

**Transaktivierung des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von
Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (ADAMs)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ASTRID EVERS

Kiel, 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias Leippe

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Karina Reiß

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2013

Zum Druck genehmigt: 10.06.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen	1
1.1.1	Domänenstruktur von ADAMs	3
1.1.1.1	Die Transmembrandomäne	6
1.1.2	Aktivierung und Regulation der proteolytischen Aktivität	7
1.1.3	Funktion und Relevanz von ADAM17	8
1.2	Signaltransduktion und Zelloberflächenrezeptoren	12
1.2.1	Rezeptor-Tyrosinkinasen	13
1.2.1.1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR)	15
1.2.1.2	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	16
1.2.2	MAP-Kinasen	17
1.2.3	Toll-like Rezeptoren	18
1.3	Zielsetzung	21
2	MATERIAL & METHODEN	22
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Chemikalien	23
2.3	Kits	25
2.4	Software	26
2.5	Stimulantien und Inhibitoren	27
2.6	Antikörper	28
2.7	Plasmide	28
2.8	Mauslinien	29
2.9	Zellkultur	30
2.9.1	Zelllinien	30
2.9.2	Kultivierung von Zelllinien	31
2.9.3	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	31
2.9.4	Auftauen von eukaryotischen Zellen	32
2.9.5	Kollagenisierung von Zellkulturgefäßen	32
2.9.6	Präparation und Kultivierung von primären humanen Keratinocyten	33
2.9.7	Präparation und Kultivierung von primären murinen Keratinocyten	35
2.10	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	36
2.11	siRNA Transfektion	37
2.12	Stimulation von Zellen und Herstellung von Zelllysaten	38
2.13	Proteinbestimmung nach Bradford	39
2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.15	Western-Transfer von Proteinen	41
2.15.1	Immunologische Detektion der transferierten Proteine	41
2.15.2	Strippen von PVDF Membranen	42
2.16	<i>Shedding</i> -Experimente mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Substraten	42
2.17	<i>In vitro</i> Wundheilungs-Versuch	43

2.18	Mutagenese.....	44
2.18.1	Ausgangsplasmid	44
2.18.2	Verwendete Oligonukleotide.....	45
2.18.3	Mutagenese-Reaktion.....	46
2.18.4	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	47
2.18.5	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....	48
2.18.6	Anlegen eines Glycerol-Stammes	48
2.18.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	49
2.18.8	Sequenzierung von DNA	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Transaktivierung des EGFR durch FGFR2b	50
3.1.1	Die Stimulation von ERK1/2 nach FGFR2b-Aktivierung ist Metalloprotease-abhängig	51
3.1.2	Vergleich von FGFR2b und VEGFR vermittelter ADAM17-Aktivierung	52
3.1.3	ADAM17 wird durch FGFR2b aktiviert.....	55
3.1.4	Die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 ist nicht erforderlich für die Aktivierung.....	56
3.1.5	Die FGF7 stimulierte Migration von Keratinocyten ist abhängig von ADAM17	57
3.1.6	Rolle von ADAM17 <i>in vivo</i>	59
3.1.7	FGFR2b als Substrat für ADAM-vermittelte Proteolyse.....	62
3.1.8	Andere Mitglieder der FGFR-Familie	64
3.2	Transaktivierung des EGFR durch Toll- <i>like</i> Rezeptoren (TLRs).....	65
3.3	Regulation der proteolytischen Aktivität von ADAM17 in Abhängigkeit von der Transmembrandomäne	73
4	DISKUSSION	78
4.1	Transaktivierung des EGFR durch den FGFR2b	78
4.2	Bedeutung der Domänenstruktur für die Aktivität von ADAM17	86
4.2.1	Die Transmembrandomäne von ADAM17.....	90
4.3	Transaktivierung des EGFR durch Toll- <i>like</i> Rezeptoren (TLR)	93
4.4	Ausblick	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	SUMMARY	102
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
8	LITERATURVERZEICHNIS	106
	Danksagung	124
	Erklärung.....	125
	Lebenslauf.....	126
	Anhang.....	127

1 EINLEITUNG

1.1 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen

Die Enzymfamilie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen – kurz ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) – besteht aus einer Gruppe transmembraner Typ I Glykoproteine, welche sich durch eine Disintegrin- und eine Metalloprotease-Domäne auszeichnen. Durch diese zwei charakteristischen Domänen sind ADAMs in der Lage die Zelloberfläche vielseitig zu modellieren, weil sie zum einen Zell-Zellkontakte vermitteln und diese zum anderen durch ihre proteolytische Aktivität, welche in dieser Arbeit im Fokus steht, auch aufheben können.

Sie gehören innerhalb der Gruppe der Zink-abhängigen Metalloproteasen zu den Metzinkinen. Diese sind durch eine hochkonservierte Anordnung von drei Histidinresten (HExxHxxGxxH) im aktiven Zentrum charakterisiert und gliedern sich in vier Untergruppen (Bode *et al.*, 1993): Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Astacine, Serralysine und Adamalysine, wobei ADAMs den Adamalysinen zugeordnet werden (siehe Abbildung 1).

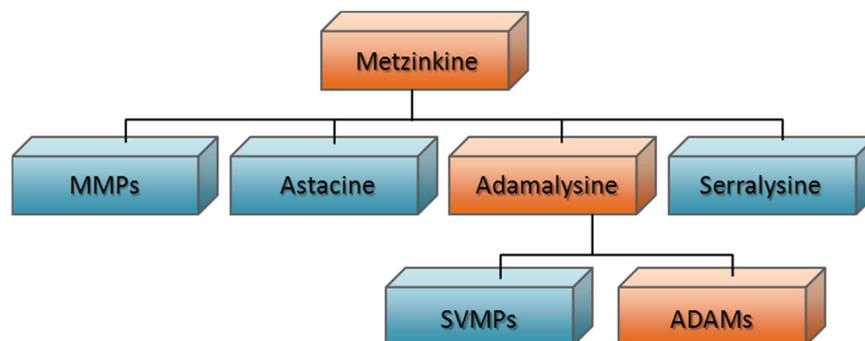


Abbildung 1: Metzinkinfamilie der Zn^{2+} -abhängigen Metalloproteasen. Zu der Metzinkinfamilie gehören Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Astacine, Serralysine und Adamalysine. Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (*a disintegrin and metalloproteases*, ADAMs) gehören ebenso wie die Schlangengift Metalloproteinasen (*snake venom metalloproteinases*, SVMPs) zu der Gruppe der Adamalysine (nach Huxley-Jones *et al.*, 2007).

ADAMs sind abhängig von der Funktion ihrer Substrate in diverse physiologische und pathologische Prozesse involviert. Das Repertoire an Substraten, die von ADAMs proteolytisch prozessiert werden, ist sehr vielfältig. Eine Gemeinsamkeit aller ADAM-Substrate ist jedoch die Eigenschaft mit der Cytoplasmamembran assoziiert zu sein. Die Substrate sind entweder selbst transmembrane Proteine, über einen

Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Membran verbunden oder durch Wechselwirkungen mit integralen Membranproteinen mit der Membran assoziiert. Lösliche Proteine sind bisher noch nicht als ADAM-Substrate beschrieben worden. Auch wenn bis heute keine einheitliche Erkennungssequenz für Substrate oder eine typische Sequenz für die Schnittstelle bestimmt werden konnte, findet die proteolytische Spaltung des Substrates immer im juxtamembranen Bereich, also dicht über der Lipiddoppelschicht statt (Reiss & Saftig, 2009). Die proteolytische Freisetzung der Ektodomäne von Proteinen wird als *Shedding* bezeichnet, weshalb die beteiligten Proteasen auch *Sheddases* genannt werden (siehe Abbildung 2).

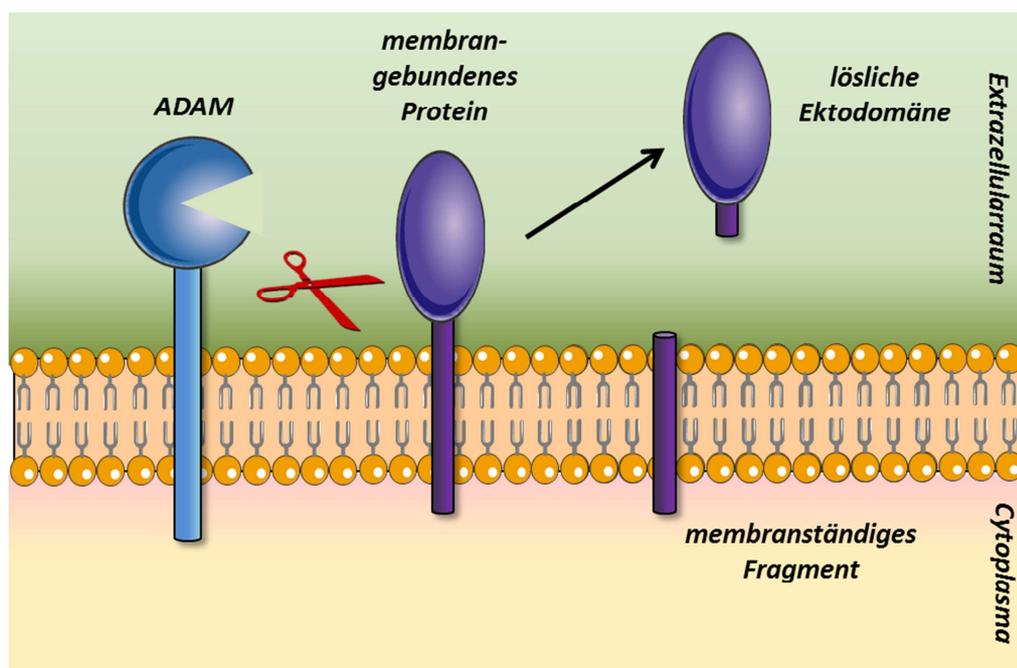


Abbildung 2: Ektodomänen-Shedding eines transmembranen Proteins. Die ADAM-vermittelte Proteolyse eines membran-gebundenen Proteins setzt dessen Ektodomäne in den extrazellulären Raum frei, während ein Fragment in der Cytoplasmamembran verbleibt (nach Blobel, 2005).

Zu den typischen ADAM-Substraten gehören zum Beispiel Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren. Letztere werden meist als inaktive, membran-gebundene Proformen synthetisiert und erst durch die proteolytische Freisetzung aktiviert, wie z.B. HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) oder TGF α (*transforming growth factor α*) (Sunnarborg *et al.*, 2002). Dies ist besonders während der Embryonalentwicklung aber auch im adulten Leben eines Organismus von größter Bedeutung.

Des Weiteren werden Cytokine, die ähnlich wie die Wachstumsfaktoren bis zu ihrer Freisetzung inaktiv sind, von ADAMs prozessiert. Die Freisetzung solcher Mediatoren

spielt in chronisch entzündlichen Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis eine Rolle und die Modulation der ADAM-Aktivität ist ein vielversprechender Ansatz für therapeutische Strategien (Saftig & Reiss, 2011).

ADAMs wurden in einer Vielzahl von Spezies gefunden, u.a. in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Taufliege *Drosophila melanogaster*, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* sowie in etlichen Vertebraten. In Bakterien und Pflanzen wurden bisher keine ADAMs nachgewiesen (Stone *et al.*, 1999).

Bis heute wurden insgesamt 40 ADAM-Proteasen in verschiedenen Säugetier-Genomen identifiziert. Das Maus-Genom zum Beispiel enthält 37 ADAM-Gene, wohingegen im menschlichen Genom nur 22 Gene, die für diese Proteasefamilie codieren, gefunden wurden. Nur etwa die Hälfte der humanen ADAMs ist proteolytisch aktiv, der anderen Hälfte fehlt das typische Zink-Bindungsmotiv im aktiven Zentrum. Die proteolytisch aktiven Mitglieder der Enzymfamilie sind ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 und 33 (Moss & Lambert, 2002). Die beiden am besten charakterisierten Vertreter dieser Familie, die in dieser Arbeit hauptsächlich untersucht wurden, sind ADAM10 und ADAM17.

1.1.1 Domänenstruktur von ADAMs

ADAMs sind generell aus folgenden Domänen aufgebaut: Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, Cystein-reiche, EGF-ähnliche, Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (Seals & Courtneidge, 2003). Ein Schema der allgemeinen Domänenstruktur ist in Abbildung 3 dargestellt.

ADAMs werden an den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) als Zymogene, also als zunächst enzymatisch inaktive Vorläuferproteine, synthetisiert (Schlöndorff *et al.*, 2000). Für die vorläufige Inaktivierung der Protease ist die N-terminale Prodomäne verantwortlich, welche über einen konservierten Cystein-Rest das Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum koordiniert und dadurch die katalytische Domäne blockiert. Dies wird als Cystein-Switch bezeichnet (van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Nach der Synthese am ER wird das Enzym auf dem sekretorischen Weg im Golgi-Apparat durch komplexe Glykosylierungen modifiziert und schließlich an die Zelloberfläche transportiert (Schlöndorff *et al.*, 2000).

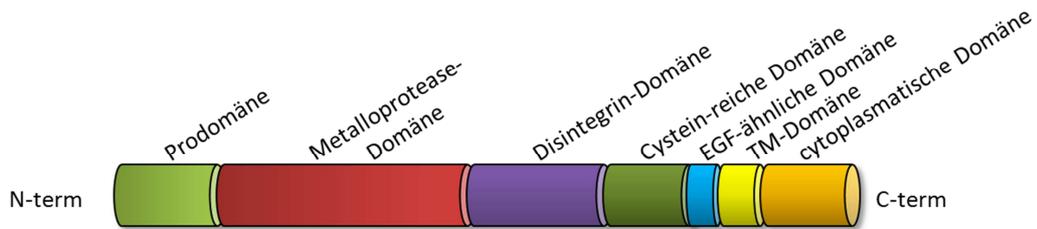


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAMs. Die katalytisch aktiven ADAMs besitzen eine Prodomäne, eine Metalloprotease-Domäne mit dem konservierten HExxHxxGxxH-Motiv, eine Disintegrin-, eine Cystein-reiche, eine EGF-ähnliche, eine Transmembran (TM)-Domäne sowie einen cytoplasmatischen Rest (nach Arribas & Esselens, 2009). Einigen ADAMs, wie ADAM10 und ADAM17, fehlt die cysteinreiche Domäne.

Im Trans-Golgi-Netzwerk erfolgt die Maturierung, d.h. die Abspaltung der Prodomäne durch Furin oder andere Proprotein-Konvertasen. Die Prodomäne bleibt zunächst über nicht-kovalente Bindungen mit der Metalloprotease-Domäne assoziiert, bis sie endgültig abgelöst wird. Solange die Prodomäne noch mit der Protease verbunden ist, wird diese in einer inaktiven Konformation gehalten (Milla *et al.*, 1999; Li & Fan, 2004). Die Prodomäne hat außerdem die Funktion eines intramolekularen Chaperons und sorgt durch die Stabilisierung von Intermediaten für eine korrekte Faltung des Proteins (Leonard *et al.*, 2005).

Die sich an die Prodomäne anschließende Metalloprotease-Domäne enthält das katalytisch aktive Zentrum mit dem Zink-bindenden Konsensusmotiv (HExxHxxGxxH). Dieses Motiv fehlt den proteolytisch inaktiven Mitgliedern der ADAM-Familie, die in dieser Arbeit jedoch nicht näher besprochen werden. Die Zink-Bindungsregion mit den drei Histidin-Resten wird durch einen konservierten Methionin-Rest und die darauf folgenden Aminosäuren, den sogenannten *Met-turn*, stabilisiert, da dieser eine hydrophobe Tasche formt und somit für die Konformation und die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums sorgt (Bode *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2007). Der in der Konsensussequenz enthaltene Glutamat-Rest dient während der Reaktion als katalytische Base und hält das für die Proteolyse benötigte Wasseratom im aktiven Zentrum (Bode *et al.*, 1993; Gomis-Rüth, 2003).

Die Nomenklatur der auf die Metalloprotease-Domäne folgenden Domänen ist in der Literatur missverständlich und nicht einheitlich, insbesondere, weil nicht jedes Mitglied der ADAM-Familie alle fünf extrazellulär vorhergesagten Domänen besitzt. Die folgenden Ausführungen beziehen sich daher der Einfachheit halber auf die in dieser Arbeit untersuchte Protease ADAM17.

Reddy und Kollegen fassen den Bereich C-terminal zur Protease-Domäne zum Beispiel als cysteinreichen Bereich zusammen, der sich wiederum in Disintegrin- und EGF-ähnliche Domäne aufteilt (Reddy *et al.*, 2000). Andere Arbeiten postulieren hingegen, es gäbe keine EGF-ähnliche Domäne bei ADAM10 und ADAM17 (Takeda, 2009). Strukturanalysen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Grötzinger (Biochemisches Institut, Universität Kiel) durchgeführt wurden, ergaben wiederum, dass ADAM10 und ADAM17 jeweils sehr wohl eine EGF-ähnliche, jedoch keine Cystein-reiche Domäne besitzen. Die von dieser Gruppe vorgeschlagene Nomenklatur unterteilt den Bereich zwischen Metalloprotease-Domäne und Plasmamembran in Disintegrin-ähnliche und membranproximale Domäne (MPD). Letztere beinhaltet zwar insgesamt 10 Cysteinreste, gilt jedoch strukturebiologisch nicht als Cystein-reiche Domäne (Lorenzen *et al.*, 2011).

Auch die Funktion dieser Domänen ist bislang kaum verstanden. Die Disintegrin-Domäne ist höchstwahrscheinlich durch die Fähigkeit zur Interaktion mit Integrinen an der Vermittlung von Zelladhäsion beteiligt, was hauptsächlich bei den proteolytisch inaktiven ADAMs relevant zu sein scheint. Dies spielt zum Beispiel bei der Fusion von Spermium und Eizelle eine Rolle, wo ADAM2 (auch Fertilin β) auf der Oberfläche von Spermien den Kontakt mit $\alpha_6\beta_1$ -Integrinen auf der Eizelloberfläche vermittelt (Evans, 2001). Für die Cystein-reiche Domäne, bzw. im Fall von ADAM17 die EGF-ähnliche Domäne, wird eine Rolle bei der spezifischen Substraterkennung diskutiert (Janes *et al.*, 2005; Lorenzen *et al.*, 2012). Außerdem wird angenommen, dass diese Domänen an der endgültigen Ablösung der Prodomäne beteiligt sind (Milla *et al.*, 1999). Durch die C-förmige Konformation des extrazellulären Bereichs ist die membranproximale Domäne von ADAM17 nahe der katalytischen Domäne lokalisiert (Takeda *et al.*, 2006), was für die vorgeschlagenen Rollen bei der Substraterkennung und -bindung als auch bei der Aktivierung durch Ablösung der Prodomäne spricht.

Die cytoplasmatischen Domänen der verschiedenen ADAMs unterscheiden sich sowohl in der Länge als auch in der Sequenz deutlich voneinander (Gooz, 2010).

Insbesondere für die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 wurden Phosphorylierungsstellen und potentielle SH3-Domänen-Bindungsstellen beschrieben, was eventuell eine Rolle bei der Regulation der Proteaseaktivität spielen könnte (siehe Kapitel 1.1.2). Möglicherweise spielt die cytoplasmatische Domäne auch bei der Regulation des Transportes und somit für die zelluläre Lokalisation eine Rolle (Seals & Courtneidge, 2003).

1.1.1.1 Die Transmembrandomäne

Die sich an die EGF-ähnliche Domäne anschließende Transmembran (TM)-Domäne ist eine ca. 23 Aminosäuren umfassende α -Helix. Untersuchungen, bei denen die Transmembrandomänen von ADAM10 und ADAM17 untereinander ausgetauscht wurden oder durch die von beliebigen anderen transmembranen Proteinen ersetzt wurden, haben gezeigt, dass diese Domäne eine Rolle für die Substraterkennung und -spezifität spielen könnte (Le Gall *et al.*, 2010). Auch Experimente mit Substrat-Chimären, bei denen die TM-Domänen von ADAM17 Substraten gegen die von ADAM10-Substraten ausgetauscht wurden oder andersrum, deuten darauf hin, dass es eine Interaktion innerhalb der Lipidmembran zwischen Protease und Substrat gibt (Horiuchi *et al.*, 2007b). Dass die Cytoplasmamembran eine geeignete Umgebung für derartige Interaktionen zwischen den TM-Domänen einzelner Proteine ist, zeigt das Beispiel des T-Zell-Rezeptors, der sich aus mehreren Unterheiten zu einem Komplex zusammenlagert. Die Bindung wird durch polare Aminosäure-Reste in der TM-Domäne vermittelt, ohne die sich der Komplex nicht bilden kann und der Rezeptor nicht aktivierbar ist (Call & Wucherpfennig, 2005).

Ye und Kollegen haben vor einigen Jahren beschrieben, dass ein Prolin-Rest in der Transmembrandomäne einen Helix-Bruch verursachen kann. Dieser führt dazu, dass das Protein ein Stück aus der Plasmamembran herausgeschoben wird. Dies wurde als Schlüsselmechanismus für die Aktivität einer membranständigen Protease postuliert, da es das Substrat räumlich in die richtige Position bringt, um von der Protease geschnitten zu werden (Ye *et al.*, 2000). Auch die TM-Domäne von ADAM17 enthält einen Prolin-Rest.

Im Rahmen von strukturellen Untersuchungen zur Zusammensetzung von bestimmten Cholesterin-reichen Membranbereichen (*Lipid rafts*) wurde eine direkte Interaktion von Transmembranproteinen mit Cholesterolmolekülen postuliert (Taïeb *et al.*, 2004). Diese wird über aromatische Aminosäuren vermittelt, wie sie auch in der TM-Domäne von ADAM17 vorkommen. Bisher ist nicht bekannt, welche Interaktionen zwischen den TM-Domänen von ADAMs und Substraten stattfinden und ob es direkte Wechselwirkungen zwischen bestimmten Aminosäureresten der TM-Domäne und der Lipidschicht gibt. Dies soll daher in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.2 Aktivierung und Regulation der proteolytischen Aktivität

Wie die proteolytische Aktivität von ADAMs reguliert wird ist sehr umstritten. Dadurch, dass über die Jahre immer mehr Substrate identifiziert wurden, ist es immer schwieriger geworden endgültige Aussagen zu diesem Thema zu machen, da viele Befunde Zelltyp- oder Substrat-spezifisch und daher nicht universell anzuwenden sind. Obwohl die ADAMs hauptsächlich auf der Zelloberfläche, wo sie auf ihre Substrate treffen, proteolytisch aktiv sein sollten, wurde unter anderem für ADAM10 und ADAM17 gezeigt, dass ein Großteil der Enzyme in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist (Schlöndorff *et al.*, 2000; Gutwein *et al.*, 2003). Es ist unklar, wie der Transport an die Zelloberfläche reguliert ist, jedoch gibt es Hinweise, dass auch in intrazellulären Kompartimenten *Shedding*-Prozesse stattfinden können (Skovronsky *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2011). Letzteres hängt davon ab, ob die entsprechenden Substrate in den Kompartimenten vorhanden sind, was wiederum von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich sein kann.

Grundsätzlich wird zwischen dem konstitutiven und dem induzierbaren *Shedding* unterschieden. Unphysiologische Stimulantien wie der Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) oder das Calcium-Ionophor Ionomycin, aber auch physiologische Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Cytokine können die proteolytische Aktivität von ADAMs steigern (Huovila *et al.*, 2005). Über welchen Mechanismus diese Stimulantien letztendlich die Proteasen regulieren und ob es einen generellen Schlüsselmechanismus gibt, ist bisher unklar. Signalmoleküle wie die Proteinkinase C (PKC) sind an der Aktivierung durch PMA beteiligt und die Gegenwart von Ionomycin bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom in das Cytoplasma, welcher die Aktivität vieler ADAMs stimuliert. Obwohl es sehr wahrscheinlich erscheint, dass es sich bei der Aktivierung der ADAMs um einen Mechanismus handelt, der aus dem Zellinneren über die cytoplasmatische Domäne an die Protease-Domäne vermittelt wird, ist die Beteiligung der cytoplasmatischen Domäne nicht eindeutig.

Auf Grund der vorhandenen Phosphorylierungsstellen und der vorhergesagten SH3-Domänen-Bindungsstellen in der cytoplasmatischen Domäne, wie sie insbesondere für ADAM17 beschrieben sind, wird der intrazellulären Domäne oft eine Rolle bei der Regulation der stimulierten Aktivität zugesprochen (Scheller *et al.*, 2011). Studien haben gezeigt, dass Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-K), wie z.B. p38 in der Lage sind, ADAM17 am intrazellulär gelegenen Tyrosin-Rest 735 zu phosphorylieren

(Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002). Andere Veröffentlichungen hingegen zeigen, dass der cytoplasmatische Teil von ADAM17 und somit alle darin vorhandenen Phosphorylierungsstellen verzichtbar für die stimulierte Aktivität sind (Reddy *et al.*, 2000; Doedens *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2010).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ADAM17 mit Protein-Disulfidisomerasen (PDIs) zusammenhängt, welche einen Einfluss auf die Konformation des Enzyms haben, da sie mit Thioredoxinmotiven (CxxC) in der Disintegrin- und der EGF-ähnlichen Domäne interagieren. Die PDI bewirkt durch Isomerisierung der Disulfidbrücken innerhalb des cysteinreichen Bereichs, dass die Protease in einer geschlossenen Konformation vorliegt, so dass die Substratumsetzung sterisch verhindert wird. Durch PMA wird die Freisetzung reaktiver Substanzen aus den Mitochondrien ausgelöst, welche die freien Thiolgruppen der PDI oxidieren und somit die Isomerase-Funktion unterbinden. ADAM17 geht dadurch in eine offene Konformation über wodurch die Aktivität gesteigert wird (Willems *et al.*, 2010).

Neben Induktoren gibt es auch Inhibitoren des ADAM-vermittelten *Sheddings*. Ein endogener Inhibitor für ADAM17 ist TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteases 3*), eines von vier Mitgliedern einer Gruppe sekretierter Inhibitoren, die Matrix-Metalloproteasen hemmen und dadurch eine Rolle bei der Gestaltung der extrazellulären Matrix spielen (Amour *et al.*, 1998). Die strukturelle Aufklärung der spezifischen Bindung von TIMP3 im aktiven Zentrum von ADAM17 hat zu der Entwicklung von synthetischen Inhibitoren beigetragen. Der Einsatz solcher Hydroxamat-basierten Verbindungen, wie zum Beispiel dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat trägt dazu bei, den Einfluss von *Shedding* in vielen biologischen Prozessen besser zu verstehen (Wisniewska *et al.*, 2008).

1.1.3 Funktion und Relevanz von ADAM17

ADAM17 *knockout*-Mäuse weisen einen sehr ähnlichen Phänotyp auf, wie Mäuse, denen der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) oder dessen Liganden (z.B. HB-EGF oder TGF α) fehlen (Peschon *et al.*, 1998). Dies zeichnet sich durch perinatale Letalität auf Grund von gravierenden Entwicklungsdefiziten aus. So ist zum Beispiel die Entwicklung des Herzens, der Augen und der Haut stark gestört (Jackson *et al.*, 2003). Diese Ähnlichkeit zwischen ADAM17-

und EGFR-defizienten Mäusen ist durch die Funktion von ADAM17 als Haupt-*Sheddase* von EGFR-Liganden begründet. Die Liganden werden als membrangebundene Vorläuferproteine synthetisiert und erst durch die proteolytische Freisetzung aktiviert. Sobald sie von der Zelloberfläche abgespalten werden sind sie in der Lage Rezeptoren auf der gleichen Zelle (autokrine Aktivierung) oder auf benachbarten Zellen (parakrine Aktivierung) zu aktivieren (Blobel, 2005).

Auch Zelloberflächen-Rezeptoren selbst können durch ADAM17 prozessiert werden. Dies kann einerseits zu einem Verlust der Responsivität führen, wie im Fall des vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) (Swendeman *et al.*, 2008) zum anderen aber auch eine aktivierende Funktion haben, wie im Fall des Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptors. Dieser kann auch in der löslichen Form seinen Liganden IL-6 binden und dann als Rezeptor-Ligand-Komplex andere Zellen, die diesen Rezeptor selbst nicht auf der Oberfläche tragen, aktivieren. Dieses Phänomen wird als *trans-signalling* bezeichnet und ist ein Beispiel dafür, dass das *Shedding* eines Rezeptors auch eine aktivierende Funktion haben kann (Müllberg *et al.*, 1993; Rose-John & Heinrich, 1994). Durch die Fähigkeit sowohl Wachstumsfaktoren als auch deren Rezeptoren zu prozessieren ist ADAM17 auf vielfältige Weise in Signaltransduktions-Prozesse sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Leben involviert.

Es spielt außerdem eine große Rolle in pathologischen Situationen, zum Beispiel in chronisch inflammatorischen Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis oder in der Sepsis (Saftig & Reiss, 2011). Dies ist hauptsächlich durch seine Funktion als TNF α (*tumor necrosis factor α*) freisetzende Protease bedingt. Durch die Identifizierung dieses Substrats hat ADAM17 auch den Beinamen TACE (*TNF α converting enzyme*) erhalten (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Die Freisetzung dieses Cytokins ist als Antwort auf eine Infektion notwendig, um Immunzellen zu rekrutieren. Wird TNF α jedoch unkontrolliert oder übermäßig freigesetzt, kommt es zu entzündlichen Überreaktionen, was im schlimmsten Fall zu einer Sepsis führen kann, wenn die systemische Konzentration an löslichem TNF α zu stark ansteigt (Horiuchi *et al.*, 2007a). Die gezielte Regulation von ADAM17 ist daher in diesem Zusammenhang ausgesprochen wichtig.

Weitere typische Substrate von ADAM17 sind Adhäsionsproteine wie L-Selektin (Condon *et al.*, 2001) oder JAM-A (*junctional adhesion molecule A*) (Koenen *et al.*, 2009). Die Spaltung von Adhäsionsproteinen hat Konsequenzen für den Zell-Zell-Verbund innerhalb eines Gewebes und erhöht, wie im Fall von JAM-A, beispielsweise

die Permeabilität von Blutgefäßen für Leukocyten (Dreymüller *et al.*, 2012). Das Shedding von L-Selektin, welches für das charakteristische Rollen von Leukocyten am Endothel verantwortlich ist, beeinflusst die Rollgeschwindigkeit und somit die Leukocytenrekrutierung zu Entzündungsherden (Hafezi-Moghadam *et al.*, 2001). Diese Beispiele untermauern die Bedeutung von ADAM17 in immunologischen Prozessen. Es sind insgesamt über 75 ADAM17-Substrate aus unterschiedlichen Proteinklassen beschrieben worden, von denen einige exemplarisch in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Tabelle 1: ADAM17-Substrate

Substratgruppe	Substrat	Referenz
<i>Wachstumsfaktoren</i>	pro-HB-EGF pro-TGF α Epiregulin Amphiregulin	Merlos-Suárez <i>et al.</i> , 2001 Peschon <i>et al.</i> , 1998 Sahin <i>et al.</i> , 2004 Sunnarborg <i>et al.</i> , 2002
<i>Rezeptoren</i>	TNF-R I&II VEGFR Notch1 HER4 IL-6R	Peschon <i>et al.</i> , 1998; Reddy <i>et al.</i> , 2000 Swendeman <i>et al.</i> , 2008 Brou <i>et al.</i> , 2000 Rio <i>et al.</i> , 2000 Althoff <i>et al.</i> , 2000
<i>Cytokine</i>	pro-TNF α Fraktalkine (CX3CL1)	Black <i>et al.</i> , 1997; Moss <i>et al.</i> , 1997 Garton <i>et al.</i> , 2001
<i>Adhäsionsmoleküle</i>	I-CAM V-CAM L-Selektin	Tsakadze <i>et al.</i> , 2006 Garton <i>et al.</i> , 2003 Peschon <i>et al.</i> , 1998
<i>andere Proteine</i>	APP MUC-1	Buxbaum <i>et al.</i> , 1998 Thathiah <i>et al.</i> , 2003

2010 wurde der erste Mensch mit einer Mutation in dem Gen für ADAM17, die zu einer funktionellen Deletion der Protease führt, aber dennoch nicht letal ist, entdeckt. Dieser Patient weist schwere Hautdefekte auf und hat veränderte Haar- und Nagelstrukturen, ähnlich wie sie bei ADAM17- oder EGFR-*knockout* Mäusen auftreten. Er leidet außerdem unter Reizungen des Darms und wiederkehrenden Infektionen der Haut mit *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*. Dass der ADAM17-defiziente Patient im Gegensatz zu den *knockout*-Mäusen lebensfähig ist und außer den Veränderungen in der Haut und dem Darm keine gravierenderen gesundheitlichen Probleme hat, deutet darauf hin, dass im Menschen im Gegensatz zum Mausmodell das Fehlen von ADAM17 kompensiert werden kann (Blaydon *et al.*, 2011).

Eine hypomorphe Maus, bei der die Expression von *adam17* bis auf ein Minimum reduziert ist (*ADAM17^{ex/ex}*), weist einen ähnlichen Phänotyp auf und ist besonders empfindlich gegenüber DSS (*dextran sulfate sodium*)-induzierter Colitis. Das Darmepithel ist dabei stärker entzündet als bei Kontroll-Mäusen, was auf die mangelnde Fähigkeit zur Regeneration des Epithels nach der DSS-Behandlung zurückgeführt wird, da die protektiven EGFR-vermittelten Signale vermindert sind, wenn ADAM17 fehlt (Chalaris *et al.*, 2010).

Dies unterstreicht die Relevanz von ADAM17 *in vivo* und macht es zu einem attraktiven, potenziellen Target für therapeutische Ansätze gegen chronisch entzündliche Krankheiten. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass ADAM17 nicht nur pro-inflammatorische sondern auch regenerierende Prozesse reguliert, die beide gleichermaßen für die Bekämpfung von Infektionen wichtig sind. Wird ADAM17 bei chronischen Entzündungen inaktiviert, kann dies zwar die exzessive Freisetzung von TNF α verhindern und damit anti-inflammatorisch wirken, jedoch kann eine Inaktivierung von ADAM17 auch unerwünschte Nebeneffekte haben, wenn wichtige regenerative Prozesse inhibiert sind (Scheller *et al.*, 2011).

Das Verständnis der Regulation von ADAM17 ist daher enorm wichtig, um diese gezielt modulieren zu können.

