht wurde mit einer Pipette verletzt und das Medium durch Opti-MEM I (+50ng/ml VEGF) ersetzt. Das Medium wurde entweder mit 10 $\mu$ g/ml TEM5-ECD oder TEM5-N60 versetzt oder unbehandelt gelassen. Die Migration wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

## 6. Diskussion

TEM5 könnte als Marker von Tumorgefäßen vielfältige klinische Einsatzmöglichkeiten eröffnen. Denkbar wäre einerseits eine Verwendung als prognostischer Tumormarker, andererseits - aufgrund seiner membranständigen Eigenschaften - ein Einsatz als Zielstruktur für zielgerichtete Angiogenese-Bildgebung. Auch als therapeutischer Angriffspunkt für selektive Pharmaka könnte TEM5 fungieren.

Allerdings muss, um diese Möglichkeiten besser ausloten zu können, mehr über dieses Protein in Erfahrung gebracht werden. Im Folgenden sollen zunächst extrazelluläre Vorgänge und Modifikationen dieses Moleküls sowie mögliche Auswirkungen dieser Veränderungen auf die biologische Funktion beschrieben werden.

### 6.1. *Die Biologie der extrazellulären Anteile von TEM5*

#### 6.1.1. TEM5 kann extrazellulär modifiziert werden

Bislang ist bekannt, dass MMP9 von TEM5 ein 80kDa großes, n-terminales Fragment abspalten kann (Vallon and Essler 2006). Von MMP9-prozessierten TEM5-Fragmenten und von diesen Fragmenten abgeleiteten, klonierten TEM5-N80-Konstrukten ist ferner eine Interaktion mit Integrinen bekannt. So nimmt man an, dass das in TEM5 enthaltene RGD-Motiv kryptisch ist und durch Proteolyse dekryptiert werden kann. Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher eine große Zahl aus der Literatur bekannter Vertreter von Dekryptasen (Roy, Zhang et al. 2006) getestet. Zu diesen zählen die bekannten Hauptdekryptasen MMP2 und MMP14 sowie weitere Metallomatrixproteasen (Hanemaaijer, Koolwijk et al. 1993; Egeblad and Werb 2002; Mott and Werb 2004; Roy, Zhang et al. 2006). Aber auch Serinproteasen wie Thrombin und Plasmin oder Cathepsin-Proteasen wie Cathepsin B (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006) werden zu den Dekryptasen gerechnet.

Diese Arbeit zeigt, dass verschiedene Proteasen TEM5 extrazellulär zu verschiedenen Fragmenten prozessieren können. Außer den bekannten n-terminalen 80kDa-Fragmenten (Vallon and Essler 2006) wurde ein weiteres n-terminales, 60kDa großes Fragment gefunden. Um die Bezeichnungen zu vereinheitlichen, wurden Fragmente ihrer Größe und ihres n-terminalen oder c-terminalen Ursprungs entsprechend benannt. Dieser Diktion folgend wurde das bekannte 80kDa große ppsTEM5 in dieser Arbeit in TEM5-N80 umbenannt.

Die Extrazellulärdomäne (TEM5-ECD) wurde lediglich von MMP1 selektiv zu einem TEM5-N80-Fragment prozessiert. Durch Prozessierung mit MMP2 und 8 entstanden unselektiv und in geringerem Maße TEM5-N80 und TEM5-N60. Die bereits beschriebene Prozessierung mit MMP9 (Vallon and Essler 2006) war ebenfalls weit weniger selektiv und zeigte als Resultat eine fast gleichwertige Entstehung von TEM5-N80- (ppsTEM5) und TEM5-N60-Fragmenten. Thrombin und MMP14 erwiesen sich dagegen als potente Proteasen für die selektive Prozessierung von TEM5-ECD zu TEM5-N60. Als erstes Ergebnis dieser Arbeit konnten also

TEM5-N80 als bereits bekanntes Fragment (Vallon and Essler 2006) reproduziert und TEM5-N60 als neues Fragment eindeutig identifiziert werden. Diese Fragmente galt es näher zu charakterisieren.

### **6.1.2. TEM5-N60 ist funktionell aktiv**

Alle gefundenen, extrazellulären Fragmente - darunter auch die c-terminalen Gegenstücke zu den benannten n-terminalen Fragmenten - wurden hinsichtlich ihrer Funktion untersucht. Nur von TEM5-N60 konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es funktionell mit Endothelzellen interagieren kann. Zwar vermittelte TEM5-N80, wie beschrieben, auch Endothelzelladhäsion, jedoch war diese vergleichsweise gering. Mit den gefundenen TEM5-N60-Fragmenten hingegen war eine quantitative Endothelzelladhäsion von bis zu 60% des Referenz-Integrin-Liganden Vitronectin möglich. Einschränkend muss erwähnt werden, dass - wie im Methoden- und Ergebnisteil beschrieben - für diese Versuche nur Verdauung mit einem reinen TEM5-N60-Anteil von etwa 50 - 60% eingesetzt werden konnten. Wenn es gelingt, TEM5-N60 in Reinform herzustellen, sind sicherlich höhere Prozentwerte im Vergleich zum Referenzwert denkbar. Es schien daher gerechtfertigt, sich im weiteren Verlauf der Arbeit hauptsächlich auf das TEM5-N60-Fragment zu konzentrieren, da weder TEM5-N80, noch ein anderes Fragment eine vergleichbare Funktionalität zeigte.

### **6.1.3. Das RGD-Motiv wird in TEM5-N60 freigelegt und ist für die Endothelzellinteraktion verantwortlich**

Geht man von Berechnungen über das Molekulargewicht aus, musste die Schnittstelle bei TEM5-N80 in etwa 200 Aminosäuren Abstand vom RGD-Motiv liegen. Für TEM5-N60 konnte diese Berechnung, bezogen auf die genaue Lage des RGD-Motivs, nicht mit ausreichender Sicherheit angestellt werden. Da die RGD-Sequenz in unmittelbarer Nachbarschaft zur Schnittstelle vermutet werden muss, ist ein solcher Schätzwert zu ungenau.

Zur Klärung wurden die c-terminalen Gegenstücke (TEM5-C60) zu den, sowohl durch MMP14 als auch durch Thrombin entstandenen TEM5-N60-Fragmenten, über Edman-Abbau sequenziert. Für beide Fragmente ergab sich, dass die Spaltstelle sehr nahe – 25 (MMP14) bzw. 32 (Thrombin) Aminosäuren - am RGD-Motiv liegen muss. Das RGD-Motiv ist folglich nicht in der c-terminalen „Hälfte“ (TEM5-C60) zu finden. Es lag nahe, dass das RGD-Motiv im n-terminalen Fragment liegen musste. Klonierungsversuche mit Punktmutation zur Verifizierung der Spaltstelle schlugen zunächst fehl. Sie zeigten jedoch, dass es entweder zwei Spaltstellen in enger Nachbarschaft geben muss oder dass die identifizierte Spaltstelle lediglich das Ergebnis einer sekundären Modifikation des c-terminalen Fragments ist. Die zweite Hypothese erscheint deshalb wahrscheinlicher, weil sich die n-terminalen Banden von TEM5-N60 für Wildtyp und Mutante nicht unterscheiden, wohl aber die c-terminalen Banden für die entstandenen TEM5-C60-Fragmente. Demnach könnte die primäre Spaltstelle in noch engerer Nachbarschaft zum RGD-Motiv zu finden sein. Der identifizierte, übrig gebliebene C-

Terminus von TEM5-C60 entstünde dabei als Produkt einer geringfügigen, sekundären Modifizierung der eigentlichen Spaltstelle.

Es lag durchaus im Bereich des Möglichen, dass bei diesen Prozessierungsschritten das RGD-Motiv auch zerstört werden konnte. Dies auszuschließen galt es zu beweisen.

Von Osteopontin, das ebenfalls ein RGD-Motiv trägt und von Thrombin gespalten wird, ist bekannt, dass diese Spaltung in engster Nachbarschaft - im Abstand von nur fünf Aminosäuren - zum RGD-Motiv stattfindet (Senger, Perruzzi et al. 1989; Smith, Cheung et al. 1996; Smith and Giachelli 1998). Diese Spaltung versetzt Osteopontin in die Lage, mit diversen Integrinen zu interagieren. Da eine n-terminale Sequenzierung des TEM5-N60-Fragments nicht in Frage kam, musste auf andere Weise geklärt werden, ob das RGD-Motiv im TEM5-N60-Fragment weiterhin enthalten ist.

Diese Alternative bestand in diversen funktionellen Versuchen. Es wurde gezeigt, dass die Endothelzell-Interaktion von TEM5-N60 über Integrine vermittelt wird. Zyklisches RGD-Peptid (cRGD) kann diese Interaktion nahezu vollständig unterbinden. Die komplette Inhibition durch cRGD beweist das Vorhandensein des RGD-Motivs im TEM-N60-Fragment.

Es muss allerdings eingeräumt werden, dass die Spaltstelle in der Hormonrezeptordomäne zwar nicht exakt gefunden, jedoch stark eingegrenzt werden konnte. N-terminal von der Spaltstelle befindet sich das RGD-Motiv, c-terminal legt die identifizierte Sequenz den Rahmen fest. Die primäre Spaltstelle kann nur zwischen diesen beiden Fixpunkten liegen. Sie ist damit auf 25 Aminosäuren genau einzugrenzen. Obwohl über die Sequenz eine noch exaktere Identifizierung der Spaltstelle möglich wäre, steht in diesem Fall ein enormer Aufwand einem nur geringen Wissensgewinn gegenüber.

