

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten

Direktor: Prof. Dr. med. Peter C. Weber

Ludwig-Maximilians-Universität München

und aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaiger

Technische Universität München

Identifizierung von extrazellulären
Bindungspartnern des Tumorendothelmarkers (TEM) 5
und Charakterisierung seiner Funktion bei der
Angiogenese

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Mario Vallon

aus

Wien

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Markus Essler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein
Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Wienecke

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Tumorangiogenese	1
Endothelzellapoptose in der Angiogenese	3
Tumorblutversorgung durch Gefäßkooption.....	3
Extrazelluläre Matrix.....	4
Integrine	5
Integrin $\alpha_v\beta_3$	5
Tumorendothel-spezifische Oberflächenmarker	6
TEMs.....	7
TEM5	9
Ziel der Arbeit.....	10
Material und Methoden	12
Puffer und Medien.....	12
Antikörper	13
Oligonukleotide.....	14
Zellkultur.....	15
Zelltransfektion	16
Immunhistochemische Färbung	16
Agarosegel-Elektrophorese	16
Klonierung von TEM5-Expressionskonstrukten.....	17
Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten.....	19
SDS-PAGE.....	19
Färbung von Proteingelen	20
Westernblot-Analyse.....	21
In Vitro-Angiogeneseversuch	21
Immunpräzipitation	22
Immunzytofluoreszenzfärbung.....	22
MMP-9-Verdau	22
Zelladhäsionsversuch	23
Affinitätschromatographie	23
Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Bindungsversuch	24
GAG-Bindungsversuch	24

Zellüberlebensversuch.....	24
Statistische Signifikanz	25
Ergebnisse	26
TEM5-Expression im Tumorendothel	26
Klonierung, Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten	27
Proteolytisch prozessiertes lösliches TEM5 vermittelt Endothelzelladhäsion.....	30
Zelladhäsion an ppsTEM5 wird von Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt	32
ppsTEM5 interagiert direkt mit Integrin $\alpha_v\beta_3$	33
TEM5 bindet an GAGs	34
ppsTEM5 vermittelt Überleben von Endothelzellen.....	36
Diskussion	38
Zusammenfassung	43
Literaturverzeichnis	44
Abkürzungsverzeichnis	50
Danksagung	53
Lebenslauf	54

Einleitung

Tumorangiogenese

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bestehenden Gefäßen, spielt eine entscheidende Rolle im Wachstum solider Tumore mit Ausnahme der vaskulär koaktiv wachsenden Tumore. Ohne die Versorgung durch Blutgefäße kann ein Tumor einen Durchmesser von 1 - 2 mm nicht überschreiten. Grund dafür ist die beschränkte Diffusion von lebenswichtigem Sauerstoff und anderen Nährstoffen im Gewebe. Der Übergang vom avaskulären zum vaskulären Wachstum eines Tumors wird „angiogenic switch“ genannt. Verschiedene Ereignisse im Tumor, wie Hypoxie, Hypoglykämie, Azidose, mechanischer Stress, Entzündungsreaktionen und genetische Mutationen, können ihn auslösen. Am Beginn des „angiogenic switch“ steht die Freisetzung von vaskulären Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem vaskuloendothelialen Wachstumsfaktor („vascular endothelial growth factor“, VEGF), aus dem Tumor (1 – 3).

Das vom Tumor ausgeschüttete VEGF führt zum Auflösen der Endothel-Zell-Zell-Kontakte angrenzender Blutgefäße. Endothelzellen spielen eine zentrale Rolle bei der physiologischen Angiogenese und Tumorangiogenese. Das Auflösen der vaskulären Zell-Zell-Kontakte führt zur Vasodilatation und erhöhter Permeabilität der Gefäße und ermöglicht die Extravasation von Plasmaproteinen, wie Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin, die eine provisorische Matrix bilden auf der Endothelzellen migrieren können. Die Basalmembran der Gefäße wird lokal abgebaut, und die darauf liegenden Endothelzellen beginnen in Richtung des angiogenen Stimulus zu migrieren. Auf ihrem Weg proliferieren die lose aneinander gereihten Endothelzellen und bilden sog. Migrationssäulen. Schließlich beginnen die Endothelzellen in den Migrationssäulen wieder Zell-Zell-Kontakte und ein Lumen zu bilden. Perizyten werden rekrutiert und eine neue Basalmembran wird gebildet. Die Interaktion von Perizyten mit den neu gebildeten unreifen Gefäßen hemmt die Endothelzellproliferation, vermindert ihre Abhängigkeit von VEGF und führt zur Gefäßreifung. Bei der Tumorangiogenese jedoch ist die Rekrutierung von Perizyten und ihre Interaktion mit den Endothelzellen gestört, was die Unreife, erhöhte Permeabilität und ungewöhnliche Morphologie von Tumorblutgefäßen zur Folge hat (Abb. 1). Die unkontrollierte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch die Tumorzellen dürfte der Grund dafür sein. Die erhöhte Permeabilität von Tumorblutgefäßen und das Fehlen von funktionellen Lymphgefäßen im Tumor führen oft zu einem hohen interstitiellen Druck. Dieser hemmt die Anreicherung von systemisch verabreichten chemotherapeutischen Substanzen im Tumor.

Nur sehr wenig ist über den letzten Schritt der Angiogenese bekannt, bei dem sich neu gebildete Gefäße mit anderen verbinden, um Anschluss an den Blutkreislauf zu finden (1 – 3).

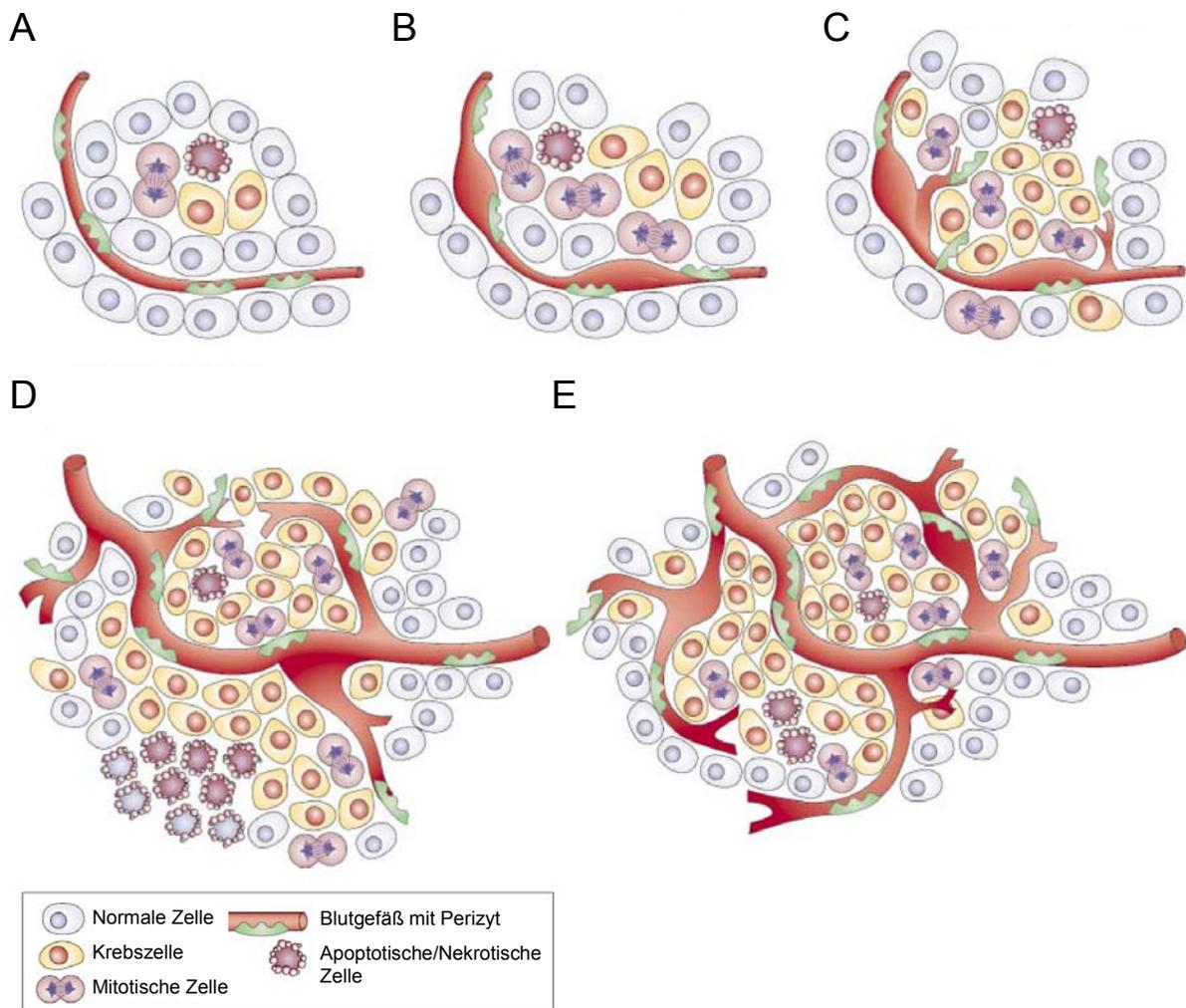


Abb. 1. Tumorangio-genese. Die meisten Tumore beginnen avaskulär (A) zu wachsen bis ein Gleichgewicht von proliferierenden und apoptotischen Zellen erreicht ist. Der „angiogenic switch“ ist Voraussetzung für ein exponentielles Tumorwachstum. Er beginnt mit dem Ablösen der Perizyten und der Gefäßerweiterung (B) gefolgt vom Aussprossen der Endothelzellen (C), neuer Gefäßbildung und Reifung und der Rekrutierung von Perizyten (D). Blutgefäßbildung findet statt solange der Tumor wächst, um hypoxische und nekrotische Bereiche des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (E).

Eine eher untergeordnete Rolle bei der Neovaskularisierung von Tumoren spielt die Vaskulogenese. Dabei führen die vom Tumor freigesetzten Wachstumsfaktoren zur Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen („endothelial progenitor cells“, EPCs) aus dem Knochenmark, die in den Tumor einwandern, zu reifen Endothelzellen differenzieren und neue Blutgefäße bilden (1 - 3).

Die Innenwand von Tumorblutgefäßen besteht nicht immer ausschließlich aus Endothelzellen. Sie kann in manchen Fällen gänzlich aus Tumorzellen oder aus Mosaiken von Tumor- und Endothelzellen bestehen. Es ist unklar, ob diese Gefäße entstehen, weil Tumorzellen in das Gefäßlumen invadieren oder das Verhalten von Endothelzellen bei der Vaskulogenese „nachahmen“ (vaskulogenes Mimikry), oder weil durch Apoptose der Endothelzellen die darunter liegenden Tumorzellen freigelegt werden (1).

Endothelzellapoptose in der Angiogenese

Wie die meisten Zelltypen im Körper können auch Endothelzellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) eintreten. In reifen Blutgefäßen findet nur sehr wenig Apoptose von Endothelzellen statt und steht im Gleichgewicht mit ihrer Proliferation (Endothelzell-„turnover“). Während der Angiogenese jedoch, zeigt sich ein ganz anderes Bild. Angiogene Endothelzellen gehen sehr schnell in die Apoptose, wenn sie nicht bestimmte Stimuli erhalten, die ihr Überleben fördern. 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, auch CD31 genannt, vermittelt werden. Fehlt einer dieser Stimuli, dann kommt es zur Endothelzellapoptose. Endothelzellen etwa, die nach einer bestimmten Zeit noch keine neuen Zell-Zell-Kontakte ausgebildet haben und nicht in neue Gefäße eingebaut wurden, sind davon betroffen (4 – 6).

Tumorblutversorgung durch Gefäßkooptation

In der Regel ist die Neovaskularisierung (Angiogenese und Vaskulogenese) eine Voraussetzung für das Wachstum von Tumoren. Es gibt allerdings einige Ausnahmen, die nicht von der Neubildung von Blutgefäßen abhängig sind. Astrozytome beispielsweise erlangen ihre Blutversorgung durch Kooptation der existierenden dichten Gehirnbloodgefäße ohne Angiogenese zu induzieren. Dabei wachsen sie auf invasive Weise entlang von Gefäßen ohne eine Tumorkapsel zu bilden und können so groß werden wie angiogene Tumore. Wenn Astrozytome jedoch zu den aggressiveren Glioblastomen fortschreiten, entstehen hypoxische und nekrotische Bereiche, die durch den Rückgang von Gefäßen entstehen, welcher durch Angiopoietin 2 und vermehrte Tumorzellproliferation verursacht wird. Schließlich führt die Hypoxie dann zum „angiogenic switch“, der zur Aggressivität von Glioblastomen beiträgt (3).

Extrazelluläre Matrix

Unter der extrazellulären Matrix („extracellular matrix“, ECM) versteht man das Netzwerk aus Proteinen und Proteoglykanen, in dem die Zellen eines Gewebes eingebettet sind. Die vorherrschenden Vertreter der ECM-Proteine sind Kollagene, die Fasern (z.B. Kollagen I) oder Netzwerke (z.B. Kollagen IV) bilden können. Andere Proteine der ECM sind Fibrillin, Elastin, Fibronectin, Laminin und Nidogen (auch Entaktin genannt). Die meisten ECM-Proteine sind in der Lage an andere Makromoleküle zu binden und somit große Netzwerke zu bilden. Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein an das ein oder mehrere Glykosaminoglykane (GAGs) kovalent gebunden sind. Sie sind ubiquitär an der Oberfläche von Zellen und in der ECM vorhanden.

GAGs sind lineare Heteropolysaccharide, die sich aus sich wiederholenden Disacharideinheiten zusammensetzen. Die Disacharideinheiten bestehen aus einem N-Acetylgalactosamin oder N-Acetylglucosamin und einer Glukuron- oder Iduronsäure, die zum Teil sulfatiert sind. Physiologisch relevante GAGs sind Heparin, Heparansulfat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat und Keratan-sulfat. Heparin und Hyaluronsäure kommen als einzige GAGs nicht kovalent gebunden an Kernproteine vor. Hyaluronsäure bindet jedoch nicht-kovalent an den Proteinanteil von Proteoglykanen und bildet somit riesige Makromoleküle. Heparin, das sich nur durch eine stärkere Sulfatierung vom Heparansulfat unterscheidet, ist als einziges GAG kein Bestandteil der Glykokalix oder ECM. Es wird vielmehr von Mastzellen synthetisiert und in ihren Granula gespeichert. Wird es freigesetzt, bewirkt es eine Hemmung der Blutgerinnung indem es Antithrombin III aktiviert. Einige Wachstumsfaktoren, wie VEGF und „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) binden an GAGs und werden dadurch in der ECM gespeichert. GAG-spaltende Enzyme, wie z.B. Heparinasen, können diese dann freisetzen. Die Aktivität des bFGF wird durch die Bindung an GAGs potenziert.

Eine wichtige Rolle beim Auf- und Umbau von Geweben (Angiogenese, Wundheilung, weiblicher Fortpflanzungszyklus) spielt die provisorische ECM, die hauptsächlich aus Fibrin, Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin besteht. Zur ECM zählt auch die Basalmembran, auf der Epithel- oder Endothelzellen verankert sind. Basalmembranen bestehen aus Kollagen IV, Laminin, Nidogen und dem Proteoglykan Perlekan. Eine wichtige Rolle bei der Verankerung von Zellen in der ECM spielen Integrine, die auf der Oberfläche der meisten Zellen exprimiert werden (7).

Integrine

Integrine sind membranständige heterodimere Rezeptoren bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die an verschiedene Proteine ECM binden und eine bidirektionale Signaltransduktion vermitteln (8). Die Interaktion von Integrinen mit ihren Liganden führt zur Aggregation der Integrine auf der Zelloberfläche und bewirkt die Aktivierung von verschiedenen intrazellulären Signalwegen (Außen-Nach-Innen-Signal), wie z.B. dem Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg, dem Phosphoinositol-3-Phosphat (PI3)-Akt-Kinaseweg und dem „nuclear factor“ (NF)- κ B-Weg. Die Aktivierung dieser und anderer Signalwege durch Integrine trägt zur Migration, zum Überleben, zur Proliferation, zur Zytoskelettorganisation und zur Differenzierung der Zellen bei. Integrine können in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, einer aufrechten hochaffinen und einer gebeugten niederaffinen Konformation, was zum Ein- bzw. Ausschalten des Rezeptors führt. Diese Konformationsänderungen werden durch ein Innen-Nach-Außen-Signal bewirkt, das durch bestimmte extrazelluläre Stimuli (z.B. Zytokine) ausgelöst wird (9, 10). Wenn Integrine keinen Kontakt zur ECM haben, kommt es zu einer speziellen Form der Apoptose, der Anoikis. Grund dafür ist die fehlende Aktivierung von NF- κ B und Akt-Kinase, die die Anoikis hemmen und Zellüberleben vermitteln würden. Außerdem vermitteln unligierte Integrine Anoikis durch die Aktivierung von Caspase-8, einer Protease, welche die Apoptose/Anoikis einleitet (11).

Integrin $\alpha_v\beta_3$

Eines von mehreren Integrinen, das in vaskulären Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) während der physiologischen Angiogenese und Tumorangiogenese exprimiert wird, ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$ (12). Es gehört zur Gruppe der RGD-bindenden Integrine, die an Proteine mit einem oder mehreren RGD-Tripeptidmotiven binden. Integrin $\alpha_v\beta_3$ spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese und ist wichtig für die Migration, Proliferation und das Überleben von Endothelzellen (13). Eine Vielzahl von Liganden von Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde bereits beschrieben, wie die ECM-Proteine Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen (13), sowie die Nicht-ECM-Proteine CD97, Prothrombin und Matrixmetalloprotease (MMP)-2 (14 - 16). Es gibt zahlreiche Studien bei denen Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten, wie monoklonale Antikörper, RGD-Peptide oder RGD-Peptidanaloga, erfolgreich für die Therapie von Tumoren in Mausmodellen eingesetzt wurden (17 – 19).