1.2 Signaltransduktion und Zelloberflächenrezeptoren

Um Signale aus der Umwelt wahrzunehmen und um innerhalb eines mehrzelligen Organismus die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen zu ermöglichen, sind Botenstoffe sowie Rezeptoren auf der Zelloberfläche notwendig. Im Menschen gibt es eine große Vielfalt solcher Signalmoleküle; darunter fallen Proteine, Peptide, Aminosäuren, Steroide, Nukleotide oder Fettsäurederivate. Die meisten Signalmoleküle treten nach ihrer Freisetzung mit einem spezifischen Rezeptor der Zielzelle in Wechselwirkung, um einen bestimmten Signaltransduktionsweg in Gang zu setzen.

Viele Rezeptoren sind transmembrane Proteine, die nach ihrer Aktivierung das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres konvertieren, welches häufig die temporäre Freisetzung intrazellulärer Botenstoffe (*second messenger*) wie cAMP, cGMP, Diacylglycerol, Inositolphosphate oder Calcium zur Folge hat.

Die Zelloberflächenrezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt, die durch ihren verwendeten Signalumwandlungsmechanismus definiert sind (siehe Abbildung 4).

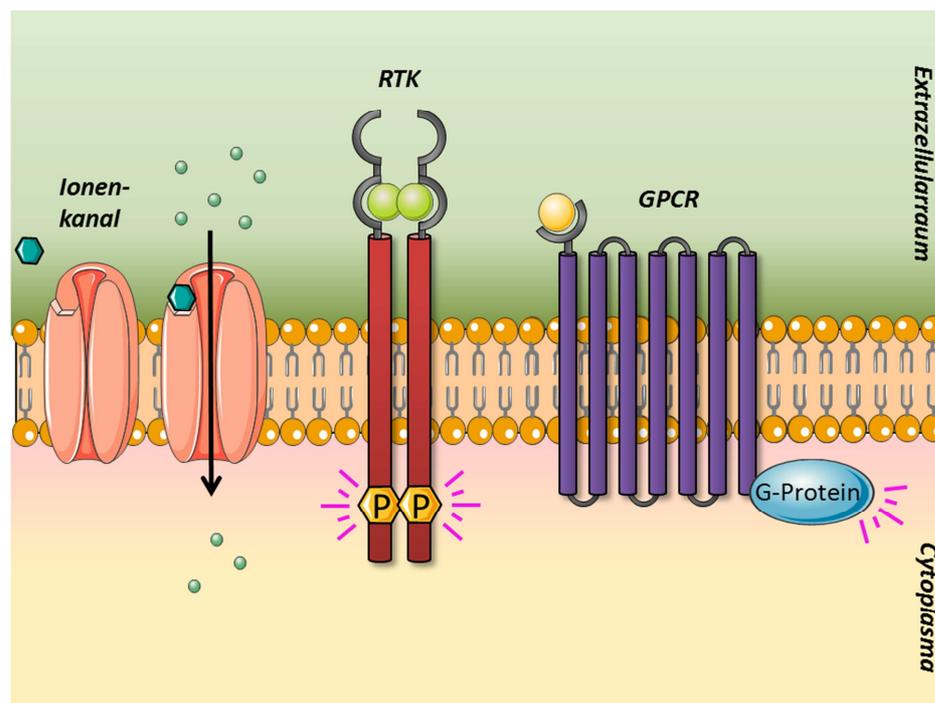


Abbildung 4: Schematische Darstellung der drei Hauptklassen von Zelloberflächen-Rezeptoren.

Ligandengesteuerte Ionenkanäle, Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) aus der Klasse der enzymgekoppelten Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Die Bindung des Liganden an den Ionenkanal bewirkt eine Öffnung desselben und ermöglicht so den Ein- oder Ausstrom von Ionen. Bei RTKs führt die Ligandenbindung zur Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle, welche sich dann intrazellulär gegenseitig phosphorylieren (P). Die Bindung eines Liganden an einen GPCR aktiviert ein intrazellulär assoziiertes G-Protein, welches dann wiederum andere Enzyme aktiviert.

Eine Rezeptorklasse stellen ligandengesteuerte Ionenkanäle dar, wie zum Beispiel der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor, der an der schnellen synaptischen Signalübertragung im Nervensystem beteiligt ist und dessen Aktivierung eine Veränderung des Membranpotenzials bewirkt (Burnstock *et al.*, 2011).

Die zweite Klasse der Zelloberflächenrezeptoren ist die Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie vermitteln Antworten auf eine Vielfalt von Signalmolekülen, zu denen Hormone, Neurotransmitter und Cytokine gehören. Beispiele für diese Rezeptorklasse sind der lichtaktivierbare Photorezeptor Rhodopsin im Auge von Wirbeltieren oder olfaktorische Rezeptoren (Deupi *et al.*, 2012).

Die dritte Klasse bilden die enzymgekoppelten Rezeptoren, die aus einem N-terminalen extrazellulären Rezeptorteil und einer C-terminalen intrazellulären Proteinkinase bestehen. Zu dieser Klasse gehören die Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

1.2.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) vermitteln Antworten auf die Mehrheit aller Wachstumsfaktoren und haben somit Einfluss auf das Zellwachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen. Störungen in der Signalübertragung durch RTKs können die Grundlage für gravierende Krankheiten wie Krebs sein, da Abnormalitäten z. B. in der EGFR-vermittelten Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Art von Erkrankungen spielen (Choura & Rebaï, 2011).

Die Signaltransduktion erfolgt bei RTKs durch die Liganden-vermittelte Dimerisierung von zwei Rezeptormolekülen. Diese wird teilweise dadurch stabilisiert, dass sich die Liganden ihrerseits als Dimere zusammenlagern und somit die Rezeptormoleküle quervernetzen. Die räumliche Zusammenführung der beiden Rezeptormoleküle bewirkt, dass sich die Kinasedomänen, die sich im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors befinden, gegenseitig an mehreren Tyrosin-Seitenketten phosphorylieren. Diese dienen dann als Bindungsstellen für weitere intrazelluläre Signalproteine. Eines der ersten typischen Adapterproteine von RTKs ist GRB2 (*growth factor receptor-bound protein-2*), welches konstitutiv mit SOS (*son of sevenless*) assoziiert ist. SOS ist ein Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor, der Ras, ein GTP-bindendes Protein, aktiviert. Dies setzt eine Phosphorylierungskaskade über MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen in Gang,

die über mindestens drei „in Reihe geschaltete“ Proteinkinasen verläuft und eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) und eine MAP-Kinase (MAP-K) umfasst (McKay & Morrison, 2007). Diese Kinasen phosphorylieren sich nacheinander und können so das Signal verstärken und verteilen. Die letzte Kinase in der Kaskade aktiviert Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die die Expression spezifischer Gene regulieren.

Die verschiedenen MAP-Kinase-Wege werden in Kapitel 1.2.2 näher beschrieben. Nachfolgend werden der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (*fibroblast growth factor receptor*, FGFR) und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), die in dieser Arbeit eingehender untersucht werden, näher vorgestellt. Die postulierten Signalwege dieser beiden RTKs sind in Abbildung 5 dargestellt.

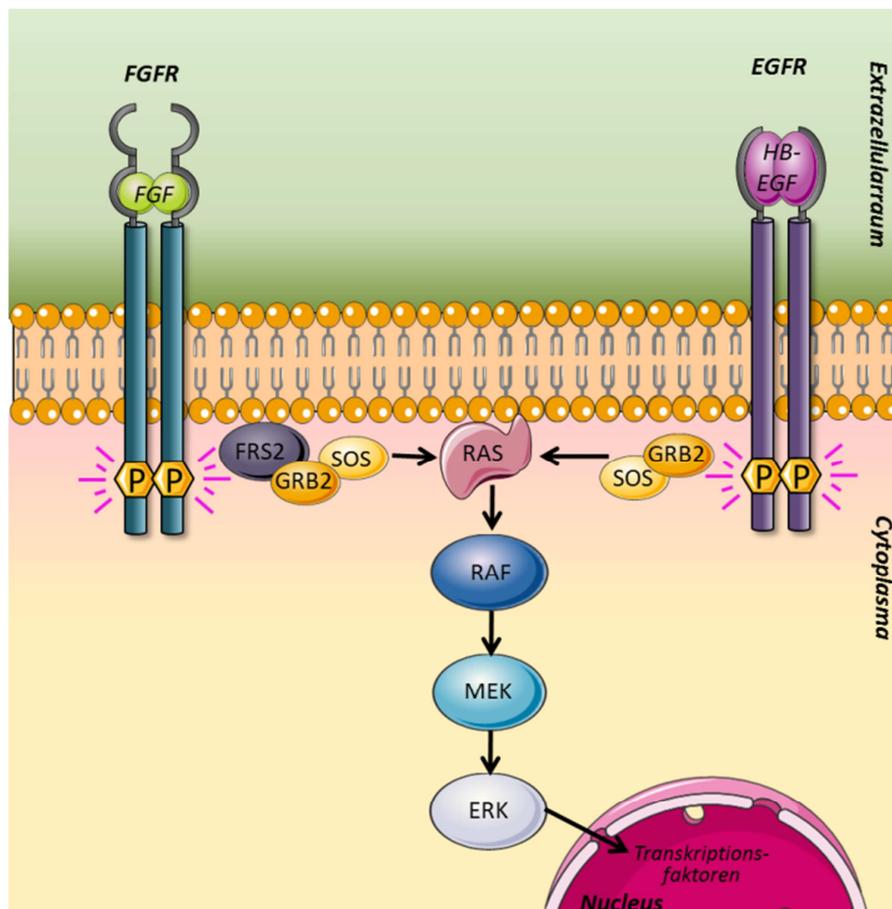


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signalkaskaden des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) und des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR). Jeweils zwei Liganden (HB-EGF bzw. FGF) vermitteln die Dimerisierung der entsprechenden Rezeptoren, was zu einer intrazellulären Autophosphorylierung führt (P). Über verschiedene Adapterproteine wird eine dreistufige Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-K)-Kaskade aktiviert, welche die MAP3K Raf, die MAP2K MEK und letztlich die MAP-Kinase ERK phosphoryliert. Dies führt zur Stimulation von Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Regulation der Genexpression (nach Goldfarb, 2001 & Katzel *et al.*, 2009).

1.2.1.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR)

Die ersten Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors*, FGFs) wurden in den 1970er Jahren entdeckt und beschrieben (Gospodarowicz, 1974). Heute sind 23 dieser Wachstumsfaktoren bekannt, die nicht nur, wie ursprünglich angenommen, einen Einfluss auf das Fibroblasten-Wachstum haben, sondern auch die Proliferation und Differenzierung von fast allen anderen Zelltypen beeinflussen können. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Angiogenese und werden auf Grund ihrer vielseitigen mitogenen Aktivität als therapeutischer Ansatz z. B. bei Knorpelschäden (Arthrose) diskutiert. Es handelt sich um Peptide mit einem Molekulargewicht von 7 – 38 kDa, welche über den sekretorischen Weg freigesetzt werden (Eswarakumar *et al.*, 2005).

Erkannt und gebunden werden diese Wachstumsfaktoren von der Familie der FGFRs (*fibroblast growth factor receptors*), welche vier Mitglieder umfasst (FGFR1-4). Von FGFR1-3 gibt es unterschiedliche Spleißvarianten, welche mit „b“ und „c“ benannt werden, so dass insgesamt sieben verschiedene Isoformen dieser Rezeptorfamilie bekannt sind. Alle FGFRs besitzen drei extrazelluläre Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen (D1-3), welche die Ligandenbindung vermitteln, sowie eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Die unterschiedlichen Varianten der Rezeptoren, die durch alternatives Spleißen entstehen, unterscheiden sich in der Ig-ähnlichen Domäne D3 und weisen unterschiedliche Ligandenbindungs-Spezifitäten auf (Plotnikov *et al.*, 2000). Manche Isoformen werden exklusiv in bestimmten Zellen exprimiert, wohingegen auf anderen Zellen verschiedene Isoformen vorkommen. Die Spleißvariante FGFR2b ist beispielsweise Keratinocyten-spezifisch und hat eine sehr hohe spezifische Affinität zu dem Liganden FGF7, welcher deshalb auch als KGF (*keratinocyte growth factor*) bezeichnet wird. FGF7 bindet außer FGFR2b keinen anderen Rezeptor aus der FGFR-Familie und wird von Fibroblasten synthetisiert. Es hat selbst keinen mitogenen Effekt auf Fibroblasten oder Endothelzellen, sondern nur auf Keratinocyten (Eswarakumar *et al.*, 2005; de Giorgi *et al.*, 2007).

Der Signalweg, der bisher für die Aktivierung von FGFRs beschrieben ist, umfasst Adaptermoleküle wie FRS (*FGF receptor substrate*) 2α und FRS 2β und führt letztendlich zu einer direkten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinases 1/2*) (Cotton *et al.*, 2008) (siehe Abbildung 5).

1.2.1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein Mitglied der ErbB-Rezeptor-Familie, welche aus vier nah verwandten RTKs besteht: EGFR (ErbB1), Her2/c-neu (ErbB2), Her3 (ErbB3) und Her4 (ErbB4) (Lurje & Lenz, 2010). Der EGFR ist für viele biologische Prozesse essentiell, was dadurch unterstrichen wird, dass die Komponenten der EGFR-vermittelten Signalkaskade in vielen Spezies konserviert sind (White *et al.*, 2012).

Zu den Liganden für diesen Rezeptor zählen TGF α (*transforming growth factor α*), EGF (*epidermal growth factor*), HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), Betacellulin, Epiregulin und Amphiregulin (Harris *et al.*, 2003). Diese Liganden werden, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, als membrangebundene Vorläuferproteine synthetisiert und erst durch die proteolytische Freisetzung durch ADAM-Proteasen aktiviert. ADAM10 ist die Haupt-*Sheddase* für Betacellulin und EGF, wohingegen die anderen Liganden bevorzugt von ADAM17 gespalten werden (Sahin *et al.*, 2004).

Der EGFR vermittelt Antworten, welche in der Regel eine anti-apoptotische Wirkung haben und daher das Überleben von Zellen fördern. Dies umfasst Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung. In vielen Tumoren ist der EGFR überexprimiert oder wird unreguliert dauerhaft stimuliert, was dann zu dem charakteristischen unkontrollierten Zellwachstum bei Krebserkrankungen führt (Dhomen *et al.*, 2012).

Der klassische Signalweg, der für die EGFR-Aktivierung beschrieben ist, führt direkt zu der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (Xue & Lucocq, 1998). 1999 wurde gezeigt, dass die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors indirekt ebenfalls zur Aktivierung des EGFR führt. Dieser Mechanismus kann als Transaktivierung bezeichnet werden und wird durch die Metalloprotease ADAM17 vermittelt, da diese die Freisetzung der EGFR-Liganden bewirkt (Prenzel *et al.*, 1999). Diese Art der Transaktivierung wurde außerdem für einige Rezeptor-Tyrosinkinasen wie den VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) (Swendeman *et al.*, 2008) und den PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) (Mendelson *et al.*, 2010) gezeigt. In diesen Fällen führten zwei Wege zur Phosphorylierung von ERK1/2: Zum einen wurden diese MAP-Kinasen direkt durch den primären Rezeptor stimuliert und zum anderen zusätzlich durch den EGFR. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob auch die

Keratinocyten-spezifische Isoform FGFR2b dazu in der Lage ist, den EGFR zu transaktivieren.

1.2.2 MAP-Kinasen

In Säugetieren sind drei Haupt-Signalwege bekannt, in die verschiedene Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-K) involviert sind. Benannt sind sie jeweils nach den terminalen MAP-Kinasen, die über diese Wege aktiviert werden. Man unterscheidet den ERK (*extracellular-signal regulated kinase*)-, den JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)- und den p38-MAP-K-Signalweg (Davis, 1994).

Alle MAP-Kinase-Kaskaden funktionieren nach dem gleichen Schema: GTP-bindende Proteine („kleine GTPasen“ genannt) fungieren als molekulare Schalter und aktivieren eine mindestens dreistufige Kaskade, die eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) und eine MAP-Kinase (MAP-K) umfasst. Diese nacheinander geschalteten Kinasen phosphorylieren sich jeweils gegenseitig und potenzieren das Signal innerhalb der Zelle (Johnson & Vaillancourt, 1994; Robinson & Cobb, 1997). Der bekannteste Vertreter der kleinen GTPasen, welcher in vielen Signaltransduktionswegen involviert ist, ist Ras (Robbins *et al.*, 1992).

In der Kaskade, die zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt, ist Raf die typische MAP3K und MEK1/2 eine typische MAP2K. Stimulatoren für diesen Signalweg sind hauptsächlich Wachstumsfaktoren, welche Effekte wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung zur Folge haben (Garrington & Johnson, 1999).

Die Signalwege, die zur Aktivierung von JNK und p38 führen, weisen in den oberen Ebenen zum Teil Gemeinsamkeiten auf. So sind zum Beispiel MAP3-Kinasen wie TAK1 (*TGF β activated kinase-1*) in der Lage, sowohl eine JNK- als auch eine p38-Phosphorylierung einzuleiten. Auch manche MAP2-Kinasen, wie MKK4, sind relativ unspezifisch und aktivieren beide MAP-Kinasen, wohingegen andere spezifisch entweder JNK (MKK7) oder p38 (MKK3) phosphorylieren. Durch diese Überschneidungen gibt es nur wenige Stimuli, die gezielt nur JNK-MAP-Kinasen aktivieren ohne gleichzeitig auch p38 zu stimulieren oder andersherum. Beide Signalwege sind sensitiv für Stressmediatoren wie Cytokine, UV-Bestrahlung, Hitze oder osmotischen Stress und sind daher an Prozessen wie Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt (Ip & Davis, 1998; Nebreda & Porras, 2000).

1.2.3 Toll-like Rezeptoren

Neben den oben beschriebenen Rezeptoren werden in dieser Arbeit auch Toll-*like* Rezeptoren (TLRs) untersucht. Toll-*like* Rezeptoren werden der Gruppe der PRRs (*pattern recognition receptors*) zugeordnet und dienen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems der Erkennung von pathogenen Strukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Zu diesen Strukturen zählen charakteristische Bestandteile von Bakterien, Viren oder Pilzen. TLRs sind in Pflanzen, adulten Insekten und in Vertebraten an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt, da sie es ermöglichen, zwischen selbst und nicht-selbst zu unterscheiden (Beutler, 2004).

Sie induzieren die Produktion von Effektormolekülen, welche zu einer Reaktion des angeborenen und zum anderen das adaptive Immunsystem anregen.

Zu den Liganden zählen beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), welche in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien vorkommen, und Lipoproteine. Auch Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie Lipoteichonsäure (LTA) oder Peptidoglykan (PGN) oder die Hauptkomponente der bakteriellen Geißeln, Flagellin, werden von den Rezeptoren erkannt. Intrazelluläre TLRs wie TLR3 erkennen beispielsweise doppelsträngige RNA, wie sie von Viren in die Zelle eingebracht werden kann (Tsan & Gao, 2004).

Alle elf bekannten TLRs besitzen eine einfache, die Membran durchspannende Domäne. Nur sieben Mitglieder dieser Rezeptorfamilie befinden sich auf der Zelloberfläche, während vier in der Membran von intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind. Ein Strukturmerkmal, das allen TLRs gemeinsam ist, sind die extrazellulären Leucin-reichen Bereiche (*leucine rich repeats*, LRRs), von denen mehrere Kopien hintereinander gelagert sind. Am C-terminalen cytoplasmatischen Ende besitzen TLRs eine Domäne, die homolog zu der des Interleukin (IL)-1-Rezeptors ist und daher als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet wird (Takeda & Akira, 2005).

Von dieser geht nach der Ligandenbindung die Signalkaskade aus, wobei das erste direkte Adapter-Protein, das sich an die intrazelluläre TIR-Domäne anlagert, meist MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) ist. MyD88 enthält ebenfalls eine TIR-Domäne und rekrutiert die Serin/Threonin-Kinasen IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) 1 und 4.

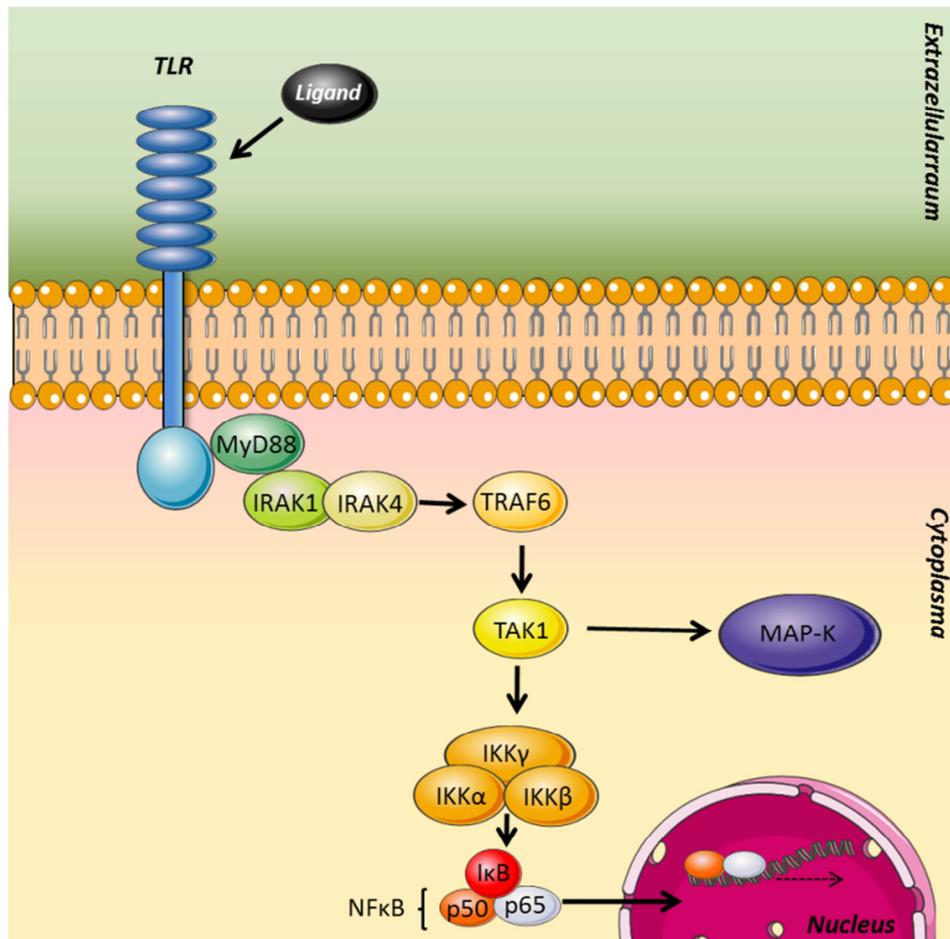


Abbildung 6: Schematische Darstellung der TLR-vermittelten Signalkaskade. Die Bindung des Liganden bewirkt die Assoziation von MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) an den Toll-like Rezeptor (TLR). Über dieses Adapter-Molekül werden die Kinasen IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) 1 und 4 phosphoryliert, was TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) aktiviert und darüber zu einer Phosphorylierung der Kinase TAK1 (*TGFβ activated kinase 1*) führt. Diese bewirkt sowohl die Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden als auch die Dissoziation und Aktivierung des IκB-Kinase (IKK)-Komplexes, was zur Freisetzung des Inhibitors IκB von dem NFκB-Dimer (Untereinheiten p50 und p65) führt. NFκB transloziert anschließend in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von für die Pathogen-Abwehr relevanten Genen reguliert (nach Akira & Takeda, 2004).

Über das Adaptermolekül TRAF-6 (*TNF receptor associated factor-6*) wird die MAP-Kinase-Kinase-Kinase TAK1 (*TGFβ activated kinase-1*) aktiviert, welche dann MAP-Kinasen aus der Familie der JNK oder p38-MAP-K stimulieren kann (Akira & Takeda, 2004). Auch die MAP-Kinasen ERK1/2 werden in einigen Veröffentlichungen direkt mit dem TLR-Signaltransduktionsweg in Verbindung gebracht (Adamo *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2010). Der klassische und für die antipathogene Funktion von Toll-like Rezeptoren wahrscheinlich entscheidende Signalweg führt nach der Aktivierung der Kinase TAK1 jedoch zur Auflösung des IκB-Kinase (IKK)-Komplexes, welcher sich aus den drei Untereinheiten IKKα, β und γ zusammensetzt. Dies führt letztendlich zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NFκB, der im Cytosol durch die Bindung eines Inhibitors (IκB) inaktiv gehalten wird. Die Aktivierung der IκB-Kinasen

führt schließlich zu einer Phosphorylierung, Ubiquitinierung und folglich zur Degradation von I κ B, woraufhin NF κ B in den Zellkern translozieren kann und dort als Transkriptionsfaktor fungiert (Barton & Medzhitov, 2003). NF κ B setzt sich als Homo- oder Heterodimer aus Mitgliedern der Familie der Rel-Proteine zusammen. Die bekannteste Form von NF κ B ist das Heterodimer p50:p65Rel (siehe Abbildung 6).

Die Gene, die durch NF κ B reguliert werden, codieren hauptsächlich für proinflammatorische Cytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α und für Chemokine wie IL-8, die dann der Aktivierung und Anlockung von Immunzellen dienen. Zusätzlich wird aber auch die Expression von Genen wie zum Beispiel von β -Defensinen induziert, welche für Proteine codieren, die Pathogene direkt bekämpfen (Steubesand *et al.*, 2009; Pahl *et al.*, 2011).

Es handelt sich bei dem hier beschriebenen und in Abbildung 6 dargestellten Signalweg um eine beispielhafte Kaskade, wie sie z.B. für TLR4 und seinen Liganden LPS ausführlich untersucht wurde. Eine ähnliche Kaskade wird im Prinzip von allen TLRs aktiviert, jedoch ermöglichen unterschiedliche Adapter-Moleküle, die von den verschiedenen TLRs benutzt werden, eine differenziertere Antwort (Häcker *et al.*, 2006).

Während der Toll-*like* Rezeptor-vermittelte Signalweg, der zur Aktivierung von NF κ B führt, recht ausführlich untersucht worden ist, ist noch unklar, welche Rolle die unterschiedlichen MAP-K-Signalkaskaden im Kontext der TLR-Aktivierung spielen, welche Effekte sie genau haben und ob diese direkt oder indirekt stimuliert werden. Insbesondere über die Aktivierung des ERK/MAP-K-Signalweges durch TLRs ist wenig bekannt. Untersuchungen mit Lungenepithelzellen haben gezeigt, dass TLRs in der Lage sind über den oben beschriebenen, ADAM17-vermittelten Transaktivierungs-Mechanismus den EGFR zu aktivieren, was ebenfalls zu der Phosphorylierung von ERK1/2 führt (Koff *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob TLRs auch auf Keratinocyten den EGFR transaktivieren können und wie die MAP-Kinasen ERK1/2 in diesen Signalweg involviert sind.

1.3 Zielsetzung

Die durch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) vermittelte Signaltransduktion spielt eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen während der Entwicklung eines Organismus und ist außerdem in pathologische Ereignisse wie Krebs involviert. Ein genaues Verständnis der Aktivierung und Regulation dieses wichtigen Signalweges ist notwendig, um mögliche therapeutische Strategien gegen Krankheiten zu entwickeln, bei denen dieser Rezeptor eine Rolle spielt. Die Metalloprotease ADAM17 ist an der Aktivierung dieses Signalweges beteiligt, da sie EGFR-Liganden proteolytisch von der Membran ablöst und sie somit aktiviert. Vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass die Stimulation eines G-Protein gekoppelten Rezeptors zu einer Aktivierung des EGFRs führt und dass ADAM17 dabei eine Schlüsselrolle als EGFR-Liganden freisetzende *Sheddase* zukommt. Anschließend wurde dieser Mechanismus der ADAM17-abhängigen EGFR-Transaktivierung auch für andere Rezeptoren, u.a. aus der Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob auch die Keratinocyten-spezifische Isoform des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR2b) in der Lage ist, den EGFR zu transaktivieren und wenn ja, ob ADAM17 in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. Insbesondere über die Mechanismen der physiologischen Regulation dieser Protease ist heute wenig bekannt, deshalb sollte in dieser Arbeit außerdem untersucht werden, wie die Aktivierung der proteolytischen Aktivität durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren, aber auch mit unphysiologischen Stimuli wie PMA oder Ionomycin vermittelt wird. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Transmembrandomäne von ADAM17 eine Rolle bei der Regulation der *Shedding*-Aktivität spielen könnte, weshalb die Aminosäurezusammensetzung dieser α -Helix in der vorliegenden Arbeit genauer analysiert wurde.

Auch eine andere Rezeptorklasse, die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), sollten auf ihre Fähigkeit zur Transaktivierung des EGFR in Abhängigkeit von ADAM17 untersucht werden. TLRs sind als Bestandteil des angeborenen Immunsystems in Keratinocyten besonders wichtig, da die Haut als Barriere zwischen Organismus und Umwelt vielen Pathogenen ausgesetzt ist. In anderen Epithelien wie dem Lungenepithel wurde bereits beschrieben, dass TLRs ADAM17 und somit den EGFR-Signalweg aktivieren können. In dieser Arbeit sollte dies nun für das dermale Epithel in Keratinocyten am Beispiel des TLR1/2-Komplexes untersucht werden.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

12-Loch-Zellkulturplatten , <i>BD Falcon™</i>	BD Biosciences, New Jersey
6-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
-80°C-Schrank <i>Forma 900 Series</i>	Thermo Scientific, Massachusetts
Absaug-Pumpe <i>BVC professional</i>	Vacuubrand, Wertheim
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank <i>HERA cell 150</i>	Thermo Scientific, Massachusetts
Einfrier-Behälter <i>Nalgene® Mr. Frosty</i>	Thermo Scientific, Massachusetts
Fotokamera <i>EOS 1100D</i> , mit Mikroskop-Aufsatz	Canon, Tokio
Frischhaltebox , luftdicht	EMSA, Emsdetten
Fusion FX7	Peqlab, Erlangen
Gel-Blotting-Papiere , Whatman 1,5mm	Roth, Karlsruhe
Kippschüttler <i>Unitwist-RT</i>	Uniequip, Planegg
Lichtmikroskop , invers	Hund, Wetzlar
Mikro-Schraubröhre , 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten , 96-Loch, flacher Boden	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten-Photometer <i>EL800</i>	BioTek, Vermont
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S , Modellnr.: 45-1010-i	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Gelsystem Mini S , Modellnr.: 40-0708	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Semi Dry Elektroblotter , Modellnr.: 52-2020	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S , Modellnr.: 52-WEB-10	Peqlab, Erlangen
Präparationsbesteck	FST, Heidelberg
Reaktionsgefäße , 2 ml / 1,5 ml / 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rollentisch <i>Stuart SRT6</i>	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire
Roti®-PVDF-Membran , 0,45 µm	Roth, Karlsruhe
Schüttelinkubator <i>Minitron</i>	Infors HT, Bottmingen
Schüttelkolben , 1000 ml und 300 ml	Schott, Mainz
Serologische Pipetten , 5 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Spannungsgeber EV231 Spritzenfilter , 0,45 µm Porendurchmesser	Peqlab, Erlangen Sarstedt, Nümbrecht
Thermozykler <i>peqSTAR 96 universal</i>	Peqlab
Überkopfschüttler , <i>MACS Mix</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Vortexer <i>Vortex Genie</i>	IKA, Staufen
Wärmeschrank Wasseraufbereitungssystem <i>TKA GenPure</i> Wasserbad <i>GFL1004</i>	Memmert, Schwabach TKA, Niederelbert GFL, Burgwedel
Zellkulturflaschen , 75 cm ² Zellkulturschalen , Ø 10 cm Zellschaber , 16 cm und 25 cm Zellsieb , 40 µm Nylon Zentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i> Festwinkelrotor F45-30-11 Zentrifuge <i>Centrifuge 5424</i> Festwinkelrotor FA45-24-11 Zentrifuge <i>Centrifuge 5804R</i> Festwinkelrotor F34-6-38 Zentrifuge <i>Centrifuge 5810R</i> Ausschwingrotor A-4-62 Zentrifuge <i>Heraeus Multifuge X3R</i> Festwinkelrotor F14-6x250LE Zentrifugenröhrchen , 50 ml und 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht BD Biosciences, New Jersey Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Thermo Scientific Sarstedt, Nümbrecht

2.2 Chemikalien

1,10-Phenanthrolin	Roth, Karlsruhe
Agar Agar Ammoniumperoxodisulfat (APS) Ampicillin Apyrase aus Kartoffel	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen
Bapta AM Betaisodona [®] BCIP [®] / NBT , <i>Sigma FAST</i> [™] (#B5655)	Tocris Bioscience, Bristol Mundipharma, Limburg Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl₂) Cetuximab C225 Choleratoxin Coomassie Plus [™] <i>Protein Assay Reagent</i>	Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Diphtherietoxin CRM197	Sigma, Deisenhofen
DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , High Glucose (4,5 g/l)	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
ECL Advanced	GE Healthcare, New Jersey
EDTA , Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
EGF , rekombinant murin	Immunotools, Friesoythe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol , 96 % (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
FGF7 , rekombinant human	Immunotools, Friesoythe
Flagellin aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dr. U. Gerstel
GI254023X (GI)	GlaxoSmithKline, London
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Gö6976	Sigma, Deisenhofen
GW280264X (GW)	GlaxoSmithKline, London
HB-EGF , rekombinant human	PeproTech, New Jersey
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hexokinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma, Deisenhofen
Ionomycin (IO)	Calbiochem, Schwalbach
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
KGM2 <i>Keratinocyte growth medium 2</i> , ready-to-use	Promocell, Heidelberg
Kollagen aus Rattenschwanz	Roche, Grenzach-Whylen
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>E. coli</i>	Sigma, Deisenhofen
Lipoteichonsäure (LTA) aus <i>S. faecalis</i>	Sigma, Deisenhofen
LY294002	EMD Chemicals (jetzt EMD Millipore, Massachusetts)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Marimastat (MM)	Tocris Bioscience, Bristol
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Pam₃Cys-SKKKK	Genaxxon BioScience, Ulm
Penicillin/Streptomycin (100-fach)	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
Peptidoglykan (PGN) aus <i>S. aureus</i>	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase-Inhibitor-Mix, PhosStop	Roche, Grenzach-Whylen
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	Sigma, Deisenhofen
pNPP-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
PP2	Calbiochem, Schwalbach
PPADS	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Mix, Complete	Roche, Grenzach-Whylen
Proteinmarker PageRuler™	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (HCl)	Roth, Karlsruhe
Suramin	Sigma, Deisenhofen
Tamoxifen	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Transfektionsreagenz HiPerFect	Quiagen, Hilden
Transfektionsreagenz TurboFect	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween® 20 (Polyoxyethylen-(20)-Sorbitan-Monolaurat)	Roth, Karlsruhe
Tyrphostin AG1478	Sigma, Deisenhofen
U73122	Sigma, Deisenhofen

2.3 Kits

QuickChange® II Site-directed Mutagenesis	Stratagene, Kalifornien
PureYield™ Midiprep-Kit	Promega, Wisconsin
GeneJET Plasmid Miniprep-Kit	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)

2.4 Software

Adobe Photoshop CS4 Extended	Adobe Systems, Kalifornien
AxioVision 4.8	Carl Zeiss, Jena
Bio 1D	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, North Carolina
Fusion 15.17	Vilber Lourmat, Eberhardzell
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Kalifornien
Mendeley 1.8.3	Mendeley Ltd., London
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2010	Microsoft Corp., Washington
QuickChange® Primer Design (http://www.stratagene.com/qcprimerdesign)	Stratagene, Kalifornien

Die Abbildungen Abbildung 2, Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 25 und Abbildung 26 wurden mit Hilfe der Powerpoint-Vorlagen von Servier Medical Art angefertigt (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

2.5 Stimulantien und Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Stimulantien und Inhibitoren wurden in den in Tabelle 2 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt, sofern dies nicht anders gekennzeichnet ist.