Neben der genauen Identifizierung der Spaltstelle ist es von großer Bedeutung, dass der Beweis erbracht werden konnte, dass das RGD-Motiv in TEM5 tatsächlich kryptisch und funktionell ist. TEM5-N60 zeigte im Gegensatz zum unprozessierten TEM5-ECD eine starke Affinität zu RGD-bindenden Integrinen. Zudem vermittelt es, wenn es immobilisiert ist, Endothelzelladhäsion. Damit steht TEM5 über sein N60-Fragment in einer Reihe von bekannten Proteinen wie Vitronectin (Seiffert and Smith 1997), Thrombospondin (Hotchkiss, Matthias et al. 1998) oder Osteopontin (Senger, Perruzzi et al. 1994), deren kryptische RGD-Motive durch Proteolyse freigelegt und dadurch aktiviert werden.

Obwohl diese Interaktion für das MMP9-prozessierte TEM5-N80 bereits thematisiert wurde (Vallon and Essler 2006), weist die vorliegende Arbeit nach, dass die Dekryptierung bei TEM5-N60 noch bei weitem noch ausgeprägter ist. Die Annahme, dass TEM5-N80 nur ein Zwischenprodukt auf dem Prozessierungsweg zu TEM5-N60 ist, konnte jedoch widerlegt werden. TEM5-N80 und TEM5-N60 stellen jeweils eigenständige Fragmente dar. TEM5-N80 ist jedoch im Vergleich zu TEM5-N60 bezüglich der Vermittlung von Signalen über das RGD-Motiv nur als untergeordnet zu betrachten.

RGD-Motive vermitteln ihre Funktionen über Integrine (Ruoslahti 1996). Jedes RGD-tragende Protein weist jedoch ein eigenes Spektrum von Integrinen auf, mit denen es interagieren kann (Ruoslahti and Pierschbacher 1987). Dies mag darauf zurückgehen, dass das RGD-Motiv direkt an die  $\beta$ -Untereinheit des Integrins binden kann. Die  $\alpha$ -Untereinheit hingegen vermittelt die Interaktion mit den sekundären Strukturen eines RGD-tragenden Proteins und ist somit für die Spezifität am Rezeptor verantwortlich (Takagi 2004). Aus der zu TEM5-N80 bereits erschienenen Veröffentlichung (Vallon and Essler 2006) ist bekannt, dass dieses Fragment über RGD-Motiv und Integrinvermittlung Endothelzellen zur Adhäsion bringen kann. Besonders Integrin  $\alpha\beta 3$ , in geringerem Maße auch Integrin  $\alpha\beta 5$ , konnte für diese Adhäsion verantwortlich gemacht werden. Es stellte sich die Frage, ob und über welche Integrine TEM5-N60 mit Endothelzellen in Kontakt treten kann und ob es Unterschiede zu TEM5-N80 gibt.

#### **6.1.4. TEM5-N60 erfüllt verschiedene Anforderungen an ein Protein mit funktionellem RGD-Motiv**

Ruoslahti und Pierschbacher, auf deren Arbeiten die meisten grundlegenden Erkenntnisse über das RGD-Motiv beruhen, stellen mehrere Bedingungen an ein funktionelles, RGD-haltiges Protein (Ruoslahti and Pierschbacher 1987; Ruoslahti 1996; Ruoslahti 2002).

Diese Moleküle interagieren mit verschiedenen Integrinen und vermitteln, wenn sie immobilisiert vorkommen, Zelladhäsion und –überleben.

Wenn sie aber in Lösung vorkommen, vermitteln sie eine antagonistische Wirkung auf Integrine (Hynes 2002).

TEM5-N60 wurde auf diese Bedingungen hin untersucht. Zunächst wurde gezeigt, dass die Endothelzelladhäsion von TEM5-N60 über das RGD-Motiv vermittelt wird. Darin unterscheiden sich die Ergebnisse zum TEM5-N60-Fragment nicht von den bekannten Erkenntnissen (Vallon and Essler 2006) zum TEM5-N80-Fragment. Jedoch entsprechend der These, dass neben dem RGD-Motiv Sekundär- und Tertiärstrukturen für die Selektivität der Integrin-Bindung verantwortlich sind (Takagi 2004), fanden sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Integrin-Erkennungsmuster von TEM5-N60 und dem größeren TEM5-N80. Beide Fragmente vermitteln einen Großteil ihrer Funktion über  $\alpha$ v-Integrine, wobei sie besonders über das für angiogene Endothelzellen spezifische  $\alpha\beta 3$ -Integrin interagieren. TEM5-N60 hat aber, anders als TEM5-N80, zusätzlich eine stark ausgeprägte Wirkung über das  $\alpha\beta 5$ -Integrin. Inhibierende Antikörper gegen  $\alpha 2$ -Integrin zeigten außerdem den erstaunlichen Effekt einer Reduktion der durch TEM5-N60-vermittelten Endothelzelladhäsion um etwa 50%. Da das  $\alpha 2$ -Integrin zur Gruppe der Kollagen- und nicht der RGD-Rezeptoren gehört, ist unklar, über welche Erkennungssequenz diese Interaktion abläuft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Frage nicht weiter abgeklärt, doch weitere Untersuchungen könnten diesbezüglich folgen.

Für Vitronectin, Fibrinogen, Osteopontin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin, die alle ein RGD-Motiv tragen, ist die Interaktion mit  $\alpha\beta 3$  und auch  $\alpha\beta 5$  beschrieben (Hynes 2002). TEM5-N60 erfüllt somit diese erste Bedingung an ein funktionelles, RGD-haltiges Protein und reiht sich in die Reihe der genannten und gut untersuchten Proteine ein.

Die genannte zweite Bedingung erfüllt TEM5-N60 ebenfalls. Lösliches TEM5-N60 konnte die Endothelzellmigration auf einem potenten  $\alpha\beta 3$ -Liganden (Vitronectin) deutlich verringern. Im Wound-Healing-Assay mit definierter Wunde zeigte sich, dass unprozessiertes TEM5-ECD keinerlei Einfluss auf die Endothelzellmigration hatte. Weder TEM5-ECD noch TEM5-N60 zeigten Wirkung auf die Endothelzellmigration auf Liganden anderer Integrine. Daher kann das lösliche TEM5-N60-Fragment als selektiver Antagonist von  $\alpha\beta 3$ -Integrinen angesehen werden.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass TEM5-N60 sowohl immobilisiert als auch löslich auf Integrine einwirken kann. Von TEM5-N60 ist anzunehmen, dass es an die extrazelluläre Matrix und Glykosaminoglykane binden kann. Für TEM5-ECD und TEM5-N80 konnte sowohl die LRR-, als auch die IG-Domäne als entscheidend für die Glykosaminbindung identifiziert werden (Vallon and Essler 2006). Diese beiden Domänen sind ebenfalls unverändert in TEM5-N60 enthalten. Sie werden von der Prozessierung in keiner Weise berührt. In derartig gebundener Form könnte TEM5-N60 eine potente Rolle als Integrinagonist zugeschrieben werden.

Aber auch als Antagonist könnte TEM5-N60 fungieren. Es ist bekannt, dass unligierte Integrine oder Integrine, die mit löslichen Antagonisten besetzt sind, Apoptosewege induzieren können (Stupack, Puente et al. 2001; Hynes 2002). TEM5-N60 könnte, wenn es löslich vorkommt, in dieser Weise Apoptose induzierend wirken.

Die Funktionen von Integrin  $\alpha\beta 3$  sind nach aktuellem Forschungsstand ambivalent als pro- und kontra-angiogen, sowie als pro- und kontra-apoptotisch beschrieben (Hynes 2002). TEM5-N60 könnte - löslich oder gebunden – ebenso ambivalent mit Integrinen interagieren.

#### **6.1.5. Verschiedene extrazelluläre Prozessierungswege von TEM5**

Aus den In-vitro-Prozessierungsversuchen ist festzuhalten, dass das vorbeschriebene TEM5-N80-Fragment reproduziert werden konnte. Klarer als die beschriebene Protease MMP9 (Vallon and Essler 2006) konnte jedoch MMP1 als Protease identifiziert werden, die diese Prozessierung deutlicher selektiver vermittelt.

Als neue Erkenntnis konnte gewonnen werden, dass der extrazelluläre Anteil von TEM5 (TEM5-ECD) vor allem von der löslichen Protease Thrombin und der membranständigen Protease MMP14 im Bereich der Hormonrezeptordomäne zu je zwei, etwa 60kDa großen, Fragmenten gespalten wird. Die c-terminalen Fragmente sind über die Sequenzierung gut identifiziert und eingegrenzt. Bei den n-terminalen Fragmenten konnte die Charakterisierung über die Sequenz nicht exakt erfolgen.

Die Frage, welche Protease für die Prozessierung von TEM5-N60 verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. In bisher unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe wurde (durch Dr. Mario Vallon) gezeigt, dass der MMP-Inhibitor GM6001 das endogene „shedding“ von TEM5-N60 in TEM5-transfizierten HUVECs reduziert. Diese Beobachtung macht deutlich, dass das TEM5-N60-shedding zumindest in diesem Ansatz über endogene MMPs läuft.

Nachgewiesen werden konnte in dieser Arbeit jedoch, dass potenziell viele Proteasen TEM5 prozessieren können. So ist es denkbar, dass in unterschiedlichen In-vivo-Situationen mehrere Proteasen für diesen Schritt verantwortlich sein können.

In den Vorarbeiten (Vallon and Essler 2006) wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne von TEM5 (TEM5-ECD) an ihrer GPS sezerniert werden kann und dadurch löslich neben membrangebundenen Vollängen-TEM5 vorkommt. Vermutlich wird dieses lösliche TEM5-Fragment von löslichen Proteasen erkannt und zu weiteren Fragmenten prozessiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit löslichen Proteasen *in vitro* stützen diese These. Für einige lösliche Proteine der extrazellulären Matrix, zum Beispiel Vitronectin (Seiffert and Smith 1997), oder im Plasma vorkommende Proteine wie Osteopontin (Senger, Perruzzi et al. 1994) sind solche Aktivierungswege bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnten *in situ* am Beispiel von MMP14 und Thrombin überdies zwei weitere potenzielle Prozessierungswege aufgezeigt werden.