Erstaunlicherweise haben Knockout-Experimente gezeigt, dass Mäuse ohne α_v -Integrine keine Defekte bei der Angiogenese oder Vaskulogenese zeigen, jedoch aufgrund

anderer Defekte embryonal lethal sind (20). Weitere Studien mit β_3 - und β_5 -Integrin-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass diese sogar verstärktes Tumorstadium und verstärkte Tumorangio-genese aufweisen (20). Seit der Veröffentlichung dieser Ergebnisse wird die zentrale Stellung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in der Angio-genese kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird aufgrund der Knockout-Studien argumentiert, dass α_v -Integrine negative Regulatoren der Angio-genese und die vermeintlichen Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten eigentlich Agonisten sind (20). Auf der anderen Seite wird der Phänotyp der Knockout-Mäuse durch eine geringere Apoptose der Endothelzellen erklärt, da unligiertes Integrin $\alpha_v\beta_3$ Caspase-8 aktivieren und vermehrt Apoptose induzieren würde (21). Wahrscheinlich ist Integrin $\alpha_v\beta_3$ sowohl ein positiver als auch ein negativer Regulator der Angio-genese.

Tumorendothel-spezifische Oberflächenmarker

Angiogene Endothelzellen unterscheiden sich von ruhenden in ihrer Genexpression. Bei der Angio-genese wird in Endothelzellen die Expression von Genen, die für Wachstum, Migration, Überleben und Gefäßdifferenzierung wichtig sind, angeschaltet, während die für den ruhenden Phänotyp verantwortlichen Gene in ihrer Expression gehemmt werden. Die Tatsache, dass im Tumorendothel bestimmte Gene verstärkt exprimiert werden und in Tumorblutgefäßen nicht der selbe hohe interstitielle Druck wie im Tumorparenchym herrscht, macht Tumorendothel-spezifische Oberflächenmarker zu attraktiven Zielstrukturen für die Krebstherapie.

Es wurden bereits verschiedene Methoden beschrieben, um Tumorendothel-spezifische Rezeptoren oder Liganden zu identifizieren. Mit Hilfe der In Vivo-Selektion von Phagen-präsentierten Peptid- oder cDNA-Banken wurden einige Tumorendothel-spezifische Peptide und Liganden gefunden und ihre Rezeptoren mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (22 - 24). Andere Methoden, die für die Identifizierung von Tumorendothel-spezifischen Markern benutzt wurden, sind: Proteomische Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese (25), Expressionsanalysen bekannter Gene mit Hilfe von DNA-Mikroarrays (26), „differential display“ und die „serielle Analyse der Genexpression“ (SAGE) zur Identifizierung neuer Tumorendothel-spezifischer Gene (27 – 29). Mit Hilfe der Bioinformatik wurden dann diejenigen Gene ausgewählt, die sezernierte oder membranständige Proteine kodieren. Monoklonale Antikörper, Peptide oder kleine organische Moleküle, die an Tumorendothel-spezifische Oberflächenmarker binden und antagonistisch wirken, wie die bereits erwähnten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten, können unkonjugiert für die Therapie von Tumoren eingesetzt werden (antiangiogene Therapie) (17 – 19, 30, 31). Nicht-

antagonistische Liganden können, an zytotoxische Substanzen oder Radionuklide gekoppelt, für die Therapie und Diagnostik von Tumoren eingesetzt werden. Die gezielte Zerstörung des Tumorendothels würde die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen unterbrechen und zur Regression des Tumors führen.

TEMs

Mit Hilfe der SAGE haben St. Croix et al. eine Reihe von Genen identifiziert, deren Expression in Endothelzellen von Kolorektalkarzinomen erhöht ist (29). Bei der Analyse wurden 46 Gene gefunden, die im Vergleich zu Endothelzellen aus normalem Kolon erhöhte Transkription aufwiesen. Neun dieser Gene waren bisher unbekannt und wurden Tumorendothelmarker (TEMs) 1 – 9 genannt (29). Weitere Studien zu den TEMs haben gezeigt, dass diese auch bei der physiologischen Angiogenese (Embryogenese, Wundheilung, weiblicher Fortpflanzungszyklus) in Endothelzellen verstärkt exprimiert werden (32). TEMs 1, 5, 7 und 8 kodieren membranständige Proteine und sind viel versprechende Zielstrukturen für die Therapie von vaskularisierten Tumoren, weil sie auf der Oberfläche von perfundierten Tumorblutgefäßen exprimiert sein könnten (Abb. 2). Bevor man jedoch TEMs in der anwendungsorientierten Forschung einsetzt, ist es wichtig grundlegende Dinge über sie zu erfahren, wie z.B.: Werden sie auf der Zelloberfläche exprimiert? Werden sie tatsächlich nur im Tumorendothel exprimiert? Werden sie in allen vaskularisierten Tumoren exprimiert? Werden sie in perfundierten Tumorblutgefäßen exprimiert? Kann man lösliche TEMs selbst als Tumor-„homing“-Moleküle einsetzen? Kann man die Tumorangiogenese hemmen, indem man ihre Funktion hemmt? Woraus sich die Frage ergibt: Welche Funktion haben sie?

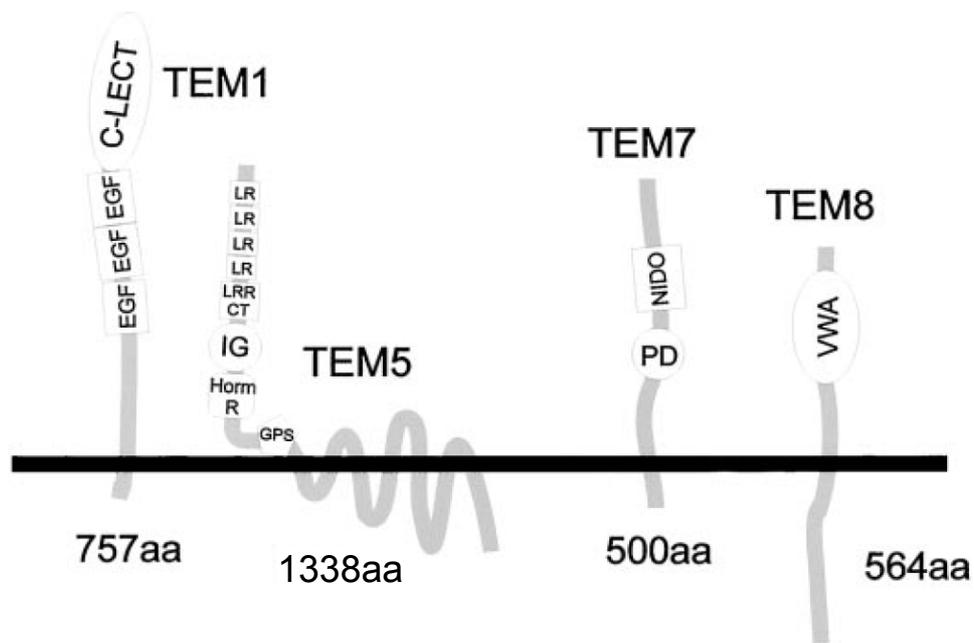


Abb. 2. Domänenstrukturen der membranständigen TEMs. C-LECT, C-Lectindomäne; EGF, „epidermal growth factor“-Domäne; LR, „leucine-rich repeat“; LRRCT, „leucine-rich repeat“-C-Terminus; IG, Immunglobulindomäne; HormR, Hormonrezeptordomäne; GPS, GPCR-Proteolysestelle; NIDO, Nidogendomäne; PD, Plexin-domäne; VWA, von Willebrandfaktor A-Domäne; aa, „amino acids“ .

Für TEM1, das auch als Endosialin bezeichnet wird, wurde noch keine Funktion und kein Ligand beschrieben (33). Es wurde gezeigt, dass TEM5, das auch als GPR124 bezeichnet wird, über seine intrazelluläre Domäne (IZD) mit dem Tumorsuppressorprotein „human disc large“ (hDlg), auch Synapsen-assoziiertes Protein (SAP) 97 genannt, interagiert und eine potentielle Rolle bei der Rekrutierung von hDlg an die Zellmembran spielt (41, 48). In dieser Arbeit wurden das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und eine Reihe von GAGs als extrazelluläre Bindungspartner von TEM5 identifiziert und eine Rolle bei der Zelladhäsion und beim Zellüberleben beschrieben. Das Zytoskelett-assoziierte Protein Cortactin wurde als Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne (EZD) von TEM7 identifiziert (34). Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion bleibt allerdings unklar. Das ECM-Protein Nidogen ist ein weiterer Ligand von TEM7, und die Interaktion von TEM7 mit immobilisiertem Nidogen bewirkt ein verstärktes Ausbreiten von Zellen (35). Anthraxtoxin und Kollagene wurden als Liganden von TEM8, das auch als Anthraxtoxinrezeptor (ATR) bezeichnet wird, beschrieben (36, 37). Die Expression von TEM8 in Endothelzellen wird bei der In Vitro-Angiogenese und durch Stimulierung mit Interleukin (IL)-1 β verstärkt (38, 39). Es wurde gezeigt, dass TEM8 die Adhäsion und Migration von Endothelzellen moduliert und eine Rolle bei der In Vitro-Angiogenese spielt (38, 40) (Tab. 1).

Name	Alternativer Name	Bindungspartner	Funktion	Referenzen
TEM1	Endosialin	Unbekannt	Unbekannt	33
TEM5	GPR124	hDlg, Integrin $\alpha_v\beta_3$, GAGs	Zelladhäsion, Zellüberleben	41, 48, diese Arbeit
TEM7	-	Cortactin, Nidogen	Zellausbreitung	34, 35
TEM8	ATR	Anthraxtoxin, Kollagene	Zelladhäsion, Zellmigration, In Vitro- Angiogenese	36 – 38, 40

Tab. 1. Membranständige TEMs, ihre Bindungspartner und Funktionen.

TEM5

Aufgrund seiner Sequenzhomologie gehört TEM5 zur Gruppe III der Adhäsions-G-Proteingekoppelten Rezeptoren („G-protein-coupled receptors“, GPCRs). Bisher wurde allerdings für keinen dieser Rezeptoren GPCR-Aktivität beschrieben. Die Adhäsions-GPCRs besitzen eine Siebenpass-Transmembrandomäne (TMD) und einen langen extrazellulären N-Terminus mit konservierten Domänen, die typisch für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sind (41). Die EZD von TEM5 besteht 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 membranproximalen GPCR-Proteolysestelle (GPS) (Abb. 2).

Fast alle Mitglieder der Adhäsions-GPCR-Familie besitzen eine GPS in der EZD (41). Es wurde gezeigt, dass diese Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) an der GPS gespalten werden und die entstehenden Proteinfragmente nicht-kovalent miteinander verbunden bleiben (42, 43). Diese Prozessierung ist Voraussetzung für die Translokation der Rezeptoren an die Zelloberfläche (44). Es wurde außerdem für den „brain angiogenesis inhibitor“ (BAI)-1 und CD97 gezeigt, dass die proteolytische Spaltung an der GPS zur Freisetzung ihrer EZD führen kann (45, 46) (Abb. 3). Bisher wurde noch keine Protease identifiziert, die die Spaltung an der GPS katalysiert. Für den „epidermal growth factor-like module containing mucin-like hormone receptor“ (EMR) 2 wurde jedoch gezeigt, dass die proteolytische Prozessierung an der GPS autokatalytisch abläuft (47). Ob dieser Mechanismus für andere Proteine mit GPS-Motiv ebenfalls gilt, bleibt allerdings unklar. Die IZD von

TEM5 trägt am C-Terminus eine PDZ-Domänen-Bindungsstelle mit der Sequenz ETTV. Es wurde beschrieben, dass hDl γ über seine PDZ-Domänen an den C-Terminus von TEM5 bindet (48). hDl γ ist in Epithelien an den „adherens junctions“ lokalisiert, verbindet Membranproteine mit dem Zytoskelett und mit Signalkaskaden und hemmt die Zellproliferation (49, 50).

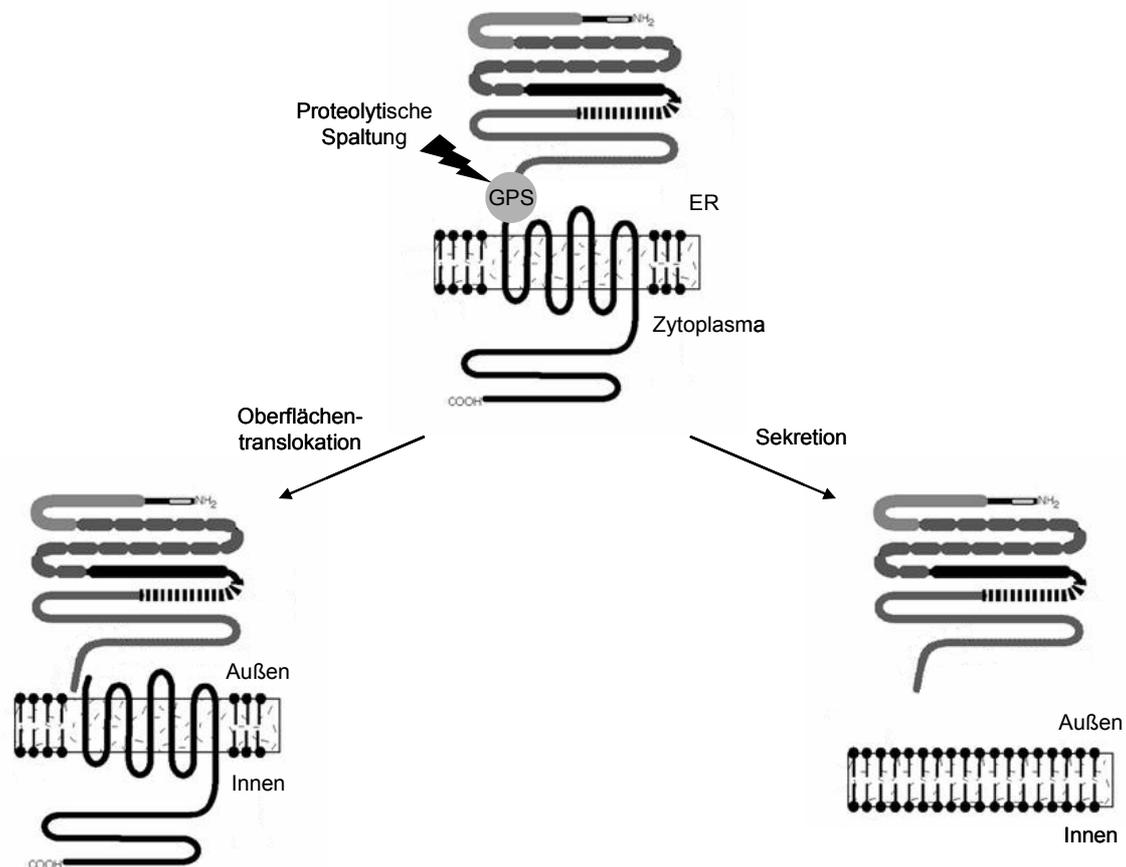


Abb. 3. *Proteolytische Prozessierung an der GPS in Adhäsions-GPCRs.* Die Spaltung des GPS-Motivs findet im ER statt. Erst nach dieser Spaltung kommt es zur Translokation des Rezeptors an die Zelloberfläche oder zur Sekretion seiner EZD.

Ziel der Arbeit

Die molekularen Mechanismen der Angiogenese sind nur teilweise aufgeklärt. Die Identifizierung neuer Tumorangiogenesemarker, wie den TEMs, bildet eine wichtige Grundlage, um die Angiogenese besser verstehen zu können. Die Aufklärung der Funktion und Identifizierung der Liganden der TEMs wird dazu beitragen einen besseren Einblick in die molekularen Mechanismen der Angiogenese zu bekommen. Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von TEM5 in der Angiogenese zu charakterisieren und Bindungspartner von TEM5 zu identifizieren. Ein Ziel war die Bestätigung der verstärkten Expression von TEM5 im Tumorendothel auf Proteinebene. Ein anderes Ziel war die Aufklärung der Funktion der

verschiedenen Subdomänen der TEM5-EZD. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob lösliches TEM5 selbst als Tumor-„homing“-Molekül eingesetzt werden kann.