Tabelle 2: verwendete Stimulantien und Inhibitoren

Bezeichnung	Verwendung	eingesetzte Konz.
AG1478	EGFR-Kinase-Inhibitor	1 μ M
Apyrase	ATPase	2 U/ml
Bapta AM	Ca ²⁺ -Chelator (membrangängig)	50 μ M
Cetuximab	EGFR-blockierender Antikörper	10 μ g/ml
CRM197	HB-EGF-Inaktivator	10 μ g/ml
EGTA	Ca ²⁺ -Chelator	3 mM
FGF7 (<i>fibroblast growth factor 7</i>)	FGFR2b-Ligand	20 ng/ml
Flagellin	TLR5-Ligand	1 μ g/ml
GI254023X (GI)	präferentieller ADAM10- Inhibitor	3 μ M
Gö6976	PKC-Inhibitor	5 μ M
GW280264X (GW)	präferentieller ADAM17/10- Inhibitor	3 μ M
HB-EGF (<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>)	EGFR-Ligand	50 ng/ml
Hexokinase	ATP-Hydrolase	2 U/ml
Ionomycin (IO)	Ca ²⁺ -Ionophor	1 μ M
Kaliumchlorid (KCl)	Aufhebung des Ionen- Konzentrationsgefälles	10 mM
Lipopolysaccharid (LPS)	TLR4-Ligand	1 μ g/ml
Lipoteichonsäure (LTA)	TLR2/6-Ligand	10 μ g/ml
LY294002	PI3-Kinase-Inhibitor	10 μ M
Marimastat	Metalloprotease-Inhibitor	5-10 μ M
Pam ₃ Cys	TLR1/2-Ligand	20 μ g/ml
Peptidoglykan (PGN)	TLR2/6-Ligand	10 μ g/ml
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	PKC-Agonist	200 ng/ml
PP2	Src-Kinase-Inhibitor	10 μ M
PPADS	P2X-Rezeptor-Inhibitor	100 μ M
Suramin	P2-Rezeptor-Inhibitor	50 μ M
U73122	PLC-Inhibitor	10 μ M

2.6 Antikörper

Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	immunisierte Spezies	Verdünnung WB
ADAM17	C. Blobel (<i>HSS</i> , NY)	Kaninchen	1:1000
EGFR	Cell signaling	Kaninchen	1:1000
ERK	Cell signaling	Maus	1:1000
FGFR2b	Sigma	Kaninchen	1:1000
GAP-DH (POD-gekoppelt)	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000
HA (3F10)	Roche	Ratte	1:3000
NFκB	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000
phospho-EGFR	Cell signaling	Kaninchen	1:1000
phospho-ERK	Cell signaling	Kaninchen	1:1000

Tabelle 4: verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Firma	Kopplung	Verdünnung WB
Schaf-α-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch	POD	1:10.000
Ziege-α-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch	POD	1:10.000
Ziege-α-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch	POD	1:10.000

2.7 Plasmide

Tabelle 5: verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Bezug
ADAM10-E/A	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
ADAM10-WT	pcDNA3.1 (Invitrogen)	AG Saftig (Inst. f. Biochemie, Kiel)
ADAM10-Δcyto	pcDNA3.1 (Invitrogen)	AG Saftig (Inst. f. Biochemie, Kiel)
ADAM17 CD62L	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
ADAM17-E/A	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
ADAM17-WT	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
ADAM17-Δcyto	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
Betacellulin-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
CD40-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
FGFR2b	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
FGFR2b-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
HB-EGF-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
TGFα-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)
TNFα-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (<i>HSS</i> , New York)

2.8 Mauslinien

Zur Untersuchung der Rolle von ADAM17 bei der Signalübertragung vom FGFR2b (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2b*) auf den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) wurden Keratinocyten aus konditionalen *knockout*-Mäusen verwendet. Die Mäuse wurden im Labor von Carl Blobel (*Hospital for Special Surgery, New York*) generiert und tragen eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase, sowie einen loxP-flankierten Genabschnitt, der für ADAM17 codiert.

Um die spezifische Deletion des Zielgens (ADAM17) zu erlangen, wurden zwei genetisch veränderte Mauslinien verpaart. Eine Linie trägt eine Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinase, welche mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert ist. Diese inhibiert die Rekombinaseaktivität solange, bis ein synthetischer Ligand, in diesem Fall Tamoxifen, bindet. Die Liganden-Bindungsdomäne des Steroidrezeptors besitzt keine Affinität gegenüber dem endogenen Liganden (z.B. Östradiol), so dass eine frühzeitige oder unkontrollierte Aktivierung der Cre-Rekombinase verhindert wird. Eine aktive Cre-Rekombinase erkennt, schneidet und religiert DNA an definierten loxP-Stellen, so dass der von diesen flankierte („gefloxt“) Genabschnitt entfernt wird.

Der verwendete Mausstamm, der die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Chicken beta actin*-Promoters exprimiert, wurde vom *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA) bezogen und wird im Folgenden als *CAG/Cre* bezeichnet (offizielle Bezeichnung: B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1*)5Amc/J).

Die zweite Mauslinie trägt „gefloxt“ Allele des Gens, das für ADAM17 codiert und wird als *Adam17flox/flox* bezeichnet. Die loxP-Sequenzen befinden sich in den Introns, die Exon 2 des ADAM17-Gens flankieren, so dass keine Beeinträchtigung der Genexpression besteht, bis die DNA an den loxP-Stellen durch eine Cre-Rekombinase geschnitten wird (Horiuchi *et al.*, 2007a).

Die beiden Mauslinien wurden miteinander verpaart und Tiere aus der F2 Generation (*Adam17flox/flox/CAG/Cre* × *Adam17flox/flox*) wurden für die Präparation der Keratinocyten verwendet (siehe 2.9.7).

Die Induktion des Gen-*knockouts* erfolgte *in vitro* durch Zugabe von Tamoxifen zu den primären Keratinocyten. Es wurde alle zwei Tage 1 µM Tamoxifen in das Keratinocytenmedium gegeben, bis diese 80 % Konfluenz erreicht haben.

2.9 Zellkultur

Alle verwendeten Lösungen und Materialien waren steril.

2.9.1 Zelllinien

A431

Die A431-Zelllinie wurde aus einem epidermoiden Karzinom aus der Haut einer 85-jährigen Patientin gewonnen und zeichnet sich durch eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche aus.

COS7

Die COS7-Zelllinie entstand aus Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die mit dem SV-40 Virus transformiert wurden.

HaCaT (*Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes*)

HaCaT-Zellen sind spontan immortalisierte, nicht-kanzerogene Keratinocyten. Die Zelllinie entstand im deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (Boukamp *et al.*, 1988) aus kultivierten Keratinocyten eines 62-jährigen Mannes.

Murine embryonale Fibroblasten (meFs)

Die murinen embryonalen Fibroblasten wurden aus entsprechenden *knockout*-Mäusen im Biochemischen Institut der Universität Kiel gewonnen (Hartmann *et al.*, 2002). Es wurden ADAM10- bzw. ADAM17-defiziente Fibroblasten verwendet, sowie Zellen, denen beide Proteasen fehlen (ADAM10/17 dKO). Als Kontrolle dienten Fibroblasten aus Wildtyp-Geschwistertieren.

2.9.2 Kultivierung von Zelllinien

Medium und Lösungen:

Kulturmedium	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)
PBS pH 7,2	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Trypsin-EDTA	10-fach

Es wurden ausschließlich adhärent wachsende Zelllinien und Zellen verwendet.

Sämtliche Zelllinien wurden bei 37 °C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen in einem Volumen von 10 ml Kulturmedium. Die verwendeten Lösungen wurden bei 4 °C gelagert und vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 – 90 % passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 Minuten inkubiert, so dass sie sich von der Zellkulturschale ablösen.

Um die proteolytische Aktivität des Trypsins zu beenden, wurden 5 ml serumhaltiges Medium hinzugefügt und die Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 200 × g für 5 Minuten sedimentiert (*Centrifuge* 5810R, Eppendorf). Das Zellsediment wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in gewünschter Verdünnung, abhängig von der Proliferationsrate der Zellen, in neuen Zellkulturschalen subkultiviert oder für Stimulationsversuche in 6- oder 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät.

2.9.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Einfrriermedium	DMEM mit 20 % FKS (v/v) und 10 % DMSO (v/v)
------------------------	---

Zur Konservierung von eukaryotischen Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 – 100 % mit Hilfe

von Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei $200 \times g$ für 5 Minuten sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einem Einfrier-Behälter (Nalgene®, *Mr. Frosty*), der eine schonende Abkühlgeschwindigkeit von $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ gewährleistet, für 2 Tage bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, bevor sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zur endgültigen Lagerung überführt wurden.

2.9.4 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Kulturmedium	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin in <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)
---------------------	--

Die Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter so schnell wie möglich im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen. Das Einfriermedium wurde durch eine 5 minütige Zentrifugation bei $200 \times g$ entfernt. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale transferiert. 24 Stunden nach dem Auftauen wurde das Medium gewechselt.

2.9.5 Kollagenisierung von Zellkulturgefäßen

Um die Anhaftung der primären Keratinocyten an die Oberflächen der Zellkulturgefäße zu erleichtern, wurden diese mit dem Strukturprotein Kollagen beschichtet.

Puffer und Lösungen:

Kollagen-Lösung	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen in 0,02 M HCl
PBS pH 7,2	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH_2PO_4 10,1 mM Na_2HPO_4

Die Zellkulturplatten und -flaschen wurden mit einem entsprechenden Volumen Kollagenlösung versehen, so dass die Oberfläche vollständig benetzt war. Anschließend wurden sie für 30 min bei 37 °C inkubiert und dreimal mit PBS gespült. Bis zu ihrer Verwendung wurden die kollagenisierten Zellkulturgefäße bei Raumtemperatur trocken gelagert.

2.9.6 Präparation und Kultivierung von primären humanen Keratinocyten

Primäre humane Keratinocyten wurden aus juvenilen oder adulten Vorhäuten gewonnen, die aus der Praxis für Kinderchirurgie (Dr. A. Eckstein, Kiel) oder aus dem Städtischen Krankenhaus Kiel bezogen wurden. Es wurden außerdem primäre Keratinocyten von der Firma Promocell (Heidelberg) verwendet, die zur Unterscheidung im Folgenden als NHEKs (*Normal Human Epidermal Keratinocytes*) bezeichnet werden. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einem Brutschrank, der mit 5 % CO₂ begast wurde.

Medium und Lösungen:

DMEM-Kulturmedium	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)
Keratinocytenmedium	<i>SupplementMix</i> 0,004 mg/ml <i>Bovine Pituitary Extract</i> 0,125 ng/ml <i>Epidermal Growth Factor</i> (rekombinant human) 5 µg/ml Insulin (rekombinant human) 0,33 µg/ml Hydrokortison 0,39 µg/ml Epinephrin 10 µg/ml Transferrin, holo (human) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,06 mM CaCl ₂ in <i>Keratinocyte Growth Medium 2</i> (KGM2)
PBS pH 7,2	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Trypsin-Lösung	0,1 % Trypsin in PBS

Nach der Zirkumzision wurden die Vorhäute in DMEM-Kulturmedium bei 4 °C gelagert und innerhalb von einem Tag verarbeitet.

Die ringförmigen Vorhäute wurden aufgeschnitten und flach ausgebreitet, um Fett- und Bindegewebe sowie die Unterhaut mit Blutgefäßen zu entfernen. Die Haut wurde anschließend mit einem Skalpell in möglichst schmale Streifen zerschnitten. Diese wurden in Trypsin-Lösung bei 4 °C inkubiert und nach 24 Stunden mit DMEM Kompletmedium versetzt, um die proteolytische Aktivität des Trypsins zu unterbinden. Mit einer Pinzette wurde die Epidermis von den einzelnen Hautstreifen abgezogen und in frisches Keratinocytenmedium überführt. Außerdem wurden möglicherweise noch an der Dermis anhaftende Zellen mit einer Pinzette abgeschabt und ebenfalls in Keratinocytenmedium aufgenommen.

Die Zellen sowie die Epidermis-Stücke wurden vereinzelt und durch ein Zellsieb (40 µm) gepresst. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 200 x g für 5 min zentrifugiert (*Centrifuge* 5810R, Eppendorf). Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Keratinocytenmedium resuspendiert und in kollagenisierten Zellkulturflaschen ausgesät (Wiedow *et al.*, 1998). Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert oder für Stimulationsversuche in kollagenisierte 6- oder 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät.

Die Zellen wurden bis zur Passage 7 für Versuche eingesetzt.

2.9.7 Präparation und Kultivierung von primären murinen Keratinocyten

Primäre murine Keratinocyten wurden aus den Schwänzen von mindestens 6-8 Monate alten Mäusen gewonnen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einem Brutschrank, der mit 5 % CO₂ begast wurde.

Medium und Lösungen:

Iodlösung	Betaisodona®
Maus-Keratinocytenmedium	<i>SupplementMix</i> 0,004 mg/ml <i>Bovine Pituitary Extract</i> 0,125 ng/ml <i>Epidermal Growth Factor</i> (rekombinant human) 5 µg/ml Insulin (rekombinant human) 0,33 µg/ml Hydrokortison 0,39 µg/ml Epinephrin 10 µg/ml Transferrin, holo (human) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,06 mM CaCl ₂ 8 ng/ml Cholera toxin 20 ng/ml murines EGF in <i>Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2)</i>
PBS pH 7,2	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Trypsin-Lösung	1 % Trypsin in DMEM

Der Mausschwanz wurde zunächst für 5 min in Betaisodona-Lösung inkubiert und anschließend dreimal in 70 % EtOH gewaschen, um eine Kontamination der Zellkultur mit Bakterien weitestgehend zu vermeiden. Mit sterilisiertem Präparierbesteck wurde die Haut der Länge nach aufgeschnitten und der Knorpel entfernt. Die Haut wurde in ca. 2 cm lange Stücke geschnitten und mit der Dermis nach unten flach auf sterilem Filterpapier ausgebreitet, um für die anschließende Trypsinbehandlung möglichst großflächig zugänglich zu sein. Diese erfolgte für 90 Minuten bei 37 °C, wobei das Filterpapier mit der darauf aufliegenden Haut in einer 1 %igen Trypsinlösung inkubiert wurde. Danach konnte die Epidermis von der darunter liegenden Dermis abgezogen werden. Die Epidermisstücke wurden in PBS mit 10 % (v/v) FKS überführt und darin mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb (40 µm) gepresst, um Haare aus der

Präparation zu entfernen und die Zellen zu vereinzeln. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g für 5 min sedimentiert und in frischem Maus-Keratinocytenmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in kollagenisierte 6 – oder 12 –Loch-Zellkulturplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von 80-100 % für Stimulationsversuche eingesetzt.

2.10 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Medium und Lösungen:

Kulturmedium	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)
Transfektionsreagenz	<i>TurboFect</i> (Thermo Scientific)

Das Einbringen von Expressionsvektoren in eukaryotische Zellen erfolgte mit Hilfe der Lipofektion.

Das Pipettierschema für einen einfachen, doppelten oder dreifachen Transfektionsansatz ist in Tabelle 6 aufgeführt. Der fertige Transfektionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektion erfolgte in 12-Lochplatten. Es wurden pro Vertiefung 100 µl Transfektionsansatz tropfenweise zu 500 µl serumfreiem Medium ohne Antibiotika gegeben.

Der Zeitpunkt der Zugabe des Transfektionsansatzes wurde als Zeitpunkt t=0 betrachtet. Nach 6 Stunden wurde das Medium auf Kulturmedium gewechselt und nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen für Stimulationsversuche verwendet.

Tabelle 6: Pipettierschema für Transfektionsansätze

	Serumfreies Medium, µl	Plasmid, µg	Turbofect, µl
<i>Einfach Transfektion</i>	100	0,5 (z.B. AP-Substrat)	1
<i>Doppel-Transfektion</i>	100	0,5 µg AP-Substrat + 0,5 µg ADAM-Protease/Rezeptor	1,5
<i>Dreifach-Transfektion</i>	100	0,4 µg AP-Substrat + 0,4 µg ADAM-Protease + 0,7 µg Rezeptor	2

2.11 siRNA Transfektion

Medium und Lösungen:

Keratinocytenmedium	<i>SupplementMix</i> 0,004 mg/ml <i>Bovine Pituitary Extract</i> 0,125 ng/ml <i>Epidermal Growth Factor</i> (rekombinant human) 5 µg/ml Insulin (rekombinant human) 0,33 µg/ml Hydrokortison 0,39 µg/ml Epinephrin 10 µg/ml Transferrin, holo (human) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,06 mM CaCl ₂ in <i>Keratinocyte Growth Medium 2</i> (KGM2)
Transfektionsreagenz	<i>HiPerFect</i> (Quiagen)

Zur Herunterregulierung der Genexpression von ADAM17 und NFκB wurde siRNA mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *HiPerFect* (Quiagen) in die Zellen eingebracht.

Für ADAM17 wurde *StealthTM* siRNA (HSS186181, Invitrogen) verwendet und für NFκB wurde *StealthTM* siRNA (HSS109159, Invitrogen) eingesetzt, die gegen die Transaktivierungsdomäne RelA/p65 des p65/p50 NF-κB Komplexes gerichtet ist. Als Kontrolle diente *StealthTM low GC control* siRNA (12935-200, Invitrogen), die aus einer zufälligen Sequenz zusammengesetzt ist und keine Homologie zu bekannten Genen aufweist.

Die Zellen wurden bei 40 – 50 % Konfluenz mit einer finalen siRNA-Konzentration von 20 nM in 12-Loch-Platten transfiziert. Es wurden pro Ansatz 3 µl *HiPerFect* und 1 µl der 20 µM siRNA Stamm-Lösung zu 96 µl KGM2-Basalmedium pipettiert und für 15 min inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen in 900 µl Keratinocytenmedium ohne Antibiotika gegeben.

Der Zeitpunkt der Zugabe des Transfektionsansatzes wurde als Zeitpunkt t=0 betrachtet. Nach 21 Stunden wurde der Transfektionsansatz entfernt, indem das Medium gewechselt wurde und nach 48 bis 60 Stunden wurden die Zellen für Stimulationsversuche verwendet.

Um die Effizienz des Gen-*knockdowns* und vor allem die Degradation bereits vorhandenen Proteins zu überprüfen, wurden Western-Blot-Analysen von Zelllysaten durchgeführt.

2.12 Stimulation von Zellen und Herstellung von Zelllysaten

Lösungen:

Lysepuffer Western Blot pH 7,4	5 mM Tris 1 mM EGTA 250 mM Saccharose 1 % (v/v) Triton-X-100 10 mM 1,10-Phenanthrolin 1 × <i>Complete</i> Protease-Inhibitor-Mix (Roche) 1 × <i>PhosStop</i> Phosphatase-Inhibitor-Mix (Roche)	vor jeder Anwendung frisch zugefügt
Lysepuffer AP-Assay	1 mM EDTA 10 mM 1-10-Phenanthrolin 2,5 % (v/v) Triton-X-100 in H ₂ O	

Alle Zellen wurden vor der Stimulation mindestens eine Stunde in zusatzfreiem Basalmedium inkubiert und die Stimulation erfolgte anschließend ebenfalls in diesem Basalmedium.

Vor der Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden die Zellen 8 Stunden in serumfreiem Basalmedium inkubiert, um die Zellen für die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu sensibilisieren und zu gewährleisten, dass Rückstände von Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium verbraucht sind.

Inhibitoren wurden, wenn nicht anders beschrieben, 15 min vor der Stimulation zu den Zellen gegeben, damit die entsprechenden Ziel-Moleküle bereits blockiert bzw. inhibiert sind, wenn die Stimulation erfolgt.

Es wurden entsprechende Lösungsmittelkontrollen für die einzelnen Stimulantien und Inhibitoren eingesetzt.

Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgenommen und vor der weiteren Verwendung für 5 min bei 15 000 × g und 4 °C zentrifugiert (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf), um Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen. Wurden die Überstände nicht sofort für weitere Analysen verwendet, wurden sie bei -20 °C eingefroren.

Je nach Art der Analyse wurden unterschiedliche Lysepuffer verwendet. Der Protease-Inhibitor-Mix *Complete* sowie der Phosphatase-Inhibitor-Mix *PhosStop* wurden jeweils frisch aus einer 25- bzw. 10-fachen Stammlösung zugegeben. Auch das 1,10-Phenanthrolin wurde erst kurz vor der Verwendung hinzugefügt.

Die Zellen wurden direkt in der 12-Loch-Platte mit 150 µl gekühltem Lysepuffer versehen und mindestens 30 min bei 4 °C auf einem Kippschüttler geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend in dem Lysepuffer aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß

überführt und gevortext. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis und wiederholtem Vortexen wurden alle unlöslichen Zellbestandteile für 5 min bei $15\,000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sedimentiert (*Centrifuge 5417R*, Eppendorf). Der Extrakt wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und ggf. bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.13 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde nach Bradford ermittelt (Bradford, 1976). Es wurde eine gebrauchsfertige Coomassie-Lösung (Thermo Scientific) verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in Mikrotiterplatten nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Kalibrierreihe wurde BSA eingesetzt. Die Messung erfolgte im Plattenphotometer EL800 von BioTek bei 595 nm.

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte nach dem von Laemmli beschriebenen System (Laemmli, 1970).

Puffer und Lösungen:

Elektrophoresepuffer pH 8,8	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Rotiphorese Gel 30 Roth	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
APS	10 % (w/v) APS in H_2O
SDS-Probenpuffer	2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerin 125 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau

Es wurden vertikale Gelsysteme (Modellnr.: 45-1010-i, Peqlab) verwendet. Ein Gel hat eine Größe von ca. 9 cm × 7 cm × 1,5 mm.

Die Trennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Gel, das aus einem 4,5 %-igen Sammelgel und einem 7,5 %-igen Trenngel bestand (siehe Tabelle 7). Das Gel wurde direkt vor dem Gellauf in der Elektrophorese-Apparatur gegossen. Die Kammern, in der sich die Anode bzw. die Kathode befinden, wurden beide mit Elektrophoresepuffer befüllt. Die Auftragstaschen waren vollständig mit Puffer bedeckt und wurden mit diesem ausgespült und das gegenüberliegende Ende des Gels tauchte ebenfalls in den Puffer ein.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versehen und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, bevor sie in die Geltaschen gefüllt wurden. Zusätzlich wurden 5 µl des Protein-Größenstandards *PageRuler™ Plus* von Thermo Scientific aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 30 Minuten bei 70 V und wurde bei 90 V fortgesetzt, bis die Lauffront das Gelende erreicht hat.

Tabelle 7: Zusammensetzung von SDS-Gelen nach Laemmli. Die Angaben beziehen sich auf ein Gel.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidkonzentration (%)	7,5	4,5
Rotiphorese Gel 30	2,33 ml	0,835 ml
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
H ₂ O	5,0 ml	2,9 ml
TEMED	30 µl	15 µl
APS	60 µl	30 µl

2.15 Western-Transfer von Proteinen

Puffer und Lösungen:

Transfer-Puffer pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
100 % Methanol	

Um Proteine aus einem SDS-Gel (siehe 2.14) auf eine PVDF-Membran zu übertragen wurde das Verfahren des *Tank-Blottings* angewendet. Es wurde Filterpapier auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde ebenfalls entsprechend zugeschnitten und in Methanol aktiviert. Zum Proteintransfer wurde eine *Tank-Blot*-Apparatur mit 8,5 x 9,5 cm Elektrodenflächen verwendet. Die Membran und das Gel wurden zwischen je zwei Filterpapierblättern und einer Fasermatte auf beiden Seiten in die *Blotting*-Kassette eingelegt. Die Kassette wurde in die Apparatur eingesetzt, wobei sich die Membran auf der Seite der Anode befand und das Gel auf der der Kathode zugewandten Seite. Der Transfer wurde bei 80 mA für 12 – 15 Stunden durchgeführt.

2.15.1 Immunologische Detektion der transferierten Proteine

Puffer und Lösungen:

Blockierlösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer
TBS-Puffer pH 7,4	20 mM Tris 140 mM NaCl 1 mM EDTA
TBST-Puffer	0,001 % (v/v) Tween-20 in TBS-Puffer

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde in Blockierlösung langsam geschüttelt. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher in Blockierlösung verdünnt wurde (siehe Tabelle 3). Antikörper der Firma Cell Signaling wurden den Herstellerangaben entsprechend über Nacht bei 4 °C rollend auf der Membran inkubiert. Nachdem

ungebundener Antikörper dreimal für 5 min mit TBST abgewaschen wurde, wurde die Membran mit speziesspezifischen Sekundärantikörpern inkubiert, welche direkt an eine Peroxidase gekoppelt waren und in TBST-Puffer verdünnt wurden (siehe Tabelle 4). Es erfolgte abermals ein dreimaliger Waschschrift für 5 min in TBST, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

Die Antikörper-markierten Proteine wurden mit Hilfe des Peroxidase-Substrates ECL *Advanced* sichtbar gemacht, welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Die emittierte Chemilumineszenz wurde mit der CCD-Kamera des Fusion FX7-Instruments (Peqlab) aufgenommen.

2.15.2 Strippen von PVDF Membranen

Puffer:

Stripping-Puffer	62,5 mM Tris
pH 6,7	20 % (w/v) SDS
	+ 0,7 % (v/v) 2-Mercaptoethanol <i>frisch zugefügt</i>

Durch das Ablösen der gebundenen primären und sekundären Antikörper von der PVDF-Membran ist es möglich, einen Blot mehrmals mit unterschiedlichen Antikörpern zu markieren. Der Vorgang des Ablösens der Antikörper wird als *Stripping* bezeichnet. Die Membran wurde hierfür je nach Intensität der zuvor detektierten Banden für 15 - 45 min bei 65 °C in *Stripping*-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich in TBST gewaschen und erneut für 1 h in 5 % Blockierungslösung inkubiert.

2.16 Shedding-Experimente mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Substraten

Puffer und Lösungen:

AP-Puffer	100 mM NaCl
pH 9,5	100 mM Tris
	20 mM MgCl ₂
Substratlösung	1 Tablette p-NPP in AP-Puffer (\triangleq 1mg/ml)
NBT-BCIP-Lösung	1 Tablette BCIP/NBT in 10 ml H ₂ O

Um die proteolytische Aktivität verschiedener ADAM-Proteasen zu vergleichen und um deren Stimulierbarkeit und Substratspezifität zu untersuchen, wurden Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelte Substrate verwendet. Dies sind Substrate, die an ihrer extrazellulären Domäne mit einer Alkalischen Phosphatase fusioniert sind und in eukaryotische Zelllinien transfiziert wurden (siehe 2.10).

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase kann durch den Umsatz des chromogenen Substrates p-Nitrophenylphosphat (pNPP) nachgewiesen werden. Durch das Verhältnis der AP-Aktivität im Zellkulturüberstand und der AP-Aktivität im Zelllysat, wurde bestimmt, wie viel Prozent des gesamten Protease-Substrates in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurde.

Die Bestimmung erfolgte in Dreifachwerten. Es wurden je 100 µl Zellkulturüberstand und 10 µl Zelllysat, welches in 90 µl AP-Puffer verdünnt wurde, für die Messung in einer Mikrotiterplatte eingesetzt. Pro Vertiefung wurden 100 µl der Substratlösung zugegeben. Die Umsetzung von pNPP zu p-Nitrophenol wurde durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm im Plattenlesegerät EL800 (BioTek) gemessen. Um die gleichmäßige Expression dieser AP-gekoppelten Substrate zu überprüfen, wurden die Zelllysate unter nicht denaturierenden Bedingungen mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde für 30 – 60 min bei 37 °C mit NBT-BCIP-Lösung inkubiert, so dass die Umsetzung dieses Substrates durch die Alkalische Phosphatase im Gel durch eine Farbreaktion sichtbar wurde.

2.17 In vitro Wundheilungs-Versuch

Um den Einfluss untersuchter Signaltransduktionswege auf die Migration von Keratinocyten zu bestimmen, wurden *in vitro* Migrationsversuche durchgeführt. Dazu wurde eine 100 % konfluente Zellschicht aus Keratinocyten mit einem sterilen Zahnstocher zerstört. Abgelöste Zellen wurden mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit Basalmedium in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren oder Stimulantien für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Der zellfreie Bereich wurde nach 0, 12 und 24 Stunden betrachtet und mit einer Mikroskop-Kamera fotografiert. Eine Markierung auf der Unterseite der Platte stellt sicher, dass jeweils der gleiche Bereich aufgenommen wurde. Die Vermessung der zellfreien Bereiche erfolgte mit dem Programm *Axio Vision Rel. 4.8* (Zeiss). Die Fläche zum Startzeitpunkt entspricht 100 %.

2.18 Mutagenese

2.18.1 Ausgangsplasmid

Das Plasmid pcDNA-ADAM17, das für die Herstellung verschiedener Transmembran-Mutanten von ADAM17 verwendet wurde, setzt sich aus dem pcDNA3.1-Expressionsvektor von Invitrogen (Carlsbad, USA) und dem 2484 bp großen Fragment, das für murines ADAM17 codiert, zusammen. Dieses Fragment beinhaltet sowohl die Sequenz für die 214 AS lange Prodomäne als auch für das mature Protein, das aus 613 AS besteht. Der Expressionsvektor codiert zusätzlich für eine neun AS lange Hämaggglutinin (HA)-Markierung, die C-terminal an die intrazelluläre Domäne von ADAM17 angefügt wird. Das Plasmid wurde von Carl Blobel (*Hospital for Special Surgery*, New York) zur Verfügung gestellt. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete AS-Sequenz der Transmembrandomäne sind in Abbildung 7 dargestellt. Rot markiert sind die Aminosäuren, die mutiert wurden.

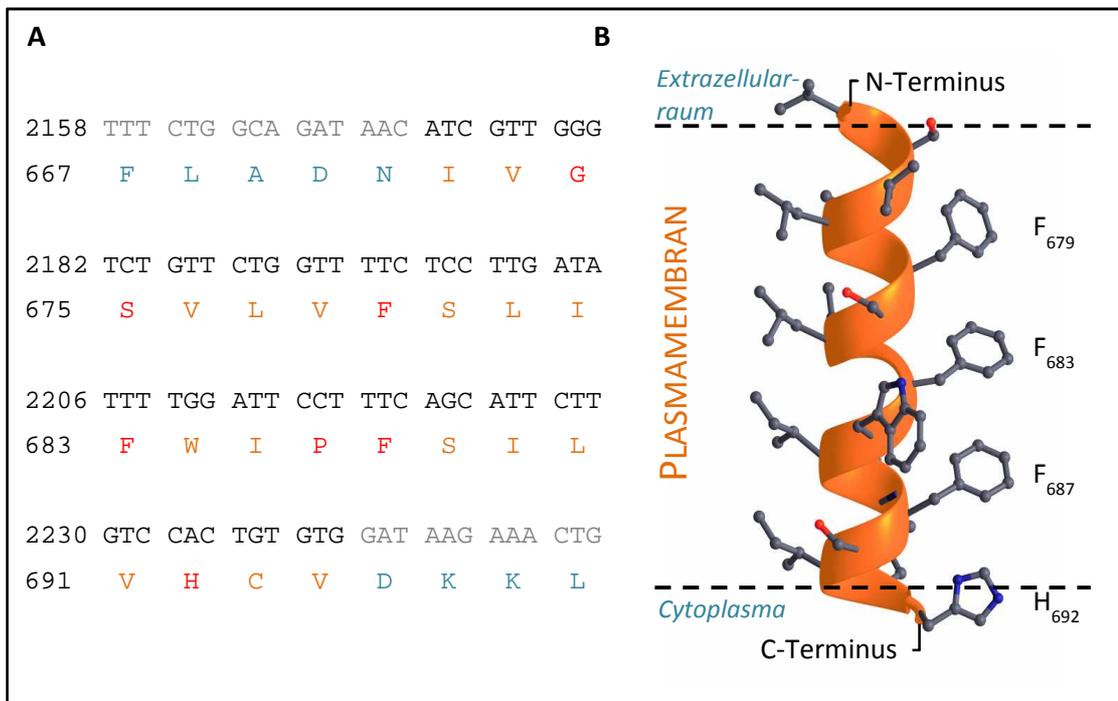


Abbildung 7: A) Nukleotid- und abgeleitete AS-Sequenz der Transmembran-Domäne von murinem ADAM17, B) schematische Darstellung der Transmembran-Domäne von ADAM17 (erstellt durch Prof. J. Grötzinger, Inst. f. Biochemie, Kiel; nach Kraulis, 1991).

2.18.2 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Die Schmelztemperaturen wurden mit dem Programm *QuickChange® Primer Design* von Stratagene berechnet.

(<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>).