Es ist möglich, dass extrazelluläre TEM5-Fragmente direkt vom membrangebundenen Vollängenprotein an der Zelloberfläche abgespalten werden. MMP14 kann an der migratorischen Front von Endothelzellen akkumulieren und dort eine hohe proteolytische Aktivität entwickeln (Galvez, Matias-Roman et al. 2002). MMP14 ist für das „shedding“ von Oberflächenmolekülen wie Syndecan, Semaphorin 4D oder CD44 (Belkin, Akimov et al. 2001; Kajita, Itoh et al. 2001; Deryugina, Ratnikov et al. 2002) verantwortlich und in Endothelzellen hochexpressiv. Für diese Arbeit wurde im Zellmodell mit HEK293-Zellen eine *In-situ*-Situation durch Doppeltransfektion von MMP14 und membranständigem Vollängen-TEM5 hergestellt. Hier zeigte sich eindeutig, dass TEM5-N60 von der Zellmembran direkt abgespalten und in Folge als lösliches Fragment im Überstand gefunden werden kann. Membranständige Proteasen sind in der Lage, TEM5-N60-shedding direkt zu induzieren. MMP14 wurde als der wichtigste Vertreter membranständiger Proteasen ausgewählt. Es darf jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere primär-membranständige (wie die restlichen Vertreter der MT-MMPs) oder sekundär-membranassoziierte Proteasen zu diesem Schritt fähig sind.

Darüber hinaus konnte noch ein weiterer Weg der extrazellulären Prozessierung von membranständigen TEM5 identifiziert werden. Thrombin kann direkt membranständige GPCRs erkennen und sie durch Abspaltung von Fragmenten proteolytisch modifizieren. Die

Abspaltung eines n-terminalen Fragments führt bei PAR-1, dem Thrombinrezeptor auf Endothelzellen, zu dessen Aktivierung (Macfarlane, Seatter et al. 2001; Leger, Covic et al. 2006; Moser 2008). Aufgrund dieser Tatsache - TEM5 ist ein GPCR-Protein - bot es sich an, Thrombin, das in vitro eine effektive Prozessierung von löslichem TEM5-ECD vermittelt hatte, auch in situ zu testen.

Wie schon membranständiges MMP14 konnte auch lösliches Thrombin TEM5-N60 direkt von der Zellmembran abspalten. Im Zellüberstand fanden sich in der Westernblot-Analyse TEM5-N60-Fragmente. Im Zell-Lysat zeigten sich die entsprechenden membranständigen TEM5- $\Delta$ N60-Fragmente als Gegenstücke. Interessant ist, ob in diesem Fall, wie auch bei PAR-1, eine Signalkaskade durch TEM5 aktiviert wird. Diese Fragestellung war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Drei Modifizierungswege für extrazelluläre TEM5-Anteile wurden aufgezeigt. Die Kenntnis der einzelnen Fragmente und ihrer Funktion sind wichtige Grundlagen für das Verständnis der Zielstrukturen, die TEM5 diagnostisch und therapeutisch bieten könnte. Die Modifizierungen des Antigens müssen beispielsweise bei der Gestaltung und Planung von Antikörpern oder anderen „Tracern“ gegen membranständiges TEM5 berücksichtigt werden. Nicht nur die membranständigen TEM5-Anteile sind interessant. Zudem ist es interessant zu wissen, welche Funktionen die verschiedenen löslichen Anteile innehaben.

## **6.2. Bedeutung der Ergebnisse**

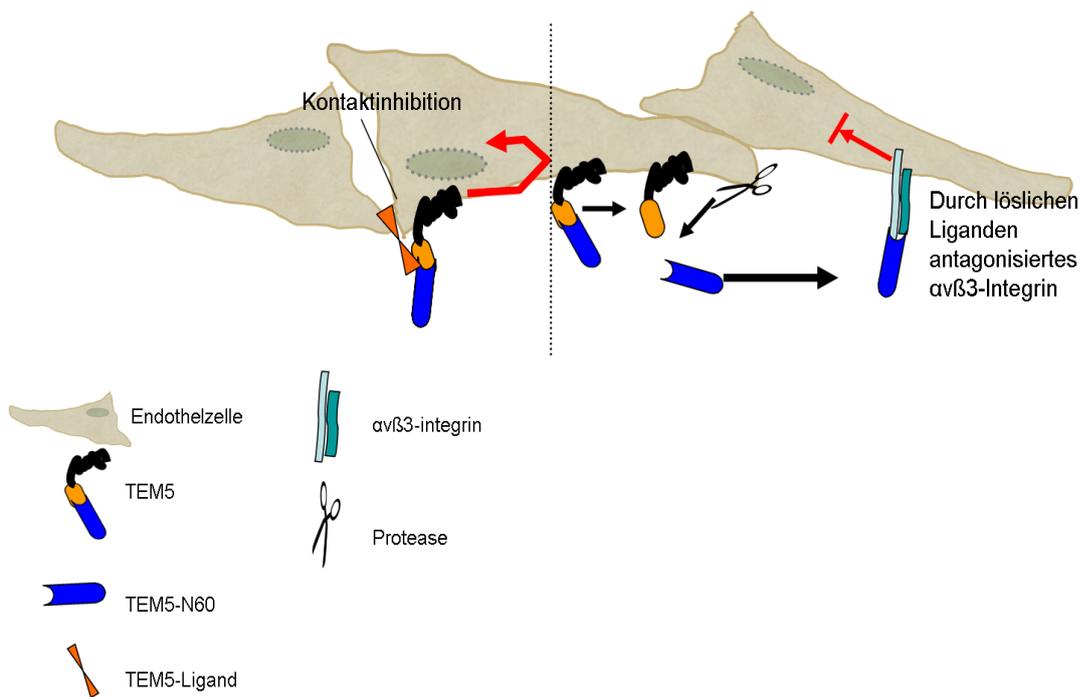
### **6.2.1. Bedeutung der Ergebnisse für die TEM5-Biologie**

Beide Fragmente - TEM5-N80 und TEM5-N60 - wurden bisher weder in Analysen von Angiogeneseassays noch in vivo in Tumormaterial beschrieben. Dies kann verschiedene Gründe haben. Vor dieser Arbeit waren nur die Abspaltung der extrazellulären Domäne und ihre mögliche Interaktion mit der extrazellulären Matrix bekannt und es gab nur Hinweise auf mögliche funktionelle Fragmente (Vallon and Essler 2006). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich erstmals mit dem Vorhandensein und der Funktion dieser Fragmente. Die Kenntnis dieser Fragmente und deren mögliche Funktionen könnte bei zukünftigen Untersuchungen den Fokus auf das Vorhandensein eben dieser Fragmente in vivo lenken.

Im Jahr 2010 wurden erste Ergebnisse zur Regulation der Expression von TEM5 veröffentlicht (Vallon, Rohde et al. 2010). Diese zeigen, dass TEM5 erst in der Spätphase der Angiogenese hochreguliert wird. In dieser Phase vermittelt das unprozessierte, membranständige Vollängen-TEM5 Kontaktinhibition durch die Interaktion mit einem bisher nicht identifizierten Liganden. Dadurch wird die weitere Proliferation von Endothelzellen in einer frühen Phase der Kapillarentstehung gestoppt. Ob die extrazellulären TEM5-Fragmente dabei eine Rolle spielen und wenn welche, ist unklar.

Ausgehend von der Tatsache, dass TEM5 in der Spätphase der Gefäßentstehung hochreguliert wird und dort inhibitorischen Charakter hat, können verschiedene Hypothesen zur Funktion der extrazellulären Modifikationen und der dabei entstehenden Fragmente in Betracht gezogen werden.

Als erste Hypothese stelle ich eine konsensuell-inhibitorische Funktion von unprozessiertem, membrangebundenen TEM5 und dem TEM5-N60-Fragment zur Diskussion (Abb.10; Modell 1). Berücksichtigt man die Ergebnisse, welche zeigen, dass membrangebundenes TEM5 Kontaktinhibition vermittelt (Vallon, Rohde et al. 2010), könnte dem TEM5-N60-Fragment eine Rolle als löslicher Integrin antagonist zugeschrieben werden. TEM5-N60 könnte von der Zelloberfläche durch Proteasen, die in dieser Phase der Angiogenese auftreten, abgespalten werden. Gesetzt den Fall, dass TEM5 nicht von einem Bindungspartner im extrazellulären Raum immobilisiert wird, könnte das Fragment über sein freigelegtes RGD-Motiv an Integrine binden. Als löslicher Integrin antagonist würde es anti-migratorisch oder sogar pro-apoptotisch auf Endothelzellen mit freien Integrinliganden wirken. Dies umso mehr, als - wie eingangs beschrieben - Endothelzellen in der Zeit des „vascular pruning“ besonders anfällig für apoptotische Stimuli sind. Membrangebundenes TEM5 und seine TEM5-N60-Fragmente hätten somit eine konsensuelle, stabilisierende Wirkung auf die Spätphase der Angiogenese.