Material und Methoden

Puffer und Medien

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:	250 mM Tris-HCl pH 6,8 200 mM DTT 8% SDS 40% Glycerin 0,2% Bromphenolblau

10x Blotpuffer: 58 g/l Tris
29 g/l Glyzin
20% Methanol

Coomassie-Entfärber: 40% Methanol
10% Essigsäure

Coomassie-Färber: Coomassie-Entfärber
0,25% Coomassie Blue R-250

Puffer A: TBS
0,1 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
0,5 mM MnCl₂

LB-Amp-Medium: LB-Medium (Sigma-Aldrich)
0,1 mg/ml Ampicillin

LB-Amp-Agar: LB-Amp-Medium
2% Agar

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 α_1	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1E6	Integrin α_2	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P1D6	Integrin α_5	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	P3G8	Integrin α_v	Maus	-	Chemicon
Monoklonal	LM609	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Maus	-	Chemicon

Q H I S V | G S H H H

T5Hplus-fwd: 5'-CCA GCA CAT CTC AGT GGG TTC TCA TCA TCA TC-3'

T5Hplus-rev: 3'-GGT CGT GTA GAG TCA CCC AAG AGT AGT AGT AG-5'

A A N S | V E I V

T5HM-fwd: 5'-GGC CGC GAA TTC AGT GGA GAT CGT GG-3'

T5HM-rev: 3'-CCG GCG CTT AAG TCA CCT CTA GCA CC-5'

A A A N S | L Y T F V

T5MPR-fwd: 5'-GCG GCC GCG AAT TCA CTG TAC ACC TTC GTG-3'

T5MPR-rev: 3'-CGC CGG CGC TTA AGT GAC ATG TGG AAG CAC-5'

A

↓

TEM5-S400G-fwd: 5'-TGTGACCGTGCCGGCCGCTGGGAGC-3'

TEM5-S400G-rev: 5'-GCTCCCAGCGGCCGGCACGGTCACA-3'

Zellkultur

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen („human umbilical vein endothelial cells“, HUVECs) wurden wie bereits beschrieben aus Nabelschnüren isoliert (51). HUVECs wurden in Kollagen-beschichteten Zellkulturflaschen in Endothelzellmedium (PromoCell) mit 0,1 mg/ml Gentamycin (Biochrom) kultiviert. Um Zellkulturflaschen mit Kollagen zu beschichten, wurden diese mit 0,1 mg/ml Kollagen (Biochrom) in PBS benetzt und in der Sterilbank offen stehen gelassen bis das Kollagen eingetrocknet war. Nur HUVECs der Passagen 0 – 4 wurden für Versuche verwendet. „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. Die Melanomzelllinien M21 und M21L wurden in RPMI-Medium (Biochrom) mit 10% FCS und 1% Antibiotikum-Antimykotikum und die humane Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 in RPMI-Medium mit 5% FCS und 0,1 mg/ml Gentamycin kultiviert. Konfluente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 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 in

1 ml DMSO-Gefriermedium (BioVeris) pro Kulturflasche resuspendiert und eingefroren (2 – 16 h bei -20 °C, 2 – 16 h bei -80 °C und dann in flüssigen Stickstoff). Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden diese im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, einmal mit 10 ml Kulturmedium gewaschen und ausgesät. Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Zelltransfektion

HUVECs wurden mit Plasmid-DNA mit dem Transfektionsreagenz Lipofectin (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert. HEK293-Zellen wurden mit Hilfe der DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitation transfiziert (52).

Immunhistochemische Färbung

1 x 10⁷ MDA-MB-435-Zellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert und subkutan in eine Nacktmaus (NMRI-nu, Charles River) injiziert. 5 Wochen nach der Injektion wurde die Maus geopfert und der Tumor und Kontrollorgane entnommen. Diese wurden in Stickstoff schockgefroren und in Tissue-Tek (Sakura Finetek) eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 7 µm-Kryoschnitte angefertigt und auf Objektträger überführt. Die Schnitte wurden 10 min bei -20 °C in Azeton fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit dem „Vectastain kit“ (Vector Laboratories) laut Protokoll des Herstellers gefärbt. Der primäre Antikörper wurde 1:40 (Anti-TEM5) bzw. 1:100 (Anti-CD31), der sekundäre Antikörper 1:500 (biotinylierter Anti-Kaninchen IgG) bzw. 1:6000 (biotinylierter Anti-Ratten IgG) verdünnt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 2 min in Hämatoxylin und 5 min in Leitungswasser inkubiert. Die getrockneten Schnitte wurden mit Glyzeringelatine und Deckgläsern eingedeckt. Gefärbte Schnitte wurden unter einem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert.

Agarosegel-Elektrophorese

Das Agarosegel bestehend aus 1% Agarose in TAE-Puffer (Invitrogen) wurde zunächst in der Mikrowelle verflüssigt und ein 50 ml-Aliquot wurden 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 mit einem Kamm versehenen Gelschlitten gegossen und zum Aushärten ca. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in die 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). Das Gel wurde bei 100 - 120 V gefahren bis der Farbstoff des Ladepuffers über die Mitte des Gels gelaufen war. Schließlich wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert (Daten nicht gezeigt).

Klonierung von TEM5-Expressionskonstrukten

Die Kodierungssequenz von TEM5 ohne Signalpeptid wurde mittels PCR aus dem cDNA-Klon FLJ00170 (Kazusa DNA Research Institute) amplifiziert:

Polymerase:	PowerScript Polymerase (PAN Biotech)
Template:	200 ng FLJ00170
Primer:	0,4 μ M TEM5cds-F1 + 0,4 μ M TEM5-Myc-rev
dNTPs:	HF dNTP-Mix (BD Biosciences)
Zusätze:	2 mM MgCl ₂ + 3 μ l Quik Solution (Stratagene)
Gesamtvolumen:	50 μ l
Programm:	1) 95 °C, 1 min 2) 95 °C, 50 sec 3) 68 °C, 5 min 4) 68 °C, 4 min

} 35x

Der Rückwärts-Primer für die TEM5-PCR (TEM5-Myc-rev) wurde so entworfen, dass ein Myc-Tag C-terminal inseriert wurde, ohne die C-terminale PDZ-Bindungsstelle (ETTV) zu maskieren. Die Kodierungssequenz von sTEM5 inklusive dem C-terminalen His-Tag wurde aus dem Plasmid pIVEX2.3-MCS-sTEM5 (Johns Hopkins Kimmel Cancer Center) amplifiziert:

Polymerase:	HF Advantage II Polymerase (BD Biosciences)
Template:	1 ng pIVEX2.3-MCS-sTEM5
Primer:	0,4 μ M TEM5cds-F1; 0,4 μ M TEM5A-6xH-rev
dNTPs:	HF dNTP-Mix (BD Biosciences)
Gesamtvolumen:	50 μ l

Programm:

1) 95 °C, 1 min	}	30x
2) 95 °C, 30 sec		
3) 68 °C, 3 min		
4) 68 °C, 3 min		

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht und aus den Gelen ausgeschnitten. Mit Hilfe des „gel extraction kits“ (Qiagen) wurden diese aufgereinigt und mittels Absorption bei 260 nm quantifiziert ($OD_{260} = 1,0$ entspricht 50 ng/ μ l dsDNA). Danach wurde 1 μ g PCR-Produkt 3 h bei 37 °C mit je 10 U EcoR I und BamH I (New England Biolabs) inkubiert. Gleichzeitig wurde 1 μ g des Mammalia-Expressionsvektors für Sekretion p3xFLAG-CMV-9 (Sigma-Aldrich) mit 10 U EcoR I, 10 U BamH I und 0,5 U „calf intestinal phosphatase“ (CIP, New England Biolabs) bei 37° C inkubiert. Die verdauten DNAs wurden mit Hilfe des „PCR purification kits“ (Qiagen) aufgereinigt und erneut quantifiziert. Nun wurde der Vektor mit je einem Insert (PCR-Produkt) im molaren Verhältnis 1:5 mit dem „rapid ligation kit“ (Roche Applied Science) ligiert. 5 – 10 μ l des Ligationsansatzes wurden eingesetzt um chemisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue-Zellen (Stratagene) laut Protokoll des Herstellers zu transformieren. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 3 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. Je 200 ng der Plasmid-DNAs wurden 1 h bei 37° C mit je 10 U EcoR I und BamH I inkubiert und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (Restriktionsanalyse). Je ein Insert-positiver Klon wurde ausgewählt und die Korrektheit der Insert-Sequenz mittels DNA-Sequenzierung (MWG Biotech) überprüft.

Die Punktmutation G400S im TEM5-Expressionskonstrukt wurde mit Hilfe des „QuickChange XL II site-directed mutagenesis kits“ (Stratagene) und dem Primerpaar TEM5-S400G-fwd/rev revertiert und die Reversion mittels DNA-Sequenzierung (MWG Biotech) bestätigt. Die Expressionskonstrukte ppsTEM5, TEM5-HG und TEM5-G wurden durch Deletion der betreffenden Regionen aus dem sTEM5-Konstrukt hergestellt. Die Deletionen wurden ebenfalls mit Hilfe des „QuickChange XL II site-directed mutagenesis kits“ und den Primerpaaren T5Hplus-fwd/rev (ppsTEM5-Konstrukt), T5HM-fwd/rev (TEM5-HG-Konstrukt) und T5MPR-fwd/rev (TEM5-G-Konstrukt) durchgeführt und mittels Restriktionsanalyse bestätigt.

Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten

HEK293-Zellen wurden mit den TEM5-Expressionskonstrukten, die lösliche Proteine kodieren, transfiziert. 48h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium mit 0,6 mg/ml Genetizin (Invitrogen) versetzt, um stabil transfizierte Zellen zu selektieren. Nach vollendeter Selektion (ca. 2 Wochen) wurden die Zellen in 175 cm²-Kulturflaschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Bei erreichter Konfluenz wurde das Kulturmedium durch 1% FCS und 0,6 mg/ml Genetizin in DMEM (NS-Medium) ersetzt und die Zellen inkubiert bis das Medium orange wurde (24 – 72 h). Nun wurden die Überstände abgenommen und die Zellen mit frischem NS-Medium versorgt. Sobald 60 – 100 ml der Überstände vorhanden war, wurden sie 10 min bei 5000xg zentrifugiert und die Pellets verworfen. Die klaren Überstände wurden mit Centricon Plus-20 Zentrifugierfiltern (Millipore) 500fach aufkonzentriert und danach in 50 Vol. PBDST verdünnt. Die aufkonzentrierten umgepufferten Überstände wurden 1 h bei Raumtemperatur mit 500 µl Anti-FLAG M2-Agarose (Sigma-Aldrich) im Rotator inkubiert. Die Agarose wurde mit 30 Vol. PBDST und 10 Vol. PBS gewaschen.

Wegen der geringen Sekretion des ppsTEM5-Proteins, wurde dieses auch aus Zelllysaten aufgereinigt. Die Zellen wurden durch spülen mit PBS von den Kulturflaschen abgelöst und 10 min bei 5000xg pelletiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem Lysepuffer (1 ml pro Kulturflasche) lysiert, 30 min auf Eis inkubiert und gelegentlich gevortext. Das Lysat wurde 10 min bei 10000xg und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Das klare Lysat wurde nun 1 h bei Raumtemperatur mit 500 µl Anti-FLAG M2-Agarose im Rotator inkubiert. Danach wurde die Agarose mit 30 Vol. Lysepuffer (ohne Proteaseinhibitoren), 10 Vol. PBDST und 20 Vol. PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in 500 µl-Fractionen mit 0,1 M Glyzin-HCl pH 3,5 eluiert und die Eluate mit 0,02 Vol. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Proteinhaltige Fraktionen (Schäumprobe) wurden vereint und in Centricon Plus-20 Zentrifugierfiltern aufkonzentriert. Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des „protein dotMetric assays“ (G-Biosciences) bestimmt.

SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli verwendet (53). Es wurde mit 8, 10 und 14%igen 1 mm dicken Polyacrylamid-Minigelen gearbeitet. Diese wurden wie folgt hergestellt (ausreichend für zwei Gele):

	Trenngel:	Sammelgel:
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	8%, 10%, 14%	4%
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
2 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,3 ml
10% SDS	100 μ l	200 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l
10% APS	100 μ l	50 μ l
Gesamtvolumen	10 ml	5 ml

Zunächst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und die Grenzschicht des Gels mit Wasser gewaschen. Das Sammelgel wurde zwischen die Platten auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingeführt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt, die Gelplatte in die Gelkammer gesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. $3 - 4 \times 10^5$ HUVECs wurden mit 40 μ l Probenpuffer lysiert. Aufgereinigte Proteine wurden mit Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C inkubiert und je 10 – 20 μ l wurden auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der „full-range rainbow molecular weight marker“ (Amersham Biosciences). Das Gel wurde bis zum Einlaufen des Farbstoffs in das Trenngel bei 100 V, danach bei 200 V gefahren. Sobald der Farbstoff vollständig aus dem Gel gelaufen war, wurde der Gellauf beendet und die Proteine im Gel gefärbt oder im Westernblot analysiert.

Färbung von Proteingelen

Coomassie-Färbung: Proteingele wurden 30 min in Coomassie-Färber inkubiert und 3 – 4 Mal 30 min in Coomassie-Entfärber.

Silberfärbung: Proteingele wurden 1 h in Coomassie-Entfärber mit 0,02% Formaldehyd inkubiert und danach dreimal 10 min mit 50% Ethanol gewaschen. Die Gele wurden 1 min mit 0,2 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt, dreimal 20 sec mit Wasser gewaschen und schließlich 20 min in 0,2% AgNO_3 und 0,02% Formaldehyd inkubiert. Dann wurden sie wieder dreimal 20 sec mit Wasser gewaschen und in 3% Na_2CO_3 , 0,02% Formaldehyd und 1 μ g/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ inkubiert bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit 1%iger Essigsäure gestoppt.

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur und im Schüttler durchgeführt. Die gefärbten Gele wurden zwischen zwei nassen Zellophanfolien (BioRad) in einen Rahmen eingespannt und getrocknet.

Westernblot-Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Amersham Biosciences) transferiert. Dazu wurde das Gel auf die mit Blotpuffer äquilibrierte Membran gelegt und zwischen zwei in Blotpuffer eingeweichte Filterpapiere (BioRad) plaziert. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen zwei Schwämme in eine Kassette gelegt und in die mit Blotpuffer gefüllte Tankblot-Apparatur überführt. Nach dem einstündigen Proteintransfer bei 100 V im Kühlraum wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C im Rotator mit dem primären Antikörper inkubiert. Je nach Antikörper wurde dieser unterschiedlich verdünnt:

Anti-FLAG (Peroxidase-konjugiert):	1:1000 in Blockpuffer
Anti-Myc:	1:5000 in PBST/BSA
Anti-His:	1:1000 in PBST/BSA
Anti-Aktin:	1:10000 in Blockpuffer
Anti-Caspase-3:	1:1000 in Blockpuffer

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 5 min mit PBST gewaschen. Falls der primäre Antikörper nicht Peroxidase-konjugiert war, wurde die Membran nun 1 h bei Raumtemperatur mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (1:5000 in Blockpuffer), der gegen die entsprechende Spezies gerichtet war, inkubiert. Nachdem die Membran erneut dreimal mit PBST gewaschen war, wurde sie mit 2 ml ECL-Substrat (Amersham Biosciences) benetzt und 1 min inkubiert. Danach wurde sie in eine Klarsichthülle gelegt und in eine lichtdichte Kassette überführt. Die Chemolumineszenz wurde mit Kodak BioMax XAR Filmen (Sigma-Aldrich) detektiert.

In Vitro-Angiogeneseversuch

Eiskaltes Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel (BD Biosciences) wurde in 6-Well-Platten pipettiert (1,5 ml pro Well) und zum Polymerisieren 15 min in den Zellkultur-Inkubator gestellt. HUVECs in Endothelzellmedium mit 10% FCS wurden auf dem Matrigel ausgesät ($2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well) und bis zu 24 h inkubiert. Die Zellen wurden unter einem

Phasenkontrastmikroskop bei 100facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert. Danach wurden sie mittels Matrisperse (BD Biosciences) aus dem Matrigel isoliert, in je 20 µl Probenpuffer lysiert und im Westernblot analysiert.

Immunpräzipitation

Zunächst wurde das Matrigel mittels Matrisperse (BD Biosciences) laut Protokoll des Herstellers solubilisiert. Die Überstände (konditioniertes Matrigel bzw. Medium) wurden 10 min bei 10000xg und 4 °C zentrifugiert und die Pellets verworfen. Danach wurden die Überstände über Nacht bei 4 °C mit 10 µl Anti-FLAG M2-Agarose (Sigma-Aldrich) im Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Agarose dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 10 µl 2x Probenpuffer für 5 min bei 95 °C eluiert und im Westernblot analysiert.

Immunzytofluoreszenzfärbung

Deckgläser wurden in 6-Well-Platten gelegt und mit Kollagen für die Kultivierung von HUVECs beschichtet (siehe Zellkultur). 1 x 10⁶ HUVECs pro Well wurden ausgesät, 24 h inkubiert und mit TEM5 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 400 µl eiskaltem Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel (1:2 in PBS verdünnt) überschichtet oder nicht behandelt. Die Zellen wurden 1 h in den Zellkultur-Inkubator gestellt, um das Matrigel polymerisieren zu lassen. Danach wurde das Matrigel mit Medium überschichtet, das Medium der unbehandelten Zellen gewechselt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Nun wurden die Zellen 10 min mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 10 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert oder nicht permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sie 1 h mit einem polyklonalen Anti-FLAG-Antikörper (1:200 in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden dreimal 5 min mit PBS gewaschen und 1 h mit einem FITC-konjugierten Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (1:200 in PBS) inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen waren, wurden die Deckgläser mit „Vectashield hard set mounting medium“ (Vector Laboratories) auf Objektträger angebracht. Transfizierte Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert.

MMP-9-Verdau

Aufgereinigte TEM5-Konstrukte wurden über Nacht bei 4 °C in „Tube-O-DIALYZER“-Röhrchen (G Biosciences) gegen MMP-9-Puffer (5 mM CaCl₂ und 0,005% Brij35 in TBS)

dialysiert. Je 0,2 mg/ml Protein in MMP-9-Puffer wurde 20 h bei 37 °C mit 10 µg/ml rekombinanter aktiver MMP-9 (Calbiochem) inkubiert. Die Verdauungen wurden in Zelladhäsionsversuchen und im Westernblot analysiert.