Verwendete Oligonukleotide:

ADAM 17 TM_{mut1}:

A17F₆₇₉A mutagenese:

5'-CATCGTTGGGTCTGTTCTGGTTGCCTCCTTGATATTTTGGATTC-3'

A17F₆₇₉A antisense:

5'-GAATCCAAAATATCAAGGAGGCAACCAGAACAGACCCAACGATG-3'

ADAM 17 TM_{mut2}:

A17F₆₈₃A mutagenese:

5'-GTCTGTTCTGGTTGCCTCCTTGATAGCTTGGATTCCTTTCAGCATTTC-3'

A17F₆₈₃A antisense:

5'-GAATGCTGAAAGGAATCCAAGCTATCAAGGAGGCAACCAGAACAGAC-3'

ADAM 17 TM_{mut3}:

A17F₆₈₇A mutagenese:

5'-CTCCTTGATAGCTTGGATTCCTGCCAGCATTCTGTCCACTGTGTG-3'

A17F₆₈₇A antisense:

5'-CACACAGTGGACAAGAATGCTGGCAGGAATCCAAGCTATCAAGGAG-3'

ADAM 17 TM_{mut4}:

A17G₆₇₄S₆₇₅AA mutagenese:

5'-CTGGCAGATAACATCGTTGCGGCTGTTCTGGTTTTCTCCTT-3'

A17G₆₇₄S₆₇₅AA antisense:

5'-AAGGAGAAAACCAGAACAGCCGCAACGATGTTATCTGCCAG-3'

ADAM 17 TM_{mut5}:

A17P₆₉₅A mutagenese:

5'-TCTCCTTGATATTTTGGATTGCTTTCAGCATTCTGTCCAC-3'

A17P₆₉₅A antisense:

5'-GTGGACAAGAATGCTGAAAGCAATCCAAAATATCAAGGAGA-3'

ADAM 17 TM_{mut6}:

A17H₆₉₂A mutagenese:

5'-TTCCTTTCAGCATTCTGTGCGCCTGTGTGGATAAGAACTGG-3'

A17H₆₉₂A antisense:

5'-CCAGTTTCTTATCCACACAGGCGACAAGAATGCTGAAAGGAA-3'

2.18.3 Mutagenese-Reaktion

Die Mutationen wurden mit Hilfe des *QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kits* der Firma Stratagene (#200523) in die Sequenz eingefügt.

Hierbei können spezifische Mutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA eingefügt werden, indem zwei synthetische Oligonukleotide (*Primer*) verwendet werden, die jeweils beide komplementär zu gegenüberliegenden Strängen eines Abschnitts sind und die gewünschte Mutation enthalten (siehe 2.18.2).

Die *Primer* wurden durch eine PCR mit der *PfuUltra HF DNA-Polymerase* verlängert, ohne dass die Ausgangs-Oligonukleotide entfernt und durch neusynthetisierte DNA ersetzt wurden. Dadurch entstanden mutierte, neusynthetisierte Plasmide, welche versetzte Bruchstellen beinhalten. Das Pipettierschema für einen PCR-Ansatz ist in Tabelle 8 beschrieben und die Amplifikation erfolgte nach den in Tabelle 9 aufgeführten Bedingungen im Thermozykler (peqSTAR 96 universal, Peqlab).

Tabelle 8: Pipettierschema für einen PCR-Ansatz

	Volumen, μ l
<i>Reaction buffer</i> (10 \times)	5
Plasmid-DNA (12,5 ng/ μ l)	2
dNTP-Mix	1
Oligonukleotid #1 (125 ng/ μ l)	1
Oligonukleotid #2 (125 ng/ μ l)	1
<i>PfuUltra HF DNA-Polymerase</i>	1
H ₂ O	39

Tabelle 9: PCR-Programm der Mutagenese-PCR

Schritt	Denaturierung 95°C	Annealing 60°C *	Elongation 68°C	Zyklen
1	30 sek	---	---	1
2	30 sek	1 min	8 min **	12
3	Kühlung 4°C		∞	

* Primer-spezifische Hybridisierungstemperatur

** Amplifikat-spezifische Elongationszeit (1000 bp/min)

Das PCR-Produkt wurde anschließend bei 37 °C für eine Stunde mit 10 U der *Dpn I* Endonuklease behandelt. Diese Endonuklease erkennt und spaltet nur methylierte und

hemimethylierte DNA, so dass nur die bakterielle, unmutierte Ausgangs-DNA abgebaut wurde.

Die verbleibende, mutierte Plasmid-DNA wurde mittels Transformation in superkompetente *E.coli*-Bakterien des Stammes *XL1 blue* eingebracht (siehe 2.18.5). Nach der Amplifikation in den Bakterien wurde das Plasmid isoliert (siehe 2.18.7) und die Mutation durch Sequenzierung überprüft (siehe 2.18.8).

2.18.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Puffer und Lösungen:

LB-Medium pH 7,0	171 mM NaCl 10 % (w/v) Trypton/Pepton 5 % (w/v) Hefeextrakt
Tris-Puffer pH 7,0	0,1 M NaCl 5 mM Tris 5 mM MgCl ₂
CaCl₂-Lösung pH 7,0	0,1 M CaCl ₂ 5 mM Tris 5 mM MgCl ₂
Glycerin	

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden die Bakterien des Stammes *XL1 blue* mit CaCl₂ behandelt.

Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 - 0,6 bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend 20 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 5000 × g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment von 50 ml Bakterienkultur wurde in 20 ml eiskaltem Tris-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min bei 5000 × g und 4 °C zentrifugiert (Heraeus *Multifuge X3R*). Anschließend wurde das Zellsediment in 20 ml vorgekühlter CaCl₂-Lösung aufgenommen und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde danach erneut zentrifugiert (10 min, 5000 × g, 4 °C) und das Zellsediment wurde in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden 500 µl Glycerin zu der Lösung gegeben und durch vortexen mit dieser vermischt. Diese Zellsuspension wurde auf Eis zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.18.5 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Medien und Lösungen:

SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2,0 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
LB/Amp-Platten	171 mM NaCl 1 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1,5 % (w/v) Agar-Agar 0,1 mg/ml Ampicillin

Für die Transformation wurden 50 µl chemisch kompetente *E. coli XL1 blue*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 40 s auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und für 5 min auf Eis abgekühlt. Nachdem 300 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben wurden, wurden diese bei 37 °C für eine Stunde bei 800 rpm geschüttelt und anschließend auf einer LB-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen. Diese wurden dann bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Einzelne Kolonien wurden von der Platte mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum überführt. Diese Vorkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 zum Anlegen eines Glycerol-Stammes verwendet.

2.18.6 Anlegen eines Glycerol-Stammes

Zur langfristigen Lagerung transformierter Bakterien wurden Glycerol-Stämme angelegt. Es wurden 850 µl einer Bakterienkultur mit 150 µl Glycerin durch Vortexen gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Stämme bei -80 °C gelagert.

2.18.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Um Plasmide zu amplifizieren und anschließend zu isolieren wurden 250 ml LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum mit Bakterien aus einem Glycerol-Stamm angeimpft.

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des *PureYield™ Midiprep*-Kits (Promega) nach Herstellerangaben.

Für die Isolierung kleinerer Mengen DNA, welche für Sequenzierungen eingesetzt wurde, wurde ein Kultur-Volumen von 5 ml und das *GeneJET Plasmid Miniprep*-Kit (Fermentas, heute Thermo Scientific) verwendet.

2.18.8 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der eingefügten Mutationen in die Transmembrandomäne von ADAM17 wurde die Plasmid-DNA von der Firma Seqlab (Göttingen) sequenziert. Dazu wurden 650 ng Plasmid-DNA zusammen mit 20 pmol des Oligonukleotids SeqpcDNA3.1BGHrev (5'-CTAGAAGGCACAGTCGAG-3') in einem Volumen von 7 µl eingeschickt.

3 ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Teile. Der erste beschäftigt sich mit der Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) durch Stimulation des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (*fibroblast growth factor receptor*, FGFR) in Keratinocyten und beschreibt die potenzielle Rolle von Metalloproteasen in diesem Prozess. Der zweite Teil behandelt die Frage, ob auch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) in der Lage sind, ein Signal nach Stimulation durch einen Liganden auf den EGFR umzuleiten.

Der dritte und letzte Teil beschreibt Analysen zur Relevanz der Aminosäurezusammensetzung der Transmembran-Domäne von ADAM17 und deren Bedeutung für die Regulation der Aktivität der Protease.

3.1 Transaktivierung des EGFR durch FGFR2b

Es ist bekannt, dass manche Zelloberflächen-Rezeptoren nach Stimulation mit ihren spezifischen Liganden ADAM17 aktivieren. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung von ADAM17-Substraten, u. a. EGFR-Liganden, und letztendlich zu einer Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges, vermittelt durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors.

Dieser Weg der indirekten EGFR-Aktivierung oder auch Transaktivierung des EGFR wurde zuerst für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben (Prenzel *et al.*, 1999). Auch für Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie den vaskulär endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) und den Rezeptor für von Blutplättchen abgeleiteten Wachstumsfaktoren (*platelet derived growth factor receptor*, PDGFR) wurde gezeigt, dass diese ADAM17 und somit die EGFR-vermittelte ERK1/2-Signalkaskade aktivieren können (Swendeman *et al.*, 2008; Mendelson *et al.*, 2010). Zusätzlich werden die MAP-Kinasen ERK1/2 in diesen Fällen jedoch auch auf direktem Wege aktiviert, was der allgemeinen Lehrmeinung zu diesen Rezeptoren entspricht.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch die Keratinocyten-spezifische FGFR-Isoform 2b (FGFR2b) aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen ADAM17 und somit den EGFR-Signalweg aktivieren kann. Der spezifische Ligand für den FGFR2b ist FGF7.

3.1.1 Die Stimulation von ERK1/2 nach FGFR2b-Aktivierung ist Metalloprotease-abhängig

Um festzustellen, ob eine Metalloprotease an der Phosphorylierung von ERK1/2 nach der Stimulation des FGFR2b beteiligt ist, wurden Keratinocyten für 5 bis 60 min mit FGF7 stimuliert. Die Metalloproteasen wurden dabei durch den unspezifischen Inhibitor Marimastat (MM) gehemmt. Die Zelllysate wurden anschließend mittels *Western Blot*-Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht, die zwischen der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten Form von ERK1/2 unterscheiden.

Abbildung 8 zeigt den *Western Blot* der Zelllysate von der humanen Keratinocyten-Zelllinie HaCaT nach verschiedenen Stimulations-Zeiträumen (a) sowie die densitometrische Quantifizierung der Banden aus drei unabhängigen Experimenten (b). Die Stimulation mit FGF7 führt zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK), welche in der Gegenwart von Marimastat vollkommen unterbunden ist. Die Phosphorylierung tritt bereits nach 5 min auf und wird durch Marimastat vollständig unterdrückt. Dieser Effekt ist über den gesamten untersuchten Zeitraum zu beobachten.

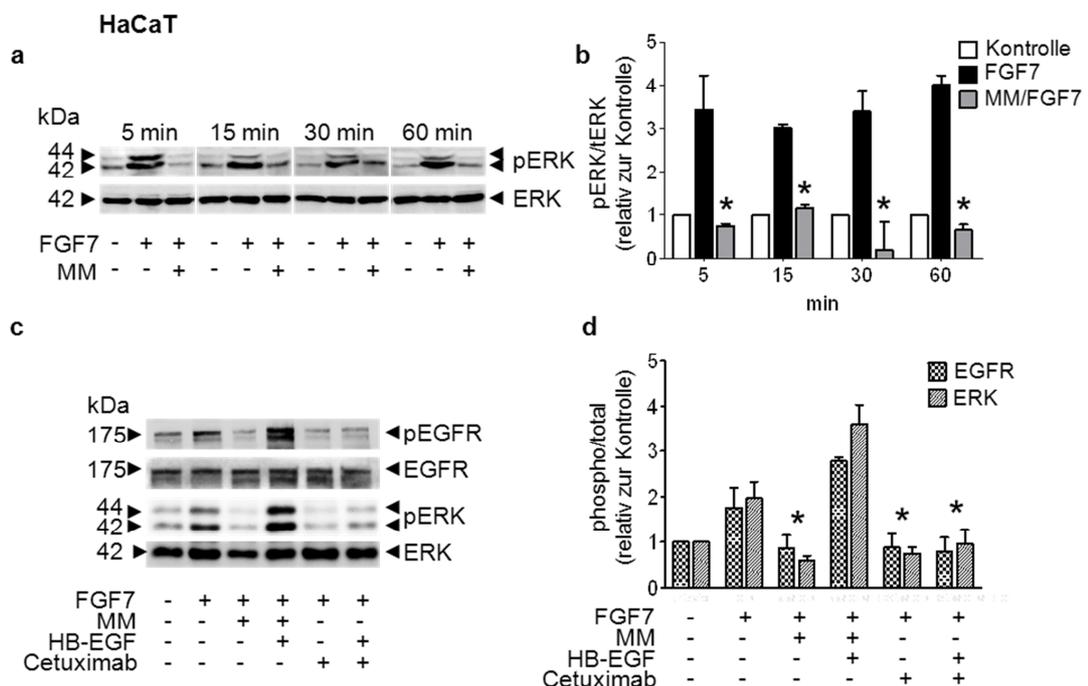


Abbildung 8: Metalloprotease-abhängige Signalübertragung zwischen FGFR2b und EGFR/ERK. HaCaT-Zellen wurden für 5 bis 60 min mit 20 ng/ml FGF7 mit oder ohne 5 µM Marimastat (MM) behandelt (a,b) oder für 15 min mit MM oder Cetuximab (10 µg/ml) vorbehandelt und anschließend 15 min mit 20 ng/ml FGF7 bzw 50 ng/ml HB-EGF stimuliert (c,d). Es ist je ein repräsentativer *Western Blot* (a,c) und die densitometrische Auswertung (Mittelwert und Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten abgebildet (b,d).

* p<0,05 im Vergleich zu der FGF7-stimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Abbildung 8 c/d zeigt, dass die MM-vermittelte Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch die Zugabe des EGFR-Liganden HB-EGF aufgehoben werden kann.

Die Inhibition, die durch den EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab bedingt ist, wird jedoch nicht durch HB-EGF kompensiert, was darauf hindeutet, dass die ERK1/2-Phosphorylierung allein vom EGF-Rezeptor abhängig ist und nicht durch den FGFR2b direkt vermittelt wird. Auch der Phosphorylierungszustand des EGFR wurde analysiert und ist in Abbildung 8 c/d dargestellt. Die Stimulation mit FGF7 führt zu einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors, welche durch den Metalloprotease-Inhibitor MM und durch den EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab unterbunden wird. Diese Inhibition der EGFR-Phosphorylierung kann wie bei ERK1/2 ebenfalls nur bei MM, nicht aber bei Cetuximab durch HB-EGF rückgängig gemacht werden.

Experimente mit primären humanen Keratinocyten zeigen das gleiche Ergebnis, sind jedoch in dieser Arbeit nicht abgebildet (siehe Anhang: Maretzky *et al.*, 2011).

Die Tatsache, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 bereits nach 5 min vollständig durch Marimastat unterbunden wird, deutet darauf hin, dass es sich dabei um einen komplett Metalloprotease-abhängigen Prozess handelt während eine direkte, intrazelluläre Signalweiterleitung vom FGFR2b zu ERK1/2, wie sie bisher angenommen wurde, nicht stattfindet.

3.1.2 Vergleich von FGFR2b und VEGFR vermittelter ADAM17-Aktivierung

Für die im Endothel vorkommende Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR2 wurde bereits beschrieben, dass diese nach Stimulation mit ihrem Liganden VEGF-A ADAM17 aktiviert (Swendeman *et al.*, 2008). Die nachfolgend beschriebenen Versuche mit HUVEC-Zellen wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Carl Blobel von Dr. Steven Swendeman (Hospital for Special Surgery, NY) durchgeführt und sind hier deshalb nicht abgebildet (siehe Anhang: (Maretzky *et al.*, 2011)).

Eine Kinetik mit VEGF-A stimulierten HUVEC-Zellen zeigte, dass es einen frühen, direkten und einen späten, indirekten Weg zur Aktivierung von ERK1/2 zu geben scheint, während Keratinocyten keine direkte Signalübertragung vom FGFR2b zu ERK1/2 zu haben scheinen. Dies ist ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Rezeptor-Tyrosinkinasen FGFR2b und VEGFR.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Aktivierung von ERK1/2 durch den FGFR2b und den VEGFR um gänzlich unterschiedliche Mechanismen handelt, wurde die Freisetzung von EGFR-Liganden in beiden Zelltypen untersucht und verglichen. Als *Readout*-System dienten A431-Zellen, eine EGFR-überexprimierende epidermoide Karzinom-Zelllinie, die mit den Überständen von vorher stimulierten Keratinocyten oder HUVECs behandelt wurden. Primäre humane Keratinocyten (phK) wurden mit FGF7 und HUVECs mit VEGF-A stimuliert. Dies geschah jeweils in An- und in Abwesenheit von Marimastat.

Die A431-Zellen besitzen weder den FGFR2b, um auf FGF7-Stimulation direkt zu reagieren, noch den VEGFR2, um den Liganden VEGF-A zu binden (Abbildung 9 a/b). Wenn in diesen Zellen ein Signal ausgelöst wird, muss es von in den Überstand freigesetzten, endogenen Liganden, höchstwahrscheinlich für den EGFR, stammen.

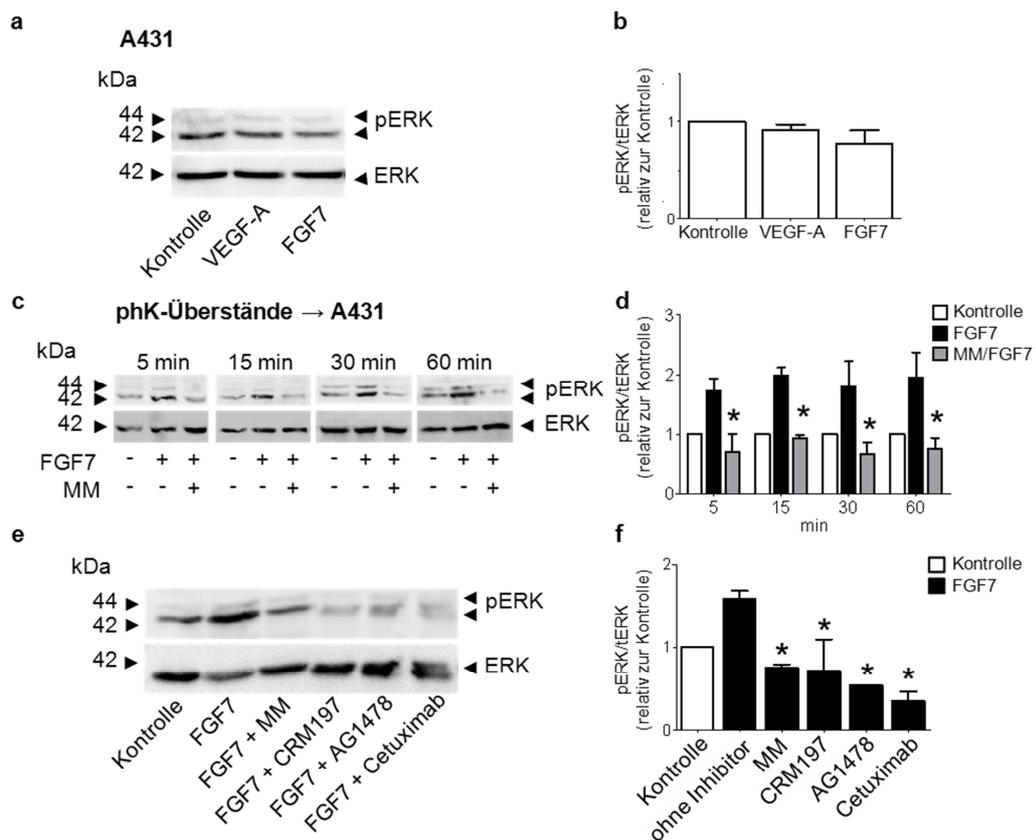


Abbildung 9: Aktivierung von ERK1/2 in A431-Zellen durch konditionierte Überstände von FGF7-stimulierten Keratinocyten. Western Blot-Analysen von A431-Zellen, die mit 25 ng/ml VEGF-A oder 20 ng/ml FGF7 stimuliert wurden (a,b). Primäre humane Keratinocyten (phK) wurden in An- oder Abwesenheit von 5 µM Marimastat (MM) für 5 bis 60 min mit 20 ng/ml FGF7 (c,d) behandelt, bevor die Überstände auf A431-Zellen überführt wurden. PhKs wurden jeweils 10 min mit 20 ng/ml FGF7 in An- oder Abwesenheit von MM (5 µM), CRM197 (10 µg/ml), AG1478 (1 µM) oder Cetuximab (10 µg/ml) inkubiert, bevor die Überstände auf A431-Zellen überführt wurden (e,f). Abgebildet sind jeweils Western Blot-Analysen der A431-Zellen nach 10-minütiger Inkubation mit den konditionierten Überständen und die densitometrische Quantifizierung der Banden, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu der FGF7-stimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Abbildung 9 zeigt, dass die Keratinocyten bereits nach 5 minütiger Stimulation des FGFR2b Botenstoffe in den Überstand freisetzen, welche in der Lage sind A431-Zellen zu aktivieren. Diese Freisetzung von Liganden ist Metalloprotease-abhängig, da sie in Gegenwart von Marimastat unterdrückt ist und hält über einen Zeitraum von 60 min konstant an (Abbildung 9 c/d). Identische Ergebnisse waren bei den endothelialen HUVEC-Zellen zu beobachten, so dass davon auszugehen ist, dass in diesen Zellen auch in der frühen, Metalloprotease-unabhängigen Phase der ERK1/2-Phosphorylierung bereits Metalloproteasen aktiviert und EGFR-Liganden freigesetzt werden (siehe Anhang: Marezky *et al.*, 2011).

Alle Überstände wurden nach der Stimulation auf die gleiche Konzentration mit MM eingestellt, bevor sie auf die A431-Zellen überführt wurden, damit ein direkter Einfluss von MM auf die ERK1/2-Phosphorylierung in den A431-Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Um die Beteiligung des EGFR an der Aktivierung der A431-Zellen durch konditionierte Überstände zu bestätigen, wurden die ungiftige Diphtherietoxin-Form CRM197, die selektiv humanes HB-EGF bindet und somit inaktiviert, der EGFR-Kinase-Inhibitor AG1478 und der EGFR-blockierende Antikörper Cetuximab eingesetzt. Alle Substanzen verhinderten die Aktivierung von ERK1/2 in A431-Zellen durch die Stimulation mit den konditionierten Überständen (Abbildung 9 e/f). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl in HUVECs (nicht abgebildet, siehe Anhang: Marezky *et al.*, 2011) als auch in Keratinocyten bereits nach 5 Minuten EGFR-aktivierende Liganden wie HB-EGF freigesetzt werden und dass dieser Vorgang in beiden Zelltypen Metalloprotease-abhängig ist.

Zusätzlich zu diesem Transaktivierungsmechanismus, der das Signal über ADAM17 auf den EGFR weiterleitet und der in beiden Zelltypen gleichermaßen vorkommt, gibt es in HUVECs offensichtlich einen zweiten, direkten Weg der Signalweiterleitung, der in Keratinocyten nicht vorhanden zu sein scheint. Dieser direkte Weg vom VEGFR zu ERK1/2 scheint nur in der frühen Phase der Aktivierung von Bedeutung zu sein, da die ERK-Phosphorylierung nach 15 min nur noch Metalloprotease-abhängig stattfindet.

3.1.3 ADAM17 wird durch FGFR2b aktiviert

Um die FGF7-vermittelte Aktivierung von ADAMs weiter zu untersuchen und zwischen den beiden bekanntesten Vertretern dieser Protease-Familie, ADAM10 und ADAM17, zu unterscheiden, wurden *Shedding*-Experimente mit Alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppelten ADAM-Substraten durchgeführt. Diese wurden zusammen mit dem FGFR2b in COS7-Zellen transfiziert, da der Rezeptor endogen nicht auf den Zellen vorkommt. Wird das extrazellulär AP-markierte Substrat von der Zelloberfläche abgespalten, wird die Alkalische Phosphatase in den Überstand freigesetzt, wo deren Aktivität photometrisch bestimmt werden kann. Es wurde die proteolytische Freisetzung von HB-EGF, einem ADAM17-Substrat, und Betacellulin (BTC), einem ADAM10-Substrat, nach Stimulation mit FGF7 untersucht.

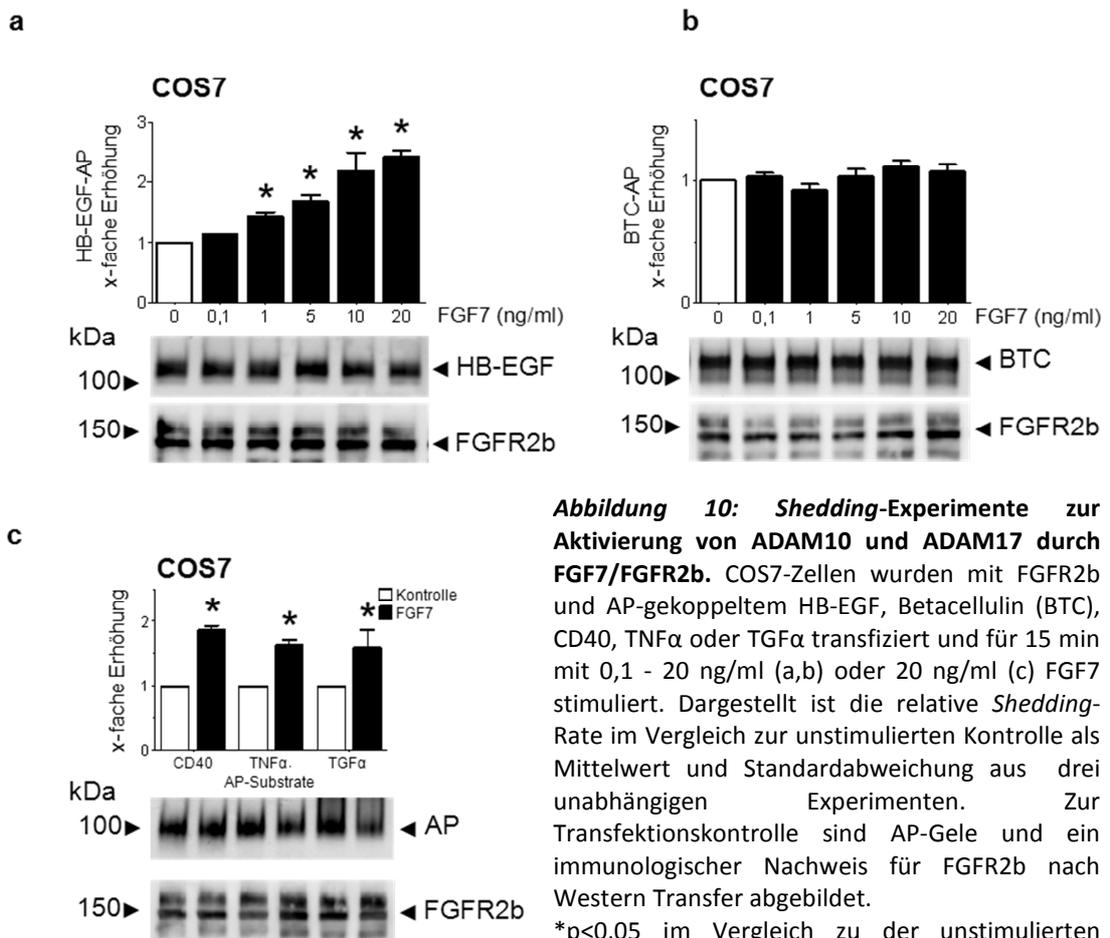


Abbildung 10: *Shedding*-Experimente zur Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 durch FGF7/FGFR2b. COS7-Zellen wurden mit FGFR2b und AP-gekoppeltem HB-EGF, Betacellulin (BTC), CD40, TNF α oder TGF α transfiziert und für 15 min mit 0,1 - 20 ng/ml (a,b) oder 20 ng/ml (c) FGF7 stimuliert. Dargestellt ist die relative *Shedding*-Rate im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Transfektionskontrolle sind AP-Gele und ein immunologischer Nachweis für FGFR2b nach Western Transfer abgebildet. *p<0,05 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Die Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von FGF7 (0,1 - 20 ng/ml) für einen Zeitraum von 15 min stimuliert. Anschließend wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Überständen und im Zelllysat bestimmt.

Der prozentuale Anteil der im Überstand befindlichen AP-Aktivität an der Gesamt-Aktivität wurde für jede Probe bestimmt und zu dem Wert der unstimulierten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Für HB-EGF-AP wurde eine dosisabhängige Zunahme der *Shedding*-Rate beobachtet (Abbildung 10 a), wohingegen BTC auch bei der höchsten Konzentration nicht prozessiert wurde (Abbildung 10 b).

Drei weitere AP-gekoppelte ADAM17-Substrate (CD40, TGF α und TNF α) wurden zusätzlich in diesen *Shedding*-Experimenten untersucht. Diese wurden ebenfalls nach Stimulation mit FGF7 von der Zelloberfläche abgespalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 c dargestellt.

Die *Shedding*-Experimente zeigen, dass ADAM17 durch die Stimulation des FGFR2b mit FGF7 aktiviert wird. ADAM10 hingegen scheint durch diesen Signalweg unter diesen Bedingungen nicht reguliert zu sein.

3.1.4 Die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 ist nicht erforderlich für die Aktivierung

Die Beteiligung der cytoplasmatischen Domäne an der Regulation von ADAM17 wird kontrovers diskutiert. Um dies für die Aktivierung von ADAM17 durch den FGFR2b zu überprüfen, wurden weitere *Shedding*-Experimente durchgeführt.

Es wurden ADAM17-defiziente murine embryonale Fibroblasten (ADAM17 $-/-$ meFs) verwendet, welche mit FGFR2b und verschiedenen, mutierten ADAM17-Konstrukten transfiziert wurden. Als Substrat diente AP-gekoppeltes TGF α . Eine inaktive ADAM17-Mutante, die einen Aminosäure-Austausch von Glutaminsäure zu Alanin im aktiven Zentrum enthält (A17 E/A), diente als Negativkontrolle und konnte nicht durch FGF7 stimuliert werden (Abbildung 11, weiße Balken). Wurde hingegen Wildtyp-ADAM17 (A17 WT) zusammen mit FGFR2b und TGF α -AP in die Zellen eingebracht, war sowohl das konstitutive *Shedding* als auch die Stimulierbarkeit durch FGF7 erhöht (Abbildung 11, dunkel graue Balken). Eine Mutante, der die cytoplasmatische Domäne und somit alle Phosphorylierungsstellen fehlen (A17 Δ cyto), war in gleichem Maße im Stande, die konstitutive und die stimulierbare Aktivität wieder herzustellen wie das Wildtyp-Konstrukt (Abbildung 11, schwarze Balken).

Wurde jedoch eine ADAM17-Mutante transfiziert, deren Transmembrandomäne gegen die des membranständigen Adhäsionsmoleküls CD62-L ausgetauscht wurde, konnte die Aktivität nicht mehr durch FGF7 stimuliert werden (Abbildung 11, hellgraue Balken).

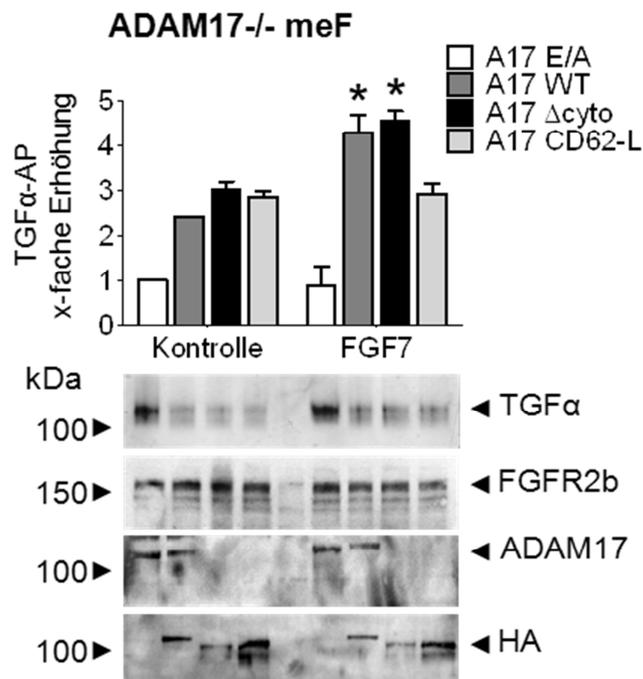


Abbildung 11: Shedding-Experimente zur Aktivierung von ADAM17 durch FGF7/FGFR2b. ADAM17 defiziente murine Keratinocyten wurden mit FGFR2b, TGF α -AP und ADAM17 Wildtyp (WT) oder der inaktiven Mutante ADAM17 E/A oder einer Mutante, der die cytoplasmatische Domäne fehlt (Δ cyto) oder einer Mutante, die die Transmembrandomäne von CD62-L (A17 CD62-L) enthält transfiziert und für 15 min mit 20 ng/ml FGF7 stimuliert. Dargestellt ist die relative *Shedding*-Rate im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sowie AP-Gele und FGFR2b-Western Blots zur Transfektionskontrolle. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 entscheidend für die Aktivierung der Protease durch FGF7 ist, sondern die Transmembrandomäne.

3.1.5 Die FGF7 stimulierte Migration von Keratinocyten ist abhängig von ADAM17

Die Aktivierung von FGFR2b durch den Liganden FGF7 reguliert unter anderem die Zellmigration von Keratinocyten. Um zu überprüfen, ob auch die ADAM17-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung an diesem physiologischen Prozess beteiligt ist, wurden *in vitro*-Wundheilungsversuche durchgeführt. Dazu wurde eine künstliche Wunde in eine

konfluente Keratinocyten-Zellschicht gekratzt. Nach 12 Stunden wurde dokumentiert, wie weit die Zellen in die „Wunde“ migriert waren. Abbildung 12 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der zellfreien Flächen zu Beginn und nach 12 Stunden sowie die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten.