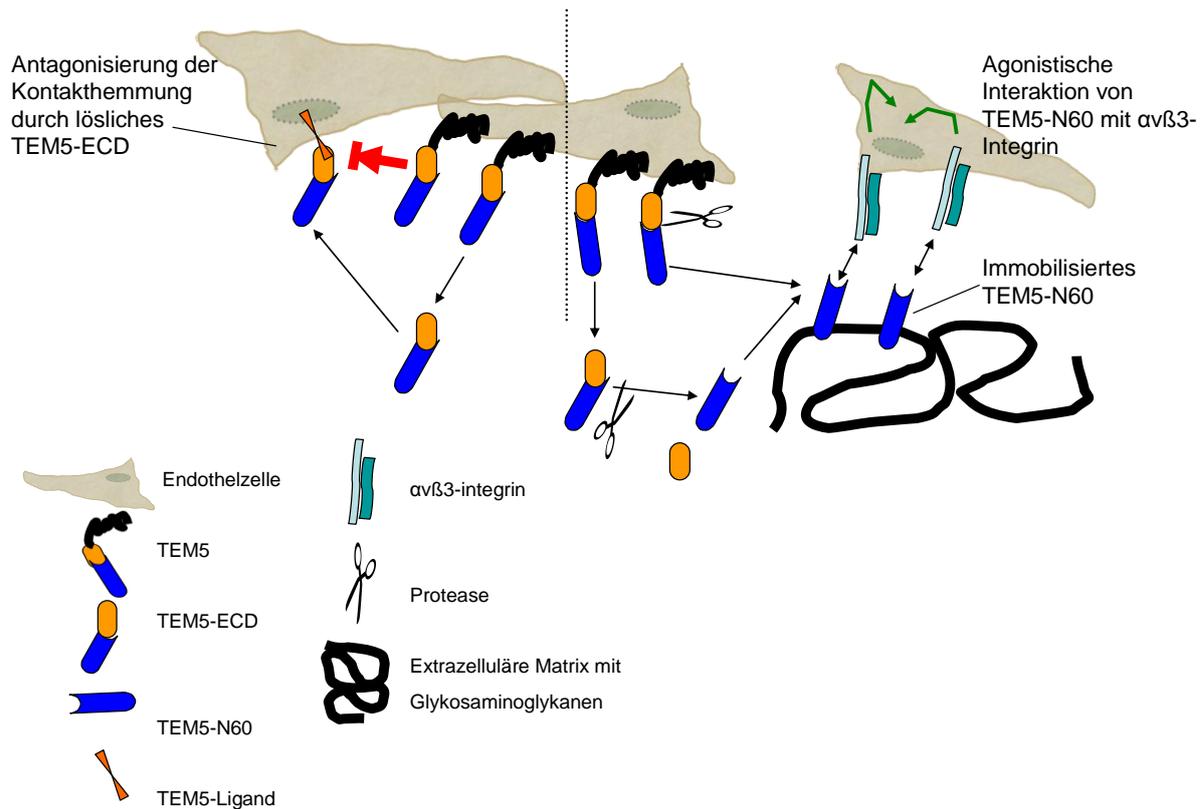
**Abb. 10**

**Modell 1:** Hypothetisches Modell für die TEM5-Interaktion mit Endothelzellen bei der Angiogenese.

**Links:** Membrangebundenes TEM5 vermittelt Kontakt-Inhibition (→) wenn es mit seinem Liganden interagiert (Vallon, Rohde et al. 2010).

**Rechts:** Hypothese zur konsensuell-inhibierenden Wirkung von membrangebundenen TEM5 und löslichem TEM5-N60. Über lösliches TEM5-N60 wird über Integrine ein inhibierendes Signal (→) an die Zelle übermittelt.

Alternativ zur ersten Hypothese bringe ich ferner eine konsensuell-proangiogene Funktion von TEM5-N60 ins Spiel (Abb. 11; Modell 2). Gleichrangig mit den negativ regulatorischen Wirkungen können auch proangiogene Wirkungen aus den Ergebnissen dieser Arbeit postuliert werden. Es wurde gezeigt (Vallon, Rohde et al. 2010), dass lösliches TEM5-ECD im Überschuss die kontaktinhibitorische Funktion von membrangebundenem TEM5 antagonisieren kann. Analog dieser Wirkung könnte über TEM5-N60-Fragmente, die an der extrazellulären Matrix verankert sind, integrinvermittelt das Überleben der apoptosegefährdeten Endothelzellen gewährleistet werden.



**Abb. 11**

**Modell 2:** Hypothetisches Modell für die TEM5-Interaktion mit Endothelzellen bei der Angiogenese.

**Links:** Nach Proteolyse an ihrer GPS bindet die lösliche Extrazellulärdomäne (TEM5-ECD) an den Liganden von TEM5. Dadurch wird eine Bindung von membrangebundenen TEM5 an den Liganden (→) verhindert. Eine TEM5 vermittelte Kontaktinhibition findet nicht mehr statt (Vallon, Rohde et al. 2010).

**Rechts:** TEM5-ECD und TEM5-N60 wirken konsensuell proangiogen. TEM5-N60 wird von der Zelloberfläche abgespalten oder sekundär aus TEM5-ECD prozessiert. Daraufhin bindet es an die extrazelluläre Matrix und fungiert als Integrin-Agonist. Dadurch erhält die Zelle positiv regulierende, proangiogene Signale (→).

Die Frage, ob und in welcher Weise die extrazellulären Modifizierungen die Interaktion von membranständigem TEM5 mit seinen Liganden beeinflusst, ist eine weitere Überlegung wert. Hierzu lässt sich allerdings aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine klare Hypothese ableiten. Die hier angeführten Hypothesen sind spekulativ. Führt man diese Gedanken jedoch weiter, so sind auch Kombinationen dieser Überlegungen denkbar.

Das Wissen um die Regulation von TEM5 eröffnet zudem eine gezieltere Suche nach Proteasen, die in der Spätphase der Angiogenese exprimiert werden.

In vitro wird es auf experimentellem Weg schwierig sein, physiologische Konditionen nachzustellen, in denen sowohl TEM5 als auch die entsprechenden Proteasen hochreguliert sind. Diese Arbeit konnte außerdem mehrere mögliche Prozessierungswege aufzeigen. Dies

wird die Identifizierung zusätzlich erschweren. Der Fokus der künftigen Untersuchung sollte sich daher bevorzugt mehr auf den Nachweis der Fragmente *in vivo* und die Klärung ihrer Funktion richten.

### **6.3. Klinische Bedeutung**

Es wurde thematisiert, dass die Kenntnis der Zielstrukturen essenziell für die Planung und Gestaltung von molekularen Markern und Pharmaka sind. Diese Arbeit trägt dazu bei, die extrazellulären Vorgänge von TEM5 besser zu verstehen und Klarheit über mögliche, anzuvisierende Strukturen zu erhalten.

Eine mögliche Anwendung von monoklonalen Antikörpern zur Aufhebung von TEM5-N60-vermittelter Endothelzelladhäsion wurde in dieser Arbeit dargestellt (Abb. 6B). Das muss jedoch angesichts der unklaren *In-vivo*-Funktion von TEM5-N60 kritisch gesehen werden. Die neuen Erkenntnisse zur Funktion von TEM5 in der Kontaktinhibition (Vallon, Rohde et al. 2010) lassen diese Zurückhaltung gerechtfertigt erscheinen. Denn dort vermittelte der identische monoklonale Antikörper eine Hemmung der eigentlich wünschenswerten stabilisierenden Kontakthemmung.

Wenn man sich nicht nur auf TEM5 als Zielstruktur konzentriert, dürften sich weitere Anwendungsgebiete aus den Ergebnissen dieser Arbeit im TEM5-N60-Fragment eröffnen. Da TEM5-N60 ein neuer und potenter Ligand von Integrin  $\alpha\beta 3$  ist, könnte dieses Fragment möglicherweise auch als molekularen „Tracer“ für die Diagnostik oder Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden und je nach Funktion regulierend als Agonist oder Antagonist in die Angiogenese eingreifen. In dieser Hinsicht ist auch an einen Einsatz bei pathologischen, nicht tumorbedingten Gefäßneubildungen zu denken. Um diese Potenziale auszuloten, müssten allerdings Biodistributionsstudien von TEM5-N60 in verschiedenen biologischen Modellorganismen durchgeführt werden.

Durch die vorliegende Arbeit konnten neue Fragmente von TEM5 identifiziert und wichtige Wesensmerkmale charakterisiert werden. Es war nicht möglich, alle in der Aufgabenstellung enthaltenen Fragen zur Gänze zu beantworten. Zudem wirft jedes erreichte Ergebnis wiederum weitere Fragen auf. Dennoch hoffe ich, dass meine Arbeit zu TEM5 zum Verständnis seiner Funktionen bei der Angiogenese beiträgt und helfen wird, seine Potenziale für eine eventuell künftig realisierbare klinische Anwendung besser einschätzen und nutzen zu können.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungen

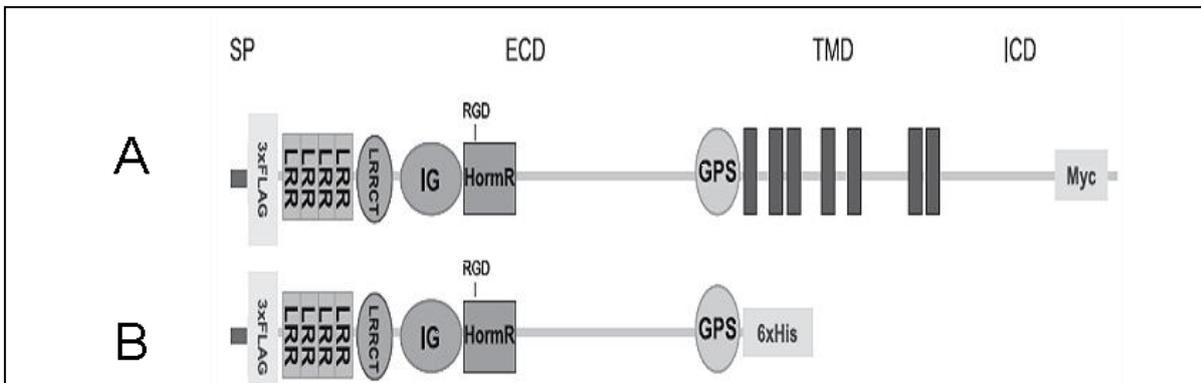


Abb. modifiziert nach Vallon, M, 2006 (Vallon and Essler 2006)

Abb. 1

Schematische Abbildung der für diese Arbeit von Dr. Mario Vallon zur Verfügung gestellten verwendeten TEM5-Konstrukte. Beide Konstrukte sind n-terminal mit einem 3xFLAG-Tag versehen. C-terminal wurde beim Volllängenkonstrukt TEM5 (A) ein Myc-Tag angehängt, beim löslichen TEM5-ECD (B) ein 6xHis-Tag.