Zelladhäsionsversuch

96-Well-Polystyrolplatten wurden über Nacht bei 4°C mit verschiedenen Proteinen in PBS verdünnt beschichtet und 1 h bei Raumtemperatur mit PBS/BSA geblockt. Die Bindung der TEM5-Konstrukte an Polystyrol wurde mittels ELISA bestätigt (Daten nicht gezeigt). Semikonfluente bis konfluente HUVECs bzw. M21/M21L-Zellen wurden abtrypsinisiert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden 2 h bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurden die HUVECs in Endothelzell-Basalmedium (PromoCell) mit 0,1% BSA und die M21/M21L-Zellen in RPMI-Medium mit 0,1% BSA resuspendiert. HUVECs wurden aliquotiert und 30 min bei Raumtemperatur mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert oder nicht behandelt. 3×10^4 Zellen pro Well wurden ausgesät und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen, die Wells mit Medium und 0,1 Vol. AlamarBlue (Serotech) gefüllt und 3 – 16 h inkubiert. Schließlich wurden die Zellüberstände in neue 96-Well-Platten überführt und die Absorption der Wells bei 570 und 600 nm gemessen. Die Anzahl der adhärenen Zellen entsprach der Reduktion des AlamarBlues, die nach den Angaben des Herstellers berechnet wurde.

Affinitätschromatographie

Vitronektin (Promega) und TEM5-Konstrukte wurden über Nacht bei 4 °C in „Tube-O-DIALYZER“-Röhrchen (G Biosciences) gegen PBS dialysiert. Je 25 µg Protein wurde an 25 µl AminoLink Plus-Agarose (Pierce) laut Protokoll des Herstellers gekoppelt. Die gekoppelte Agarose wurde mit 0,1% BSA und 0,2% Triton X-100 in Puffer A (Bindepuffer) äquilibriert und über Nacht bei 4 °C mit 10 µg Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon, 50 µg/ml in Bindepuffer) im Rotator inkubiert. Die Agarose wurde viermal mit 10 Vol. 0,2% Triton X-100 in Puffer A gewaschen und das gebundene Integrin $\alpha_v\beta_3$ 30 min bei Raumtemperatur mit 1 Vol. 2x nicht-reduzierendem Probenpuffer eluiert. Die Eluate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Bindungsversuch

Ein polyklonaler Integrin α_v -Antikörper (Chemicon) wurde mittels Protein G Plus-Agarose (Calbiochem) laut Protokoll des Herstellers aufgereinigt. 96-Well-Polystyrolplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit dem Integrin α_v -Antikörper (10 µg/ml in PBS) beschichtet. Die Wells wurden dreimal mit 0,05% Tween 20 in Puffer A (Puffer A/Tween) gewaschen und 1 h mit 3,5 µg/ml Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon) in 0,2% Triton X-100 in Puffer A inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer A/Tween wurden die Wells 1 h mit 1% BSA in Puffer A (Puffer A/BSA) geblockt. Die Wells wurden über Nacht bei 4 °C mit Vitronektin (Promega) oder TEM5-Konstrukten in Puffer A/BSA verdünnt inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie dreimal mit Puffer A/Tween gewaschen und 1 h mit einem Vitronektin- (1:3000 in Puffer A/BSA) bzw. Peroxidase-konjugierten Anti-FLAG-Antikörper (1:10000 in Puffer A/BSA) inkubiert. Wells, die mit dem Vitronektin-Antikörper inkubiert waren, wurden dreimal mit Puffer A/Tween gewaschen und 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Maus IgG-Antikörper (1:5000) inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit Puffer A/Tween gewaschen und 30 min mit TMB-Substrat (Sigma-Aldrich) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 Vol. 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption der Wells wurde bei 450 nm gemessen und auf die Nullwerte normalisiert.

GAG-Bindungsversuch

96-Well-Polystyrolplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit 10 µg/ml Kollagen (Biochrom), Laminin (aus Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom, Sigma-Aldrich) oder Avidin (Sigma-Aldrich) in PBS verdünnt beschichtet. Die Avidin-beschichteten Wells wurden für 30 min mit 100 µg/ml Heparin-Biotin (Sigma-Aldrich) inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit PBST gewaschen, 1 h mit PBS/BSA geblockt und 1 h mit verschiedenen TEM5-Konstrukten in PBS/BSA verdünnt (100 nM) inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit PBST gewaschen und 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-FLAG-Antikörper (1:10000 in PBS/BSA) inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit PBST gewaschen und ca. 5 min mit TMB-Substrat (Sigma-Aldrich) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 Vol. 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption der Wells wurde bei 450 nm gemessen und auf Substrat mit H₂SO₄ normalisiert.

Zellüberlebensversuch

Die Platten und Zellen (HUVECs) wurden wie für den Zelladhäsionsversuch vorbereitet. 3 x 10⁴ Zellen pro Well wurden in 96-Well-Platten und 1,5 x 10⁵ Zellen pro Well in 24-Well-

Platten ausgesät. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen in den 24-Well-Platten unter dem Phasenkontrast-Mikroskop bei 320facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert. 48 h nach dem Aussäen wurden die Zellüberstände in den 96-Well-Platten mit 0,1 Vol. AlamarBlue versetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Überstände wurden in neue 96-Well-Platten überführt und die Absorption der Wells bei 570 und 600 nm gemessen. Das Zellüberleben entsprach der Reduktion des AlamarBlues, die nach den Angaben des Herstellers berechnet wurde. 48 h nach dem Aussäen wurden die Zellen in den 24-Well-Platten mit 20 µl Probenpuffer lysiert und im Westernblot analysiert.

Statistische Signifikanz

Statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student t-Tests berechnet. Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% ($p < 0,05$) wurden als signifikant gewertet.

Ergebnisse

TEM5-Expression im Tumorendothel

Bisher wurde die Expression von TEM5 im Tumorendothel nur auf RNA-Ebene durch die SAGE oder In Situ-Hybridisierung gezeigt (29, 32). Um die Expression auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Gewebeschnitte von murinen MDA-MB-435-Xenograft-Tumoren mit einem TEM5-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. TEM5-Färbungen von normalen murinen Geweben dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden die Gewebe mit einem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 gefärbt. Die Ergebnisse der Färbungen zeigten, dass TEM5 auf Proteinebene im Tumorendothel exprimiert wird und nicht in Endothelzellen normaler Gewebe detektierbar ist (Abb. 4).

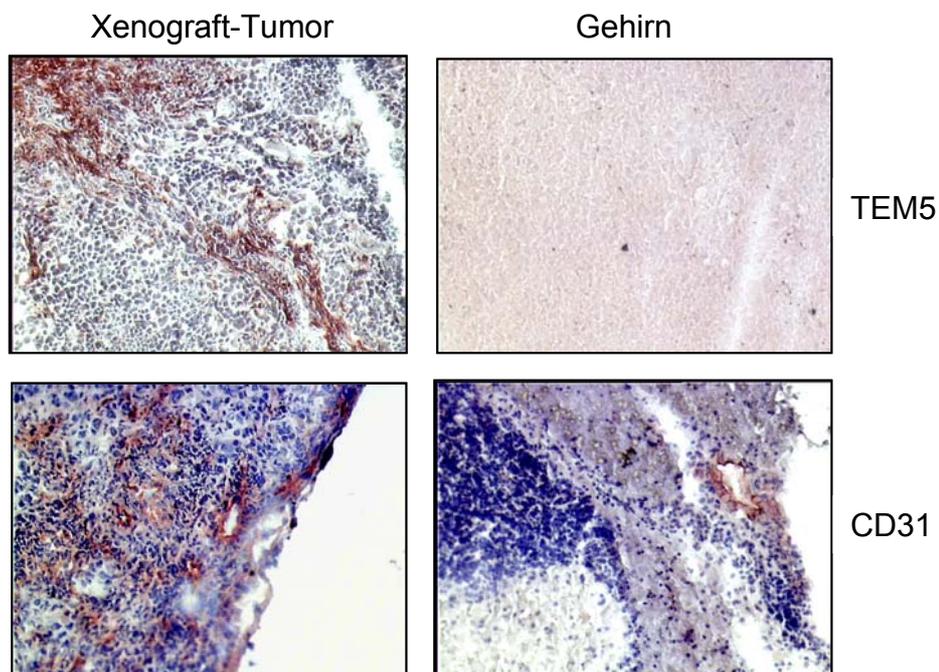


Abb. 4. TEM5-Expression in murinen Xenograft-Tumoren. MDA-MB-435-Zellen wurden subkutan in eine Nacktmaus injiziert. 5 Wochen nach der Injektion wurde die Maus geopfert, der Tumor und Kontrollorgane präpariert und Gewebeschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch mit einem TEM5- (oben) und einem CD31-Antikörper (unten) gefärbt (rot-braun). Zellkerne (blau) wurden mit Hämatoxilin gefärbt. Mikroskopische Bilder wurden bei 200facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert.

Klonierung, Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten

Um die Funktion von TEM5 zu untersuchen wurden mehrere TEM5-Expressionskonstrukte mit N- und C-terminalen Epitoptags kloniert (Abb. 5A). TEM5-Konstrukte ohne TMD wurden in HEK293-Zellen exprimiert und aus den Zellüberständen und Lysaten mittels Anti-FLAG-Agarose aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung oder Westernblot-Analyse auf Reinheit und Stabilität überprüft. Alle aufgereinigten Konstrukte waren hochgradig rein und wurden stabil exprimiert. Nur das Konstrukt ppsTEM5 wurde C-terminal geringfügig degradiert (Abb. 5B).

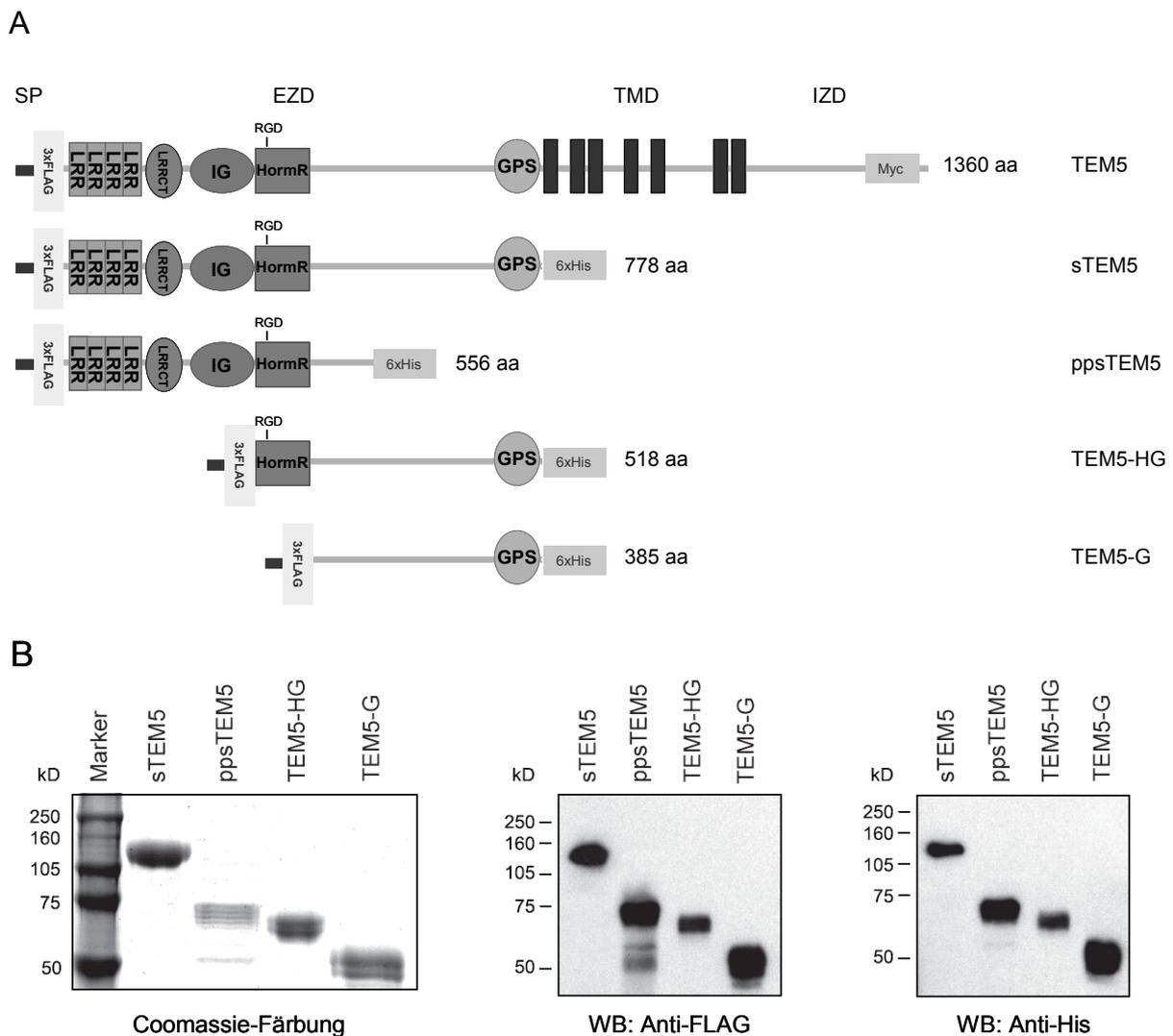


Abb. 5. Klonierung, Expression und Aufreinigung von TEM5-Expressionskonstrukten. **(A)** Struktur der TEM5-Expressionskonstrukte, die für diese Arbeit kloniert wurden. SP, Signalpeptid; EZD, extrazelluläre Domäne; TMD, Transmembrandomäne; IZD, intrazelluläre Domäne; LRR, „leucine-rich repeat“; LRRCT, LRR-C-Terminus; IG, Immunglobulindomäne; s, „soluble“; pps, „proteolytically processed soluble“; HormR/H, Hormonrezeptordomäne; GPS/G, GPCR-Proteolysestelle; aa, „amino acids“. **(B)** TEM5-Konstrukte ohne TMD wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mittels Anti-FLAG-Agarose aus den Zellüberständen oder Lysaten

aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung oder Westernblot-Analyse sichtbar gemacht.

Proteolytische Prozessierung von TEM5 an der GPS

Um die proteolytische Prozessierung von TEM5 an der GPS in Endothelzellen zu untersuchen, wurden zunächst unstimulierte HUVECs mit TEM5 transfiziert und mittels Westernblot analysiert. Vektor-transfizierte HUVECs dienten als Negativkontrolle. Die Analyse zeigte, dass Vollängen-TEM5 in der SDS-PAGE bei ~200 kD läuft und teilweise an der GPS gespalten wird, was zur Auftrennung in das lösliche N-terminale Fragment (sTEM5) von ~140 kD und das membranständige C-terminale Fragment (mTEM5) von ~60 kD führt. Die Doppelbanden bei ~200 bzw. ~140 kD repräsentieren alternative Glykosylierungsformen von TEM5 bzw. sTEM5 (Abb. 6).

Da TEM5 in unstimulierten Endothelzellen größtenteils als Vollängenprotein exprimiert wird, nahm ich an, dass die proteolytische Spaltung an seiner GPS induzierbar ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden TEM5-transfizierte HUVECs stimuliert, indem sie auf einer dreidimensionalen Matrix (Matrigel) ausgesät wurden, was zur Bildung von Kapillar-ähnlichen Netzwerken (In Vitro-Angiogenese) führte. Als Negativkontrolle wurden TEM5-transfizierte HUVECs auf einer zweidimensionalen Matrix (Kollagen) ausgesät (Abb. 7A). 1, 7 und 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen lysiert und mittels Westernblot analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die proteolytische Prozessierung an der GPS bei der In Vitro-Angiogenese auf Matrigel signifikant ansteigt, jedoch nicht in unstimulierten Zellen auf der zweidimensionalen Kollagenmatrix. Nach 24 h auf Matrigel lag mehr als die Hälfte

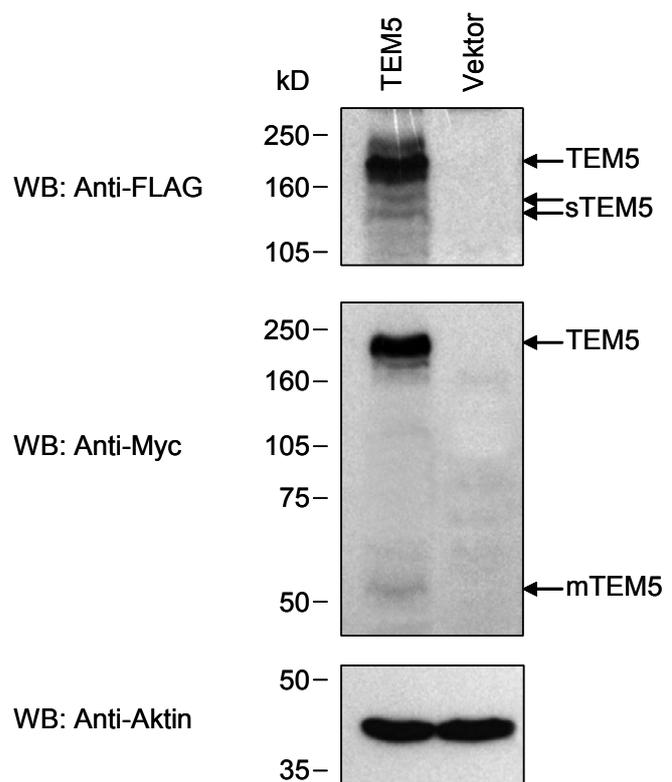


Abb. 6. Proteolytische Prozessierung von TEM5 an der GPS. HUVECs wurden mit TEM5 bzw. leerem Vektor transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen im Westernblot analysiert.

des TEM5 in prozessierter Form vor. Die Analyse der Zellüberstände ergab außerdem, dass die erhöhte Prozessierung an der GPS auch zur Sekretion von sTEM5 führte. Der Überstand von sTEM5-transfizierten HUVECs bestätigte, dass es sich bei dem sezernierten N-terminalen TEM5-Fragment tatsächlich um sTEM5 handelt (Abb. 7B).