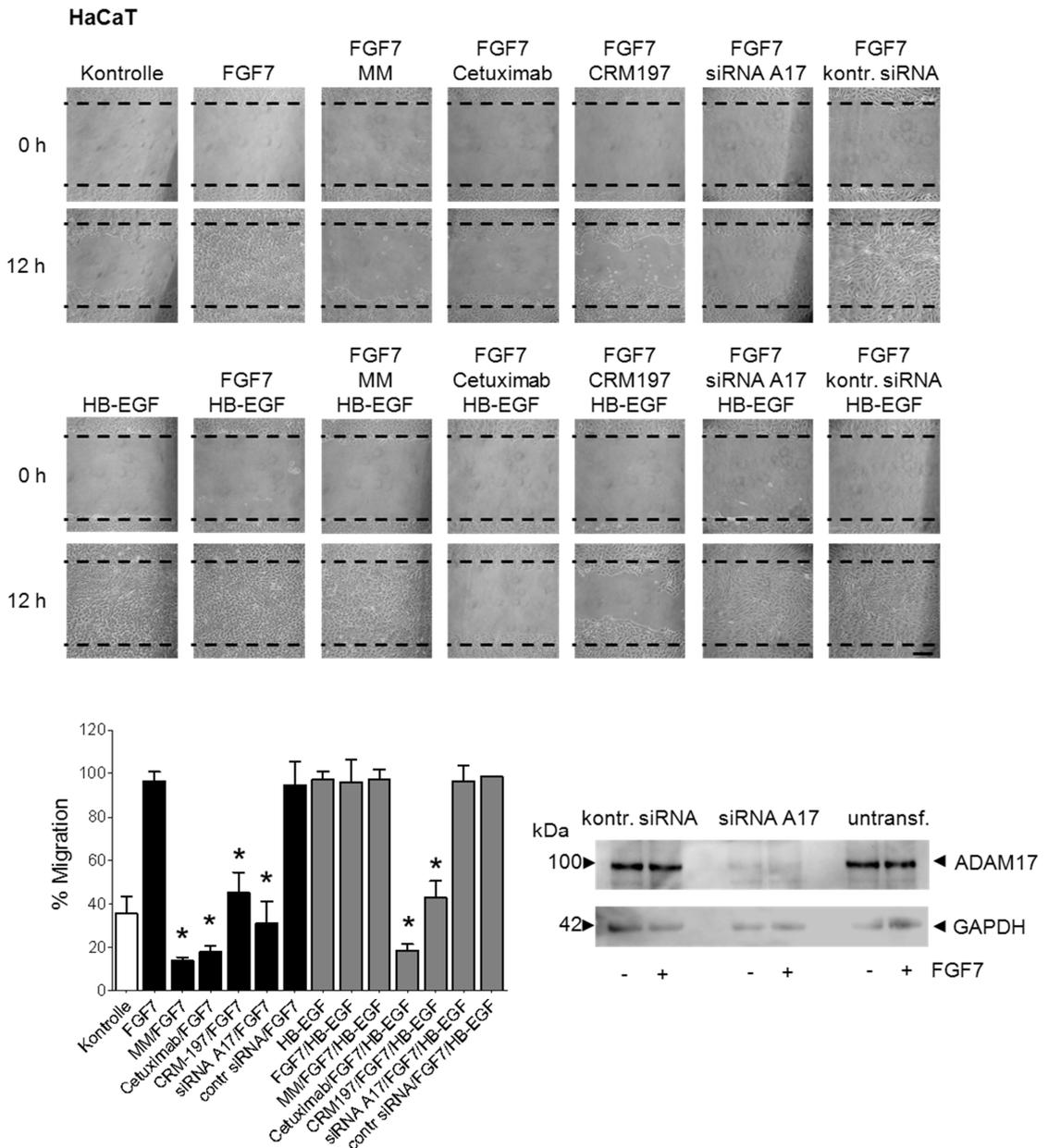


Abbildung 12: FGF7-stimulierte Keratinocyten-Migration. Eine künstliche Wunde wurde mit einer Pipettenspitze in eine konfluente Schicht aus HaCaT-Zellen gezogen. Diese wurden anschließend mit 50 ng/ml FGF7 oder HB-EGF in An- oder Abwesenheit von 5 µM Marimastat (MM), 10 µg/ml Cetuximab, 10 µg/ml CRM197 oder im Voraus mit siRNA gegen ADAM17 inkubiert. Mikroskopische Aufnahmen wurden zu Beginn und nach 12 Stunden von dem zellfreien Bereich gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Dargestellt sind Bilder aus einem repräsentativen Experiment (a) und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung von drei unabhängigen Versuchen (b). *Western Blot*-Analyse zur Überprüfung des ADAM17-*knockdowns* durch siRNA (c). *p<0,05 im Vergleich zu der FGF7-stimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Unstimulierte Zellen konnten die Wunde nach 12 Stunden nicht schließen. Eine Behandlung mit FGF7 führte jedoch zu einem vollständigen Zusammenwachsen der Keratinocyten. Diese gesteigerte Migration wurde sowohl durch den Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM) als auch durch den EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab gehemmt. Die Zugabe des EGFR-Liganden HB-EGF konnte nur den Effekt von Marimastat, nicht aber den von Cetuximab aufheben, da der Antikörper die Bindung des Liganden an den EGF-Rezeptor verhindert. Dies zeigt, dass die Signalüberleitung auf den EGFR essentiell für die Migration von Keratinocyten ist und nicht allein durch die Aktivierung des FGFR2b reguliert werden kann. Der Einsatz der HB-EGF-bindenden Form des Diphtherietoxins (CRM197) bestätigt dies, da auch diese die FGF7 stimulierte Migration inhibiert, indem der EGFR-Ligand inaktiviert wird. Da HB-EGF in den Signalweg involviert zu sein scheint und bekanntermaßen von ADAM17 freigesetzt wird, wurde in diesem Versuchsaufbau ebenfalls ADAM17 siRNA eingesetzt, um die Bedeutung von ADAM17 in der Regulation der Migration von Keratinocyten zu unterstreichen.

Die Herunterregulation von ADAM17 durch den Einsatz von siRNA führte zu einer signifikant verringerten Migrationsrate der Keratinocyten, welche jedoch durch Zugabe von HB-EGF wieder normalisiert werden konnte. Die Transfektion von Kontroll siRNA hatte keinen Effekt auf die Migration. In Abbildung 12 c ist ein *Western Blot* zur Überprüfung des *ADAM17-knockdowns* dargestellt, der zeigt, dass zum Versuchszeitpunkt nahezu kein ADAM17 mehr in den Zellen vorhanden war.

3.1.6 Rolle von ADAM17 in vivo

Nachdem alle Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Stimulation des FGFR2b mit FGF7 zu einer Aktivierung von ADAM17 führt, welches wiederum ein vermehrtes Freisetzen von EGFR-Liganden und somit die Aktivierung des EGFR/ERK1/2-Signalweges zur Folge hat, wurde dies im Mausmodell mit Hilfe von konditionalen *ADAM17-knockout*-Mäusen überprüft.

Dabei wurden Mäuse, die sowohl eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase als auch zwei loxP-Stellen im Gen für ADAM17 tragen (fl/fl-Cre) mit Mäusen verglichen, die nur die loxP-Stellen im ADAM17-Gen, jedoch keine Cre-Rekombinase besitzen (fl/fl). Ist ein Gen von zwei loxP-Stellen flankiert, bezeichnet man dies als „gefloxt“. Aus den

Mausschwänzen von beiden Stämmen wurden Keratinocyten gewonnen, die mit Tamoxifen behandelt wurden, um die Cre-Rekombinase zu aktivieren und somit ADAM17 zu deletieren.

Mit den primären murinen Keratinocyten wurden FGF7-Stimulationsversuche durchgeführt, um mittels *Western Blot*-Analyse zu überprüfen, ob die Phosphorylierung von ERK1/2 in den Keratinocyten durch das Fehlen von ADAM17 beeinträchtigt ist. Außerdem wurden die Zellen für *in vitro*-Wundheilungsversuche eingesetzt, um den Einfluss von ADAM17 auf die Migration der Zellen zu bestimmen und somit einen genetisch gestützten Beweis für die physiologische Relevanz von ADAM17 zu erhalten.

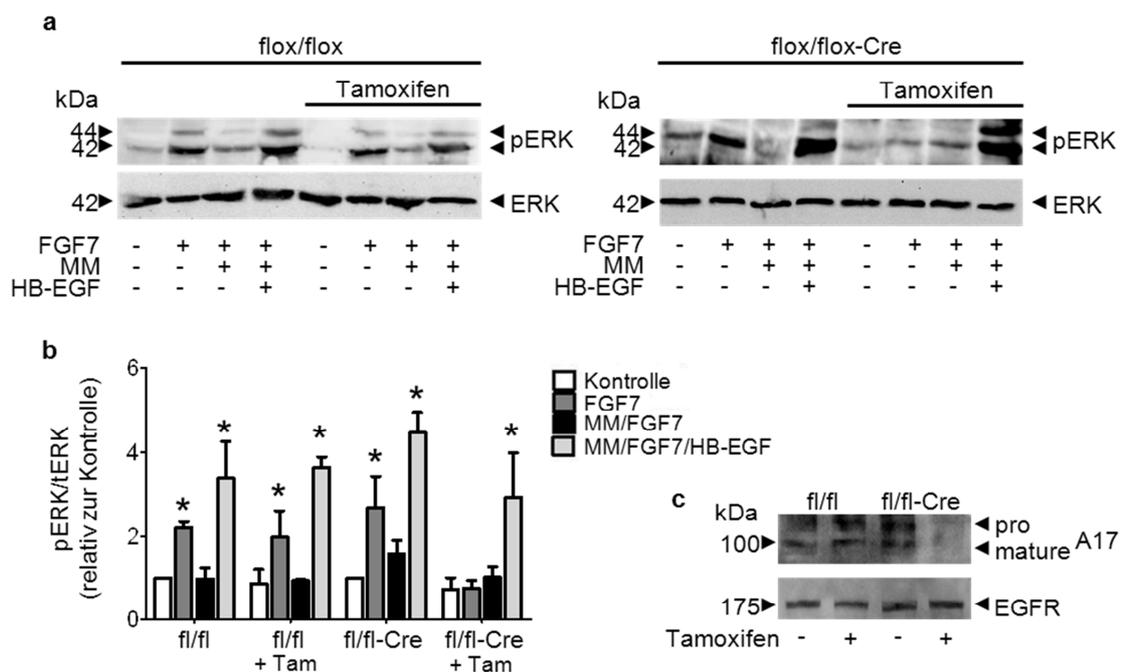


Abbildung 13: FGF7-vermittelte ERK1/2-Aktivierung in primären murinen Keratinocyten aus konditionalen ADAM17-knockout-Mäusen. Primäre murine Keratinocyten wurden aus Mäusen mit zwei „geflochten“ ADAM17-Allelen (fl/fl) oder mit Tamoxifen-induzierbarer Cre-Rekombinase und „geflochten“ ADAM17-Allelen (fl/fl-Cre) präpariert und mit oder ohne 1 µM Tamoxifen für 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden für 15 min mit 20 ng/ml FGF7 oder 50 ng/ml HB-EGF mit oder ohne 5 µM Marimastat (MM) behandelt. Es ist je ein repräsentativer *Western Blot* (a) und die densitometrische Auswertung (Mittelwerte und Standardabweichungen) von drei unabhängigen Experimenten abgebildet (b). *Western Blot*-Analyse zur Überprüfung der ADAM17 Expression (c). * p<0,05 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Abbildung 13 zeigt eine *Western Blot*-Analyse von Zelllysaten der primären murinen Keratinocyten. Die Behandlung der fl/fl-Cre-Keratinocyten mit Tamoxifen führte zu einer vollständigen Herunterregulation von ADAM17. In den unbehandelten Zellen und

in den fl/fl Zellen sind hingegen sowohl die Proform als auch die prozessierte mature Form von ADAM17 nachweisbar (Abbildung 13 c).

Die *Western Blot*-Analysen der Stimulationsexperimente in Abbildung 13 zeigen, dass sich die murinen Zellen in gleicher Weise mit FGF7 stimulieren lassen, wie es auch in Abschnitt 3.1.1 bei humanen Keratinocyten beobachtet wurde.

Die Stimulation von ERK1/2 kann durch Marimastat inhibiert werden, was wiederum durch die Zugabe von HB-EGF aufgehoben wird. Bei den Keratinocyten, die nur die „geflochten“ ADAM17-Allele ohne Cre-Rekombinase (fl/fl) enthalten hat die Behandlung mit Tamoxifen keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der MAP-Kinasen. Nur bei den fl/fl-Cre-Zellen, die mit Tamoxifen behandelt wurden, führte die Zugabe von FGF7 nicht zu einer Phosphorylierung von ERK1/2. Der Einsatz von HB-EGF zeigt, dass die Zellen durch das Fehlen von ADAM17 nicht prinzipiell die Fähigkeit verloren haben, ERK1/2 zu phosphorylieren. ADAM17 scheint also eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges nach FGF7-Stimulation zu spielen. Die Ergebnisse bestätigen außerdem, dass es keinen direkten Weg vom FGFR2b zu ERK1/2 gibt, wie ursprünglich in der Literatur angenommen wurde.

Mit den primären murinen Keratinocyten wurden außerdem Migrationsversuche durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 14 dargestellt sind. Die fl/fl-Zellen migrieren bei FGF7-Stimulation trotz Tamoxifen-Behandlung in den zellfreien Bereich und schließen diesen nach 18 Stunden annähernd vollständig. Bei den fl/fl-Cre-Zellen, die ohne Tamoxifen inkubiert wurden, ist die „Wunde“ ebenfalls nach 18 Stunden zugewachsen. Ist jedoch ADAM17 durch die Zugabe von Tamoxifen zu diesen Zellen herunterreguliert, sind die Zellen nicht mehr in der Lage durch FGF7-Stimulation zur Migration angeregt zu werden. Die Zugabe von HB-EGF zu diesem Ansatz zeigt, dass die Zellen auch ohne ADAM17 grundsätzlich dazu in der Lage sind, die „Wunde“ zu schließen, dass dafür allerdings die Stimulation des EGFR essentiell ist. Diese bleibt durch das Fehlen von ADAM17 offensichtlich aus, da keine oder nur noch sehr wenige EGFR-Liganden freigesetzt werden können.

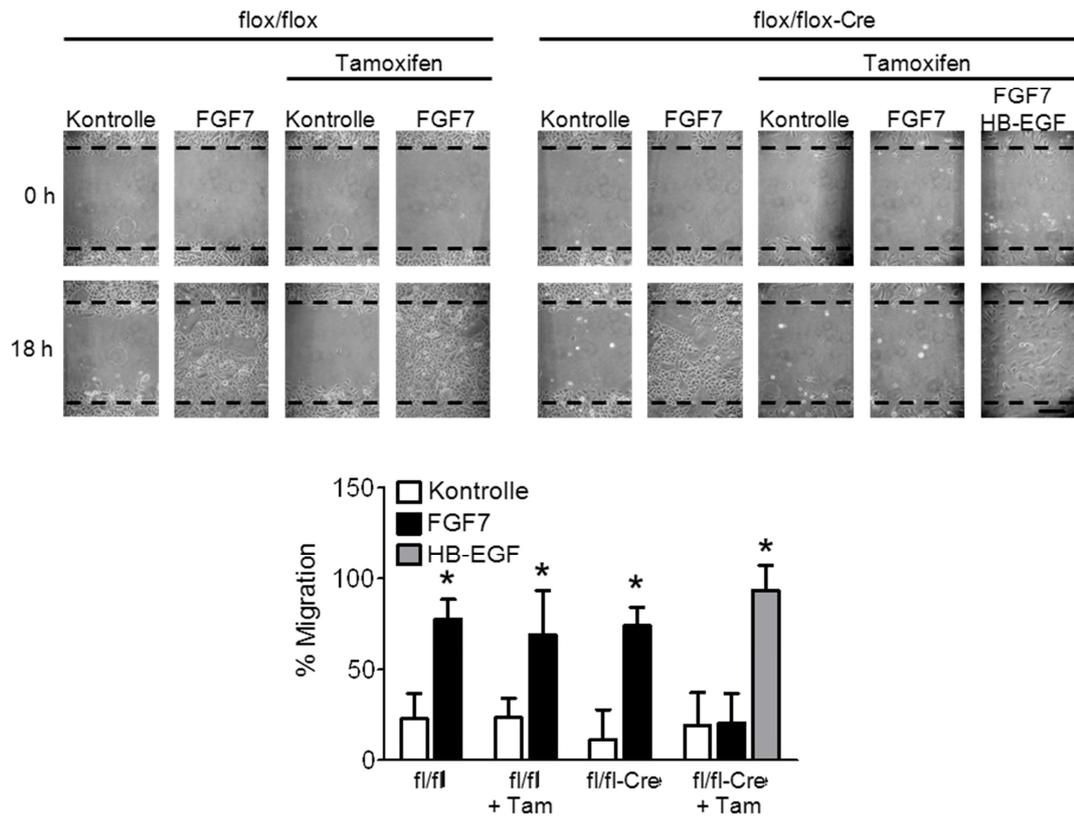


Abbildung 14: FGF7-stimulierte Keratinocyten-Migration in primären murinen Keratinocyten aus konditionalen ADAM17-knockout-Mäusen. Primäre murine Keratinocyten wurden aus Mäusen mit zwei „geflochten“ ADAM17-Allelen (fl/fl) oder mit Tamoxifen-induzierbarer Cre-Rekombinase und „geflochten“ ADAM17-Allelen (fl/fl-Cre) präpariert und mit oder ohne 1 µM Tamoxifen für 48 Stunden kultiviert. Eine künstliche Wunde wurde mit einer Pipettenspitze in die konfluente Zellschicht gezogen. Die Zellen wurden anschließend mit 50 ng/ml FGF7 oder HB-EGF inkubiert. Mikroskopische Aufnahmen wurden zu Beginn und nach 18 Stunden von dem zellfreien Bereich gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Dargestellt sind Bilder aus einem repräsentativen Experiment und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung von drei unabhängigen Versuchen. *p<0,05 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

3.1.7 FGFR2b als Substrat für ADAM-vermittelte Proteolyse

Da einige Zelloberflächen-Rezeptoren von ADAMs geschnitten werden können, sollte untersucht werden, ob auch der FGFR2b proteolytisch prozessiert wird und falls dies zutrifft, welche Protease dafür verantwortlich ist. Für den VEGFR2 wurde gezeigt, dass er von ADAM17 proteolytisch geschnitten und somit inaktiviert werden kann. Es handelt sich dabei also um einen negativen Rückkopplungsmechanismus, da ADAM17 durch die Aktivierung des VEGFR stimuliert wird (Swendeman *et al.*, 2008).

Für die Untersuchung des FGFR2b als ADAM-Substrat wurde der Rezeptor C-terminal mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt und in COS7-Zellen oder murine embryonale Fibroblasten (meFs) transfiziert.

Die Ergebnisse der so durchgeführten *Shedding*-Experimente sind in Abbildung 15 dargestellt.

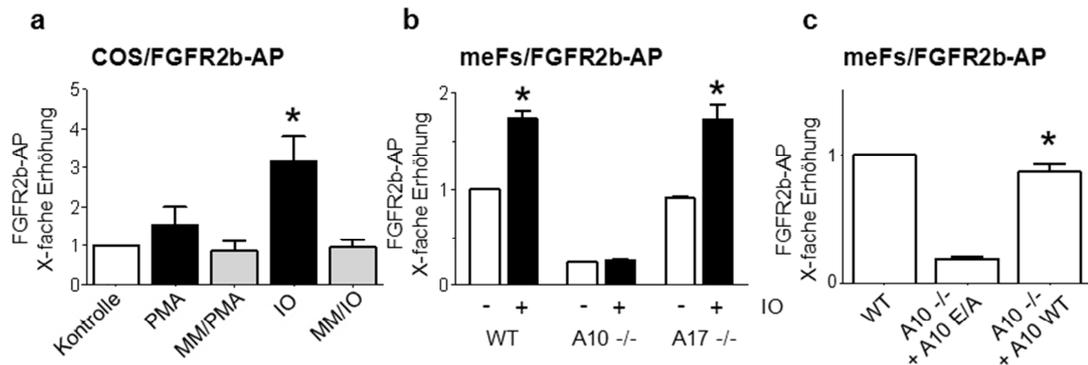


Abbildung 15: *Shedding*-Experimente mit AP-gekoppeltem FGFR2b.

COS7-Zellen oder murine embryonale Fibroblasten (meFs) wurden mit AP-gekoppeltem FGFR2b (FGFR2b-AP) transfiziert und für 30 min mit 1 μ M Ionomycin (IO) oder für 2 h mit 200 ng/ml PMA stimuliert (a,b). ADAM10-defiziente meFs wurden mit FGFR2b-AP und Wildtyp-ADAM10 (WT) oder inaktivem ADAM10 (A10 E/A) transfiziert und das konstitutive *Shedding* über 6 h gemessen (c). Dargestellt ist die relative *Shedding*-Rate im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Student's t-Test).

Abbildung 15 a zeigt, dass in COS7-Zellen das *Shedding* von FGFR2b durch Ionomycin stimulierbar ist. Eine Inkubation mit PMA führt ebenfalls zu einer leichten Erhöhung der *Shedding*-Rate, welche jedoch nicht signifikant ist. Die durch Ionomycin hervorgerufene Aktivitätssteigerung ist in Gegenwart von Marimastat unterbunden. Dass nur Ionomycin, nicht aber PMA das *Shedding* von FGFR2b stimuliert deutet darauf hin, dass die verantwortliche Protease eher ADAM10 und nicht ADAM17 ist, da Ionomycin zwar ADAM10 und ADAM17 aktivieren kann, PMA jedoch eher als spezifischer ADAM17-Stimulus betrachtet werden kann.

Dies wurde durch *Shedding*-Experimente mit FGFR2b-AP in jeweils ADAM10- oder ADAM17-defizienten meFs überprüft. Die Stimulation mit Ionomycin führte in Wildtyp-Fibroblasten zu einer Erhöhung der *Shedding*-Rate. Auch in Fibroblasten, die kein ADAM17 exprimieren, konnte Ionomycin die Freisetzung des FGFR2b stimulieren. In ADAM10-defizienten meFs blieb dies jedoch aus (Abbildung 15 b).

Das *Shedding* von FGFR2b konnte in ADAM10 $-/-$ meFs durch die Retransfektion von Wildtyp-ADAM10 wiederhergestellt werden, jedoch nicht durch die inaktive Mutante (ADAM10 E/A), bei der im aktiven Zentrum Glutaminsäure zu Alanin ausgetauscht ist (Abbildung 15 c).

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ADAM10 die Protease ist, die den FGF-Rezeptor 2b prozessiert und dass dieser kein Substrat für ADAM17 darstellt. Da ADAM10 jedoch nicht durch die Stimulation des FGFR2b mit dem Liganden FGF7 aktiviert wird, sondern nur ADAM17 (siehe 4.1.3), scheint es sich bei diesem Prozess nicht um einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu handeln, wie er für das *Shedding* von VEGFR2 durch ADAM17 postuliert wurde.

3.1.8 Andere Mitglieder der FGFR-Familie

Nachdem für die Keratinocyten-spezifische Isoform des FGF-Rezeptors, FGFR2b, und den spezifischen Liganden FGF7 gezeigt werden konnte, dass die Stimulation zu einer Aktivierung von ADAM17 führt, sollte überprüft werden, ob auch die anderen Mitglieder der FGFR-Familie diese Fähigkeit besitzen. Es konnte jedoch kein weiteres spezifisches Liganden-Rezeptor-Paar gefunden werden, um diese Untersuchungen durchführen zu können. Die meisten Liganden aktivieren mehrere Rezeptoren und auf den meisten Zellen werden verschiedene Isoformen exprimiert, so dass eine eindeutige Zuordnung der Aktivierung nicht möglich gewesen wäre.

3.2 Transaktivierung des EGFR durch Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Auf Epithelien, die als Abgrenzung zur Außenwelt mit vielen Pathogenen in Kontakt kommen, sind Rezeptoren, die bestimmte Bakterien-assoziierte Muster (*pathogen associated molecular patterns* – PAMPs) erkennen, essentiell. Eine wichtige Gruppe dieser Rezeptoren sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs).

Wenn große Rezeptorfamilien wie die G-Protein gekoppelten Rezeptoren und mehrere Vertreter der Rezeptor-Tyrosinkinasen nach Bindung ihrer Liganden ADAM17 aktivieren und somit das Signal auf den EGFR weiterleiten können, stellt sich die Frage, ob auch andere Rezeptor-Familien wie zum Beispiel TLRs dazu in der Lage sind. Diese Signalüberleitung auf einen zweiten Rezeptor könnte wichtige funktionelle Konsequenzen für die Zelle haben.

Die klassische TLR-vermittelte Signaltransduktion endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, der spezifisch Gene für die antimikrobielle Abwehr reguliert.

Es werden auch MAP-Kinasen mit dem TLR-Signalweg in Verbindung gebracht, allerdings hauptsächlich c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) oder p38 Mitogen-aktivierte Kinasen, und weniger ERK1/2 (Sharma *et al.*, 2010). Außerdem gibt es Hinweise aus Studien mit Zellen aus Atemwegsepithelien, die ebenfalls eine Aktivierung des EGFR-Signalweges nach TLR-Stimulation beschreiben (Koff *et al.*, 2008).

Da auch die Haut ein Epithel ist, das ständig mit Mikroorganismen in Kontakt kommt, wurden in dieser Arbeit Keratinocyten für die Analyse der TLR-Aktivierung und der potenziellen EGFR-Transaktivierung verwendet. Keratinocyten besitzen eine Vielzahl von TLRs, sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär.

Es wurde untersucht, ob in diesen Zellen ebenfalls ein Metalloprotease-abhängiger Transaktivierungsmechanismus von TLRs zum EGFR vorliegt und wenn ja, in wie weit die zwei Signalwege unabhängig voneinander sind und welche Effekte sie jeweils haben.

Zunächst wurden verschiedene TLRs auf primären humanen Keratinocyten mit den unterschiedlichen PAMPs stimuliert. Pam₃Cys ist ein synthetisches Analogon zu bakteriellen Lipoproteinen, das von dem Rezeptor-Heterodimer TLR1/2 erkannt und gebunden wird. Die Bestandteile der bakteriellen Zellwand, Lipoteichonsäure (*Lipoteichoic acid*, LTA) und Peptidoglykan (PGN), aktivieren ebenfalls TLR2. Das Lipopolysaccharid (LPS), das in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien

vorkommt, ist ein Ligand für TLR4, wohingegen der Hauptbestandteil der bakteriellen Flagellen, Flagellin, TLR5 aktiviert.

Die primären humanen Keratinocyten wurden für 15 Minuten mit den jeweiligen Stimulantien inkubiert und anschließend für die *Western Blot*-Analyse eingesetzt um die Phosphorylierung von ERK1/2 zu überprüfen. Marimastat wurde als unspezifischer Metalloprotease-Inhibitor eingesetzt, um zu testen, ob Metalloproteasen an der Aktivierung von ERK1/2 beteiligt sind. Bei allen verwendeten TLR-Liganden wurde eine Metalloprotease-abhängige Stimulation der ERK-MAP-Kinasen beobachtet (Abbildung 16).

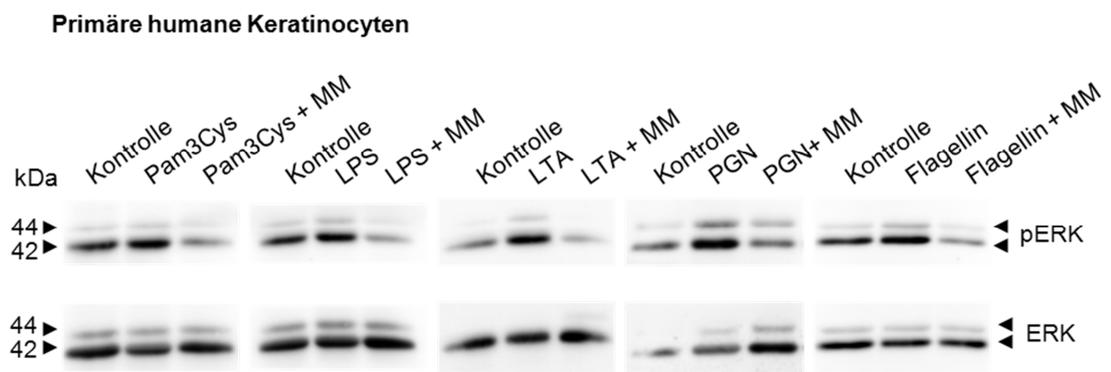


Abbildung 16: Metalloprotease-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 durch TLR-Liganden. Primäre humane Keratinocyten wurden für 15 min mit 20 µg/ml Pam₃Cys, 1 µg/ml LPS, 10 µg/ml LTA, 10 µg/ml PGN oder 1 µg/ml Flagellin mit oder ohne 10 µM Marimastat (MM) behandelt. Es ist je ein repräsentativer *Western Blot* von drei unabhängigen Experimenten abgebildet.

Um diese ERK-Aktivierung durch Toll-*like*-Rezeptoren näher zu untersuchen, wurden weitere Analysen exemplarisch mit Pam₃Cys, einem Liganden für TLR1/2, durchgeführt, da diese Rezeptoren besonders stark in Keratinocyten exprimiert sind (Mempel *et al.*, 2003).

Um die optimalen Bedingungen für die Stimulation mit Pam₃Cys zu bestimmen, wurden eine Zeit- und eine Konzentrationsreihe erstellt. Abbildung 17 zeigt die *Western Blot*-Analyse und die densitometrische Auswertung einer Zeitreihe, bei der HaCaT-Zellen über einen Zeitraum von 5 bis 120 min mit 50 µg/ml Pam₃Cys stimuliert wurden. Bereits nach 15 Minuten erreicht die Rate der ERK1/2-Phosphorylierung ein Maximum. Nach 60 Minuten konnte keine Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden. Verglichen mit den Verhältnissen bei der Stimulation des FGFR2b und des VEGFR handelt es sich bei der Aktivierung von ERK1/2 durch den TLR um einen relativ kurzen Impuls.

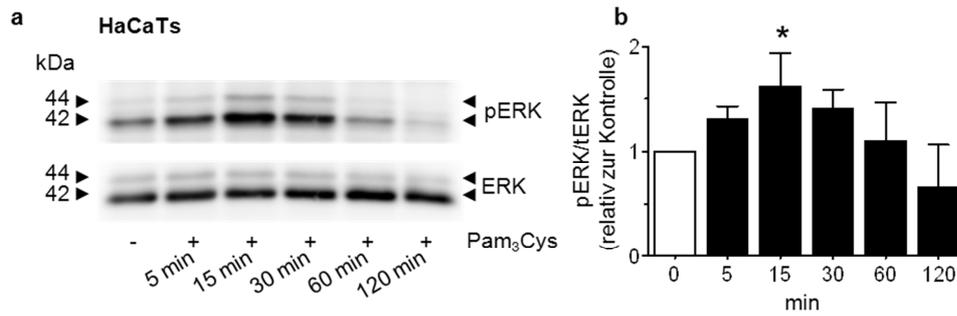


Abbildung 17: Zeitabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 durch Pam₃Cys. HaCaTs wurden für 5 bis 120 min mit 20 µg/ml Pam₃Cys stimuliert und anschließend für *Western Blot*-Analysen eingesetzt. Es ist ein repräsentativer *Western Blot* (a) und die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten abgebildet (b). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse).

Die Ergebnisse der Konzentrations-abhängigen Stimulation mit Pam₃Cys sind in Abbildung 18 dargestellt.

Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle ist bei 15 minütiger Inkubation mit nur 1 µg/ml Pam₃Cys bereits eine leichte Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung festzustellen, die mit steigenden Konzentrationen zunimmt und ab einer Konzentration von 10 µg/ml signifikant erhöht ist. Auch der Phosphorylierungszustand des EGF-Rezeptors wurde in Abhängigkeit der Pam₃Cys-Konzentration betrachtet.

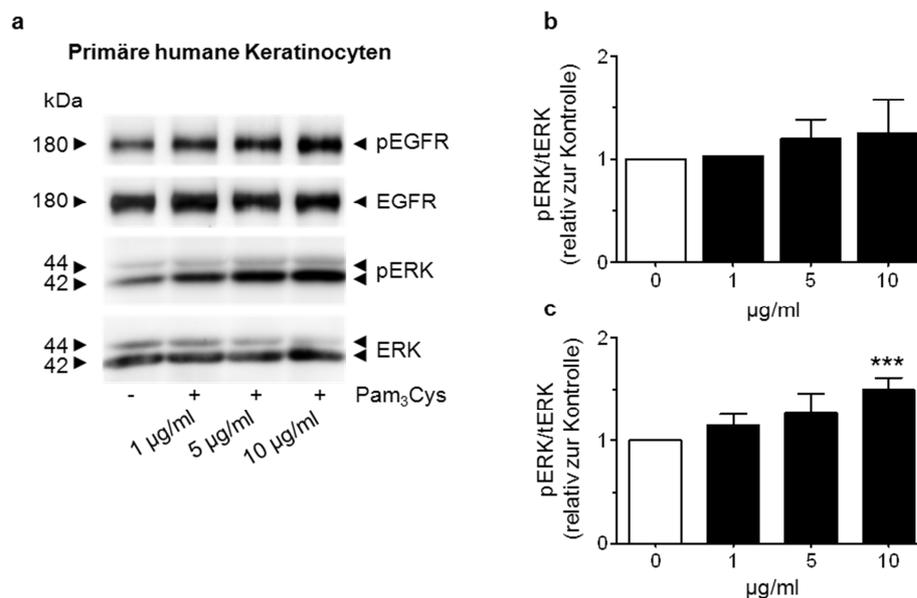


Abbildung 18: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 und EGFR durch Pam₃Cys. Primäre humane Keratinocyten wurden für 15 min mit den angegebenen Konzentrationen Pam₃Cys stimuliert und anschließend für *Western Blot*-Analysen eingesetzt. Es ist ein repräsentativer *Western Blot* für den Phosphorylierungsgrad von EGFR und ERK1/2 (a) sowie die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten abgebildet (b,c). Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. *** p < 0,001 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse).

Wie in Abbildung 18 dargestellt, kommt es auch bei dem Rezeptor zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Phosphorylierung, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 auch in diesem Fall durch die Aktivierung des EGFR-Signalweges zustande kommt.

Um zu überprüfen, welche Metalloprotease an der Aktivierung von ERK1/2 beteiligt ist, wurden neben dem unspezifischen Metalloprotease-Inhibitor Marimastat zusätzlich die für ADAM10 und ADAM17 spezifischeren Inhibitoren GI und GW eingesetzt.