SP: Signalpeptid; ECD: Extracellular domain; TMD: transmembrane domain;  
 ICD: intracellular domain; LRR: leucin-rich-repeat; LRRCT: LRR-c-terminus;  
 IG: immunoglobulin-domain; HormR: hormone-receptor-domain; GPS: G/GPS, GPCR  
 proteolysis site; RGD: Arginin-Glycin-Aspartat

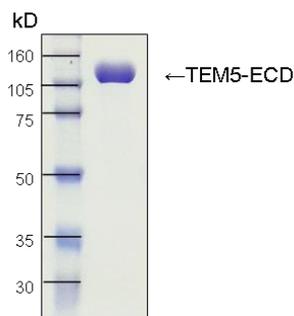


Abb. 2

Kontrolle der Aufreinigung von HEK293-TEM5-ECD-Überständen mittels FLAG-Agarose; Coomassie-gefärbtes SDS-Gel

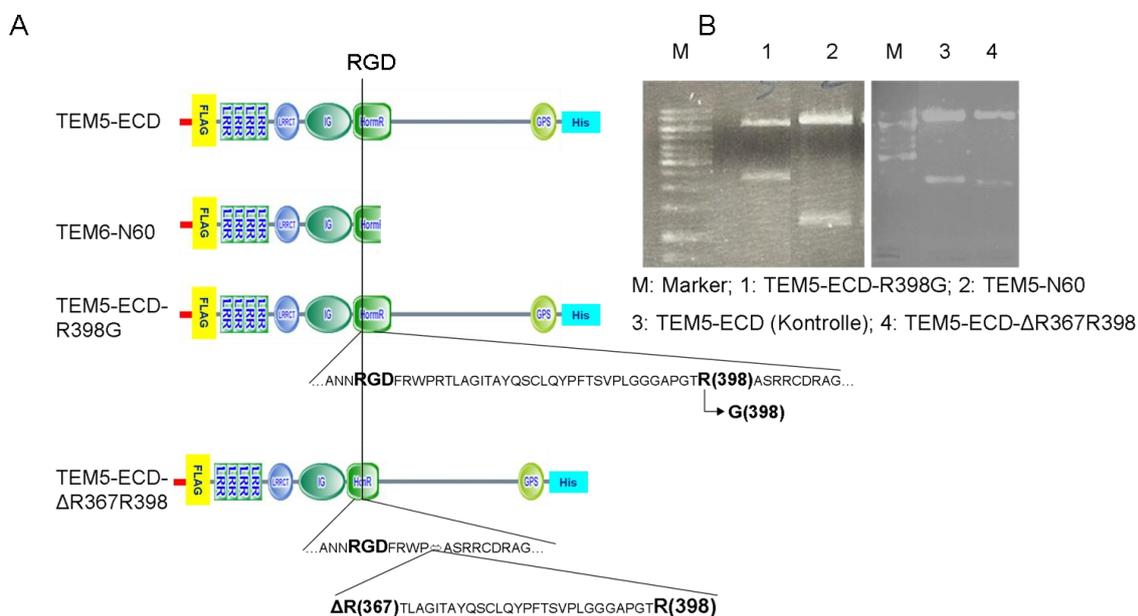


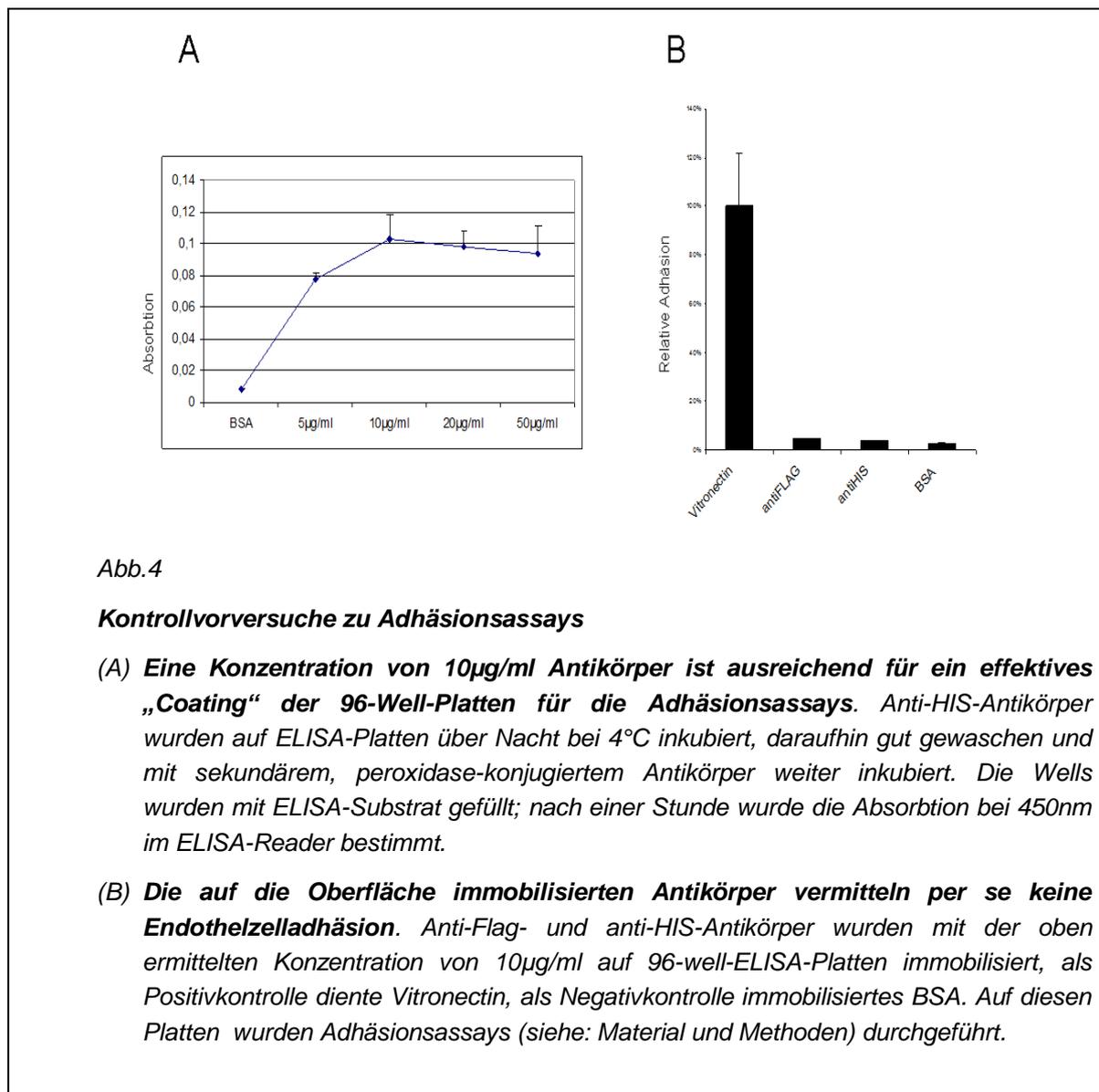
Abb.3

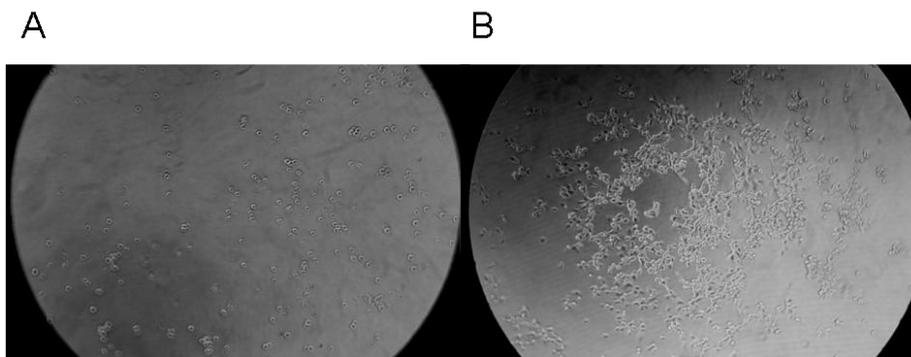
Klonierte Mutanten von TEM5-ECD.

**(A)** Schematisches Modell der Mutanten. Bei TEM5-N60 wurde durch Deletion der C-Terminus eliminiert. Bei TEM5-ECD-R398G wurde durch Punktmutation Arginin 398 durch Glycin ersetzt. Bei TEM5-ECD-ΔR367R398 wurde ein Teil der HormR-Domäne durch Deletion entfernt; jedes für Thrombin erkennbare Arginin in dieser Region sollte dadurch eliminiert werden.