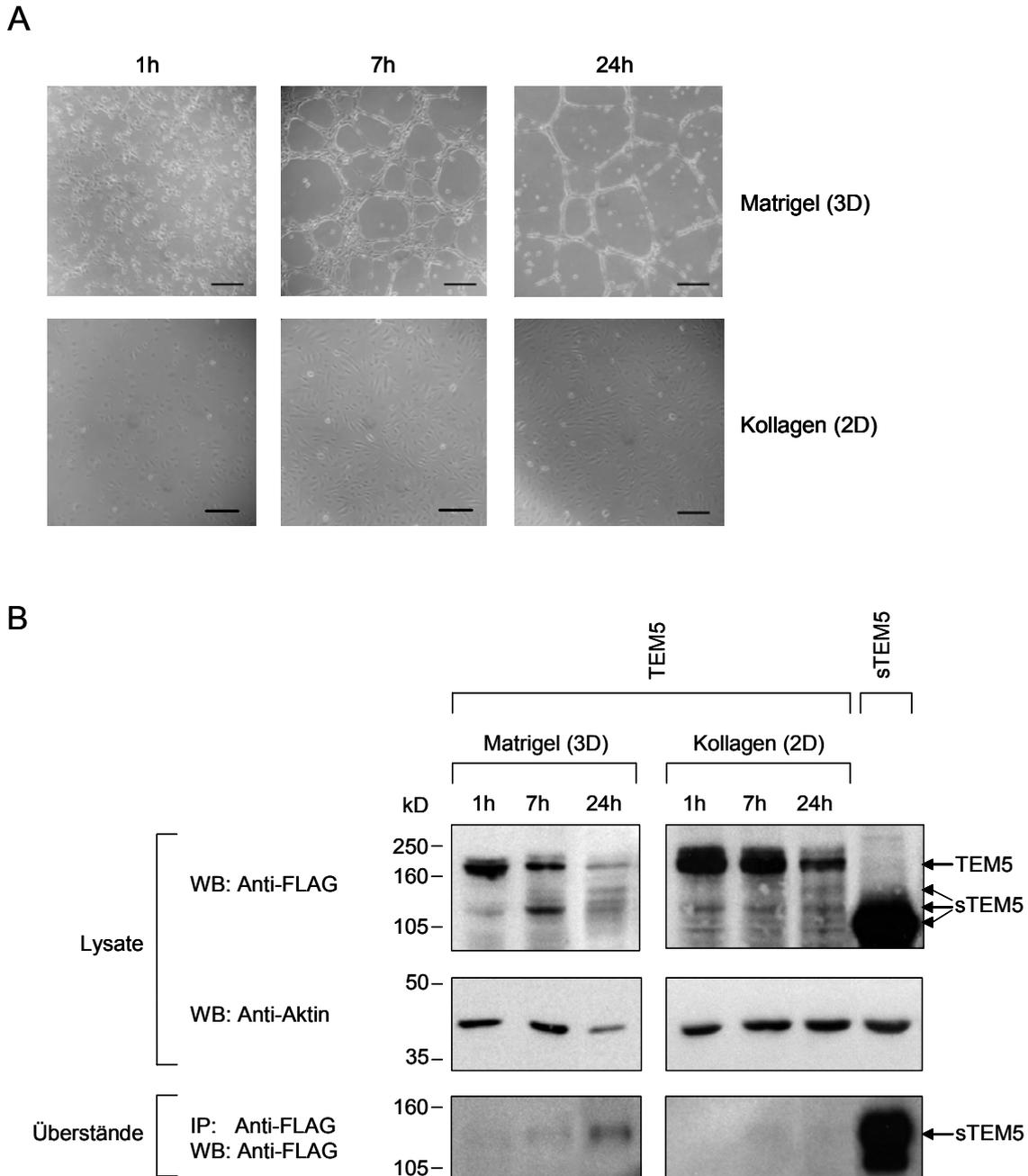


Abb. 7. Proteolytische Prozessierung von TEM5 an der GPS bei der *In Vitro*-Angiogenese. TEM5-transfizierte HUVECs wurden 24 h nach der Transfektion auf einer dreidimensionalen Matrix (Matrigel) oder auf einer zweidimensionalen Matrix (Kollagen) ausgesät. **(A)** Phasenkontrastmikroskopische Bilder bei 100facher Vergrößerung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fotografiert. Balken: 220 μ m. **(B)** Sezerniertes TEM5 wurde mit Anti-FLAG-Agarose aus den Zellüberständen präzipitiert (IP) und Zellen wurden lysiert. Lysate und IPs wurden mittels Westernblot analysiert.

Wie bereits erwähnt, ist die proteolytische Prozessierung an der GPS auch eine Voraussetzung für die Translokation von Adhäsions-GPCRs an die Zelloberfläche. Um zu überprüfen, ob sich die Lokalisierung von TEM5 genauso verhält, wurden TEM5-transfizierte HUVECs mit Matrigel zu Bildung von Kapillar-ähnlichen Netzwerken stimuliert oder nicht stimuliert und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Um intrazelluläres TEM5 von TEM5 auf der Zelloberfläche zu unterscheiden wurden permeabilisierte und nicht-permeabilisierte Zellen gefärbt. Die Ergebnisse zeigten, dass TEM5 in Matrigel-stimulierten Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird und in unstimulierten Zellen kaum auf der Oberfläche detektierbar ist, was mit der Proteolyse an der GPS korreliert. Die Färbung von unstimulierten permeabilisierten Zellen zeigte, dass in diesen Zellen der Großteil des Proteins im ER rund um den Zellkern lokalisiert ist (Abb. 8).

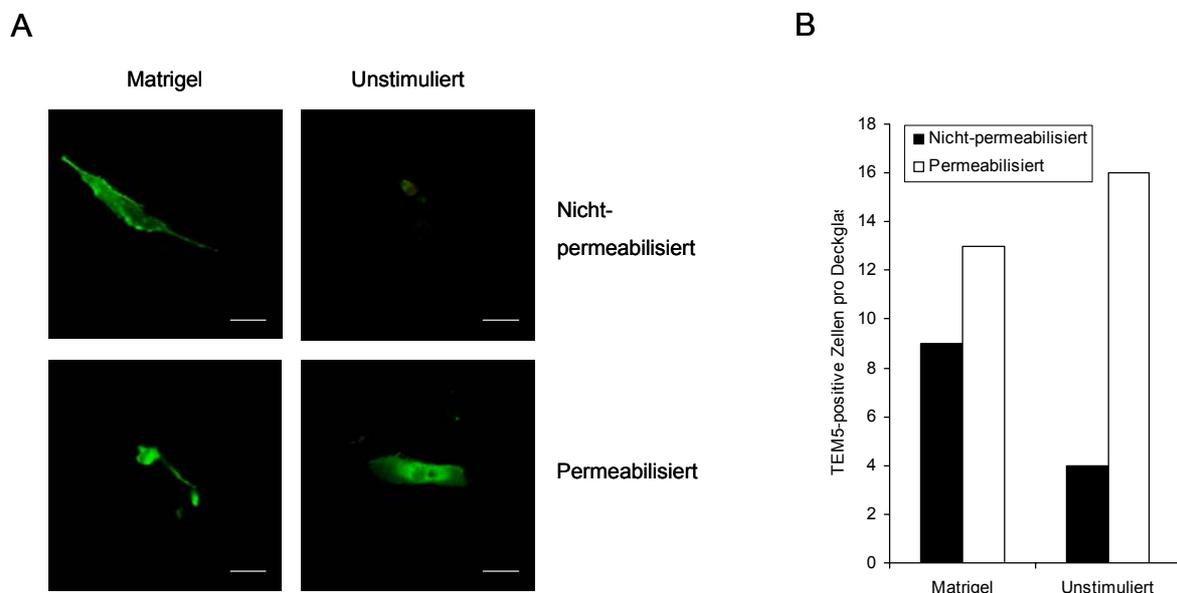


Abb. 8. Lokalisierung von TEM5 in Endothelzellen. TEM5-transfizierte HUVECs wurden 24 h nach der Transfektion mit Matrigel überschichtet oder nicht überschichtet (unstimuliert) und für weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert oder nicht permeabilisiert und mit einem Anti-FLAG-Antikörper gefolgt von einem FITC-konjugierten Anti-Kaninchen IgG-Antikörper inkubiert. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von TEM5-positiven Zellen (grün) wurden bei 400facher Vergrößerung fotografiert. Balken: 55 μ m. **(B)** TEM5-positive Zellen wurden durch Auszählen quantifiziert.

Proteolytisch prozessiertes lösliches TEM5 vermittelt Endothelzelladhäsion

Für den Adhäsions-GPCR CD97 wurde eine Interaktion mit Integrinen über sein RGD-Motiv und eine Rolle bei der Angiogenese beschrieben (14). Sequenzanalysen von TEM5 im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass seine HormR-Domäne ebenfalls ein RGD-Motiv enthält (Abb. 5). Aus diesem Grund vermutete ich, dass TEM5 mit RGD-bindenden Integrinen

interagieren könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden HUVEC-Adhäsionsversuche auf immobilisiertem sTEM5 und immobilisiertem Vitronektin als Positivkontrolle durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Interaktion von Integrinen mit ihren immobilisierten Liganden Adhäsion und Ausbreitung von Zellen vermittelt (8). Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass sTEM5 im Vergleich zu Vitronektin keine Zelladhäsion vermittelt (Abb. 9A). Auf Grund dieser Tatsache nahm ich an, dass die RGD-Bindungsstelle in TEM5, wie in anderen Proteinen, kryptisch sei und erst durch proteolytische Prozessierung zugänglich werden würde (54 - 56). Tatsächlich zeigten HUVEC-Adhäsionsversuche auf MMP-9-prozessiertem sTEM5 und TEM5-HG eine 11fach höhere Zelladhäsion als auf den unprozessierten Proteinen. Das Konstrukt TEM5-G, das kein RGD-Motiv besitzt, vermittelte keine Zelladhäsion nach MMP-9-Prozessierung (Abb. 9B).

Westernblot-Analysen der MMP-9-Verdaue zeigten, dass die Prozessierung von sTEM5 mit MMP-9 zu zwei N-terminalen Proteinfragmenten von ~80 und ~60 kD führt. Die Kodierungssequenz des 80 kD-Fragments wurde anhand seines Molekulargewichts geschätzt und kloniert („proteolytically processed soluble“ TEM5, ppsTEM5). Die Prozessierung von TEM5-HG mit MMP-9 führte zu einem N-terminalen Fragment von ca. 27 kD, welches der HormR-Domäne von TEM5 entspricht. Der MMP-9-Verdau von TEM5-G führte zu keinen detektierbaren N-terminalen Proteinfragmenten (Abb. 9C). HUVEC-Adhäsionsversuche auf immobilisiertem ppsTEM5 zeigten, dass es konstitutiv Zelladhäsion vermittelt (Abb. 9D).

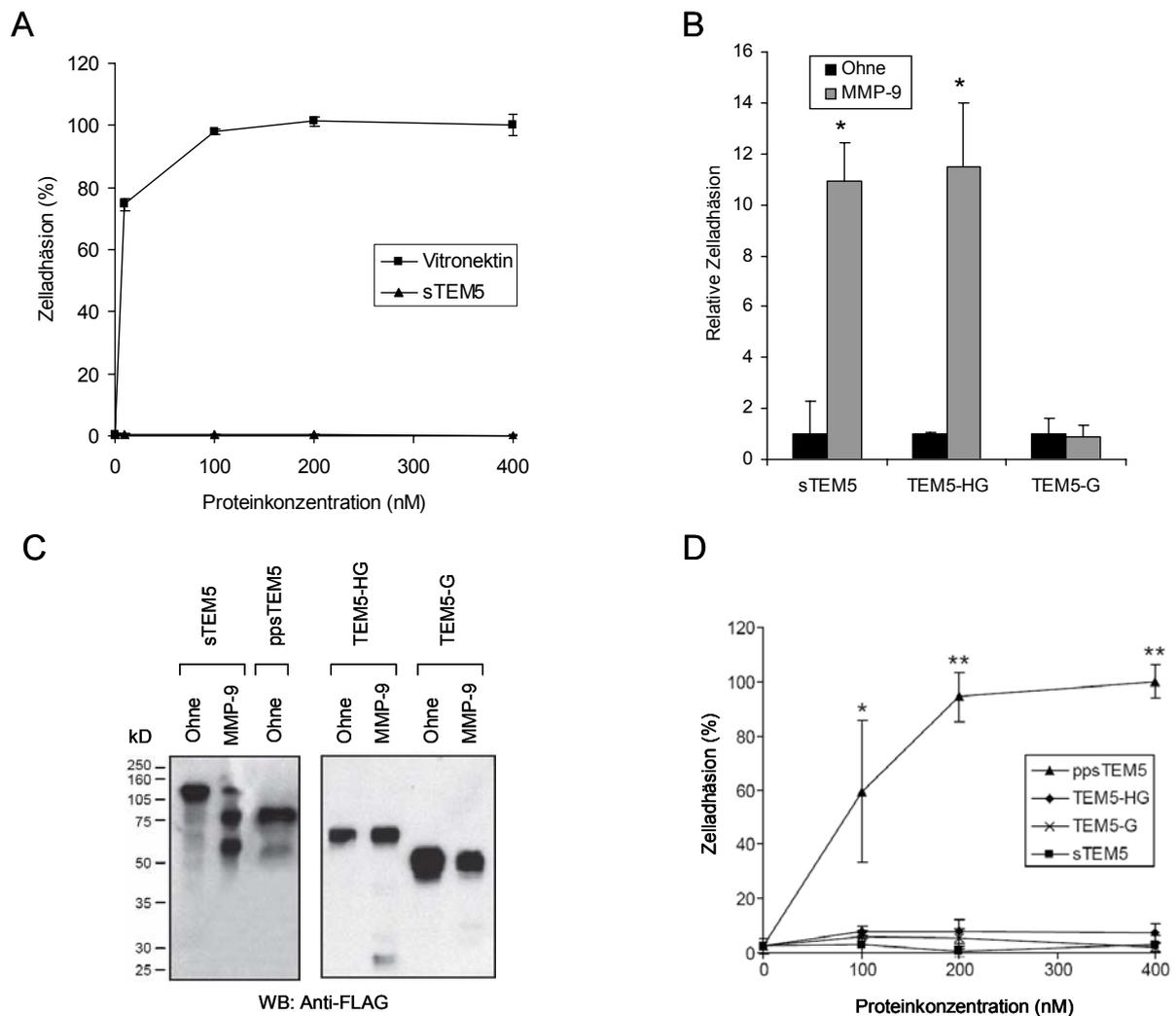


Abb. 9. Proteolytisch prozessiertes lösliches TEM5 vermittelt Endothelzelladhäsion. **(A)** HUVEC-Adhäsion an Vitronektin und sTEM5, die bei den angegebenen Konzentrationen immobilisiert wurden. **(B)** HUVEC-Adhäsion an unprozessierte (ohne) und MMP-9-prozessierte TEM5-Konstrukte, die bei 400 nM immobilisiert wurden (* $p < 0,001$ versus ohne). **(C)** Westernblot-Analyse der unprozessierten und MMP-9-prozessierten TEM5-Konstrukte. **(D)** HUVEC-Adhäsion an TEM5-Konstrukte, die bei verschiedenen Konzentrationen immobilisiert wurden (* $p < 0,05$ versus TEM5-G, ** $p < 0,001$ versus TEM5-G). Mittelwerte (Datenpunkte, breite Balken) und Standardabweichungen (schmale Balken) wurden aus Dreifachwerten berechnet.

Zelladhäsion an ppsTEM5 wird von Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt

Um herauszufinden welches RGD-bindende Integrin die Adhäsion von Zellen an ppsTEM5 vermittelte, wurden HUVECs vor dem Adhäsionsversuch mit RGD-Peptid (Bachem) oder inhibierenden Integrin-Antikörpern inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass RGD-Peptid, Integrin α_v - und Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper die Zelladhäsion vollständig inhibierten. Die Zelladhäsion wurde mit einem α_5 -Integrin-Antikörper um ca. 50% reduziert, jedoch nicht mit Antikörpern gegen α_1 -, α_2 - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine (Abb. 10A). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden Zelladhäsionsversuche mit der α_v -Integrin-exprimierenden Melanomzell-

Linie M21 und der α_v -Integrin-negativen Subzelllinie M21L durchgeführt. Im Einklang mit den Inhibitionsstudien adhärten M21-Zellen gut an ppsTEM5, wohingegen M21L-Zellen nur sehr schwach an ppsTEM5 hafteten. Die immer noch vorhandene schwache Adhäsion von M21L-Zellen an ppsTEM5 wurde wahrscheinlich von anderen RGD-bindenden Integrinen, wie z.B. Integrin $\alpha_5\beta_1$, vermittelt. Weder M21- noch M21L-Zellen adhärten an sTEM5. Die Adhäsion an Kollagen ist unabhängig von α_v -Integrinen und war bei beiden Zelllinien gleich stark (Abb. 10B).