Diese beiden Hydroxamat-basierten Inhibitoren hemmen präferentiell ADAM10 (GI) bzw. ADAM17 (GW), wobei GW auch in geringem Maße die Aktivität von ADAM10 inhibieren kann.

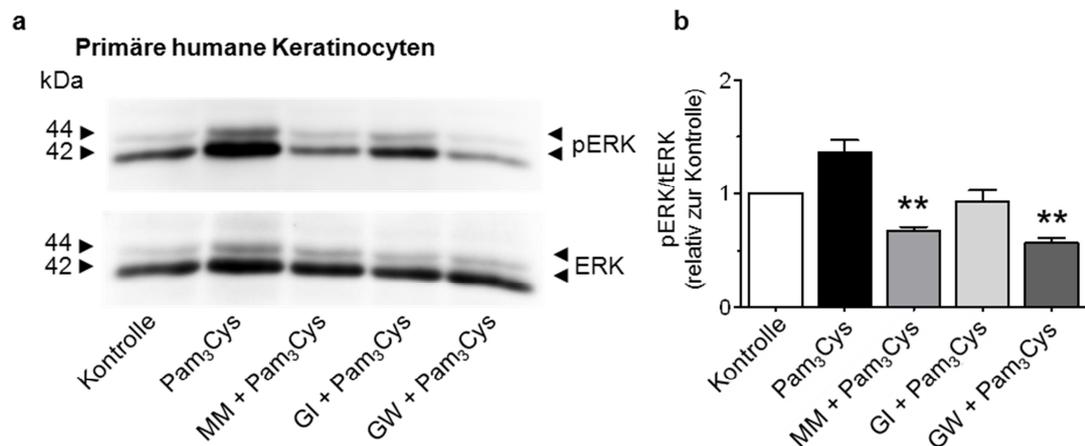


Abbildung 19: Metalloprotease-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 durch Pam₃Cys. Primäre humane Keratinocyten wurden für 15 min mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW vorinkubiert und anschließend 15 min mit 10 μ g/ml Pam₃Cys stimuliert. Ein repräsentativer *Western Blot* für den Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 (a) sowie die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (b). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

** $p < 0,01$ im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse).

Abbildung 19 zeigt, dass eine Stimulation von primären humanen Keratinocyten mit Pam₃Cys zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führt. Diese ist in Gegenwart von MM und GW, dem für ADAM17 präferentiellen Inhibitor, signifikant gehemmt. Auch der für ADAM10 präferentielle Inhibitor GI führt zu einer leichten Abnahme der Phosphorylierungsrate im Vergleich zu der stimulierten Probe, kann diese jedoch nicht vollständig verhindern.

Im Folgenden sollte die Beteiligung von ADAM17 an der TLR-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 mit Hilfe von siRNA-Experimenten verifiziert werden. Zusätzlich wurde siRNA gegen den Transkriptionsfaktor NFκB eingesetzt, um zu überprüfen, ob dieser typische Bestandteil des klassischen TLR-Signalweges für die ERK1/2-Phosphorylierung notwendig ist.

Außerdem wurde der EGFR-blockierende Antikörper Cetuximab verwendet, um eine Beteiligung des EGF-Rezeptors an der ERK1/2-Phosphorylierung zu bestätigen. In Abbildung 20 sind *Western Blot*-Analysen zur Überprüfung des *knockdowns* für ADAM17 und NFκB sowie des Phosphorylierungszustandes der MAP-Kinasen ERK1/2 abgebildet. Die Aktivierung von ERK1/2 wird durch MM, Cetuximab und den Einsatz von ADAM17 siRNA gehemmt. Das Fehlen von NFκB hat keinen Einfluss auf die Stimulation von ERK1/2. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch TLRs nach ihrer Stimulation mit einem Liganden ADAM17 aktivieren, was eine verstärkte Freisetzung von EGFR-Liganden und somit eine Aktivierung des EGFR/ERK-Signalweges zur Folge hat. Es scheint sich hier allerdings um einen Signalweg zu handeln, der unabhängig von der klassischen TLR-Signaltransduktion abläuft, da NFκB nicht darin involviert zu sein scheint.

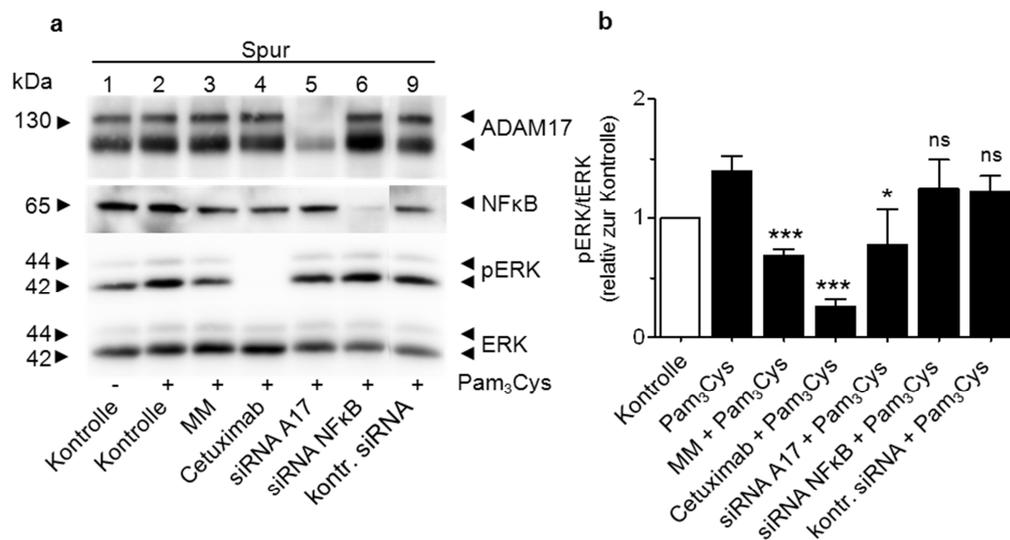


Abbildung 20: ADAM17- aber nicht NFκB-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 durch Pam₃Cys. Primäre humane Keratinocyten wurden für 15 min mit 10 μM MM oder 10 μg/ml Cetuximab vorinkubiert bzw. mit siRNA gegen ADAM17 oder NFκB vorbehandelt und anschließend 15 min mit 10 μg/ml Pam₃Cys stimuliert. Ein repräsentativer *Western Blot* zur Überprüfung des *knockdowns* von ADAM17 und NFκB und des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 (a) sowie die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (b). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Für die Abbildung wurden von dem *Western Blot* die Spuren 7-8 entfernt, es handelt sich jedoch um eine einzige Membran. *p<0,05; *** p<0,001 im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse).

Abschließend sollte der Mechanismus, der zur Aktivierung von ADAM17 und somit dem EGFR/ERK1/2-Signalweg führt untersucht werden. Für diese Analysen wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die bestimmte Moleküle, die mit der Aktivierung von ADAM17 in Verbindung gebracht werden könnten, hemmen. In Abbildung 21 sind die *Western Blot*-Analysen sowie die densitometrische Quantifizierung der Banden aus drei unabhängigen Experimenten für die Stimulation mit Pam₃Cys in Verbindung mit diversen Inhibitoren abgebildet. Die Inhibitoren wurden jeweils eine Viertelstunde vor der 15 minütigen Pam₃Cys-Stimulation zu den Zellen gegeben.

Eine typische Signal-Kaskade, die z. B. nach der Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert wird, ist die Stimulation der Proteinkinase C (PKC) über die Phospholipase C (PLC). Für beide Enzyme wurden Inhibitoren in Kombination mit der Stimulation durch Pam₃Cys eingesetzt. Sowohl der PKC-Inhibitor Gö6976, als auch der PLC-Inhibitor U73122, haben die ERK1/2-Phosphorylierung leicht, jedoch nicht vollständig, inhibiert (Abbildung 21 a/b).

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind ebenfalls wichtige Bestandteile in vielen Signaltransduktionsprozessen, da sie Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphorylieren, welches als Andockstelle für weitere Botenproteine dient. Der PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 hat ebenfalls einen leicht hemmenden Einfluss auf die Pam₃Cys-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 21 a/b).

Die Untersuchungen im Rahmen der FGFR2b-vermittelten ADAM17-Aktivierung, die in dieser Arbeit nicht dargestellt sind (siehe Anhang: Marezky *et al.*, 2011), haben gezeigt, dass die Proteinkinase Src an der Aktivierung der Protease beteiligt ist. Daher wurde auch in diesen Untersuchungen der Src-Inhibitor PP2 eingesetzt, der einen stark hemmenden Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung zeigte (Abbildung 21 a/b). Die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 war in gleichem Maße gehemmt, wie auch durch den Metalloprotease-Inhibitor MM und den EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab (Abbildung 21 a/b), was darauf schließen lässt, dass Src maßgeblich an der Aktivierung von ADAM17 in Keratinocyten beteiligt ist.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von P2-Rezeptoren zu einer Aktivierung von ADAMs führen kann (Sengstake *et al.*, 2006). Der ATP-bindende Rezeptor P2X7 ist ein Mitglied dieser Rezeptor-Familie und es sollte überprüft werden, ob dieser oder ein anderer P2-Rezeptor bei der Transaktivierung des EGFR möglicherweise zwischen den TLR und ADAM17 geschaltet sein könnte bzw. ob ATP vielleicht eine Rolle bei der Aktivierung von ADAM17 spielt.

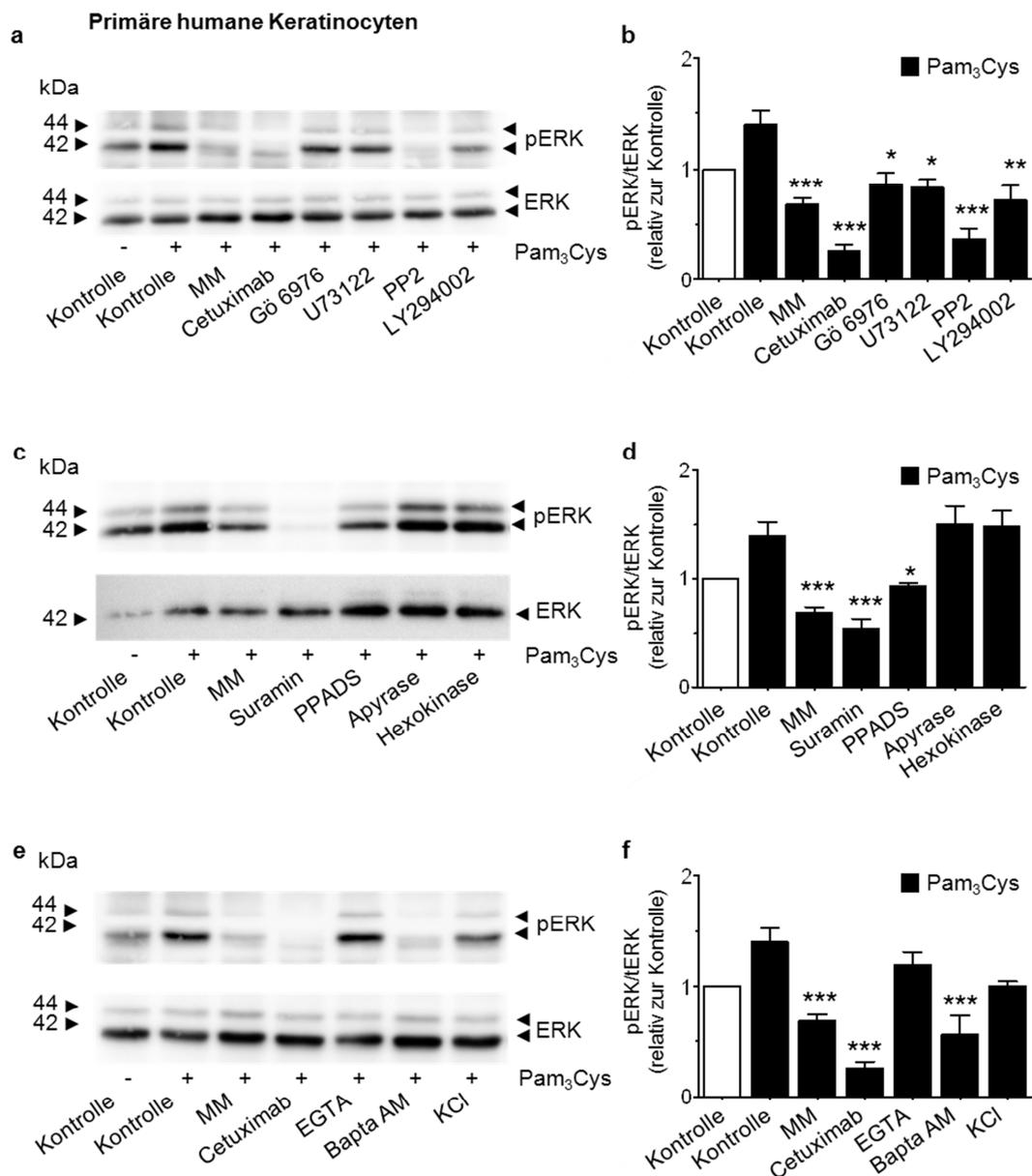


Abbildung 21: An der Phosphorylierung von ERK1/2 durch Pam₃Cys beteiligte Moleküle. Primäre humane Keratinocyten wurden für 15 min mit 10 µM MM, 10 µg/ml Cetuximab, 5 µM Gö 6976, 10 µM U73122, 10 µM PP2, 10 µM LY294002, 50 µM Suramin, 100 µM PPADS, 2 U/ml Apyrase, 2 U/ml Hexokinase, 3 mM EGTA, 50 µM Bapta AM oder 10 mM KCl vorinkubiert und anschließend 15 min mit 10 µg/ml Pam₃Cys stimuliert. Ein repräsentativer *Western Blot* zur Überprüfung des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 (a,c,e) sowie die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (b,d,f). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.
 *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse).

Dazu wurden der allgemeine P2-Rezeptor-Inhibitor Suramin, der P2X-Rezeptor-Inhibitor PPADS, die ATPase Apyrase sowie Hexokinase, welche 6-fach Zucker unter Umsetzung von ATP phosphoryliert, eingesetzt.

Während Suramin und PPADS einen deutlichen Einfluss auf die ERK-Phosphorylierung nach Pam₃Cys-Stimulation zeigten, hatten die ATPase, die freigesetztes ATP zu ADP und AMP degradiert, und die Hexokinase, die ebenfalls ATP für die Bindung an den P2X-Rezeptor unbrauchbar macht, lediglich einen schwachen Effekt auf die Phosphorylierung der MAPKinasen (Abbildung 21 c/d). Der Mechanismus, der zu der Aktivierung von ADAM17 und entsprechend zu der Freisetzung von EGFR-Liganden führt, scheint nach diesen Ergebnissen also unabhängig von freigesetztem ATP zu sein. Ein P2-Rezeptor ist jedoch möglicherweise daran beteiligt.

Zuletzt wurde der Einfluss von bestimmten Ionen auf den Transaktivierungs-Mechanismus überprüft. Die Aktivierung von ADAMs mit dem Ionophor Ionomycin wird direkt mit dem Ca²⁺-Influx in das Cytoplasma in Verbindung gebracht und auch die Proteinkinase C, die wie in Abbildung 21 a/b gezeigt zumindest anteilig eine Rolle bei der Aktivierung von ADAM17 spielen könnte, ist Ca²⁺-Ionen-abhängig. Der Chelator EGTA, der im extrazellulären Raum Ca²⁺-Ionen bindet, hatte, wie in Abbildung 21 e/f zu sehen, kaum einen Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung. Der membrangängige Calcium-Chelator Bapta AM hingegen, der intrazellulär Ca²⁺-Ionen bindet, hat die Phosphorylierungsrate signifikant herabgesetzt, was auf eine Beteiligung von cytoplasmatischen Ca²⁺-Ionen an der Aktivierung von ADAM17 durch TLR1/2 schließen lässt (Abbildung 21 e/f).

Der Einfluss von K⁺ und Cl⁻ Ionen-Ausstrom aus der Zelle im Kontext der Stimulation mit Pam₃Cys wurde ebenfalls überprüft, da dies mit pro-apoptischen Prozessen nach der Erkennung einer bakteriellen Infektion durch TLRs in Verbindung gebracht wird. Es sollte geklärt werden, ob die Phosphorylierung von ERK1/2 ebenfalls in diesen Signalweg involviert ist, obwohl dies untypisch für den EGFR/ERK-Signalweg ist, da dieser normalerweise eine anti-apoptische Wirkung hat. Durch Zugabe von 10 mM KCl zum Zellkulturmedium wurde ein Ausstrom der beiden Ionen aus der Zelle verhindert, da der Extrazellulärraum mit diesen Ionen übersättigt war und das für den Efflux essentielle Konzentrationsgefälle fehlte. Dies hatte jedoch wie erwartet nur einen leichten, aber keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 nach der Stimulation mit Pam3Cys.

3.3 Regulation der proteolytischen Aktivität von ADAM17 in Abhängigkeit von der Transmembrandomäne

Die Aktivität von ADAM-Proteasen kann durch verschiedene physiologische und nicht physiologische Stimuli, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, PMA oder Ionomycin, reguliert werden. An der Aktivierung sind wie bereits beschrieben Signalmoleküle wie zum Beispiel die PKC oder Ca^{2+} -Ionen beteiligt. Auch die Struktur der Proteasen selbst scheint von großer Bedeutung für die Regulation der Aktivität zu sein. Welcher Mechanismus letztendlich zu einer Aktivierung der Proteasen führt ist jedoch noch weitgehend unklar. Es gibt kontroverse Befunde darüber, welche Domänen tatsächlich in die Aktivierung involviert sind. Insbesondere die Beteiligung der cytoplasmatischen Domäne ist umstritten. So gibt es verschiedene Publikationen, die zeigen, dass die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 auf Grund ihrer Phosphorylierungsstellen notwendig für die stimulierbare und die konstitutive Aktivität ist (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003; Xu & Derynck, 2010). Andere Veröffentlichungen zeigen wiederum, dass auch ADAM17-Mutanten, deren cytoplasmatische Domäne fehlt, konstitutiv aktiv und stimulierbar sind (Reddy *et al.*, 2000; Doedens *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2010).

Eine weitere Domäne, die in die Aktivierung und Regulation der proteolytischen Aktivität von ADAMs involviert sein könnte, ist die Transmembran (TM)-Domäne. Es wurde gezeigt, dass das Austauschen der TM-Domäne gegen die transmembrane α -Helix eines anderen membranständigen Proteins zu einer Veränderung der *Shedding*-Eigenschaften von ADAM17 und ADAM10 geführt hat (Horiuchi *et al.*, 2007b; Le Gall *et al.*, 2010). Auch das Ergebnis aus Abbildung 11 (siehe 3.1.4) zeigt, dass ADAM17 nicht mehr durch FGF7 stimulierbar ist, wenn die Transmembran-Domäne durch die von CD62-L ersetzt ist, wohl aber, wenn die cytoplasmatische Domäne fehlt. Es ist vorstellbar, dass die Transmembran-Domäne Wechselwirkungen mit den Transmembran-Domänen der entsprechenden Substrate eingeht und dadurch zur ebenfalls noch kaum verstandenen Substratspezifität beiträgt.

Um dies zu untersuchen wurden *Shedding*-Experimente mit Alkalischer-Phosphatase (AP)-gekoppelten Substraten in ADAM10/17 doppel-defizienten murinen Fibroblasten (ADAM10/17 dKo meFs) durchgeführt, die die Substratspezifität sowie die Spezifität einzelner Stimuli bestimmen sollten.

Um die Beteiligung der cytoplasmatischen Domänen von ADAM10 und ADAM17 an der proteolytischen Prozessierung der jeweiligen Substrate Betacellulin (BTC) und *Transforming Growth Factor alpha* (TGF α) zu untersuchen, wurden in den *Shedding*-Versuchen verkürzte Protease-Konstrukte eingesetzt, deren Sequenz intrazellulär kurz hinter der Cytoplasmamembran aufhört.

Die relative Umsetzung des ADAM10-Substrates Betacellulin ist in Abbildung 22 gezeigt. Die Freisetzung des AP-gekoppelten Substrates in den Überstand wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und zu der an der Zelloberfläche verbleibenden AP-Aktivität ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Wildtyp-ADAM10-Konstrukt transfiziert, dessen gemessene Aktivität als Referenzwert diente. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, ist nur ADAM10, nicht aber ADAM17 in der Lage, Betacellulin zu prozessieren. Des Weiteren zeigt Abbildung 22, dass nur das Calcium-Ionophor Ionomycin fähig ist, die Aktivität von ADAM10 zu stimulieren. Der Phorboldiester PMA hat keinen Einfluss auf die Aktivität von ADAM10. Die Mutante von ADAM10, der die cytoplasmatische Domäne fehlt, hat zwar nur eine halb so hohe *Shedding*-Rate wie das Wildtyp-Konstrukt, die Aktivität ist jedoch immer noch um ein vierfaches durch Ionomycin erhöht.

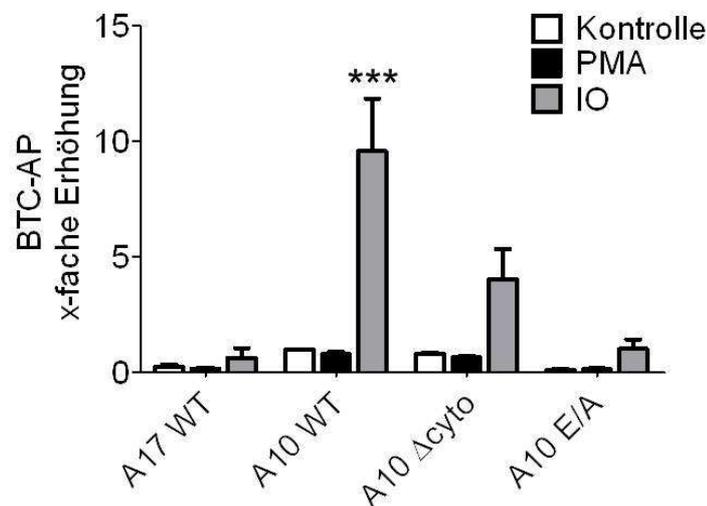


Abbildung 22: Shedding von Betacellulin durch ADAM-Proteasen.

ADAM10/17 defiziente murine Fibroblasten wurden mit Alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Betacellulin (BTC-AP) transfiziert. Gleichzeitig wurde entweder Wildtyp-ADAM10 (A10 WT), Wildtyp-ADAM17 (A17 WT), ADAM10 ohne cytoplasmatische Domäne (A10 Δ cyto) oder eine proteolytisch inaktive ADAM10-Mutante (A10 E/A) in die Zellen eingebracht. Nach 24 h wurden die Zellen mit 200 ng/ml PMA für 2 h oder mit 1 μ M Ionomycin (IO) für 30 min stimuliert. Die *Shedding*-Rate wurde relativ zu der Aktivität des WT-Konstruktes dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

*** $p < 0,001$ im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse)

Im Gegensatz zu Betacellulin ist TGF α , wie in Abbildung 23 gezeigt, ein spezifisches ADAM17-Substrat und wird nicht von ADAM10 prozessiert. Abbildung 23 zeigt außerdem, dass die Aktivität von ADAM17 sowohl durch Ionomycin als auch durch PMA stimuliert werden kann. Dadurch kann PMA in diesem Versuchsaufbau und für diese Substrate als präferenzzieller ADAM17 Stimulus in Abgrenzung zu ADAM10 betrachtet werden.

Im Fall von ADAM17 und TGF α ist die Aktivität der Mutante ohne cytoplasmatische Domäne in gleichem Maße wie das Wildtyp-Molekül durch Ionomycin und PMA stimulierbar (siehe Abbildung 23).

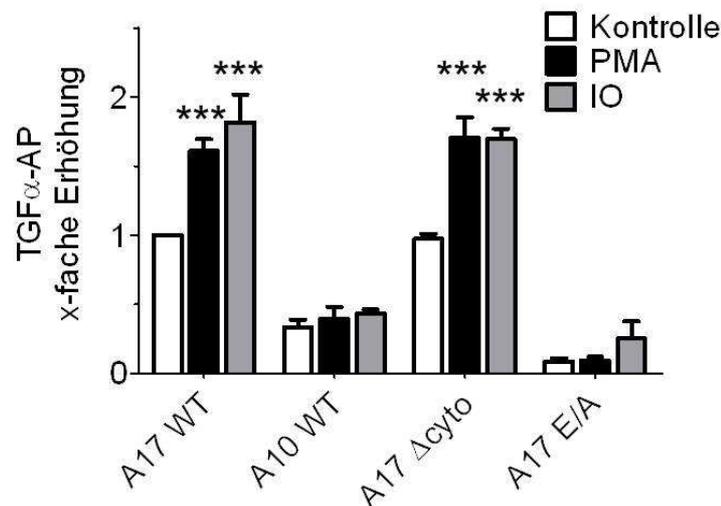


Abbildung 23: Shedding von TGFalpha durch ADAM-Proteasen.

ADAM10/17 defiziente murine Fibroblasten wurden mit Alkalischer Phosphatase-gekoppeltem TGF α (TGF α -AP) transfiziert. Gleichzeitig wurde entweder Wildtyp-ADAM10 (A10 WT), Wildtyp-ADAM17 (A17 WT), ADAM17 ohne cytoplasmatische Domäne (A17 Δ cyto) oder eine proteolytisch inaktive ADAM17-Mutante (A17 E/A) in die Zellen eingebracht. Nach 24 h wurden die Zellen mit 200 ng/ml PMA für 2 h oder mit 1 μ M Ionomycin (IO) für 30 min stimuliert. Die *Shedding*-Rate wurde relativ zu der Aktivität des WT-Konstruktes dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

*** p<0,001 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse)

Neben der Beteiligung der cytoplasmatischen Domäne an der Regulation der Aktivität von ADAM10 und ADAM17, wurde außerdem die Rolle der Transmembran-Domäne von ADAM17 untersucht. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Austauschen der Transmembrandomäne einer ADAM-Protease durch die Transmembran-Domäne einer anderen Protease aus dieser Familie oder eines

beliebigen membrandurchspannenden Proteins, zu dem Verlust der spezifischen Aktivität der Protease führt (Horiuchi *et al.*, 2007b).

Um dies genauer zu untersuchen, wurden strukturell auffällige Motive in der Transmembran-Domäne von ADAM17 verändert, so zum Beispiel die drei aromatischen, von der α -Helix in die Lipidschicht hineinragenden Phenylalanin-Reste A17 TM_{mut1-3}). Zudem wurde der Histidin-Rest 692, der sich an der Grenzschicht der Membran zum Cytoplasma befindet und in dieses hineinragt, ausgetauscht (A17 TM_{mut6}). Weiterhin wurde in A17 TM_{mut4} das Glycin-Serin-Motiv (Position 674/675) ausgetauscht, da diese beiden Aminosäuren α -helikale Strukturen unterbrechen können, was wiederum Konformationsänderungen zur Folge haben könnte (Li & Deber, 1994; Fluhrer *et al.*, 2012). Ein solcher Helixbruch wurde ebenfalls in Zusammenhang mit dem *Shedding* eines membranständigen Substrates der Site-2-Protease (S2P) beschrieben (Ye *et al.*, 2000). In dieser Studie wird die Hypothese aufgestellt, dass ein Prolin-Rest in der Transmembran-Domäne des Substrates SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) einen Helixbruch bewirkt, der ein „Herausschieben“ des Proteins aus der Lipid-Membran zur Folge hat, was dann wiederum den Zugang zur Spaltstelle für die Site-2-Protease freilegt. Der Prolin-Rest 686 wurde daher in A17 TM_{mut5} zu Alanin mutiert, um zu untersuchen, ob ein solcher Federmechanismus ebenfalls bei ADAM17 vorliegt und möglicherweise an der Aktivierung beteiligt ist.

In Tabelle 10 sind die verschiedenen Aminosäure-Sequenzen der Transmembran-Domänen der einzelnen Mutanten gegeneinander verglichen. Die hervorgehobenen Aminosäurereste wurden jeweils durch eine Alanin-Seitenkette ersetzt.

Tabelle 10: Transmembran-Mutanten von ADAM17. Durch Alanin ausgetauschte Aminosäurereste sind orange markiert

Bezeichnung	Aminosäure-Sequenz	Mutierte Aminosäuren
ADAM17 WT	...I V G S V L V F S L I F W I P F S I L V H C V...	---
A17 TM _{mut1}	...I V G S V L V A S L I F W I P F S I L V H C V...	F679
A17 TM _{mut2}	...I V G S V L V A S L I A W I P F S I L V H C V...	F679, F683
A17 TM _{mut3}	...I V G S V L V A S L I A W I P A S I L V H C V...	F679, F683, F687
A17 TM _{mut4}	...I V A A V L V F S L I F W I P F S I L V H C V...	G674, S675
A17 TM _{mut5}	...I V G S V L V F S L I F W I A F S I L V H C V...	P686
A17 TM _{mut6}	...I V G S V L V F S L I F W I P F S I L V A C V...	H692

Die verschiedenen Mutanten wurden in *Shedding*-Experimenten mit AP-gekoppeltem TGF α als Substrat untersucht.

Abbildung 24 zeigt, dass die ADAM17 Mutanten TM_{mut1}, TM_{mut2} und TM_{mut3} zwar jeweils eine leicht geringere Grundaktivität aufweisen als das Wildtyp-Enzym, jedoch trotzdem noch durch PMA aktivierbar sind. Ob dabei eine, zwei oder drei der ringförmigen, aromatischen Phenylalanin-Seitenketten deletiert sind, macht für die Stimulierbarkeit und die Aktivität keinen Unterschied.

Der Austausch von Histidin₆₉₂, einer basischen und ebenfalls aromatischen Aminosäure, die sich an der Grenzschicht der Plasmamembran zum Cytoplasma befindet (A17 TM_{mut6}), hat auf die Aktivität und Stimulierbarkeit von ADAM17 in Bezug auf das TGF α -Shedding in diesem Ansatz ebenfalls keinen Einfluss.

Die Transmembran-Mutanten 4 und 5 zeigen eine leicht erhöhte Grundaktivität, die im Fall von A17 TM_{mut5} im Vergleich zu Wildtyp-ADAM17 sogar signifikant gesteigert ist. Auch die PMA-stimulierte Aktivität ist bei beiden Konstrukten entsprechend leicht erhöht, wobei die Stimulation bei A17 TM_{mut4} jedoch nicht signifikant ist.

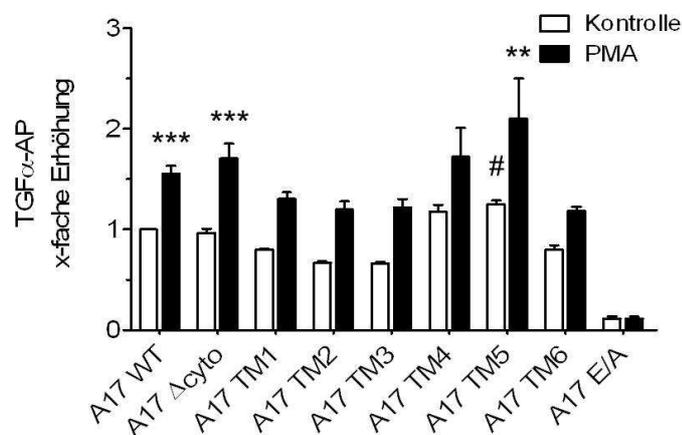


Abbildung 24: Shedding von TGF α durch ADAM17-Transmembran-Mutanten.

ADAM10/17 defiziente murine Fibroblasten wurden mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem TGF α (TGF α -AP) transfiziert. Gleichzeitig wurde entweder Wildtyp-ADAM17 (A17 WT), ADAM17 ohne cytoplasmatische Domäne (A17 Δ cyto), eine der ADAM17 Transmembran-Mutanten (A17 TMmut1-6) oder eine proteolytisch inaktive ADAM17-Mutante (A17 E/A) in die Zellen eingebracht. Nach 24 h wurden die Zellen mit 200 ng/ml PMA für 2 h stimuliert. Die *Shedding*-Rate wurde relativ zu der Aktivität des WT-Konstruktes dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

*** p<0,001; ** p<0,01 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle; # p<0,05 im Vergleich zu A17 WT Kontrolle (gemäß ANOVA und Bonferroni *post-hoc* Analyse).

Diese Ergebnisse lassen keine eindeutige Aussage zu den für die Regulation von ADAM17 essentiellen Aminosäuren und Motiven zu.

4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Zelloberflächen-Rezeptoren wie die Keratinocyten-spezifische Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR2b und Toll-*like*-Rezeptoren (TLRs) nach Bindung ihrer spezifischen Liganden in der Lage sind, den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR in Abhängigkeit von der Metalloprotease ADAM17 zu transaktivieren. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, wie die proteolytische Aktivität von ADAMs im Allgemeinen und von ADAM17 im Speziellen reguliert wird.

4.1 Transaktivierung des EGFR durch den FGFR2b

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) haben spezifische Liganden, die innerhalb einer Familie von Rezeptoren entweder mehrere oder nur eine ganz spezifische Isoform aktivieren können. Es wird angenommen, dass die Aktivierung jedes einzelnen Rezeptors eine Signalkaskade anschaltet, welche über verschiedene Zwischenstufen am Ende direkt zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt (McKay & Morrison, 2007). Die Beteiligung bestimmter intrazellulärer Adaptermoleküle, welche für jedes Signal definiert sind, ermöglicht der Zelle eine sehr spezifische und differenzierte Antwort auf die unterschiedlichen Faktoren und Signale, die extrazellulär vermittelt werden. Diese kann durch die Menge an Botenstoffen, durch Rückkopplungsmechanismen, die die Dauer der Stimulation beeinflussen sowie durch das Zusammenspiel verschiedener Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Hormone zusätzlich moduliert werden (Wetzker & Böhmer, 2003). Die Entdeckung, dass verschiedene Rezeptorklassen den EGF-Rezeptor transaktivieren können, erweitert das Spektrum an möglichen zellulären Antworten auf einen einzigen Stimulus, der dann gleich zwei synergistische Signalwege auf einmal aktiviert. Diese zwei Signalwege können verwandt und daher recht ähnlich sein, wie in den Beispielen, in denen der EGFR von anderen RTKs, wie dem PDGFR (Mendelson *et al.*, 2010) oder dem VEGFR (Swendeman *et al.*, 2008) transaktiviert wird. Sie können jedoch auch unterschiedlicher Natur sein, wie im Fall der GPCR-vermittelten Transaktivierung des EGFR (Saito & Berk, 2001). In jedem Fall aber erweitert sich das

Spektrum an möglichen Antworten, mit der die Zelle auf einen Stimulus reagiert, was als Konsequenz daraus eine stärkere Spezifizierung ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde mit dem FGFR2b das erste Beispiel beschrieben, bei dem ein Rezeptor aus der Klasse der RTKs keinen eigenen, direkten Signalweg induzieren kann, sondern bei dem die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 ausschließlich durch den EGFR und damit in Abhängigkeit von ADAM17 vermittelt wird.