SP: Signalpeptid; ECD: Extracellular domain; TMD: transmembrane domain;  
ICD: intracellular domain; LRR: leucin-rich-repeat; LRRCT: LRR-c-terminus;  
IG: immunoglobulin-domain; HormR: hormone-receptor-domain; GPS: G/GPS, GPCR proteolysis site; RGD: Arginin-Glycin-Aspartat

**(B)** Agarose-Gel-Elektrophorese nach Restriktionsverdau. Die Inserts der entsprechenden Mutanten sind deutlich sichtbar. Aufgenommen unter UV-Licht mit Polaroid-Kamera (links) und Digitalkamera (rechts)





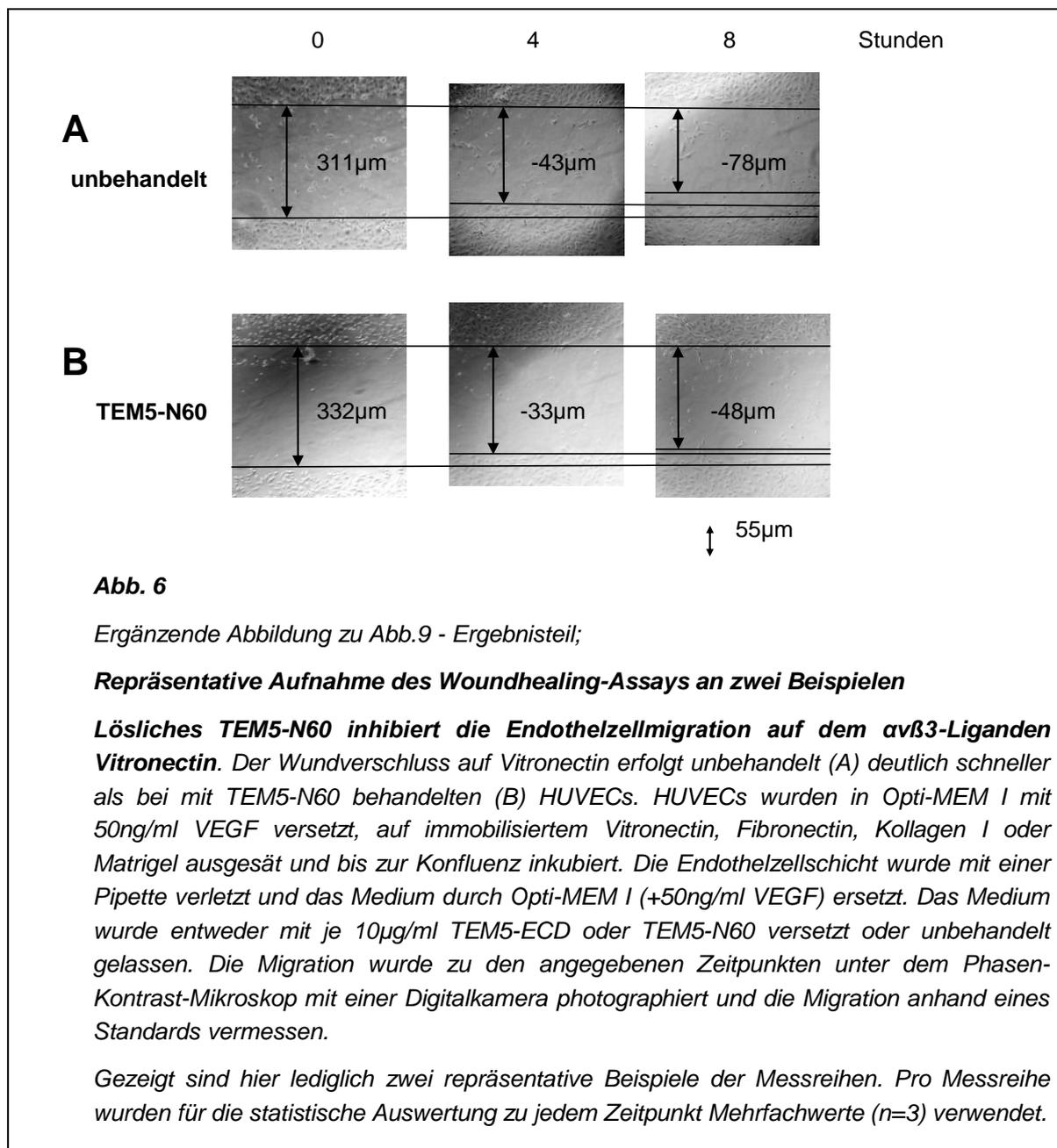
**Abb.5**

*Ergänzende Abbildung zu Abb.7 - Ergebnisteil; repräsentative Aufnahme*

**Konditioniertes Medium von TEM5-MMP14-kotransfizierten Zellen vermittelt Endothelzelladhäsion und „spreading“.**

*HUVEC-Adhäsion gegen mit TEM5-Vektor-transfizierten (A) und TEM5-MMP14-transfizierten (B) Medien, die mittels FLAG-Antikörper selektiv immobilisiert wurden.*

*HEK293 wurden mit TEM5 und zugleich wahlweise MMP14 oder Vektor transfiziert. Das Medium wurde gewechselt und nach 24 Stunden wurden die Überstände gesammelt. Die Überstände wurden über FLAG-Agarose aufgereinigt, eluiert und auf FLAG-beschichteten Kulturplatten immobilisiert. Darauf wurden HUVECs ausgesät. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Platten gewaschen und mit neuem Medium befüllt. (siehe: „Adhäsionsassays“ in Material und Methoden) Acht Stunden später wurden die Wells unter dem Mikroskop mit einer Digitalkamera fotografiert.*



## 7.2. **Abkürzungen**

<b>Abb.</b>	Abbildung
Ang-1/2	Angiopoetin-1/2
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
<b>BAI</b>	„brain angiogenesis inhibitor“
BSA	Bovines Serumalbumin
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
<b>C</b>	„copy“
CD	„cluster of differentiation“
<b>D</b>	Asparaginsäure
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	“deoxyribonucleic acid”
DTT	Dithiothreitol
<b>E</b>	Glutaminsäure
ECL	„enhanced chemoluminescence“
ECM	„extracellular matrix“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EMR	„epidermal growth factor-like module containing mucin-like hormone receptor“
ECD	“extracellular domain”
<b>Fak</b>	“focal adhesion kinase”
FCS	„fetal calf serum“
FGF	“fibroblast growth factor”
<b>G</b>	Glyzin,
GAG	Glykosaminoglykan
GPCR	„G-protein-coupled receptor“
GPS	GPCR-Proteolysestelle
<b>HormR</b>	Hormonrezeptor
HEK	„human embryonic kidney“
HIF- $\alpha$	“hypoxia inducible factor”
hDlg	“ <i>human</i> homologue of the <i>Drosophila</i> discs large”
His	Histidin
Hox-Gene	“homeobox-gene”
HRE	“hypoxic responsive elements”
HUVECs	„human umbilical vein endothelial cells“

---

<b>IG, Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>ICD</b>	„intracellular domain“
<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>kD, kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>LNB-TM7</b>	„long amino terminus“- Familie B
<b>LRR</b>	„leucin-rich repeat“
<b>m</b>	membranständig
<b>MAP-Kinase</b>	„mitogen-activated protein“-Kinase
<b>MMP</b>	Matrixmetalloprotease
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>p</b>	„probability“, Plasmid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
<b>PAI</b>	„plasminogen activator inhibitor“
<b>PAR-1</b>	„Protease-activated receptor“
<b>PBS</b>	„phosphate buffered saline“
<b>PBDS</b>	„phosphate buffered double concentrated saline“
<b>PCR</b>	„polymerase chain reaction“
<b>PECAM</b>	„platelet endothelial cell adhesion molecule“
<b>pps</b>	„proteolytically processed soluble“
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>R</b>	Arginin
<b>RGD</b>	Arginin-Glyzin-Asparagin
<b>RNA</b>	„ribonucleic acid“
<b>S</b>	Serin
<b>s</b>	„soluble“
<b>SAGE</b>	serielle Analyse der Genexpression
<b>SDS</b>	„sodium dodecyl sulfate“
<b>T</b>	Threonin
<b>TAE</b>	Tris-Azetat-EDTA
<b>TBS</b>	„tris buffered saline“
<b>TCA-DOC</b>	„trichloroacetic acid- Na-deoxycholate“
<b>TEM</b>	Tumorendothelmarker
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin

---

<b>TF</b>	“tissue factor”
<b>TGF</b>	“transforming growth factor”
<b>TMB</b>	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine
<b>TMD</b>	Transmembrandomäne
<b>Tris</b>	Trishydroxymethylamminomethan
<b>u</b>	„unit“
<b>V</b>	Valin
<b>VE</b>	“vascular endothelial”
<b>VEGF</b>	„vascular endothelial growth factor“
<b>Vol.</b>	Volumen
<b>WB</b>	Westernblot

### 7.3. Lizenzen

#### Erklärung:

Die mit \*-gekennzeichneten Abbildungen (Abb. 1, 2 und 3; Einleitung) unterliegen dem Urheberrecht. Eine Verwendung und der Abdruck ohne Genehmigung / Lizenzierung durch den Rechteinhaber sind untersagt. Für die gekennzeichneten Abbildungen liegen folgenden Lizenzen zum alleinigen Abdruck in dieser Arbeit vor:

#### Copyright-Declaration:

The \*-marked-illustrations/pictures (Abb. 1, 2 and 3; Einleitung) are protected by copyright. Reuse and reprint are prohibited. Licenses for this thesis are as followed:

Lizenz Einleitung Abb. 1:

#### NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 18, 2012

This is a License Agreement between Philipp Aubele ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2891890768048
License date	Apr 18, 2012
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Medicine
Licensed content title	Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis
Licensed content author	Peter Carmeliet
Licensed content date	Apr 1, 2000
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Figures	Figure 2: Role of hypoxia in tumor angiogenesis; only right upper part of the figure
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	doctoral thesis: Identification and characterisation of extracellular fragments of tumor-endothelial-marker 5 (TEM5)
Expected completion date	May 2012
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

## Lizenz Einleitung Abb. 2:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 18, 2012

This is a License Agreement between Philipp Aubele ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2891890348139
License date	Apr 18, 2012
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch
Licensed content author	Gabriele Bergers, Laura E. Benjamin
Licensed content date	Jun 1, 2003
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 2 a-e
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	doctoral thesis: Identification and characterisation of extracellular fragments of tumor-endothelial-marker 5 (TEM5)
Expected completion date	May 2012
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