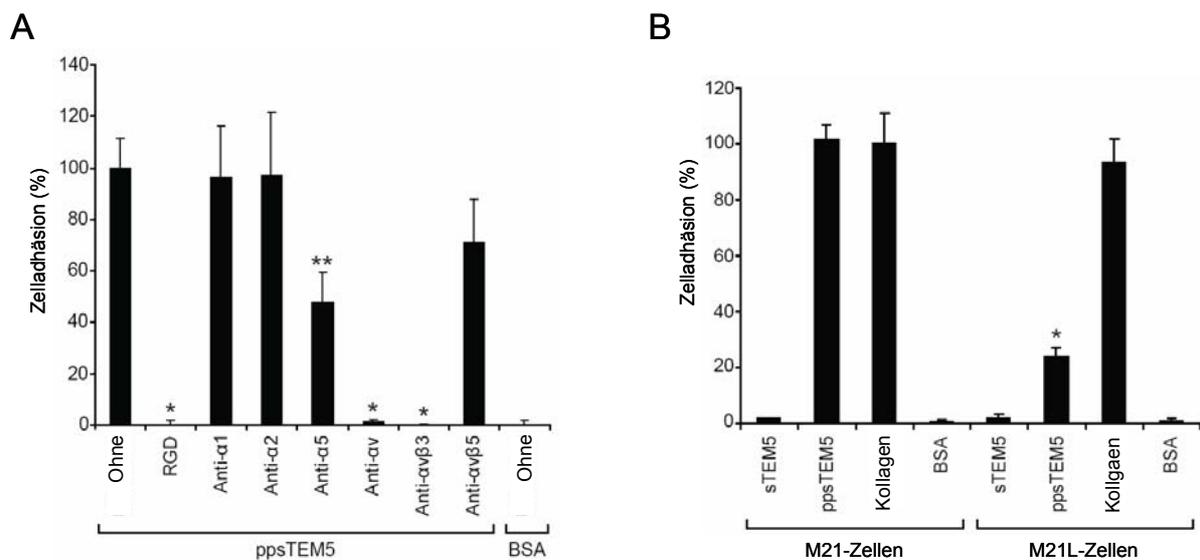


Abb. 10. Zelladhäsion an ppsTEM5 wird von Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt. **(A)** HUVEC-Adhäsion an ppsTEM5 (bei 200 nM immobilisiert). Vor dem Aussäen wurden die Zellen 30 min mit 600 μ M RGD-Peptid, 25 μ g/ml inhibierendem Integrin-Antikörper oder ohne Inhibitor inkubiert (* $p < 0,001$ versus ohne, ** $p < 0,01$ versus ohne). **(B)** Adhäsion von M21- (α_v -Integrin-positiv) und M21L-Zellen (α_v -Integrin-negativ) an ppsTEM5 und sTEM5, die bei 200 nM immobilisiert wurden, und an Kollagen, das bei 1 μ g/ml immobilisiert wurde (* $p < 0,001$ versus M21L-Zellen). Mittelwerte (breite Balken) und Standardabweichungen (schmale Balken) wurden aus Dreifachwerten berechnet.

ppsTEM5 interagiert direkt mit Integrin $\alpha_v\beta_3$

Um zu überprüfen, ob ppsTEM5 Zelladhäsion durch direkte Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt, wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Die TEM5-Konstrukte und der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Ligand Vitronektin wurden an aktivierte Agarose gekoppelt und mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Agarose wurde das gebundene Integrin eluiert. Die Ergebnisse zeigten, dass Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit Vitronektin und ppsTEM5, nicht aber mit sTEM5 und TEM5-G interagiert (Abb. 11A). Um quantitativere Ergebnisse zu erhalten, wurde ein auf ELISA basierender Bindungsversuch mit immobilisiertem Integrin $\alpha_v\beta_3$ durchgeführt. Dieser Versuch zeigte, dass ppsTEM5 mit etwas geringerer Affinität als

Vitronektin an Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet. sTEM5 interagiert nur sehr schwach, und TEM5-G, dem das RGD-Motiv fehlt, gar nicht, mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Abb. 11B).

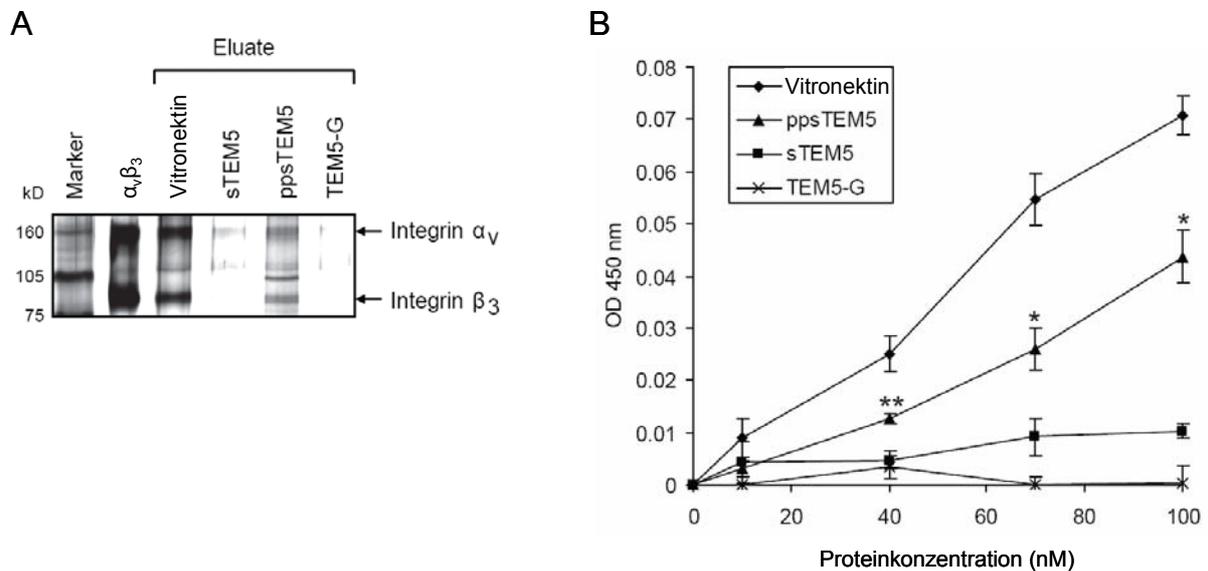


Abb. 11. Direkte Interaktion von ppsTEM5 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$. **(A)** TEM5-Konstrukte und Vitronektin wurden an aktivierte Agarose gekoppelt. Die Agarose wurde mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ inkubiert, gründlich gewaschen und gebundenes Integrin mit nicht-reduzierendem Probenpuffer eluiert. Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und das Proteingel wurde silbergefärbt. **(B)** Immobilisiertes Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde mit Vitronektin und TEM5-Konstrukten inkubiert, gründlich gewaschen und gebundene Proteine wurden mittels Anti-Vitronektin- bzw. Anti-FLAG-ELISA detektiert. Mittelwerte (Datenpunkte) und Standardabweichungen (Balken) wurden aus Dreifachwerten berechnet (* $p < 0,001$ versus TEM5-G, ** $p < 0,01$ versus TEM5-G).

TEM5 bindet an GAGs

Da die ECM-Proteine Nidogen und Kollagen als Liganden von TEM7 bzw. TEM8 identifiziert wurden, vermutete ich, dass auch TEM5 mit Bestandteilen der ECM interagieren könnte (35, 37). Aus diesem Grund wurde ein Bindungsversuch mit TEM5-Konstrukten und verschiedenen immobilisierten ECM-Molekülen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sTEM5 und ppsTEM5 nicht mit den ECM-Proteinen Kollagen und Laminin, aber mit dem GAG Heparin interagieren. TEM5-HG interagiert mit keinem der getesteten Makromoleküle (Abb. 12A). Um festzustellen, ob TEM5 auch mit anderen GAGs interagiert, wurde die Bindung von sTEM5 an Heparin mit anderen GAGs kompetitiv inhibiert. Aus den Ergebnissen lässt sich die folgende relative Affinität für die getesteten GAGs ableiten: Heparin > Chondroitinsulfat = Dermatanulfat > Heparansulfat. Die Anwesenheit von EDTA bzw. 1 M NaCl zeigte außerdem, dass die Interaktion von TEM5 mit GAGs nicht abhängig von bivalenten Kationen, aber von der Ionenstärke der Umgebung ist (Abb. 12B). Die Proteinsequenzen BBXB und BBBXB (B = basische Aminosäure, X = irgendeine

Aminosäure) wurden als Konsensussequenzen für GAG-Bindungsstellen beschrieben (64). Sequenzanalysen von TEM5 haben zwar keine exakte Übereinstimmung mit einer dieser Konsensussequenzen ergeben, aber eine ähnliche, sehr basische Sequenz am N-Terminus von TEM5 (Position 43 – 66: **RSCKCSGERPKGLSGGVPGPARRR**, basische Aminosäuren hervorgehoben).

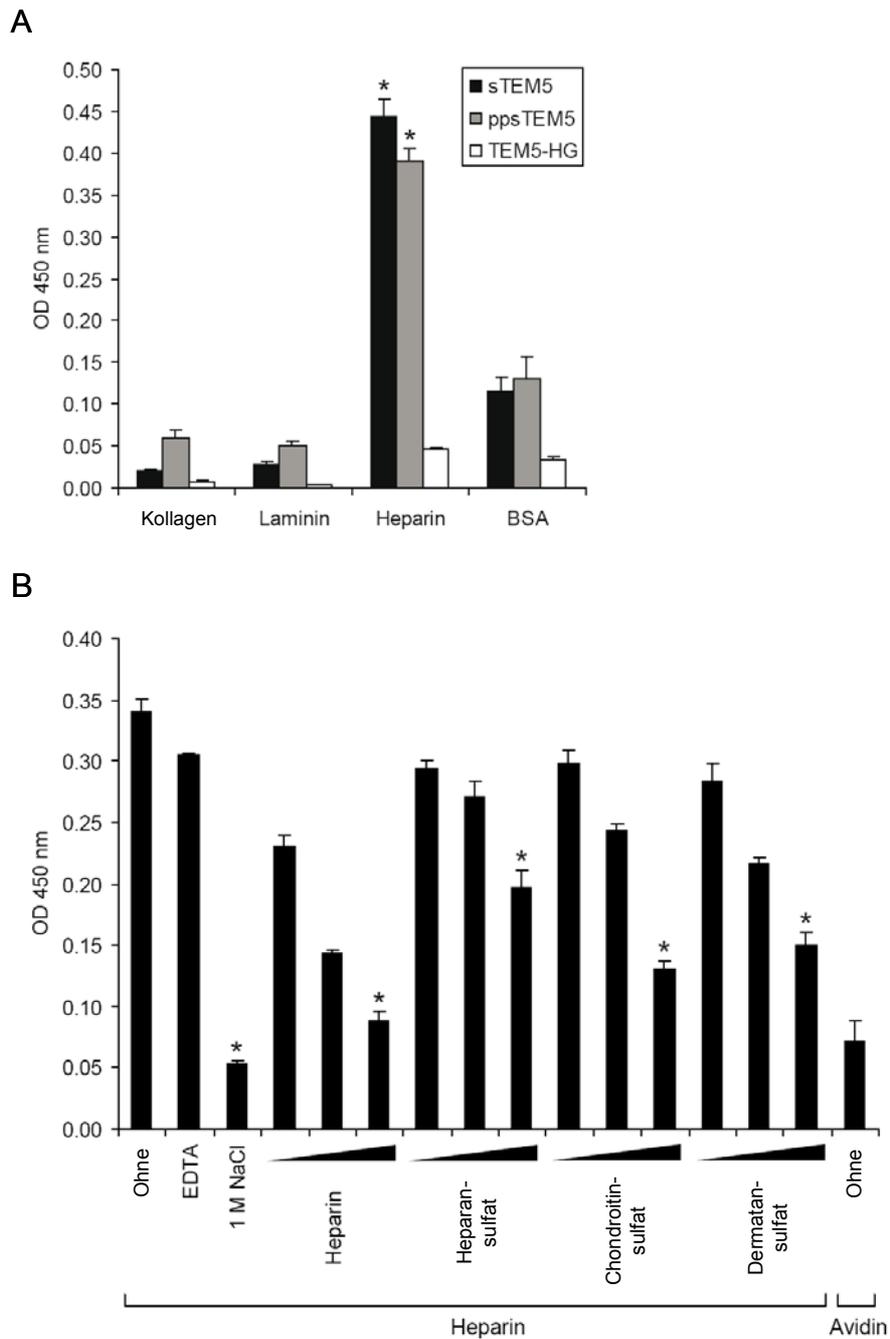


Abb. 12. TEM5 bindet an GAGs. (A) Kollagen, Laminin und Avidin wurden bei 10 µg/ml immobilisiert. Das immobilisierte Avidin wurde 30 min mit 100 µg/ml Heparin-Biotin inkubiert. Die immobilisierten Makromoleküle wurden 1 h mit TEM5-Konstrukten (100 nM) inkubiert und die gebundenen Proteine mittels Anti-

FLAG-ELISA detektiert (*p < 0,001 versus BSA). **(B)** Avidin und Heparin-Biotin wurden wie bei (A) immobilisiert und 1 h mit sTEM5 (100 nM) und dem jeweiligen Inhibitor inkubiert. Die EDTA-Konzentration war 1 mM. Die Heparin-, Heparansulfat-, Chondroitinsulfat A- und Dermatansulfat-Konzentrationen waren 1, 10 und 100 µg/ml. Gebundenes sTEM5 wurde mittels Anti-FLAG-ELISA detektiert (*p < 0,001 versus ohne). Mittelwerte (breite Balken) und Standardabweichungen (schmale Balken) wurden aus Dreifachwerten berechnet.

ppsTEM5 vermittelt Überleben von Endothelzellen

Da bei der In Vitro-Angiogenese lösliches TEM5 von Endothelzellen sezerniert wird und nach proteolytischer Prozessierung mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ interagiert, wäre es möglich, dass TEM5 eine Rolle beim Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese spielt. Um diese Hypothese zu testen, wurden HUVEC-Überlebensversuche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 48 h in Abwesenheit von Serum und Wachstumsfaktoren auf immobilisierten TEM5-Konstrukten oder Vitronektin inkubiert. Danach wurden die überlebenden Zellen mittels AlamarBlue quantifiziert und die Apoptose in einem Caspase-3-Westernblot semiquantitativ bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass ppsTEM5 und Vitronektin Zellüberleben vermitteln, sTEM5 und BSA hingegen nicht. Die Anwesenheit eines inhibierenden Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpers reduzierte das Zellüberleben auf ppsTEM5 signifikant. Lösliches Heparin hatte keinen Einfluss auf das ppsTEM5-vermittelte Zellüberleben (Abb. 13A und B). Die proteolytische Aktivierung von Procaspasen spielt eine zentrale Rolle in der Apoptose (57). Westernblot-Analysen der Zellen zeigten, dass die Proteolyse der Procaspase-3 auf Vitronektin und ppsTEM5 inhibiert wurde, was die Apoptose verhinderte (Abb. 13C).

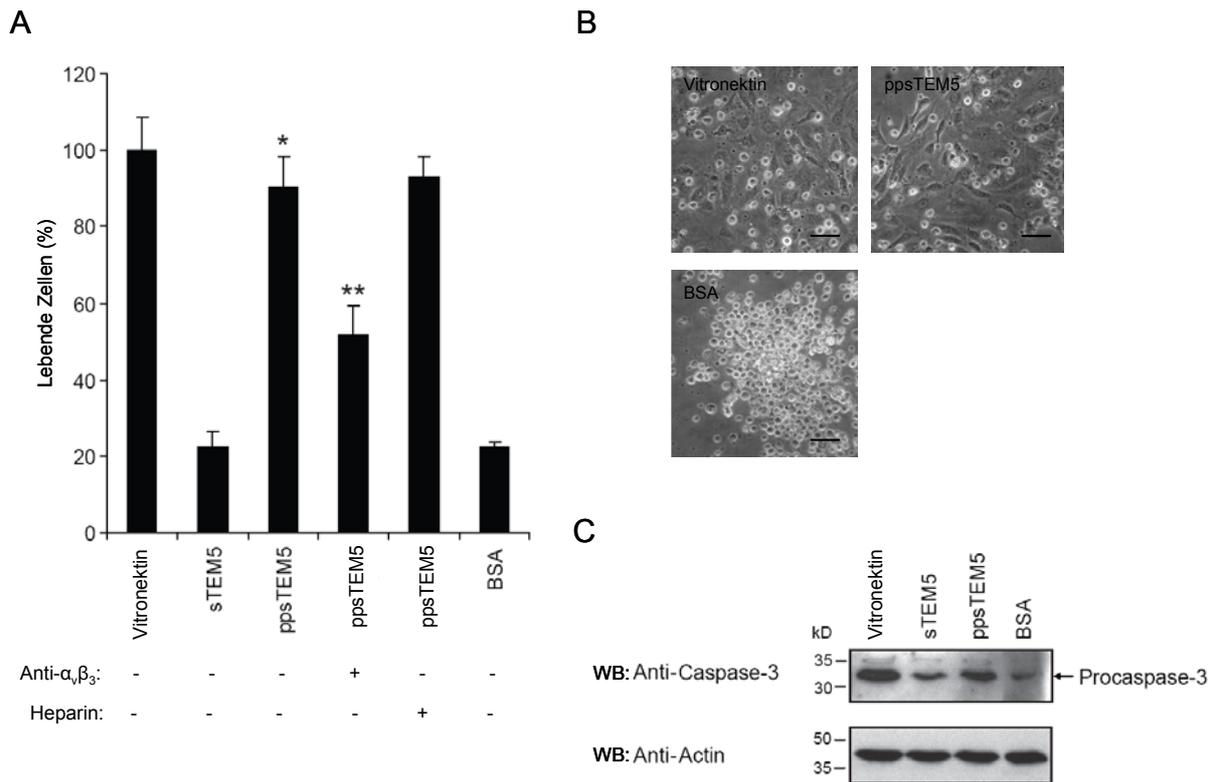


Abb. 13. *ppsTEM5* vermittelt Überleben von Endothelzellen. HUVEC-Überlebensversuche auf Vitronektin und TEM5-Konstrukten (bei 100 nM immobilisiert). Die Zellen wurden mit einem inhibierenden Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper (25 $\mu\text{g/ml}$), Heparin (100 $\mu\text{g/ml}$) oder ohne Inhibitor in Abwesenheit von Serum und Wachstumsfaktoren ausgesät. **(A)** 48 h nach dem Aussäen wurden die lebenden Zellen mittels AlamarBlue quantifiziert. Mittelwerte (breite Balken) und Standardabweichungen (schmale Balken) wurden aus Dreifachwerten berechnet (* $p < 0,001$ versus BSA, ** $p < 0,01$ versus ppsTEM5). **(B)** 24 h nach dem Aussäen wurden phasenkontrastmikroskopische Bilder bei 320facher Vergrößerung fotografiert. Balken: 55 μm . **(C)** Westernblot-Analyse der Zellen 48 h nach dem Aussäen.