Dies zeigte sich insbesondere daran, dass in der Stimulations-Zeitreihe mit dem FGFR2b-Liganden FGF7 bereits nach 5 Minuten das Signal der ERK-Phosphorylierung vollständig durch den Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM) unterbunden wurde (siehe Abbildung 8). Dieser Effekt trat bei der Stimulation des VEGFR auf HUVEC-Zellen erst nach 30 Minuten auf (siehe Anhang: Marezky *et al.*, 2011; Abb. 1), was darauf hindeutet, dass es in dem Fall mindestens zwei Signaltransduktionswege gibt, die zur Phosphorylierung von ERK1/2 führen: einen direkten, Metalloprotease-unabhängigen sowie einen Metalloprotease-abhängigen Weg, wobei die Rolle der Metalloprotease erst nach längeren Stimulationszeiträumen sichtbar wird, wenn der frühe, direkte Signalweg nachlässt. Dass jedoch in beiden Fällen (beim FGFR2b und beim VEGFR) bereits 5 Minuten nach Stimulation des Rezeptors mit dem entsprechenden Liganden eine Metalloprotease aktiviert wird, welche EGFR-Liganden freisetzt, zeigt sich in den Untersuchungen mit der EGFR-überexprimierenden Karzinom-Zelllinie A431. Die A431-Zellen, welche weder den VEGFR noch den FGFR2b auf der Oberfläche tragen und somit nicht auf direkte Stimulation mit den entsprechenden Liganden VEGF-A und FGF7 reagieren, wurden mit konditionierten Überständen von HUVECs oder primären humanen Keratinocyten (phKs) stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überstände von den Zellen, die vorher mit VEGF-A oder FGF7 inkubiert wurden, in der Lage waren, eine Phosphorylierung von ERK1/2 in A431-Zellen auszulösen. In beiden Fällen wurde dieser Effekt bereits nach 5 Minuten festgestellt und konnte durch die Zugabe von Marimastat zu den ursprünglich stimulierten Zellen aufgehoben werden. Dies bedeutet, dass sowohl der FGFR2b als auch der VEGFR innerhalb von 5 Minuten nach Ligandenzugabe eine Metalloprotease aktivieren, welche EGFR-Liganden freisetzt, was wiederum zur Transaktivierung des EGFR führt. Auch wenn die Versuche, bei denen ausschließlich ein Zelltyp verwendet und somit im engeren Sinne nur die autokrine Signaltransduktion betrachtet wurde, auf den ersten Blick unterschiedliche Ergebnisse für die ERK1/2-Aktivierung durch den VEGFR auf HUVECs und den FGFR2b auf

Keratinocyten zeigten, handelt es sich möglicherweise bei beiden RTKs um einen ähnlichen Mechanismus, der zur Aktivierung einer Metalloprotease führt.

Dass das beobachtete Signal der phosphorylierten MAP-Kinasen ERK1/2 durch den EGFR vermittelt wird und nicht durch einen anderen Rezeptor konnte durch den Einsatz des EGFR-blockierenden, monoklonalen Antikörpers Cetuximab sowie verschiedener Inhibitoren, die die EGFR-vermittelte Signaltransduktion stören, gezeigt werden. Alle diese Substanzen haben die ERK1/2-Phosphorylierung vollständig verhindert, was nicht der Fall gewesen wäre, wenn die Kinasen durch den FGFR2b direkt aktiviert werden könnten, wie bisher allgemein angenommen wurde (Schlessinger, 2004).

HB-EGF wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz der Diphtherietoxin-Isoform CRM197 als ein an der EGFR-Transaktivierung beteiligter Ligand identifiziert. Diese ungiftige Mutante des Diphtherietoxins bindet spezifisch an humanes HB-EGF (Naglich *et al.*, 1992) und macht es deshalb für die Bindung an den EGFR untauglich, was dazu führte, dass der Effekt von FGF7 zum Beispiel in den Migrationsversuchen stark gehemmt war (siehe Abbildung 12). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben HB-EGF eventuell auch andere EGFR-Liganden nach Stimulation des FGFR2b durch ADAM17 freigesetzt werden und zur Transaktivierung des EGFR beitragen. Es kommen die Liganden TGF α , Amphiregulin und Epregrulin in Frage, da diese ebenfalls durch ADAM17 prozessiert werden (Sahin *et al.*, 2004). Da ADAM10 nicht durch den FGFR2b aktiviert wird (siehe Abbildung 10), sind die EGFR-Liganden Betacellulin und EGF, welche als ADAM10-Substrate beschrieben wurden (Sahin *et al.*, 2004), vermutlich nicht an der EGFR-Transaktivierung durch den FGFR2b beteiligt.

Die Verwendung von konditionalen ADAM17-*knockout*-Mäusen in dieser Arbeit zeigte, dass dies höchstwahrscheinlich die verantwortliche Metalloprotease bei der Transaktivierung des EGFR in Keratinocyten ist. Dass TACE als *Sheddase* von HB-EGF maßgeblich an solchen Prozessen beteiligt ist, wurde auch in den meisten anderen Arbeiten, die sich mit der Metalloprotease-abhängigen Transaktivierung des EGFR befassen, vermutet (Gschwind *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2004a; Mifune *et al.*, 2005). Manche Arbeiten beschreiben allerdings auch ADAM10 oder ADAM12 als hauptverantwortliche Protease im Zusammenhang mit GPCR-vermittelter EGFR-Transaktivierung, wobei ebenfalls HB-EGF der entscheidende Ligand gewesen sein soll (Asakura *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2002). Diese Unstimmigkeiten in der Zuordnung von spezifischen Substraten zu einer bestimmten Protease ist wahrscheinlich dadurch begründet, dass den einzelnen Studien unterschiedliche Ansätze zugrunde liegen. So

zeigten zum Beispiel grundlegende *loss of function*-Versuche mit *knockout*-Zellen, dass ADAM17 unverzichtbar für das Shedding der EGFR-Liganden TGF α , HB-EGF, Amphiregulin und Epiregulin ist, wohingegen ADAM10 für das Shedding von EGF und Betacellulin essentiell ist (Merlos-Suárez *et al.*, 2001; Sunnarborg *et al.*, 2002; Sahin *et al.*, 2004; Sanderson *et al.*, 2005; Horiuchi *et al.*, 2007b). Überexpressions-Studien lassen jedoch den Schluss zu, dass auch andere ADAMs, wie ADAM8, 12 und 19, prinzipiell in der Lage sind eben diese Substrate zu spalten (Kurisaki *et al.*, 2003; Gschwind *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2004b; Horiuchi *et al.*, 2005). Beide Ansätze sind wichtig und auch berechtigt, allerdings müssen sie differenziert betrachtet werden. Während *loss of function*-Untersuchungen zeigen, welche Protease unter physiologischen Bedingungen unverzichtbar für das *Shedding* eines bestimmten Substrates ist, geben *gain of function*-Experimente, bei denen einzelne ADAMs überexprimiert werden, darüber Auskunft, welche Proteasen generell die Fähigkeit haben, das Substrat zu erkennen und zu prozessieren. Dies kann beispielsweise unter pathologischen Bedingungen wie in einigen Tumoren eine Rolle spielen, in denen manche ADAMs hochreguliert sind und somit eventuell doch an *Shedding*-Prozessen beteiligt sein können, obwohl sie das bestimmte Substrat unter normalen Bedingungen gar nicht schneiden würden (Kveiborg *et al.*, 2005; Mazzocca *et al.*, 2005; Peduto *et al.*, 2005; Peduto *et al.*, 2006). Dieses Phänomen, dass verschiedene ADAM-Proteasen zwar das gleiche Substrat prozessieren können, dies aber abhängig vom Kontext jeweils nur von einer Protease übernommen wird, ist zum Beispiel auch beim *Shedding* des Notch-Rezeptors zu beobachten, welcher kontextabhängig entweder von ADAM10 oder von ADAM17 gespalten und somit aktiviert wird (Christian, 2012). Während ADAM10 insbesondere für die Liganden-induzierte Signaltransduktion essentiell ist, hat ADAM17 eine Funktion bei der Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Rezeptors (Bozkulak & Weinmaster, 2009).

Weiterhin ist zu bemerken, dass auch der jeweilige Stimulus, der in den Experimenten eingesetzt und untersucht wird einen Einfluss auf die Substratspezifität einer Protease haben kann (Herrlich *et al.*, 2008), was laut der Gruppe um Harvey Lodish auf die Beteiligung unterschiedlicher PKC-Isoformen bei der Aktivierung von ADAMs zurückzuführen ist (Dang *et al.*, 2011). Demnach aktivieren die verschiedenen physiologischen und auch unphysiologischen Stimuli, die bekanntermaßen eine Steigerung der proteolytischen Aktivität von ADAMs induzieren, unterschiedliche PKC-Isoformen, welche dann wiederum entweder mit einem spezifischen Substrat oder mit

einer bestimmten Protease oder mit beiden interagieren und dadurch die Substratspezifische Proteolyse vermitteln.

Auch die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen in den verschiedenen Studien kann ein möglicher Grund für die unterschiedliche Benennung der hauptverantwortlichen Protease sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ADAM17 maßgeblich an der Transaktivierung des EGFR durch den FGFR2b in Keratinocyten beteiligt ist, was sowohl durch Überexpression der Protease in Fibroblasten als auch durch den genetischen *knockout* von ADAM17 in primären murinen Keratinocyten gezeigt wurde. Dass nur ADAM17, nicht jedoch ADAM10 durch die Stimulation mit FGF7 aktiviert werden kann, wurde in Shedding-Experimenten mit für die jeweilige Protease spezifischen Substraten gezeigt (siehe Abbildung 10).

Zusammengefasst führten die Ergebnisse der Untersuchungen zur Transaktivierung des EGFR durch den FGFR2b zu dem in Abbildung 25 dargestellten Modell.

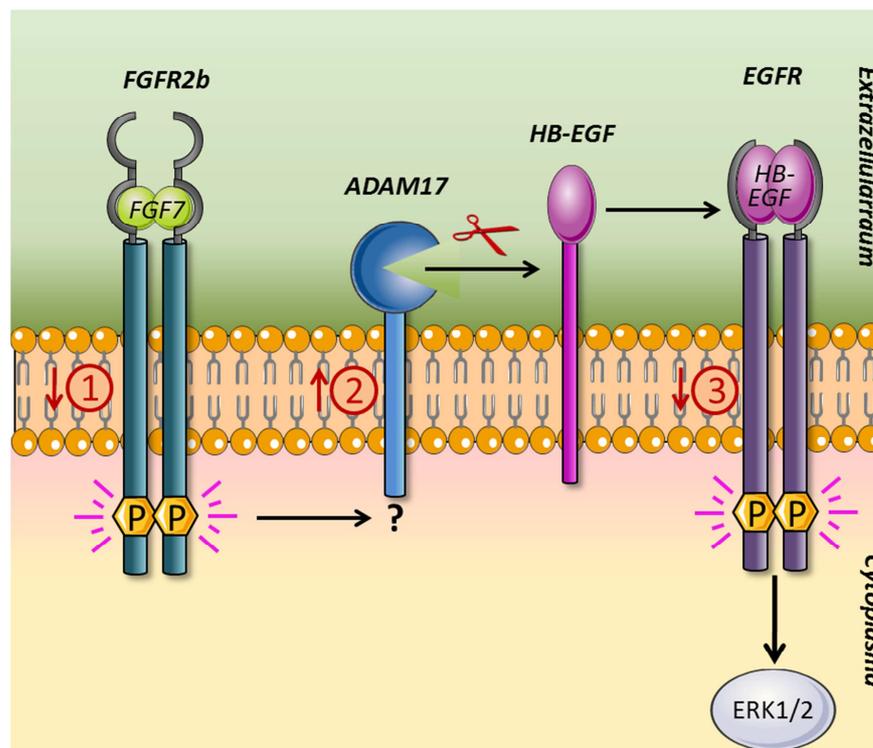


Abbildung 25: Modell zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch Stimulation des FGFR2b in Abhängigkeit von ADAM17. Da dieser Signalweg die Plasmamembran dreimal überquert, wird er als *triple membrane spanning pathway* bezeichnet. Die Bindung von FGF7 führt zur Aktivierung des FGFR2b, welcher das Signal ins Zellinnere leitet (1). ADAM17 wird aktiviert, was zu einem extrazellulären *Shedding*-Ereignis führt, bei dem HB-EGF freigesetzt wird (2). Dieser EGFR-Ligand bindet an den Rezeptor, was letztendlich intrazellulär zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt (3).

Der Signalweg, der nach der Stimulation des FGFR2b mit FGF7 zur Phosphorylierung von ERK1/2 führt, kann als *triple membrane spanning pathway* bezeichnet werden, da das Signal die Plasmamembran dreimal überquert, bevor letztendlich die MAP-Kinasen ERK1/2 phosphoryliert werden. Der erste Schritt ist die Aktivierung des FGFR2b, welcher das Signal in die Zelle leitet (1) und über einen bislang unbekanntem Mechanismus die Metalloprotease ADAM17 stimuliert. Diese vermittelt anschließend die extrazelluläre Spaltung eines EGFR-Liganden (2), z.B. HB-EGF, welcher dann an den EGF-Rezeptor bindet und diesen aktiviert. Dies leitet das Signal wieder zurück ins Zellinnere (3) und führt letztendlich zu der Phosphorylierung von ERK1/2.

Diese Signalweiterleitung, die mehrfach die Plasmamembran überwindet, wurde ursprünglich für die Transaktivierung des EGFR durch GPCRs beschrieben (Wetzker & Böhmer, 2003). Gleichzeitig wurde auch eine intrazelluläre, direkte Aktivierung von MAP-Kinasen durch GPCRs postuliert, bei der G-Proteine über die Proteinkinase A direkt Raf und somit die MAP-Kinase Kaskade aktivieren, die letztendlich zur Phosphorylierung von ERK1/2 führt (Schmitt & Stork, 2000). Es wurde außerdem angenommen, dass cytoplasmatische Kinasen wie Src oder Pyk2 durch GPCRs aktiviert werden und anschließend den EGFR intrazellulär phosphorylieren, was einer Aktivierung ohne Liganden-Bindung entsprechen würde und ebenfalls zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Andreev *et al.*, 2001). Diese beiden intrazellulären Protein-Kinasen werden heute jedoch eher als *downstream*-Effektoren des EGFR betrachtet (Schauwienold *et al.*, 2008) oder mit der zwischengeschalteten Aktivierung einer Metalloprotease in Verbindung gebracht (Maretzky *et al.*, 2011). Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass die Transaktivierung des EGFR in den meisten Fällen durch die extrazelluläre Ligandenbindung erfolgt und die Aktivität einer Metalloprotease erfordert, auch wenn es Ausnahmen gibt, die einen alternativen, Metalloprotease-unabhängigen Weg benutzen (Blobel, 2005).

Es stellt sich zwangsläufig die Frage, warum es so viele verschiedene Rezeptoren für unterschiedliche Liganden auf der Zelloberfläche gibt, wenn am Ende doch immer wieder ein bestimmter Signaltransduktionsweg, nämlich der EGFR-vermittelte, angeschaltet wird - insbesondere im Fall von FGFR2b, der als einzige bekannte RTK keinen eigenen, direkten Weg zur Aktivierung von ERK1/2 hat. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung des FGFR2b noch weitere

Signaltransduktionswege im Zellinneren induziert, welche bislang allerdings noch unbekannt sind.

Eine mögliche Erklärung für die Verknüpfung von Signalwegen ist in diesem Fall, dass die Stimulation eines bestimmten, zelltypspezifischen Rezeptors (FGFR2b) zur Freisetzung anderer Liganden (z.B. HB-EGF) führt, welche auch benachbarte Zellen erreichen können: Neben der autokrinen Transaktivierung des EGFR, bei der die Rezeptoren auf der gleichen Zelle oder im weiteren Sinne auf dem gleichen Zelltyp aktiviert werden, stellt die parakrine Aktivierung eine Möglichkeit dar, das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen innerhalb eines Gewebes zu regulieren. Durch diesen Mechanismus können auch angrenzende Zellschichten aktiviert werden, welche keinen passenden Rezeptor für das ursprüngliche Signal haben. Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Keratinocyten könnten beispielsweise die Zellen des Bindegewebes (z. B. Fibroblasten) stimuliert und zur Proliferation angeregt werden, was im weitesten Sinne zum Beispiel beim Prozess der Wundheilung förderlich sein könnte. Es wurde außerdem beschrieben, dass es unterschiedliche Effekte haben kann, wenn der EGFR direkt mit einem Liganden stimuliert wird oder wenn die Aktivierung indirekt über einen GPCR erfolgt, obwohl diese nachweislich auch zur Freisetzung endogener Liganden führt (Drube *et al.*, 2006). Wie dieses Paradigma zu erklären ist, ist unbekannt, es könnte jedoch klinische Relevanz haben, wenn man bedenkt, dass eventuell nur ein ganz bestimmter Transaktivierungsweg für pathologische Befunde verantwortlich sein könnte und dass die physiologischen Funktionen des Signalwegs unbeeinträchtigt blieben, wenn man die vorangehenden Transaktivierungswege inhibieren würde. Dies genauer zu untersuchen ist schwierig, da es sich bei der EGFR-vermittelten Signaltransduktion offensichtlich sowohl „*upstream*“ als auch „*downstream*“ des Rezeptors um ein sehr komplexes Netzwerk von möglichen beteiligten Molekülen und Wegen handelt.

Wie oben schon erwähnt führt die Stimulation von Zellen mit unterschiedlichen Faktoren zur proteolytischen Freisetzung einzelner, wahrscheinlich sehr genau definierter Substrate und nicht zu einer generellen und unspezifischen Aktivierung von ADAM17. Darüber hinaus wird angenommen, dass die verschiedenen EGFR-Liganden jeweils eine etwas unterschiedliche, spezifische Zellantwort vermitteln (Dang *et al.*, 2011). Es ist denkbar, dass die Stimulation mit FGF7 zu einer sehr speziellen Aktivierung des EGFR führt, welche dann ganz spezifische Effekte auf die Proliferation und die Migration von Keratinocyten hat. Andere Aktivatoren der Keratinocytenmigration

und -proliferation, wie PAR1 (Gao *et al.*, 2010), der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (Yahata *et al.*, 2006) oder das antimikrobielle Peptid LL-37 (Tokumaru *et al.*, 2005) wurden ebenfalls mit der Aktivierung des EGFR in Verbindung gebracht. Möglicherweise ist ADAM17 in diesen Fällen ebenfalls involviert. Die Rolle des EGFR für die Homöostase der Haut sowie für die Wundheilung ist gut bekannt (Schneider *et al.*, 2008) und die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass diese maßgeblich durch die ADAM17-bedingte Freisetzung von EGFR-Liganden begründet ist. Dies konnte in nachfolgenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Blobel mit konditionalen *knockout*-Mäusen, bei denen ADAM17 in der Haut ausgeschaltet ist, bestätigt werden (Franzke *et al.*, 2012). Diese Studie zeigte, dass sich die Haut in Abwesenheit von ADAM17 zwar zunächst normal entwickelte, kurz nach der Geburt jedoch gravierende Defekte in der epidermalen Barriere aufwies, welche auf eine reduzierte EGFR-Signaltransduktion zurückzuführen sind und zur Entstehung von chronischer Dermatitis führten.

Ob es sich bei der Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch den FGFR2b um einen generellen Mechanismus für Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder sogar für RTKs allgemein handelt, konnte in dieser Arbeit nicht herausgefunden werden. Die Unspezifität der übrigen Rezeptor-Liganden-Paarungen innerhalb der FGFR-Familie hat eine eindeutige Zuordnung von Signalen unmöglich gemacht. Es ist jedoch reizvoll zu spekulieren, dass auch andere FGFRs einen Mechanismus zur Transaktivierung des EGFRs vermitteln können. Auch innerhalb der Klasse der RTKs gibt es neben dem PDGFR (Mendelson *et al.*, 2010), dem VEGFR (Swendeman *et al.*, 2008) und dem FGFR2b (Maretzky *et al.*, 2011) sicherlich noch andere Rezeptoren, die die Transaktivierung des EGFR induzieren. Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch andere Mitglieder ebenso wie der FGFR2b keinen eigenen, direkten Signalweg zu den MAP-Kinasen ERK1/2 aktivieren.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, ist die Frage nach dem Mechanismus, der in diesem Kontext zur Aktivierung von ADAM17 führt. Dies soll im folgenden Abschnitt vor allem im Hinblick auf die Domänenstruktur von ADAM17 ausführlicher diskutiert werden.

4.2 Bedeutung der Domänenstruktur für die Aktivität von ADAM17

Es gibt verschiedene Hypothesen zur Regulation der Aktivität von ADAM17. Da es sich um einen sehr schnellen Prozess handelt, der zur Steigerung der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 führt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein posttranslationales Ereignis handelt, welches nicht auf der Neusynthese des Enzyms beruht. Welche Domänen an der Aktivierung von ADAM17 beteiligt sind ist unklar und umstritten. Es gibt zudem Theorien, welche eine externe Regulation der Metalloprotease unabhängig von der Domänenstruktur vorschlagen.

So wird die konstitutive Aktivität von ADAM17 *in vivo* durch den extrazellulären, endogenen Inhibitor TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 3*) reguliert. Die Relevanz dieses negativen Regulators von ADAM17 wurde in Versuchen mit JunB/c-Jun-defizienten Mäusen deutlich, in welchen die Expression von TIMP3 herunterreguliert ist, da es unter der direkten Kontrolle der beiden Transkriptionsfaktoren JunB und c-Jun steht. Diese Mäuse weisen Psoriasis-ähnliche, inflammatorische Hautveränderungen auf, welche auf eine übermäßige TNF α -Freisetzung zurückzuführen sind. Diese ist wiederum durch die erhöhte TACE-Aktivität zu erklären, welche durch das Fehlen des Inhibitors TIMP3 begründet ist (Guinea-Viniegra *et al.*, 2009). Auch wenn Studien wie diese zeigen, dass TIMP3 die Aktivität von ADAM17 beeinflusst und dass dieser endogene Inhibitor dadurch eine physiologische Relevanz in der Entwicklung und in Entzündungen hat, gibt es keine Studien, die TIMP3 direkt mit der stimulierten Aktivierung durch externe Faktoren in Verbindung bringen. Es wurde stattdessen in TIMP3-*knockout*-Fibroblasten gezeigt, dass TIMP3 keine Rolle bei der PMA-stimulierten Aktivierung von ADAM17 spielt (Le Gall *et al.*, 2010), weshalb man davon ausgehen kann, dass diesem Inhibitor möglicherweise nur eine Rolle bei der Kontrolle des konstitutiven *Sheddings* zukommt, nicht jedoch bei der des stimulierten.

Ein weiteres Enzym, das möglicherweise einen externen Einfluss auf die Aktivität von ADAM17 hat, ist die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI). Es wurde mehrfach beschrieben, dass die Aktivierung von ADAM17 auf eine sehr schnelle Konformationsänderung zurückzuführen ist, welche die Metalloprotease-Domäne von einer geschlossenen, inaktiven in eine offene, aktive Form versetzen soll (Willems *et al.*, 2010; Le Gall *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012). Diese Änderung der Konformation ist möglicherweise durch eine Umverteilung von intramolekularen Disulfidbrücken bedingt, welche unter anderem durch PDIs vermittelt werden kann. Wie wiederum PDIs durch die ADAM17-

aktivierenden Stimuli reguliert werden ist unklar. Es wird jedoch vermutet, dass reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) daran beteiligt sein könnten, welche ebenfalls bereits mit der ADAM17-Aktivierung durch PMA oder Stressmediatoren in Verbindung gebracht wurden (Zhang *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2009). Sie verändern den Redox-Status innerhalb und auch außerhalb der Zelle und reduzieren so verfügbare Thiolgruppen, was die PDI hemmt. Die Inhibition der Isomerase führte zu einem gesteigerten HB-EGF-*Shedding*, weshalb vermutet werden kann, dass die PDI die inaktive Konformation von ADAM17 begünstigt und dadurch ebenfalls als Negativ-Regulator betrachtet werden kann (Willems *et al.*, 2010). Reaktive Sauerstoffspezies und Isomerasen können auch Effekte auf die Substrate von ADAM17 haben, wie zum Beispiel für L-Selektin und HB-EGF gezeigt wurde (Bennett *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005). Diese sind hauptsächlich auf die Veränderung der Verfügbarkeit durch Modulation der Lokalisation in der Zelle zurückzuführen.

Wenn man davon ausgeht, dass die stimulierte Aktivität von ADAM17 nicht nur durch externe Proteine reguliert sondern auch auf die eigene Domänenstruktur zurückzuführen ist, erscheint der cytoplasmatische Teil der Protease ein plausibler Mediator für verschiedene Stimuli zu sein. Verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle, welche durch externe Stimuli aktiviert werden, können mit der cytoplasmatischen Domäne interagieren. So sind zum Beispiel SH3-Bindungsdomänen bekannt und auch die Phosphorylierung einiger bestimmter Threonin- und Serin-Reste innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von ADAM17 wurde beschrieben (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003). Es konnte jedoch nie eindeutig und überzeugend gezeigt werden, dass diese Phosphorylierungs-Ereignisse, die beispielsweise durch die MAP-Kinasen p38 oder ERK vermittelt werden, direkt mit der Aktivierung von ADAM17 durch bekannte Stimuli zusammenhängen, auch wenn dies postuliert wurde (Xu & Derynck, 2010). Es wurde lediglich gezeigt, dass die Phosphorylierung von ADAM17 an Threonin 735 zur Maturierung der Protease beiträgt und den Transport an die Zelloberfläche fördert (Soond *et al.*, 2005). Es wurde in diesem Zusammenhang ein Modell vorgeschlagen, nach dem die Phosphorylierung von ADAM17 an seiner cytoplasmatischen Domäne zu einer Dissoziation von TACE-Dimeren führt, wie sie hauptsächlich auf der Zelloberfläche vorkommen sollen und welche durch die EGF-ähnliche Domäne vermittelt werden (Lorenzen *et al.*, 2011). Die Auflösung der Dimere

soll die Ablösung des endogenen Inhibitors TIMP3 zur Folge haben und somit zur Aktivierung von ADAM17 führen (Xu *et al.*, 2012).

Dass dies zu einer erhöhten Substrat-Freisetzung führt ist denkbar, wenn zum einen mehr Proteasemoleküle an die Oberfläche transportiert werden und zum anderen TIMP3 abgelöst wird, es scheint jedoch nicht der Hauptmechanismus zu sein, der die stimulierte *Shedding*-Aktivität - insbesondere von den Protease-Molekülen, welche sich bereits auf der Zelloberfläche befinden - reguliert. Dies wird durch Studien mit ADAM17-Konstrukten, denen die cytoplasmatische Domäne und somit jegliche Phosphorylierungsstellen fehlen, deutlich, da diese trotzdem durch diverse Stimuli normal aktivierbar waren (Reddy *et al.*, 2000; Doedens *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2010). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass nicht die cytoplasmatische sondern die Transmembran-Domäne entscheidend für die Stimulation von ADAM17 mit FGF7 sowie PMA und Ionomycin ist. Der Einsatz von verschiedenen ADAM17-Mutanten, von denen eine keine cytoplasmatische Domäne besitzt (ADAM17 Δ cyto) und die andere eine durch die α -Helix von L-Selektin ersetzte TM-Domäne hat (ADAM17-CD62L), zeigt dies in Bezug auf das *Shedding* von zwei verschiedenen ADAM17-Substraten. Die Stimulierbarkeit des HB-EGF-*Sheddings* mit FGF7 war in COS7-Zellen durch ADAM17 Δ cyto vollständig gegeben, wohingegen sich ADAM17-CD62L nicht mehr durch FGF7 stimulieren ließ (siehe Abbildung 11). Auch in ADAM17-defizienten murinen Fibroblasten konnte das *Shedding* von TGF α durch ADAM17 Δ cyto in gleichem Maße wie durch Wildtyp-ADAM17 durch Ionomycin und PMA stimuliert werden (siehe Abbildung 23).

Dass der Austausch der Transmembrandomäne von ADAM17 zu einem Verlust der stimulierbaren, nicht jedoch der konstitutiven Aktivität führt, zeigt, dass das Enzym offensichtlich korrekt synthetisiert wird und die Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des Substrates nicht beeinträchtigt ist. Die Hypothese, dass die Transmembran-Domäne maßgeblich an der Regulation der Aktivität beteiligt ist, wird in der Literatur durch verschiedene Befunde untermauert. Zum einen wurde postuliert, dass ADAM17 hauptsächlich in bestimmten Cholesterol-reichen Membrankompartimenten (*lipid rafts*) lokalisiert ist und dass die Depletion von Cholesterol zu einem erhöhten IL6-Rezeptor-*Shedding* führt (Matthews *et al.*, 2003). Dies trägt insofern zur Regulation der Aktivität bei, als dass die Einteilung in besondere Membranbereiche die Zugänglichkeit zu Substraten limitiert, deren Eintritt in *lipid rafts* wahrscheinlich spezifisch reguliert ist und ebenfalls von deren TM-Domäne abhängt (Tellier *et al.*, 2006; D'Alessio *et al.*,

2012). Dass der membrannaher Bereich möglicherweise ebenfalls zur Substratspezifität beiträgt, wurde durch den Einsatz von Chimären aus ADAM17 und den Transmembrandomänen von anderen membranständigen Proteinen gezeigt (Li *et al.*, 2007; Le Gall *et al.*, 2010). Es wurden in diesem Zusammenhang außerdem Substrat-Chimären untersucht, wobei festgestellt wurde, dass ein ADAM17-Substrat (TGF α), das die juxtamembrane Domäne eines ADAM10-Substrates (Betacellulin) trägt, nicht mehr durch ADAM17 gespalten werden konnte (Horiuchi *et al.*, 2007b). Diese Versuche, bei denen Proteine nach dem Baukasten-Prinzip aus einzelnen Domänen zusammengesetzt werden, sind natürlich sehr artifiziell und müssen durch weitere Untersuchungen mit physiologischeren Ansätzen überprüft werden. Nichts desto trotz geben sie einen Hinweis darauf, dass die cytoplasmatische Domäne verzichtbar für das stimulierte *Shedding* ist und der Bereich rund um die Plasmamembran eine wichtige Rolle spielt.

Dies passt zu dem Befund, dass Apoptose zur Induktion von ADAM17-vermitteltem L-Selektin- und IL6-Rezeptor-*Shedding* führt (Walcheck *et al.*, 2006; Chalaris *et al.*, 2007). Die Aktivierung von ADAM17 durch Faktoren, welche Apoptose induzieren (z. B. Fas Stimulation, UV-Licht, Cytokine), ist abhängig von der Aktivität von Caspasen, jedoch unabhängig von der Caspase- und auch PMA-aktivierbaren Proteinkinase C (PKC). Wie Caspasen unabhängig von der PKC ADAM17 aktivieren ist unklar. Der Mechanismus dahinter kann eventuell durch einen Effekt der Caspase auf die für die Apoptose charakteristischen Veränderungen an der Plasmamembran erklärt werden (Chalaris *et al.*, 2007). Es handelt sich bei diesen Membranveränderungen um die Exposition von Phosphatidylserin in der äußeren Schicht der Lipidmembran, was sich direkt auf die TM-Domäne und den juxtamembranen Bereich auswirken könnte und möglicherweise einen Einfluss auf die Konformation des Enzyms hat (Scheller *et al.*, 2011).

Kürzlich wurde ein weiteres Molekül entdeckt, das einen signifikanten Einfluss auf die Maturierung und den intrazellulären Transport von ADAM17 hat und somit an dessen Aktivierung beteiligt ist. Es handelt sich um die proteolytisch inaktive Rhomboid-Protease, iRhom2 (Lichtenthaler, 2013). Es wird vermutet, dass dieses membrandurchspannende Protein im ER mit ADAM17 interagiert und den Übergang vom ER in den Golgi-Apparat unterstützt. In Makrophagen von iRhom2-defizienten Mäusen ist die Expression von TACE zwar normal, es konnte jedoch kein aktives ADAM17 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass der Transport durch das Fehlen von iRhom2 unterbunden ist (Adrain *et al.*, 2012;

McIlwain *et al.*, 2012). Der genaue Mechanismus, wie iRhom2 die Maturierung und den Transport von ADAM17 reguliert ist noch unklar, es ist jedoch denkbar, dass iRhom2 als Protein mit sieben Transmembrandomänen direkt mit der TM-Domäne von ADAM17 interagiert.

Obwohl es sich bei der Aktivierung von ADAM17 sicherlich um einen vielschichtigen, mehrstufigen und streng regulierten Prozess handelt, der die Translokation innerhalb der Zelle und innerhalb der Zellmembran, die Modulation von Disulfidbrücken und die Wirkung extrazellulärer, inhibitorischer Proteine umfasst, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass im Hinblick auf die Domänenstruktur von ADAM17 der TM-Domäne dabei eine entscheidende Rolle zukommt, während die cytoplasmatische Domäne daran nicht beteiligt zu sein scheint.

Deshalb wird nachfolgend die Aminosäurezusammensetzung der TM-Domäne von ADAM17, welche in dieser Arbeit untersucht wurde, diskutiert.