## Lizenz Einleitung Abb. 3:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 18, 2012

This is a License Agreement between Philipp Aubele ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2891880634771
License date	Apr 18, 2012
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Medicine
Licensed content title	Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic
Licensed content author	Donald M McDonald, Peter L Choyke
Licensed content date	Jun 1, 2003
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1; a + b
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	doctoral thesis: Identification and characterisation of extracellular fragments of tumor-endothelial-marker 5 (TEM5)
Expected completion date	May 2012
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

#### 7.4. Literaturverzeichnis

- Andreasen, P. A., L. Kjoller, L. Christensen and M. J. Duffy (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." *Int J Cancer* **72**(1): 1-22.
- Artman, T., D. Schilling, J. Gnann, M. Molls, G. Multhoff and C. Bayer (2010). "Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**(2): 574-82.
- Basile, J. R., K. Holmbeck, T. H. Bugge and J. S. Gutkind (2007). "MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D." *J Biol Chem* **282**(9): 6899-905.
- Belkin, A. M., S. S. Akimov, L. S. Zaritskaya, B. I. Ratnikov, E. I. Deryugina and A. Y. Strongin (2001). "Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion." *J Biol Chem* **276**(21): 18415-22.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 401-10.
- Bi, L., A. M. Lawler, S. E. Antonarakis, K. A. High, J. D. Gearhart and H. H. Kazazian, Jr. (1995). "Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A." *Nat Genet* **10**(1): 119-21.
- Bjarnadottir, T. K., R. Fredriksson, P. J. Hoglund, D. E. Gloriam, M. C. Lagerstrom and H. B. Schioth (2004). "The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors." *Genomics* **84**(1): 23-33.
- Blom, J. W., C. J. Doggen, S. Osanto and F. R. Rosendaal (2005). "Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis." *Jama* **293**(6): 715-22.
- Boudreau, N., C. Andrews, A. Srebrow, A. Ravanpay and D. A. Cheresh (1997). "Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3." *J Cell Biol* **139**(1): 257-64.
- Brooks, P. C., R. A. Clark and D. A. Cheresh (1994). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." *Science* **264**(5158): 569-71.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier and D. A. Cheresh (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." *Cell* **79**(7): 1157-64.
- Buback, F., A. C. Renkl, G. Schulz and J. M. Weiss (2009). "Osteopontin and the skin: multiple emerging roles in cutaneous biology and pathology." *Exp Dermatol* **18**(9): 750-9.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." *Nat Med* **9**(6): 653-60.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-57.
- Carson-Walter, E. B., D. N. Watkins, A. Nanda, B. Vogelstein, K. W. Kinzler and B. St Croix (2001). "Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans." *Cancer Res* **61**(18): 6649-55.
- Christian, S., H. Ahorn, A. Koehler, F. Eisenhaber, H. P. Rodi, P. Garin-Chesa, J. E. Park, W. J. Rettig and M. C. Lenter (2001). "Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium." *J Biol Chem* **276**(10): 7408-14.
- Collen, A., R. Hanemaaijer, F. Lupu, P. H. Quax, N. van Lent, J. Grimbergen, E. Peters, P. Koolwijk and V. W. van Hinsbergh (2003). "Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix." *Blood* **101**(5): 1810-7.
- Cullen, M., S. Seaman, A. Chaudhary, M. Y. Yang, M. B. Hilton, D. Logsdon, D. C. Haines, L. Tessarollo and B. St Croix (2009). "Host-derived tumor endothelial marker 8 promotes the growth of melanoma." *Cancer Res* **69**(15): 6021-6.

- Davis, G. E., K. J. Bayless, M. J. Davis and G. A. Meininger (2000). "Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules." *Am J Pathol* **156**(5): 1489-98.
- Denda, S., U. Muller, K. L. Crossin, H. P. Erickson and L. F. Reichardt (1998). "Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin alpha 8 beta 1 receptor interactions with tenascin: murine alpha 8 beta 1 binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C." *Biochemistry* **37**(16): 5464-74.
- Denhardt, D. T. and X. Guo (1993). "Osteopontin: a protein with diverse functions." *Faseb J* **7**(15): 1475-82.
- Deryugina, E. I., B. I. Ratnikov, T. I. Postnova, D. V. Rozanov and A. Y. Strongin (2002). "Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase." *J Biol Chem* **277**(12): 9749-56.
- Duesbery, N. S., J. Resau, C. P. Webb, S. Koochekpour, H. M. Koo, S. H. Leppla and G. F. Vande Woude (2001). "Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 4089-94.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-74.
- Eliceiri, B. P. and D. A. Cheresh (1999). "The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development." *J Clin Invest* **103**(9): 1227-30.
- Forootan, S. S., C. S. Foster, V. R. Aachi, J. Adamson, P. H. Smith, K. Lin and Y. Ke (2006). "Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer." *Int J Cancer* **118**(9): 2255-61.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 555-62.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, J. P. Albar, F. Sanchez-Madrid and A. G. Arroyo (2001). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling." *J Biol Chem* **276**(40): 37491-500.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid and A. G. Arroyo (2002). "ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells." *J Cell Biol* **159**(3): 509-21.
- Genis, L., B. G. Galvez, P. Gonzalo and A. G. Arroyo (2006). "MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis?" *Cancer Metastasis Rev* **25**(1): 77-86.
- Genis, L., P. Gonzalo, A. S. Tutor, B. G. Galvez, A. Martinez-Ruiz, C. Zaragoza, S. Lamas, K. Tryggvason, S. S. Apte and A. G. Arroyo (2007). "Functional interplay between endothelial nitric oxide synthase and membrane type 1 matrix metalloproteinase in migrating endothelial cells." *Blood* **110**(8): 2916-23.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology* **52**(2): 456-67.
- Grigoriu, B. D., C. Grigoriu, B. Chahine, T. Gey and A. Scherpereel (2009). "Clinical utility of diagnostic markers for malignant pleural mesothelioma." *Monaldi Arch Chest Dis* **71**(1): 31-8.
- Gutheil, J. C., T. N. Campbell, P. R. Pierce, J. D. Watkins, W. D. Huse, D. J. Bodkin and D. A. Cheresh (2000). "Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3." *Clin Cancer Res* **6**(8): 3056-61.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanemaaijer, R., P. Koolwijk, L. le Clercq, W. J. de Vree and V. W. van Hinsbergh (1993). "Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester." *Biochem J* **296** (Pt 3): 803-9.

- Hotchkiss, K. A., L. J. Matthias and P. J. Hogg (1998). "Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase." Biochim Biophys Acta **1388**(2): 478-88.
- Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." Cell **48**(4): 549-54.
- Hynes, R. O. (2002). "A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis." Nat Med **8**(9): 918-21.
- Im, D. S. (2002). "Orphan G protein-coupled receptors and beyond." Jpn J Pharmacol **90**(2): 101-6.
- Jain, R. K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." Science **307**(5706): 58-62.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh and M. Seiki (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." J Cell Biol **153**(5): 893-904.
- Karpatkin, S. (2003). "Role of thrombin in tumor angiogenesis, implantation, and metastasis." Pathophysiol Haemost Thromb **33 Suppl 1**: 54-5.
- Keshet, E. and S. A. Ben-Sasson (1999). "Anticancer drug targets: approaching angiogenesis." J Clin Invest **104**(11): 1497-501.
- Koo, H. M., M. VanBrocklin, M. J. McWilliams, S. H. Leppla, N. S. Duesbery and G. F. Woude (2002). "Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3052-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Leger, A. J., L. Covic and A. Kuliopulos (2006). "Protease-activated receptors in cardiovascular diseases." Circulation **114**(10): 1070-7.
- Liao, D. and R. S. Johnson (2007). "Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 281-90.
- Lin, H. F., N. Maeda, O. Smithies, D. L. Straight and D. W. Stafford (1997). "A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B." Blood **90**(10): 3962-6.
- Löffler G, P. P. (2003). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Springer.
- Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter and R. Plevin (2001). "Proteinase-activated receptors." Pharmacol Rev **53**(2): 245-82.
- McDonald, D. M. and P. L. Choyke (2003). "Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic." Nat Med **9**(6): 713-25.
- Molema, G. (2002). "Tumor vasculature directed drug targeting: applying new technologies and knowledge to the development of clinically relevant therapies." Pharm Res **19**(9): 1251-8.
- Moser, M. (2008). "[The role of thrombin in angiogenesis]." Hamostaseologie **28**(4): 189-94.
- Mott, J. D. and Z. Werb (2004). "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 558-64.
- Myers, C., A. Charboneau and N. Boudreau (2000). "Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis." J Cell Biol **148**(2): 343-51.
- Myers, C., A. Charboneau, I. Cheung, D. Hanks and N. Boudreau (2002). "Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis." Am J Pathol **161**(6): 2099-109.
- Nanda, A. and B. St Croix (2004). "Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy." Curr Opin Oncol **16**(1): 44-9.
- Papaconstantinou, M. E., C. J. Carrell, A. O. Pineda, K. M. Bobofchak, F. S. Mathews, C. S. Flordellis, M. E. Maragoudakis, N. E. Tsopanoglou and E. Di Cera (2005). "Thrombin functions through its RGD sequence in a non-canonical conformation." J Biol Chem **280**(33): 29393-6.
- Pollman, M. J., L. Naumovski and G. H. Gibbons (1999). "Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling." J Cell Physiol **178**(3): 359-70.
- Rajavashisth, T. B., J. K. Liao, Z. S. Galis, S. Tripathi, U. Laufs, J. Tripathi, N. N. Chai, X. P. Xu, S. Jovinge, P. K. Shah and P. Libby (1999). "Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase." J Biol Chem **274**(17): 11924-9.