Diskussion

TEM5 wurde vor einigen Jahren als eines von neun bisher unbekannt Genen (TEM1 - 9), die im Tumorendothel verstärkt exprimiert werden, identifiziert (29). Weitere Studien haben ergeben, dass TEMs auch bei der physiologischen Angiogenese (Embryogenese, Wundheilung, weiblicher Fortpflanzungszyklus) in Endothelzellen exprimiert werden (32). Aufgrund seiner Sequenzhomologie gehört TEM5 zur Gruppe III der Adhäsions-GPCRs (41). In dieser Arbeit wurde die Rolle von TEM5 während der Angiogenese untersucht.

Bisher wurde die Expression von TEM5 in Endothelzellen während der Tumorangioese nur auf RNA-Ebene durch die SAGE oder In Situ-Hybridisierung gezeigt (29, 32). Um die Expression auf Proteinebene nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen eines murinen Xenograft-Tumors durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass das TEM5-Protein im Tumorendothel, aber nicht im Endothel von Kontrollorganen, exprimiert wird. Da lösliches TEM5 (sTEM5) während der Angiogenese von Endothelzellen freigesetzt wird und der verwendete Antikörper gegen sTEM5 gerichtet war, ist es wahrscheinlich, dass das Signal sowohl membranständiges TEM5 als auch sTEM5 darstellt.

Wie fast alle Adhäsions-GPCRs besitzt TEM5 eine membranproximale GPS (41). Westernblot-Analysen haben gezeigt, dass die proteolytische Prozessierung von TEM5 an der GPS in unstimulierten Endothelzellen nur sehr schwach abläuft, während der In Vitro-Angiogenese jedoch verstärkt wird. Die Proteolyse an der GPS führte einerseits zur Sekretion von sTEM5 und andererseits zur Translokation der nicht-kovalent verbundenen TEM5-Fragmente sTEM5 und mTEM5 an die Zelloberfläche. Diese Prozessierung scheint, neben der Regulation der TEM5-Expression, ein weiterer Regulationsmechanismus von TEM5 zu sein. Bisher wurde noch keine Protease identifiziert, die für die Proteolyse an der GPS verantwortlich ist. Für EMR2 wurde jedoch gezeigt, dass die proteolytische Prozessierung an der GPS autokatalytisch abläuft (47). Auch wenn eine Autoproteolyse der TEM5-GPS auf den ersten Blick unwahrscheinlich erscheint, da die Proteolyse der TEM5-GPS hochgradig reguliert ist, wäre sie bei genauerer Betrachtung durchaus möglich. Bei der Studie mit EMR2 wurde gezeigt, dass die korrekte Faltung des Proteins eine Voraussetzung für die autokatalytische Proteolyse der GPS ist. Es ist bekannt, dass posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung und Hydroxylierung, sowie Chaperone die Faltung von Proteinen erheblich beeinflussen können. Diese Modifikationen und Chaperone sind ihrerseits auch reguliert, was eine Regulation der Autoproteolyse der GPS zur Folge haben könnte.

Sequenzanalysen von TEM5 haben ergeben, dass seine HormR-Domäne ein RGD-Motiv enthält, das eine Bindungsstelle für bestimmte Integrine darstellt. Da Endothelzellen jedoch nicht an immobilisiertes sTEM5 adhärten, vermutete ich, dass sein RGD-Motiv, wie bei anderen Proteinen, kryptisch ist (54 – 56). Es ist bekannt, dass proteolytische Prozessierung mit MMPs oder anderen Proteasen zur Freilegung dieser kryptischen RGD-Bindungsstellen führen kann (54 - 56). Eine von mehreren Proteasen, die in Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert werden, ist MMP-9 (58). Tatsächlich adhärten Endothelzellen an MMP-9-prozessiertes immobilisiertes sTEM5 (ppsTEM5). Die Tatsache, dass MMP-9-verdautes TEM5-HG ebenfalls Zelladhäsion vermittelte, weist darauf hin, dass die N-terminale LRR- bzw. IG-Domäne nicht an der Interaktion mit Integrinen beteiligt ist. Ob MMP-9 auch *in vivo* für die proteolytische Prozessierung von sTEM5 verantwortlich ist, bleibt allerdings unklar. sTEM5, jedoch nicht ppsTEM5, war in den Überständen von TEM5-transfizierten Endothelzellen, die zu Kapillar-ähnlichen Netzwerken differenzierten, detektierbar. Da bei der *In Vitro*-Angiogenese nur Endothelzellen zur Bildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen stimuliert werden, ist es möglich, dass andere Zelltypen bei der Angiogenese *in vivo* Proteasen sezernieren oder auf ihrer Zellmembran exprimieren, die für die Prozessierung von sTEM5 verantwortlich sind. Mögliche Kandidaten wären Monozyten/Makrophagen, von denen bekannt ist, dass sie bei der Angiogenese eine Rolle spielen und wesentlich mehr Proteasen exprimieren und sezernieren als Endothelzellen (63). Eine andere Erklärung für die Abwesenheit von ppsTEM5 in Überständen von Endothelzellen bei der *In Vitro*-Angiogenese wäre das Fehlen bestimmter Stimuli (Wachstumsfaktoren oder Zytokine), die zur verstärkten Expression von Proteasen führen, die in der Lage sind sTEM5 zu ppsTEM5 zu prozessieren.

Inhibitionsexperimente zeigten, dass die Adhäsion von Endothelzellen an ppsTEM5 von Integrin $\alpha_v\beta_3$ und in geringerem Ausmaß von Integrin $\alpha_5\beta_1$ vermittelt wird. Interessanterweise war die Zelladhäsion an ppsTEM5 nicht durch einen inhibierenden Integrin $\alpha_v\beta_5$ -Antikörper hemmbar. Andere Integrinliganden, wie etwa Vitronektin, binden sowohl an Integrin $\alpha_v\beta_3$ also auch an Integrin $\alpha_v\beta_5$. Mittels Affinitätschromatographie und Bindungsstudien in zellfreien Systemen wurde eine direkte Interaktion von ppsTEM5 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ nachgewiesen. Eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt auch MMP-2 (59). Es wurde beschrieben, dass die Assoziation von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit MMP-2 auf der Zelloberfläche essentiell für die Angiogenese ist (60). Es wäre möglich, dass diese Kollokalisierung auch eine konzertierte Prozessierung und Interaktion mit sTEM5 vermittelt.

Da andere TEMs mit Bestandteilen der ECM interagieren, nahm ich an, dass auch TEM5 an ECM-Moleküle bindet (35, 37). Bindungsstudien zeigten, dass sTEM5 und ppsTEM5 mit den GAGs Heparin, Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat interagieren. Das Konstrukt TEM5-HG interagiert nicht mit GAGs, was zeigt, dass die N-terminale LRR- oder IG-Domäne oder beide diese Interaktion vermitteln. Sequenzanalysen haben ergeben, dass der N-Terminus von TEM5 eine sehr basische Sequenz enthält, die Ähnlichkeiten mit den Konsensussequenzen von bekannten GAG-Bindungsstellen hat. Möglicherweise ist der basische N-Terminus von TEM5 verantwortlich für die Interaktion mit den negativ geladenen GAGs. Da sTEM5 an GAGs bindet, wäre es möglich, dass TEM5 auf der Zelloberfläche, bestehend aus sTEM5 und mTEM5, als Rezeptor für GAGs fungiert. Über die sTEM5-Untereinheit könnten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte hergestellt und über die mTEM5-Untereinheit Signale ins Zellinnere weitergeleitet werden. Die Bindung von ppsTEM5 an GAGs spielt eine wichtige Rolle für seine Funktion, da lösliche Liganden von Integrin $\alpha_v\beta_3$ andere Signalwege als immobilisierte Liganden aktivieren (61, 62).

Da bei der In Vitro-Angiogenese sTEM5 von Endothelzellen sezerniert wurde und nach proteolytischer Prozessierung (ppsTEM5) mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ interagiert, kam ich zu der Überlegung, dass ppsTEM5 eine Rolle beim Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese spielen könnte. Endothelzell-Überlebensversuche zeigten, dass Vitronektin und ppsTEM5 in gleichem Ausmaß Zellüberleben vermitteln. Das ppsTEM5-vermittelte Überleben konnte signifikant durch einen inhibierenden Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper reduziert werden, aber nicht durch einen Überschuss an Heparin. Diese Inhibitionsversuche zeigten, dass ppsTEM5 Zellüberleben durch die Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$, nicht aber durch die Interaktion mit Zelloberflächen-GAGs, vermittelt.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten habe ich das folgende Modell für die Funktion von löslichem TEM5 entwickelt: Während der Angiogenese wird sowohl die Expression von TEM5 (29, 32) als auch seine proteolytische Prozessierung an der GPS in Endothelzellen angeschaltet. Dies führt zur Freisetzung von sTEM5, das zunächst an GAGs bindet, die ubiquitär auf der Oberfläche von Zellen und in der ECM vorkommen. Das gebundene sTEM5 wird von Proteasen wie MMP-9 weiter proteolytisch prozessiert (ppsTEM5), was zur Freilegung seines RGD-Motivs führt, an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden kann. Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird während der Angiogenese in Endothelzellen verstärkt exprimiert (12). Die Interaktion von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit ppsTEM5 führt zu einer Signaltransduktion, die zum Überleben der Endothelzellen beiträgt (Abb. 14).

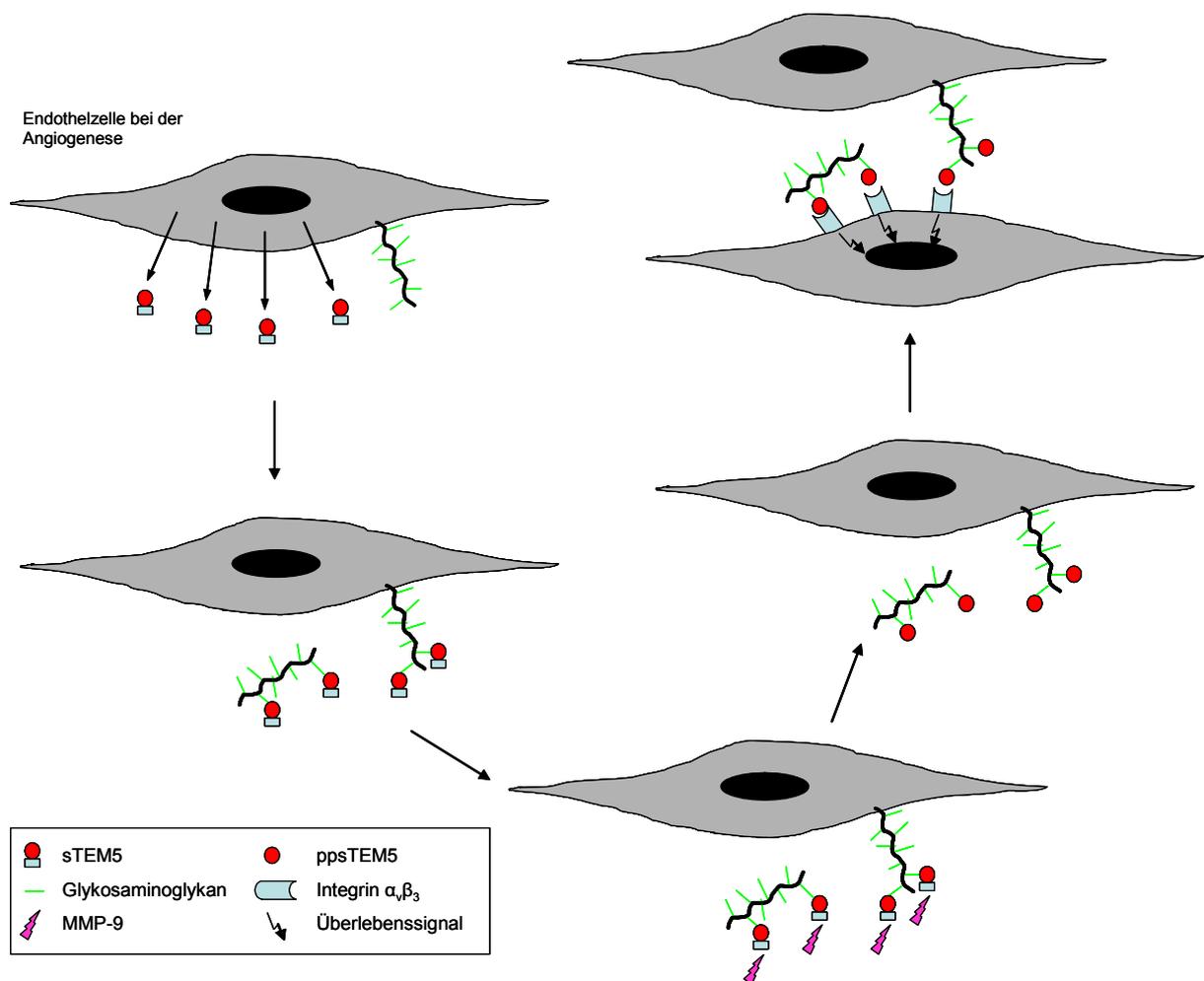


Abb. 14. Modell der Funktion von löslichem TEM5 bei der Angiogenese.

Eine wichtige offene Frage in Bezug auf TEM5 ist, welche Stimuli zu seiner verstärkten Expression während der Angiogenese führen und in welcher Phase der Angiogenese es dazu kommt. Für TEM8 wurde gezeigt, dass es bei der In Vitro-Angiogenese und durch Stimulierung mit IL-1 β in Endothelzellen verstärkt exprimiert wird (38, 39). Möglicherweise wird die Expression von TEM5 auf ähnliche Weise reguliert. Bei der In Vitro-Angiogenese kommt es zur Bildung von Kapillar-ähnlichen Netzwerken, was einer späten Phase der Angiogenese in vivo entspricht. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen sezerniert, die auch eine Rolle bei der Angiogenese spielen, aber die Zuordnung zu einer bestimmten Phase in der Angiogenese ist schwierig (63). In dieser Arbeit wird zum ersten Mal berichtet, dass die proteolytische Spaltung an der GPS in einem Adhäsions-GPCR induzierbar ist. Weitere Studien zur Regulation dieser Proteolyse würden nicht nur Aufschluss über die Funktion von TEM5, sondern vielleicht auch anderen Adhäsions-GPCRs geben. Weitere Untersuchungen wären ebenfalls notwendig, um die

Proteasen zu identifizieren, die in vivo die Konvertierung von sTEM5 zu ppsTEM5 bewirken. Da ppsTEM5 ein neuer Ligand von Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist, könnte man es möglicherweise auch als molekularen „Tracer“ für die Diagnostik und Therapie von Tumoren einsetzen. Biodistributionen von ppsTEM5 in Tumor-tragenden Mäusen wären eine Möglichkeit, um dieses Potential zu untersuchen. In dieser Arbeit konnten nicht alle Fragen in Bezug auf die Funktion, Regulation und Bindungspartner von TEM5 beantwortet werden, aber sie trägt sicherlich dazu bei seine Rolle bei der Angiogenese besser zu verstehen.

Zusammenfassung

Tumorendothelmarker (TEM) 5 gehört zu den Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird in Endothelzellen während der physiologischen Angiogenese und Tumorangiogenese exprimiert. Bisher wurden noch kein Ligand und keine Funktion von TEM5 beschrieben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TEM5 in Endothelzellen während der In Vitro-Angiogenese intrazellulär an einer konservierten Proteolysestelle (GPS) gespalten wird. Diese Proteolyse führte einerseits zur Translokation der nicht-kovalent verbundenen TEM5-Fragmente an die Zelloberfläche und andererseits zur Freisetzung von löslichem TEM5 (sTEM5). Bindungsstudien haben ergeben, dass sTEM5 mit verschiedenen Glykosaminoglykanen interagiert. Sequenzanalysen und funktionelle und biochemische Studien haben gezeigt, dass sTEM5 eine kryptische RGD-Bindungsstelle für Integrin $\alpha_v\beta_3$ enthält. Matrixmetalloprotease 9-prozessiertes, jedoch nicht unprozessiertes, sTEM5 vermittelte Endothelzelladhäsion durch direkte Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$. Die Interaktion von immobilisiertem proteolytisch prozessierten sTEM5 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelte Überleben von Wachstumsfaktor-deprivierten Endothelzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Schlußfolgerung, dass sTEM5 während der Angiogenese von Endothelzellen freigesetzt wird und an Glykosaminoglykane in der extrazellulären Matrix und auf der Oberfläche von Zellen bindet. Proteolytische Prozessierung von sTEM5 führt zur Freilegung seines RGD-Motivs und vermittelt Überleben von Endothelzellen durch die Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$.

Literaturverzeichnis

1. P. Carmeliet and R. K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257 (2000)
2. P. Carmeliet. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.* 9:653-660 (2000)
3. G. Bergers and L. E. Benjamin. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3:401-410 (2003)
4. I. Segura, A. Serrano, G. González de Buitrago, M. A. González, J. L. Abad, C. Clavería, L. Gómez, A. Bernad, C. Martínez-A, and H. H. Riese. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB J.* 16:833–841 (2002)
5. M. J. Pollman, L. Naumovski, and G. H. Gibbons. Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J. Cell. Physiol.* 178:359-370 (1999)
6. E. Dejana, M. Corada, and M. G. Lampugnani. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9:910-918 (1995)
7. D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, A. G. Beck-Sickinger, und U. Hahn. *Lehrbuch der Biochemie.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland (2002)
8. R. O. Hynes. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554 (1987)
9. N. J. Boudreau and P. L. Jones. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem. J.* 339:481-488 (1999)
10. R. O. Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling molecules. *Cell* 110:673-687 (2002)
11. D. G. Stupack, X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, and D. A. Cheresh. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell. Biol.* 155:459-470 (2001)
12. P. C. Brooks, R. A. Clark, and D. A. Cheresh. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264:569-571 (1994)
13. B. P. Eliceiri, and D. A. Cheresh. Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J.* 6:245-249 (2000)
14. T. Wang, Y. Ward, L. Tian, R. Lake, L. Guedez, W. G. Stetler-Stevenson, and K. Kelly. CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. *Blood* 105:2836-2844 (2005)
15. T. V. Byzova, and E. F. Plow. Activation of integrin alphavbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J. Cell. Biol.* 143:2081-2092 (1998)

16. P. C. Brooks, S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley, and D. A. Cheresh. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85:683-693 (1996)
17. N. Reinmuth, W. Liu, S. A. Ahmad, F. Fan, O. Stoeltzing, A. A. Parikh, C. D. Bucana, G. E. Gallick, M. A. Nickols, W. F. Westlin, and L. M. Ellis. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res.* 63:2079-2087 (2003)
18. J. F. Harms, D. R. Welch, R. S. Samant, L. A. Shevde, M. E. Miele, G. R. Babu, F. F. Goldberg, V. R. Gilman, D. M. Sosnowski, D. A. Campo, C. V. Gay, L. R. Budgeon, R. Mercer, J. Jewell, A. M. Mastro, H. J. Donahue, N. Erin, M. T. Debies, W. J. Meehan, A. L. Jones, G. Mbalaviele, A. Nickols, N. D. Christensen, R. Melly, L. N. Beck, J. Kent, R. K. Rader, J. J. Kotyk, M. D. Pagel, W. F. Westlin, and D. W. Griggs. A small molecule antagonist of the alpha(v)beta3 integrin suppresses MDA-MB-435 skeletal metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 21:119-128 (2004)
19. C. C. Kumar. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr. Drug Targets* 4:123-131 (2003)
20. R. O. Hynes. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature Med.* 8:918-921 (2002)
21. D. A. Cheresh, and D. G. Stupack. Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype? *Nature Med.* 8:193-194 (2002)
22. N. Oku, T. Asai, K. Watanabe, K. Kuromi, M. Nagatsuka, K. Kurohane, H. Kikkawa, K. Ogino, M. Tanaka, D. Ishikawa, H. Tsukada, M. Momose, J. Nakayama, and T. Taki. Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 21:2662-2669 (2002)
23. K. Porkka, P. Laakkonen, J. A. Hoffman, M. Bernasconi, and E. Ruoslahti. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:7444-7449 (2002)
24. S. Christian, J. Pilch, M. E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen, and E. Ruoslahti. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell. Biol.* 163:871-878 (2003)
25. S. Bohman, T. Matsumoto, K. Suh, A. Dimberg, L. Jakobsson, S. Yuspa, and L. Claesson-Welsh. Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell

- differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 280:42397-42404 (2005)
26. S. E. Bell, A. Mavila, R. Salazar, K. J. Bayless, S. Kanagala, S. A. Maxwell, and G. E. Davis. Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *J. Cell Sci.* 114:2755-2773 (2001)
 27. F. Prols, B. Loser, and M. Marx. Differential expression of osteopontin, PC4, and CEC5, a novel mRNA species, during in vitro angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 239:1-10 (1998)
 28. J. Kahn, F. Mehraban, G. Ingle, X. Xin, J. E. Bryant, G. Vehar, J. Schoenfeld, C. J. Grimaldi, F. Peale, A. Draksharapu, D. A. Lewin, and M. E. Gerritsen. Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 156:1887-1900 (2000)
 29. B. St. Croix, C. Rago, V. Velculescu, G. Traverso, K. E. Romans, E. Montgomery, A. Lal, G. J. Riggins, C. Lengauer, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. Genes expressed in tumor endothelium. *Science* 289:1197-1202 (2000)
 30. P. Laakkonen, M. E. Akerman, H. Biliran, M. Yang, F. Ferrer, T. Karpanen, R. M. Hoffman, and E. Ruoslahti. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:9381-9386 (2004)
 31. I. Ohizumi, S. Tsunoda, K. Taniguchi, H. Saito, K. Esaki, H. Makimoto, Y. Wakai, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, N. Utoguchi, S. Kaiho, Y. Ohsugi, and T. Mayumi. Antibody-based therapy targeting tumor vasculature endothelial cells suppresses solid tumor growth in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236:493-496 (1997)
 32. E. B. Carson-Walter, D. N. Watkins, A. Nanda, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and B. St. Croix. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res.* 61:6649-6655 (2001)
 33. S. Christian, H. Ahorn, A. Koehler, F. Eisenhaber, H. Rodi, P. Garin-Chesa, J. E. Park, W. J. Rettig, and M. C. Lenter. Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium. *J. Biol. Chem.* 276:7408-7414 (2001)
 34. A. Nanda, P. Buckhaults, S. Seaman, N. Agrawal, P. Boutin, S. Shankara, M. Nacht, B. Teicher, J. Stampfl, S. Singh, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and B. St. Croix. Identification of a binding partner for the endothelial cell surface proteins TEM7 and TEM7R. *Cancer Res.* 64:8507-8511 (2004)

35. H. K. Lee, I. A. Seo, H. K. Park, and H. T. Park. Identification of the basement membrane protein nidogen as a candidate ligand for tumor endothelial marker 7 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 580:2253-2257 (2006)
36. K. A. Bradley, J. Mogridge, M. Mourez, R. J. Collier, and J. A. Young. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414:225-229 (2001)
37. A. Nanda, E. B. Carson-Walter, S. Seaman, T. D. Barber, J. Stampfl, S. Singh, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and B. St. Croix. TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen $\alpha 3$ (VI). *Cancer Res.* 64:817-820 (2004)
38. K. A. Hotchkiss, C. M. Basile, S. C. Spring, G. Bonucci, M. P. Lisanti, and B. I. Terman. TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp. Cell Res.* 305:133-144 (2005)
39. K. A. Rmali, M. A. Al-Rawi, C. Parr, M. C. Puntis, and W. G. Jiang. Up regulation of tumour endothelial marker-8 (TEM-8) by interleukin-1 β and its impact in IL-1 β induced angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 14:75-80 (2004)
40. K. A. Rmali, M. C. Puntis, and W. G. Jiang. TEM-8 and tubule formation in endothelial cells, its potential role of its vW/TM domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:231-238 (2005)
41. T. K. Bjarnadóttir, R. Fredriksson, P. J. Hoglund, D. E. Gloriam, M. C. Lagerstrom, and H. B. Schioth. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics* 84:23-33 (2004)
42. J. Abe, T. Fukuzawa, and S. Hirose. Cleavage of Ig-Hepta at a "SEA" module and at a conserved G protein-coupled receptor proteolysis site. *J. Biol. Chem.* 277:23391-23398 (2002)
43. M. Stacey, G. Chang, S. L. Sanos, L. R. Chittenden, L. Stubbs, S. Gordon, and H. Lin. EMR4, a novel epidermal growth factor (EGF)-TM7 molecule up-regulated in activated mouse macrophages, binds to a putative cellular ligand on B lymphoma cell line A20. *J. Biol. Chem.* 277:29283-29293 (2002)
44. V. Krasnoperov, Y. Lu, L. Buryanovsky, T. A. Neubert, K. Ichtchenko, and A. G. Petrenko. Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of α -latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 277:46518:46526 (2002)
45. B. Kaur, D. J. Brat, N. S. Devi, and E. G. Van Meir. Vasculostatin, a proteolytic fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor. *Oncogene* 24:3632-3642 (2005)

46. J. X. Gray, M. Haino, M. J. Roth, J. E. Maguire, P. N. Jensen, A. Yarme, M. Stetler-Stevenson, U. Siebenlist, and K. Kelly. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J. Immunol.* 157:5438-5447 (1996)
47. H. Lin, G. Chang, J. Q. Davies, M. Stacey, J. Harris, and S. Gordon. Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolysis site motif. *J. Biol. Chem.* 279:31823-31832 (2004)
48. Y. Yamamoto, K. Irie, M. Asada, A. Mino, K. Mandai, and Y. Takai. 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* 23:3889-3897 (2004)
49. S. M. Reuver and C. C. Garner. E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 111:1071-1080 (1998)
50. T. Ishidate, A. Matsumine, K. Toyoshima, and T. Akiyama. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* 19:365-372 (2000)
51. M. A. Gimbrone, Jr., E. J. Shefton, and S. A. Criuse. Isolation and primary culture of endothelial cells from human umbilical vessels. *TCA Manual* 4:813-817 (1978)
52. M. A. Fred, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York (1990)
53. U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1970)
54. M. A. Horton, J. H. Spragg, S. C. Bodary, and M. H. Helfrich. Recognition of cryptic sites in human and mouse laminins by rat osteoclasts is mediated by beta 3 and beta 1 integrins. *Bone* 15:639-646 (1994)
55. S. Denda, U. Muller, K. L. Crossin, H. P. Erickson, and L. F. Reichardt. 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* 37:5464-5474 (1998)
56. J. Xu, D. Rodriguez, E. Petitclerc, J. J. Kim, M. Hangai, Y. S. Moon, G. E. Davis, and P. C. Brooks. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J. Cell. Biol.* 154:1069-1079 (2001)
57. M. O. Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776 (2000)

58. E. Mira, R. A. Lacalle, J. M. Buessa, G. G. de Buitrago, S. Jimenez-Baranda, C. Gomez-Mouton, C. Martinez-A., and S. Manes. Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J. Cell Sci.* 117:1847-1857 (2004)
59. V. Masson, L. R. de la Ballina, C. Munaut, B. Wielockx, M. Jost, C. Maillard, S. Blacher, K. Bajou, T. Itoh, S. Itohara, Z. Werb, C. Libert, J. M. Foidart, and A. Noel. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.* 19:234-236 (2005)
60. S. Silletti, T. Kessler, J. Goldberg, D. L. Boger, and D. A. Cheresh. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha v beta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:119-124 (2001)
61. S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, and L. A. Liotta. Integrin alpha v beta 3 mediates chemotactic and haptotactic motility in human melanoma cells through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 271:3247-3254 (1996)
62. S. Bhattacharya, C. Fu, J. Bhattacharya, and S. Greenberg. Soluble ligands of the alpha v beta 3 integrin mediate enhanced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in adherent bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270:16781-16787 (1995)
63. N. I. Moldovan. Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 11:179-194 (2002)
64. E. Ruoslahti. Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 264:13369-13372 (1989)

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
C	Cytosin
c	„copy“
CD	„cluster of differentiation“
D	Asparaginsäure
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“
ds	„double stranded“
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECL	„enhanced chemoluminescence“
ECM	„extracellular matrix“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EMR	„epidermal growth factor-like module containing mucin-like hormone receptor“
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZD	extrazelluläre Domäne
FCS	„fetal calf serum“
G	Glyzin, Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
GPCR, GPR	„G-protein-coupled receptor“
GPS, G	GPCR-Proteolysestelle
HormR, H	Hormonrezeptor
HEK	„human embryonic kidney“
His	Histidin

HUVECs	„human umbilical vein endothelial cells“
IG, Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IZD	intrazelluläre Domäne
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LRR	„leucine-rich repeat“
m	membranständig
MMP	Matrixmetalloprotease
OD	optische Dichte
p	„probability“, Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PBDS	„phosphate buffered double concentrated saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PDZ	PSD95, D1, ZO-1
pps	„proteolytically processed soluble“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
RNA	„ribonucleic acid“
S	Serin
s	„soluble“
SAGE	serielle Analyse der Genexpression
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
T	Threonin, Thymin, Tween 20
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	„tris buffered saline“
TEM	Tumorendothelmarker
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine
TMD	Transmembrandomäne

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	„unit“
V	Valin
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
Vol.	Volumen
WB	Westernblot

Danksagung

Mein Dank geht zunächst an den Leiter des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankheiten Prof. Peter Weber für die Möglichkeit, die ich hatte den ersten Teil meiner Doktorarbeit in seinem Institut durchzuführen. Außerdem möchte ich Prof. Wolfgang Siess danken, dass ich während dieser Zeit in seinem Labor arbeiten durfte. Ich werde meine Zeit im Efeu-bewachsenen Gartenpavillon, der von außen einfach überhaupt nicht nach Labor aussieht, sicherlich nie vergessen. Prof. Siess danke ich auch für die guten Verbesserungsvorschläge für das Manuskript, das kurze Zeit später im „Journal of Biological Chemistry“ veröffentlicht wurde. Mein Dank geht auch an den Leiter der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik Prof. Markus Schwaiger und an Frau Prof. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Möglichkeit, die ich hatte einen Teil meiner Doktorarbeit in den Labors der Nuklearmedizin durchzuführen.

Vor allem aber möchte ich meinem Doktorvater Markus Essler danken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Ich danke ihm für seine Unterstützung und die gute Betreuung während dieser Zeit in der ich lernen konnte wissenschaftlich auf eigenen Beinen zu stehen. Ich möchte natürlich auch den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Enken Drecol, Birgit Blechert, Florian Gärtner, Caroline Schultheiss und Jan Müller für ihre Unterstützung und das gute Arbeitsklima danken, das bei uns immer geherrscht hat. Mein besonderer Dank geht an Birgit, der besten technischen Assistentin weit und breit, für ihre Hilfe bei den Biodistributionen und Immunhisto-Färbungen.

Ich danke auch Stefan Linder und seiner Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung. Mein besonderer Dank geht an Barbara Böhlig und Vanessa van Vliet für die vielen, vielen HUVECs, die ich von ihnen bekommen habe und an Stefan Linder und Petra Kopp für ihre Hilfe bei den Mikroinjektionen und am konfokalen Mikroskop. Ich bedanke mich auch bei Carsten Kirschning und seiner (meiner ehemaligen) Arbeitsgruppe für die beste Zelllinie der Welt, nämlich den HEK293-Zellen, und dass ich ihren Thermocycler benutzen konnte als unserer den Geist aufgegeben hatte. Ich danke Takahiro Nagase vom Kazusa DNA Research Institute (Japan) für den cDNA-Klon FLJ00170 und Kenneth Kinzler und Bert Vogelstein vom Johns Hopkins Kimmel Cancer Center (Baltimore, MD) für das Plasmid pIVEX2.3-MCS-sTEM5.

Zuletzt, aber nicht am geringsten, möchte ich meiner Frau Jasmin für ihre Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

Lebenslauf

Name: Mario Vallon
Geburtsdatum: 12.01.1977
Geburtsort: Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: Verheiratet

Sep. 1983 – Juli 1987 Volksschule, Wien
Sep. 1987 – Juli 1991 Hauptschule, Henndorf a. W., Österreich
Sep. 1991 – Juli 1992 Höhere Technische Bundeslehranstalt, Salzburg
Sep. 1992 – Juli 1996 Bundesoberstufenrealgymnasium, Salzburg
Sep. 1996 – Sep. 1998 Kirche Jesu Christi HLT, Missionsdienst, Paris
Okt. 1998 – Jan. 1999 Universität Salzburg, Diplomstudium Biologie
Jan. 1999 – Sep. 1999 Österreichisches Bundesheer, Grundwehrdienst, St. Johann i. P.
Okt. 1999 – Feb. 2001 Universität Salzburg, Fortsetzung Diplomstudium Biologie
März 2001 – April 2003 Technische Universität München, Fortsetzung Diplomstudium Biologie
Juni 2003 – Mai 2005 Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Promotionsstudium Humanbiologie
Juni 2005 – Nov. 2006 Technische Universität München, Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Fortsetzung Promotionsstudium Humanbiologie