- Reynolds, L. E., L. Wyder, J. C. Lively, D. Taverna, S. D. Robinson, X. Huang, D. Sheppard, R. O. Hynes and K. M. Hodivala-Dilke (2002). "Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins." *Nat Med* **8**(1): 27-34.
- Rickles, F. R. and R. L. Edwards (1983). "Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited." *Blood* **62**(1): 14-31.
- Rosen, L. (2000). "Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials." *Oncologist* **5 Suppl 1**: 20-7.
- Roy, R., B. Zhang and M. A. Moses (2006). "Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis." *Exp Cell Res* **312**(5): 608-22.
- Ruegg, C. and N. Mutter (2007). "Anti-angiogenic therapies in cancer: achievements and open questions." *Bull Cancer* **94**(9): 753-62.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 697-715.
- Ruoslahti, E. (2002). "Specialization of tumour vasculature." *Nat Rev Cancer* **2**(2): 83-90.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* **238**(4826): 491-7.
- Schenk, S., E. Hintermann, M. Bilban, N. Koshikawa, C. Hojilla, R. Khokha and V. Quaranta (2003). "Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution." *J Cell Biol* **161**(1): 197-209.
- Schenk, S. and V. Quaranta (2003). "Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix." *Trends Cell Biol* **13**(7): 366-75.
- Segura, I., A. Serrano, G. G. De Buitrago, M. A. Gonzalez, J. L. Abad, C. Claveria, L. Gomez, A. Bernad, A. C. Martinez and H. H. Riese (2002). "Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis." *Faseb J* **16**(8): 833-41.
- Seiffert, D. and J. W. Smith (1997). "The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic." *J Biol Chem* **272**(21): 13705-10.
- Senger, D. R., C. A. Perruzzi, C. F. Gracey, A. Papadopoulos and D. G. Tenen (1988). "Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation." *Cancer Res* **48**(20): 5770-4.
- Senger, D. R., C. A. Perruzzi, A. Papadopoulos-Sergiou and L. Van de Water (1994). "Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain." *Mol Biol Cell* **5**(5): 565-74.
- Senger, D. R., C. A. Perruzzi, A. Papadopoulos and D. G. Tenen (1989). "Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin." *Biochim Biophys Acta* **996**(1-2): 43-8.
- Smith, L. L., H. K. Cheung, L. E. Ling, J. Chen, D. Sheppard, R. Pytela and C. M. Giachelli (1996). "Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin." *J Biol Chem* **271**(45): 28485-91.
- Smith, L. L. and C. M. Giachelli (1998). "Structural requirements for alpha 9 beta 1-mediated adhesion and migration to thrombin-cleaved osteopontin." *Exp Cell Res* **242**(1): 351-60.
- St Croix, B., C. Rago, V. Velculescu, G. Traverso, K. E. Romans, E. Montgomery, A. Lal, G. J. Riggins, C. Lengauer, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (2000). "Genes expressed in human tumor endothelium." *Science* **289**(5482): 1197-202.
- Stupack, D. G. and D. A. Cheresh (2003). "Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis." *Oncogene* **22**(56): 9022-9.
- Stupack, D. G., X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard and D. A. Cheresh (2001). "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." *J Cell Biol* **155**(3): 459-70.
- Takagi, J. (2004). "Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt3): 403-6.
- Teodoro, J. G., S. K. Evans and M. R. Green (2007). "Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome." *J Mol Med* **85**(11): 1175-86.

- Tsofanoglou, N. E., P. Andriopoulou and M. E. Maragoudakis (2002). "On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of alphavbeta3-integrin." Am J Physiol Cell Physiol **283**(5): C1501-10.
- Vallon, M. and M. Essler (2006). "Proteolytically processed soluble tumor endothelial marker (TEM) 5 mediates endothelial cell survival during angiogenesis by linking integrin alpha(v)beta3 to glycosaminoglycans." J Biol Chem **281**(45): 34179-88.
- Vallon, M., F. Rohde, K. P. Janssen and M. Essler (2010). "Tumor endothelial marker 5 expression in endothelial cells during capillary morphogenesis is induced by the small GTPase Rac and mediates contact inhibition of cell proliferation." Exp Cell Res **316**(3): 412-21.
- van Hinsbergh, V. W., M. A. Engelse and P. H. Quax (2006). "Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 716-28.
- Vaupel, P. and L. Harrison (2004). "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response." Oncologist **9 Suppl 5**: 4-9.
- Veitch, D. P., P. Nokelainen, K. A. McGowan, T. T. Nguyen, N. E. Nguyen, R. Stephenson, W. N. Pappano, D. R. Keene, S. M. Spong, D. S. Greenspan, P. R. Findell and M. P. Marinkovich (2003). "Mammalian tolloid metalloproteinase, and not matrix metalloproteinase 2 or membrane type 1 metalloproteinase, processes laminin-5 in keratinocytes and skin." J Biol Chem **278**(18): 15661-8.
- Wang, T., Y. Ward, L. Tian, R. Lake, L. Guedez, W. G. Stetler-Stevenson and K. Kelly (2005). "CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells." Blood **105**(7): 2836-44.
- Wojtukiewicz, M. Z., E. Sierko, P. Klement and J. Rak (2001). "The hemostatic system and angiogenesis in malignancy." Neoplasia **3**(5): 371-84.
- Yamamoto, Y., K. Irie, M. Asada, A. Mino, K. Mandai and Y. Takai (2004). "Direct binding of the human homologue of the Drosophila disc large tumor suppressor gene to seven-pass transmembrane proteins, tumor endothelial marker 5 (TEM5), and a novel TEM5-like protein." Oncogene **23**(22): 3889-97.
- Yokosaki, Y. and F. Higashikawa (2005). "[Osteopontin receptors and signal transduction]." Nippon Rinsho **63 Suppl 10**: 613-7.
- Yokosaki, Y., K. Tanaka, F. Higashikawa, K. Yamashita and A. Eboshida (2005). "Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin." Matrix Biol **24**(6): 418-27.

### **7.5. Danksagung**

Mein Dank geht zunächst an den Direktor der Nuklearmedizinischen Klinik Herrn Prof. Dr. Markus Schwaiger und die Laborchefin Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke dafür, dass ich die Laboreinrichtungen der Klinik für meine Versuche nutzen durfte.

Bedanken möchte ich mich besonders bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die ich während meiner Laborzeit kennenlernte: Bei Dr. Enken Drecoll für die aufmunternden Worte an den vielen Samstag- und Sonntagnachmittagen, bei Dr. Jan Müller für seine kritischen, lehrreichen Unterweisungen in technischen und biologischen Fragen, bei unserer MTA Frau Birgit Blechert für ihre stete Hilfsbereitschaft und besonders für die Organisation der finanziellen Mittel, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Viele wertvolle Tipps bekam ich besonders auch von Dr. Florian Gärtner.

Den größten Dank schulde ich Prof. Dr. Markus Essler und Dr. Mario Vallon. Meinem Doktorvater Markus Essler danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seine exzellente Betreuung, seine Motivationskünste und insbesondere, dass er während der Phase der Niederschrift dieser Arbeit immer wieder Zeit für mich fand. Er war mir ein wichtiger und wohlwollender Mentor nicht nur in Belangen, die diese Arbeit betreffen. Von ihm lernte ich mehr als nur wissenschaftliches Denken und Arbeiten. So hoffe ich sehr, dass unsere Zusammenarbeit nicht mit dieser Arbeit endet.

Dr. Mario Vallon brachte mir alle benötigten molekularbiologischen Techniken bei und stand mir jederzeit und geduldig bei allen Fragen zur Seite. Ich danke ihm besonders, dass ich seine Expressionskonstrukte, Zellen und etablierten Methoden für meine Fragestellungen nutzen durfte. Die vielen Diskussionen und sein konstruktiv wissenschaftliches Hinterfragen, aber auch seine zahlreichen wertvollen Anregungen haben entscheidend mit dazu beigetragen, dass diese Arbeit zustande kam. Nicht zuletzt möchte ich ihm besonders für seinen Anteil und sein großes Engagement bei der Veröffentlichung unserer gemeinsamen Daten danken.

Meinen Eltern, Waltraud und Dr. Rudolf Aubele, danke ich für ihre langjährige und vielfältige Unterstützung während meines Studiums, ganz besonders in der letzten Phase dieser Arbeit.

Zuletzt, aber nicht weniger, danke ich meiner Freundin Tuuli Artman. Sie brachte viel Verständnis für meine oft lange Abwesenheit im Labor und die Missstimmungen auf, wenn nicht jedem meiner Versuche gleich Erfolg beschieden war. Aufmunternd unterstützte sie mich mit steter Motivation, fachkundig mit konstruktiven Diskussionen und Vorschlägen.

## 7.6. *Lebenslauf*

Philipp Oliver Aubele

Persönliche Informationen

Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Geburtsdatum: 05.07.1981  
 Geburtsort: Penzberg / Obb.  
 Eltern: Dr. med. Rudolf Aubele, Waltraud Aubele

1983 - 2002 aufgewachsen in Konzell / Niederbayern

Schulische Ausbildung:

1988 - 1992 Grundschule Konzell  
 1992 - 2001 Johannes - Turmair - Gymnasium, Straubing  
 (Humanistische Ausrichtung)

Juni 2001 Abiturprüfung

2001 - 2002 Zivildienst: Klinikum St. Elisabeth, Straubing  
 Abteilung: Nuklearmedizin, „Medizinische Physik“

WS 2002 - SS 2003: Studium an der Universität Regensburg:  
 Germanistik, Geschichte, Informationswissenschaften

### **Medizinstudium:**

WS 2003 - SS 2005: Studium an der LMU München / TU München:  
 Medizin (Vorklinik)

Sept. 2005: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Okt. 2005: Immatrikulation an der TU München für das  
 Klinisches Studium der Medizin am  
 Klinikum rechts der Isar

11. Dez. 2009: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Beruflicher Werdegang:**

14. Jan. 2010: Approbation als Arzt

Mai 2010: Assistenzarzt in der 3. Med. Klinik für Hämatologie  
 und Hämato-Onkologie des Klinikums Großhadern  
 der Ludwig-Maximilian-Universität München