4.2.1 Die Transmembrandomäne von ADAM17

Es wurde bereits für andere Proteasen an der Zelloberfläche gezeigt, dass deren Transmembran-Domäne oder auch die Transmembran-Domäne eines Substrates für die Vermittlung der spezifischen Spaltung notwendig ist. Es wurden dabei bestimmte Motive in der Aminosäuresequenz von Transmembran-Helices identifiziert, auf deren Grundlage die Mutation der TM-Sequenz von ADAM17 in dieser Arbeit erfolgte. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Aminosäure-Reste innerhalb der TM-Domäne oder im juxtamembranen Bereich mit Strukturen in der Lipidschicht interagieren können (Anderson & Jacobson, 2002). So sind zum Beispiel Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten von Phenylalaninen und den aliphatischen Ketten von Cholesterol, welches in *lipid rafts* angereichert ist, beschrieben (Taïeb *et al.*, 2004). Da ADAM17 in *lipid rafts* lokalisiert sein soll (D'Alessio *et al.*, 2012) und eine Reduktion der Anzahl an Phenylalanin-Resten innerhalb einer α -Helix zu einem Ausschluss aus diesen Membranbereichen führen kann (Bock & Gulbins, 2003), wurden in dieser Arbeit die drei Phenylalanin-Reste in der TM-Domäne von ADAM17 (F679, F683 und F687) durch Alanin-Reste ausgetauscht, um zu überprüfen, ob dies einen Einfluss auf die PMA-stimulierte Aktivität hat. Dies war nicht der Fall. Es müsste jedoch in weiteren Analysen überprüft werden, ob die Mutation der

Phenylalanin-Gruppen überhaupt zu einer Veränderung der Lokalisation von ADAM17 auf der Zelloberfläche führt oder ob das Enzym trotzdem mit *lipid rafts* assoziiert ist.

Eine weitere Möglichkeit der Interaktion von Transmembranproteinen mit *lipid rafts* bieten die membranproximalen Bereiche des Proteins. Da die innere Hälfte der Lipiddoppelschicht in diesen Bereichen normalerweise reich an negativ geladenem Phosphatidylserin (PS) ist, ist eine elektrostatische Interaktion mit positiv geladenen, basischen Aminosäuren wie Arginin, Lysin oder Histidin denkbar (Taïeb *et al.*, 2004). Der Histidinrest 692 von ADAM17, welcher sich an der Grenzschicht zwischen der Plasmamembran und dem Cytosol befindet wurde ebenfalls zu Alanin mutiert, was jedoch keinen Effekt auf die stimulierbare Aktivität der Protease hatte. Die Wechselwirkungen einer einzigen Aminosäure mit der Membran sind wahrscheinlich zu schwach um in diesem Kontext wirklich relevant zu sein.

Der membrandurchspannende Bereich eines Proteins liegt normalerweise in einer α -helikalen Struktur vor, bei der unpolare Aminosäurereste den Lipiden zugewandt sind und das polare Rückgrat der Peptidkette abschirmen. Studien zur regulierten intramembranen Proteolyse (RIP), einem sehr speziellen und bislang wenig verstandenen proteolytischen Vorgang, der im Inneren der Plasmamembran stattfindet, haben gezeigt, dass α -Helices nicht oder nur schwer von den Proteasen gespalten werden können (Ye *et al.*, 2000; Lemberg & Martoglio, 2002; Akiyama & Maegawa, 2007). Daher sind für die intramembrane Proteolyse bestimmte Aminosäuren in der Sequenz notwendig, die als Helix-Brecher fungieren und somit die gewundene Struktur auflösen (Urban & Freeman, 2003). Bekannt als Helix-Brecher sind die Aminosäuren Glycin, Asparagin, Prolin und Serin (Li & Deber, 1994). Ein Helix-Bruch kann ein Protein nicht nur für die intramembrane Proteolyse zugänglich machen sondern stellt auch eine sterische Strukturveränderung dar, welche das Protein ein Stück aus der Membran herausschieben könnte, wenn die Helix ab einer gewissen Stelle linearisiert wird. Ein solcher Mechanismus, der die Schnittstelle eines Substrates aus der Membran heraushebt und somit für die Protease zugänglich macht, wurde von Ye und Kollegen postuliert (Ye *et al.*, 2000). Andersherum kann man sich vorstellen, dass auch ein Helix-Bruch in der Transmembrandomäne einer Protease wie ADAM17 zu einem solchen Effekt führt. Die katalytische Domäne könnte so in eine Position gebracht werden, in der sie die Schnittstelle eines Substrates besser erreichen kann. Deshalb wurden die als Helix-Brecher bekannten Aminosäuren innerhalb der TM-Domäne von ADAM17 in dieser Arbeit mutiert, jedoch hatte weder die Mutation von

Glycin 674 und Serin 675 noch die Mutation von Prolin 686 einen Effekt auf die stimulierbare Aktivität von ADAM17.

Es ist möglich, dass diese Aminosäuren, obwohl sie das Potential haben eine α -helikale Struktur zu unterbrechen, dies nicht immer tun. So wurde zum Beispiel für das Transmembran-Protein Bri2 beschrieben, dass nur einer von drei Glycin-Resten innerhalb der Transmembrandomäne einen Helix-destabilisierenden Effekt hatte (Fluhrer *et al.*, 2012). Es wurde außerdem vermutet, dass es sich bei diesen Aminosäuren möglicherweise um „Sollbruchstellen“ handelt, welche nur unter bestimmten funktionalen Bedingungen induziert werden (Page *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012). Eventuell können andere Stimuli, die die Aktivität von ADAM17 steigern, jedoch nicht PMA, einen Helix-Bruch an den entsprechenden Stellen induzieren. Die Konstrukte müssten dafür in Kombination mit verschiedenen Substraten und verschiedenen Stimulantien getestet werden. Des Weiteren sollten die transmembranen Regionen von diversen ADAM17-Substraten auf solche potenziell Helix-brechenden Motive untersucht werden.

Da keiner der untersuchten Aminosäure-Austausche einen signifikanten Effekt auf die stimulierbare Aktivität von ADAM17 hatte, sollte die TM-Domäne in nachfolgenden Untersuchungen nach einem strukturierten Schema, zum Beispiel in Blöcken von jeweils drei Aminosäuren mutiert werden, um das Motiv -wenn es denn eins gibt- zu finden, welches für die Regulation der stimulierten Aktivität von ADAM17 ausschlaggebend ist. Dabei sollte auch der juxtamembrane Bereich zu beiden Seiten der Plasmamembran mit eingeschlossen werden, da dieser zum einen ebenfalls noch mit Strukturen der Plasmamembran interagieren könnte (Taïeb *et al.*, 2004) und zum anderen mit der Multimerisierung von ADAM17 in Verbindung gebracht wird (Lorenzen *et al.*, 2011). Da ADAM17 in einer dimerisierten Form vorliegend inaktiv und nur als Monomer aktiv sein soll (Xu *et al.*, 2012), müsste der Verlust des Motivs, welches die Dimerisierung vermittelt zu einer erhöhten *Shedding*-Aktivität von ADAM17 führen. Dies steht im Gegensatz zu der Bedeutung von Dimerisierungen bei anderen Mitgliedern der Metzinkin-Familie: Für Meprine und MT1-MMP (*membrane type 1 matrix metalloproteinase*) ist beispielsweise gezeigt worden, dass eine Multimerisierung essentiell für die Aktivität der Proteasen ist (Bertenshaw *et al.*, 2003; Sterchi *et al.*, 2008; Tochowicz *et al.*, 2011). Auch wenn das für die Regulation von ADAM17 entscheidende Motiv innerhalb der TM-Domäne in dieser Arbeit nicht

bestimmt werden konnte, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass diese Domäne sowie die angrenzenden Bereiche dabei eine wichtige Rolle spielen.

4.3 Transaktivierung des EGFR durch Toll-like Rezeptoren (TLR)

Das angeborene Immunsystem basiert darauf, dass in den Körper eindringende pathogene Mikroorganismen schnell erkannt und bekämpft werden. Insbesondere der Haut, aber auch anderen Epithelien, welche direkt mit der Außenwelt in Kontakt kommen, wie das Lungen- und das Darmepithel, kommt dabei eine wichtige Funktion zu. Keratinocyten besitzen daher eine Vielzahl von Rezeptoren (*pathogen recognition receptors*, PRRs) auf der Zelloberfläche aber auch im Zellinneren, welche Pathogene anhand von spezifischen molekularen Strukturen erkennen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Zu diesen PRRs zählen die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), welche als Antwort auf Pathogene typischerweise die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, wie dem chemotaktisch aktiven Cytokin IL-8, oder von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) wie den humanen β -Defensinen 2 und 3 (hBD2/hBD3) induzieren (Pivarcsi *et al.*, 2003; Sumikawa *et al.*, 2006; Selleri *et al.*, 2007).

Untersuchungen mit Keratinocyten haben gezeigt, dass sowohl die Expression als auch die Freisetzung von IL-8 durch Stimulation mit Cytokinen von der Aktivierung des EGF-Rezeptors abhängig ist (Mascia *et al.*, 2003) und dass auch die MAP-Kinasen ERK1/2 in diesen Prozess involviert sind (Pastore *et al.*, 2005). Auch als Folge von Verletzungen wurde in *in vivo*- und *ex vivo*-Modellen der Haut eine Aktivierung des EGFR beschrieben, welche die Freisetzung von IL-8 und von AMPs reguliert (Sørensen *et al.*, 2006; Roupé *et al.*, 2010). Da Wunden oder Barrierestörungen allgemein das Eindringen von Pathogenen in den Körper begünstigen, ist die präventive Rekrutierung von Immunzellen durch Chemokine und die Freisetzung von AMPs wichtig. Diese Vorgänge müssen noch verstärkt werden, wenn die angrenzenden Zellen -hauptsächlich Keratinocyten im Falle der Haut- Pathogene mit Hilfe der TLRs wahrnehmen. Es ist also denkbar, dass der EGFR auch in der TLR-vermittelten Induktion dieser Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems involviert sein könnte.

Eine differenzielle Regulation der Expression von hBD2 und hBD3 wurde zum Beispiel im Rahmen eines *in vitro*-Modells für *Candida albicans*-Ösophagitis beschrieben. Dabei

war die Expression von hBD2 auf die Aktivierung des TLR-abhängigen Transkriptionsfaktors NFκB zurückzuführen, während die Expression von hBD3 in Abhängigkeit eines EGFR/ERK1/2-Signalweges erhöht war (Steubesand *et al.*, 2009).

Ein Transaktivierungsmechanismus, bei dem der EGFR durch Toll-like-Rezeptor-Liganden indirekt aktiviert wird, wurde ebenfalls bereits in Lungenepithel-Zellen beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von TLR2, TLR3, TLR5 und TLR6 mit jeweils spezifischen Liganden zu einer ADAM17-abhängigen Phosphorylierung des EGFR führte, welche wiederum essentiell für die Expression und Freisetzung von IL-8 zu sein scheint (Koff *et al.*, 2008). Ein wichtiger Bestandteil des EGFR-vermittelten Signaltransduktionsweges sind die MAP-Kinasen ERK1/2, welche in anderen Studien mit Lungenepithelzellen ebenfalls bereits im Zusammenhang mit der Freisetzung von IL8 beschrieben wurden (Kawahara *et al.*, 2007; Le Quément *et al.*, 2008).

Auf Grund dieser verschiedenen beschriebenen Befunde sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich das Modell der TLR-vermittelten Transaktivierung des EGFR auch auf die Zellen der Haut übertragen lässt. Es sollte außerdem untersucht werden, ob die beschriebene EGFR-abhängige Freisetzung von IL-8 oder hBD3 in Keratinocyten nicht nur durch Cytokine oder mechanische Störungen sondern auch in Abhängigkeit von TLRs induziert werden kann und wenn ja, welche Signal- und Effektormoleküle an der Überleitung des Signals vom TLR an den EGFR beteiligt sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation verschiedener TLRs in Keratinocyten zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führt (siehe Abbildung 16). Die Phosphorylierung von ERK1/2 und anderen MAP-Kinasen wurde in verschiedenen Veröffentlichungen auch unmittelbar mit dem klassischen TLR-Signalweg in Verbindung gebracht (Adamo *et al.*, 2004; Oda & Kitano, 2006; McNamara *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2010). Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass diese Phosphorylierung nicht direkt vermittelt wird, sondern auf eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors zurückzuführen ist. Dies wird unter anderem dadurch deutlich, dass die ERK-Phosphorylierung in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen vollständig durch die Anwesenheit des EGFR-blockierenden Antikörpers Cetuximab unterbunden wurde (siehe Abbildung 20). Auch die Inhibition von Metalloproteasen durch Marimastat führte in diesem Zusammenhang zu einer drastischen Reduzierung der Phosphorylierung von ERK1/2, was wahrscheinlich auf die bereits diskutierte Rolle von ADAM10 und ADAM17 als Haupt-*Sheddases* von EGFR-Liganden zurückzuführen ist. Der Einsatz von spezifischeren Inhibitoren sowie von siRNA gegen ADAM17 hat gezeigt, dass ADAM17 eher als

ADAM10 im Kontext der Pam₃Cys-vermittelten EGFR-Transaktivierung in Keratinocyten, eine entscheidende Rolle spielt (siehe Abbildung 19 & Abbildung 20). Dies stimmt mit den Befunden von Koff und Kollegen überein, die für den entsprechenden TLR-vermittelten EGFR-Transaktivierungsmechanismus in Atemwegsepithelien ebenfalls ADAM17 als verantwortliche Protease sowie TGF α als beteiligten Liganden identifiziert haben (Koff *et al.*, 2008). Darüber hinaus deckt sich dies mit den bereits in Kapitel 4.1 diskutierten Rezeptoren aus anderen Klassen, welche in der Lage sind den EGFR in Abhängigkeit von ADAM17 zu stimulieren. Auch im Fall der Stimulation von ADAM17 durch TLRs ist allerdings unklar, welcher Mechanismus die Aktivierung vermittelt.

Substanzen wie Melittin, welche mit der Plasmamembran von Zellen interagieren, beeinflussen die Aktivität von ADAM-Proteasen durch P2-Rezeptor-Aktivierung (Sommer *et al.*, 2012). P2-Rezeptoren gliedern sich in zwei große Familien, wobei P2X-Rezeptoren zu den ATP-gesteuerten Ionenkanälen zählen und P2Y-Rezeptoren zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Fredholm *et al.*, 1994). Mehrere dieser Rezeptoren wurden bereits als Aktivatoren für die proteolytische Aktivität von ADAMs diskutiert (Moon *et al.*, 2006; Sengstake *et al.*, 2006; Ratchford *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass der TLR1/2-Komplex den P2X1-Rezeptor auf Thrombocyten aktivieren kann (Fung *et al.*, 2012). Darauf, dass P2-Rezeptoren tatsächlich als Mediatoren zwischen TLR1/2 und ADAM17 fungieren könnten und somit an der Transaktivierung des EGFR beteiligt sind, deuten die signifikant inhibitorischen Effekte der beiden in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren PPADS und Suramin auf die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation mit Pam₃Cys hin (siehe Abbildung 21). Da es sich bei diesen beiden Substanzen allerdings um recht unspezifische Inhibitoren handelt, die eine Bandbreite an Molekülen beeinflussen können, muss der Befund, dass P2-Rezeptoren an der Aktivierung von ADAM17 nach TLR-Stimulation beteiligt sind, in anderen Systemen überprüft werden. Eignen würden sich dafür HEK293-Zellen, welche weder die TLRs 2 und 4 exprimieren (Brightbill, 1999; Smith *et al.*, 2003) noch P2X-Rezeptoren auf der Oberfläche tragen (Humphreys *et al.*, 1998). Untersuchungen mit diesen Zellen, in die man die Rezeptoren einzeln oder in Kombination durch Transfektion einbringen könnte, könnten Aufschluss darüber geben, ob zumindest P2X-Rezeptoren für die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation der TLRs notwendig sind.

Ein Ligand, der P2-Rezeptoren aktivieren kann ist ATP und es wurde gezeigt, dass dieses nach Stimulation mit TLR-Liganden freigesetzt wird (Piccini *et al.*, 2008). Außerdem

wurde ATP mit der Flagellin-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in Lungenepithelzellen in Verbindung gebracht (McNamara *et al.*, 2006). Die beiden ATP-abbauenden Enzyme Apyrase und Hexokinase hatten in dieser Arbeit allerdings wenig Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 nach der Stimulation von Keratinocyten mit Pam₃Cys (siehe Abbildung 21). Dies ist möglicherweise allerdings darauf zurückzuführen, dass es sich bei der ATP-Freisetzung aus Zellen um einen lokal sehr begrenzten Effekt handelt (Fung *et al.*, 2012). Eventuell sind die zugegebene Hexokinase und Apyrase räumlich nicht in der Lage gewesen, freigesetztes ATP zu hydrolysieren, da dieses durch die extrazelluläre Matrix abgeschirmt war. Eine mögliche Beteiligung von ATP an der Aktivierung von ADAM17 kann in diesem Kontext also nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Weitere Signalmoleküle, welche durch den Einsatz diverser Inhibitoren mit der ADAM17-Aktivierung nach TLR-Stimulation in Verbindung gebracht werden konnten sind intrazelluläre Calcium-Ionen, die Proteinkinase C (PKC), Phospholipase C (PLC), sowie Src- und PI3-Kinasen (siehe Abbildung 21).

All diese Faktoren sind bekannte Aktivatoren von ADAM-Protease-Aktivität (Ohtsu *et al.*, 2006; Le Gall *et al.*, 2009), auch wenn bisher nicht bekannt ist, welche genauen molekularen Mechanismen dem zugrunde liegen.

Ein entscheidender Schritt, der bei der Aktivierung von ADAM17 durch TLR-Liganden in den Epithelzellen der Atemwege benannt wurde, ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Koff *et al.*, 2008). ROS-Produktion wurde außerdem mit der P2R-Aktivierung (Lenertz *et al.*, 2009) und der Induktion von ADAM-vermitteltem *Shedding* in Verbindung gebracht (Wang *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2009) und sollte daher unbedingt in diesem Zusammenhang durch den Einsatz von Radikalfängern (*scavengern*) überprüft werden.

Weiterhin bleibt zu klären, ob Adaptermoleküle des klassischen TLR-Signalweges an der Transaktivierung des EGFR bzw. an der Aktivierung von ADAM17 beteiligt sind. Die Herunterregulation von NFκB durch siRNA hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, was jedoch auch zu erwarten war, da es sich um das finale Effektormolekül des TLR-Signalweges handelt. Es wäre interessant zu prüfen, ob MyD88 -das direkte Adapterprotein von nahezu allen TLRs- an der Aktivierung von ADAM17 und nachfolgend der Transaktivierung des EGFR beteiligt ist. Versuche mit MyD88-siRNA oder mit Keratinocyten von MyD88-defizienten Mäusen könnten darüber Auskunft geben.

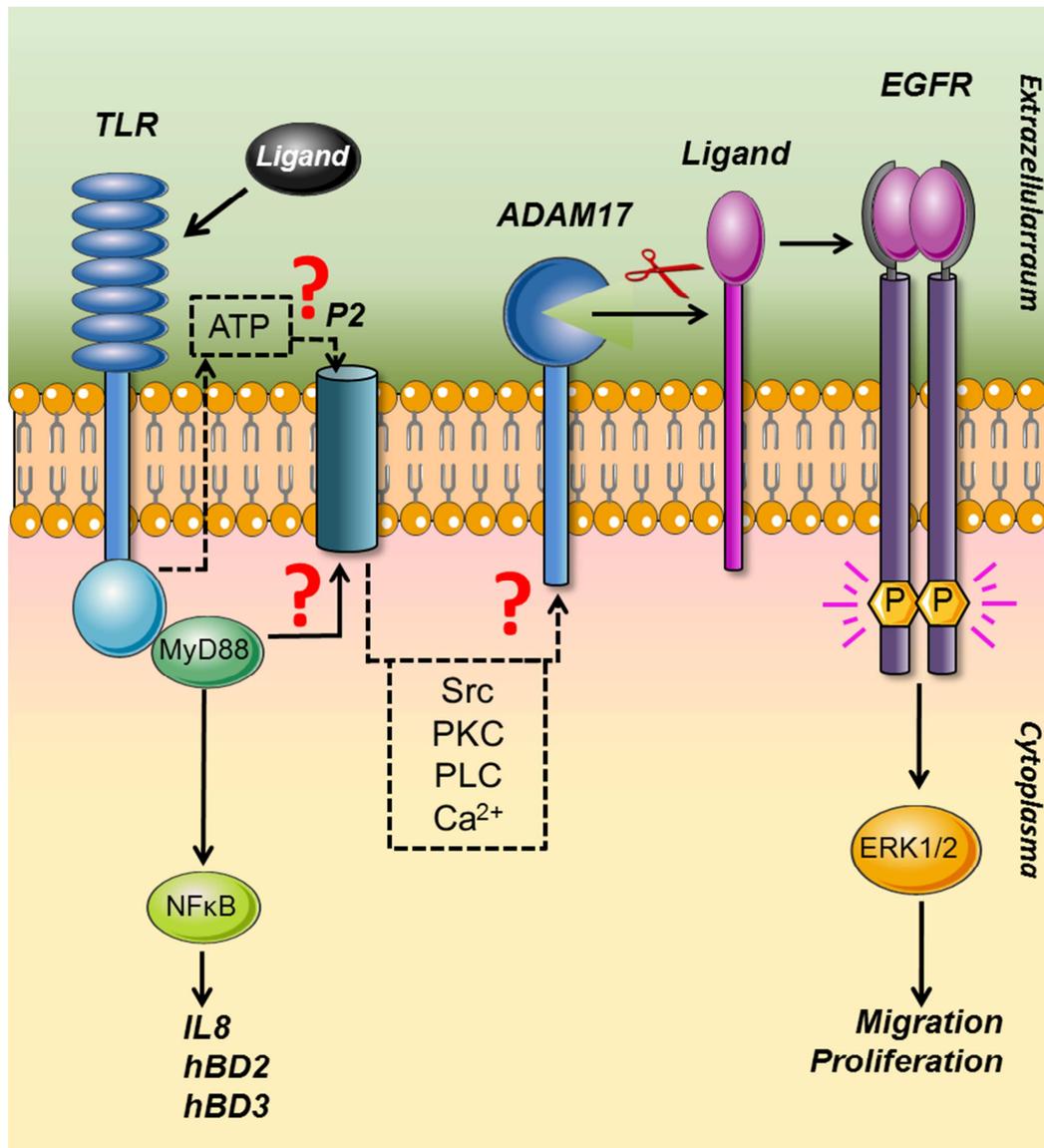


Abbildung 26: Hypothetische Darstellung eines Mechanismus, der zur Transaktivierung des EGFR durch Toll-like-Rezeptoren führen könnte. Die Bindung eines Liganden an Toll-like-Rezeptoren (TLRs) führt einerseits zur Aktivierung von NFκB, was wahrscheinlich zur Expression und Freisetzung von Interleukin-8 (IL8) und humanen β-Defensinen (hBDs) führt. Desweiteren wird vermutlich unter Mitwirkung von P2-Rezeptoren ADAM17 aktiviert, was zu einem extrazellulären Shedding-Ereignis führt, bei dem EGFR-Liganden freigesetzt werden. Dieser EGFR-Ligand bindet an den Rezeptor, was letztendlich intrazellulär zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt und wahrscheinlich für die Zell-Homöostase wichtige Prozesse induziert. An der Aktivierung von ADAM17 sind in einer noch ungeklärten Art und Weise Src-Kinasen, die Proteinkinase C (PKC), die Phospholipase C (PLC) und intrazelluläre Ca²⁺-Ionen beteiligt.

In Abbildung 26 ist ein hypothetisches Modell der EGFR-Transaktivierung durch TLRs dargestellt. Der Mechanismus sowie die funktionelle Bedeutung dieser möglichen Interaktion der beiden Rezeptoren muss jedoch eingehender untersucht werden, daher sind die spekulativen Bereiche mit Fragezeichen markiert.

Welche Auswirkungen die Transaktivierung des EGFR durch TLRs in Keratinocyten hat und ob es sich bei den beiden Signalwegen um getrennte Kaskaden handelt konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und muss in weiterführenden Experimenten analysiert werden. Vorläufige Ergebnisse, die in dieser Arbeit nicht dargestellt sind, deuten jedoch darauf hin, dass es sich um zwei unabhängige Kaskaden handelt, die unterschiedliche Effekte zur Folge haben. So deuten z. B. ELISA-Untersuchungen und mRNA-Expressionsanalysen darauf hin, dass die Freisetzung und auch die Expression von IL-8 und den humanen β -Defensinen 2 und 3 nach TLR-Aktivierung unabhängig von der EGFR-Signalkaskade sind. Dies steht im Gegensatz zu den bisher in der Literatur zu findenden Hinweisen auf einen Zusammenhang von EGFR-Signaltransduktion und IL-8-Produktion (Koff *et al.*, 2008; Steubesand *et al.*, 2009).

Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass der TLR-Signalweg eher Verteidigungsmechanismen wie die Freisetzung von Chemokinen und AMPs induziert, während der EGF-Rezeptor durch die Regulation von anti-apoptotischen Prozessen wie Zellproliferation und -Wachstum für das Überleben der Zellen verantwortlich ist, da dies den klassischen Funktionen für diese Rezeptoren entsprechen würde.

Für das Überleben eines Organismus ist es essentiell, dass beide Wege in einer Balance gehalten werden, weshalb es wichtig ist, dass sie -zum Beispiel durch einen solchen hier vorgeschlagenen Mechanismus- auf einander abgestimmt und miteinander verbunden sind.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl der zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehörige Rezeptor FGFR2b als auch einige Toll-*like*-Rezeptoren – insbesondere der Komplex TLR1/2 – in der Lage sind den EGFR zu transaktivieren. Dies erfolgt höchstwahrscheinlich über einen die Plasmamembran dreimal durchspannenden Mechanismus, deren molekulare Einzelheiten noch nicht bis ins Detail geklärt werden konnten. So bleibt zum Beispiel die Frage offen, wie Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen generell und ADAM17 im Speziellen durch verschiedene physiologische und unphysiologische Stimuli aktiviert werden können. Dies muss durch weitere Studien geklärt werden, bei denen beispielsweise spezifischere Inhibitoren für einzelne Moleküle eingesetzt werden, welche an der Regulation beteiligt sein könnten. Die spezifische Deletion oder Inaktivierung einzelner intrazellulärer Signalmoleküle gestaltet sich bis heute allerdings schwierig, da diese meist in ein hochkomplexes Netzwerk eingegliedert sind, in dem es extrem kompliziert ist, einzelne Komponenten ausfindig zu machen. Des Weiteren kann der Verlust eines einzelnen Mediators möglicherweise oft durch andere, verwandte Proteine ausgeglichen werden. Trotzdem gibt es vielversprechende Kandidaten, wie die P2-Rezeptoren welche insbesondere im Kontext mit der TLR-Stimulation weiter analysiert werden sollten. In diesem Zusammenhang ist außerdem zu klären, welche Funktion die Aktivierung des EGF-Rezeptors parallel zu TLRs hat.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass im Fall der Aktivierung von ADAM17 durch die FGF7-Stimulation des FGFR2b nicht die cytoplasmatische sondern die Transmembrandomäne von ADAM17 eine entscheidende Rolle spielt. Es konnte allerdings durch Mutationsversuche kein essentielles Motiv innerhalb der Transmembrandomäne ausfindig gemacht werden, welches für die Stimulierbarkeit von ADAM17 durch PMA verantwortlich ist. Daher sind weitere, systematische Analysen der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne von ADAM17 aber auch von den durch diese Protease gespaltenen Substraten vonnöten. Diese Analysen sollten den membranproximalen Bereich mit einschließen, da dieser möglicherweise strukturelle Relevanz für die *Shedding*-Funktion von ADAM17 hat.

Ein genaues Verständnis der Regulation von ADAM17 ist wichtig, da es dazu beitragen kann, Ansätze für die Therapie von Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis und Krebs zu entwickeln.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der EGF-Rezeptor ist sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus einer der wichtigsten Rezeptoren auf der Oberfläche vieler Zellen. Er reguliert durch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie HB-EGF oder TGF α hauptsächlich Prozesse wie Migration, Differenzierung und Wachstum von Zellen. Die Liganden werden als membrangebundene Vorläuferproteine synthetisiert und erst durch die proteolytische Spaltung durch spezifische Proteasen aktiviert.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der EGFR nicht nur direkt, sondern auch indirekt nach Stimulationen von einigen anderen Rezeptoren wie G-Proteingekoppelten Rezeptoren oder dem VEGFR aktiviert werden kann. Dieser Vorgang wird als „EGFR-Transaktivierung“ bezeichnet und wird maßgeblich durch die membranständige Metalloprotease ADAM17 beeinflusst, da diese u. a. die Freisetzung von fast allen EGFR-Liganden vermittelt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch die keratinocytenspezifische Isoform des FGF-Rezeptors -FGFR 2b- nach der Bindung seines Liganden FGF7 ADAM17 aktiviert, was eine Transaktivierung des EGFR zur Folge hat. Bei den anderen zuvor in der Literatur beschriebenen Rezeptoren, die in der Lage sind den EGFR zu transaktivieren, war der EGFR-vermittelte Signalweg als zusätzlicher, zweiter Signalweg zu betrachten. Der in dieser Arbeit untersuchte FGFR2b ist das erste bekannte Beispiel für einen EGFR-transaktivierenden Rezeptor, bei dem im Gegensatz zu früheren Annahmen keine direkte, ADAM17-unabhängige Signaltransduktion stattfindet. Dies und vor allem die Rolle von ADAM17 in diesem Prozess wurden in dieser Arbeit in *in vitro*- sowie in *ex vivo*-Versuchen nachgewiesen.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob eine solche Signalüberleitung auf den EGFR auch von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) ausgehen kann, da kontrovers diskutiert wird, ob MAP-Kinasen, welche für die EGFR-vermittelte Signalkaskade charakteristisch sind, direkt durch TLRs aktiviert werden können oder nicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass TLRs nach Stimulation mit ihren spezifischen Liganden ebenfalls den EGFR transaktivieren, da die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in diesem Kontext sowohl Metalloprotease- als auch EGFR-abhängig war. Durch siRNA-Experimente sowie den Einsatz von spezifischen Inhibitoren konnte ADAM17 auch in diesem Zusammenhang als verantwortliche Protease identifiziert werden.

Der Mechanismus, der der Regulation der proteolytischen Aktivität von ADAMs im Allgemeinen und von ADAM17 im Speziellen zu Grunde liegt, ist bislang kaum verstanden und wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Die Beteiligung der cytoplasmatischen Domäne an der Regulation der stimulierten Aktivität ist ebenso wie die Rolle der Transmembran (TM)-Domäne dabei noch nicht eindeutig geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass nicht die cytoplasmatische Domäne sondern die TM-Domäne essentiell für die stimulierte Aktivität von ADAM17 ist. Es wurden daher bestimmte Motive in der Aminosäuresequenz der TM-Domäne mutiert, welche in α -Helices generell mit Konformationsänderungen in Verbindung gebracht werden, da diese zu einer Regulation der Aktivität beitragen könnten. Da diese Mutationen keinen Effekt auf die Aktivierbarkeit von ADAM17 hatten, konnten diese Analysen jedoch keine Antwort auf die Frage liefern, wie die Aktivität von ADAM17 reguliert wird und welcher molekulare Mechanismus der Aktivierung zu Grunde liegt. Zusammenfassend hat diese Arbeit neue Erkenntnisse über die Aktivierung des EGFR-Signaltransduktionsweges geliefert und die Bedeutung von ADAM17 an diesem essentiellen Signalweg unterstrichen. Das genaue Verständnis dieses Signalweges und seiner Regulation ist wichtig, da er sowohl in physiologischen Prozessen wie der Entwicklung als auch bei der Entstehung von Krankheiten wie Krebs eine Rolle spielt und deshalb einen Ansatz zur Entwicklung therapeutischer Strategien darstellt.

6 SUMMARY

The EGF receptor plays an essential role in embryonic development as well as in adult life and is of major importance on the surface of many cells. It regulates processes like cell migration, differentiation and proliferation by binding its specific ligands (e. g. HB-EGF or TGF α). EGFR ligands are synthesized as membrane-bound precursors that remain inactive until they are cleaved and thereby released from the cells by distinct proteases.

Recent studies showed that the EGFR can be activated either directly by ligand binding or indirectly after stimulation of other receptors like G-protein coupled receptors or VEGFR for example. The indirect stimulation event is termed *EGFR transactivation* and is mediated mainly by ADAM17, since this protease is the major sheddase for almost all EGFR ligands. In this work, the keratinocyte specific isoform of FGF receptors -FGFR2b- was investigated with regard to its ability to activate ADAM17 and subsequently transactivate the EGFR. FGFR2b was found to be the first EGFR transactivating receptor that has no autonomous signaling pathway leading to the activation of ERK MAP-kinases. Instead, the phosphorylation of these kinases following stimulation with the FGFR2b ligand FGF7 is entirely dependent on the EGFR and the activity of ADAM17 as shown by using both *in vitro* and *ex vivo* approaches.

Furthermore, the transactivation of EGFR upon stimulation of Toll-like receptors (TLRs) was analyzed, since the interaction of TLRs and MAP-kinase signaling is a highly controversial issue. The results presented in this study indicate that TLR stimulation by specific ligands does not directly lead to phosphorylation of ERK1/2 but that instead ADAM17 and EGFR transactivation are required to induce MAP-kinase signaling. These findings were obtained by siRNA experiments and the use of specific ADAM17 inhibitors.

How the activity of ADAMs in general and of ADAM17 in particular is regulated is still unknown and thus a matter of investigation. In this context there are contrary opinions about the role of the cytoplasmic and the transmembrane (TM) domain. The results of the present study point towards an involvement of the TM-domain and suggest that the cytoplasmic tail of ADAM17 is dispensable for the stimulated proteolytic activity. Therefore several mutations were introduced into the amino acid sequence of the TM-domain of ADAM17. Specific amino acids that are known to disrupt α -helical structures

in general were mutated, because this could lead to a conformational change affecting the whole molecule and therefore might have an impact on the proteolytic activity under certain conditions during stimulation. Since the introduced mutations had no effect on the activity of ADAM17, the question which molecular mechanism regulates ADAM17 activity remains unanswered.

Taken together, the results of this thesis provide new insights into the activation and regulation of EGFR signaling and emphasize the importance of ADAM17 in this essential signaling pathway. As EGFR signaling is implicated not only in embryonic development but also in severe diseases like cancer, the detailed understanding of this pathway and of ADAM17 regulation is of great benefit for the development of new therapeutic strategies.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTC	Betacellulin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	zyklisches AMP (Adenosinmonophosphat)
cGMP	zyklisches GMP (Guanosinmonophosphat)
d.h.	das heißt
Da	Dalton, relative Masse
E	Glutaminsäurerest
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
e. g.	zum Beispiel (<i>exempli gratia</i>)
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
G	Glycinrest
g	einfache Gravitationsbeschleunigung
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
H	Histidinrest
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IO	Ionomycin
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (<i>lipoteichoic acid</i>)

M	molar
MAP-K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
meF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
MPD	membranproximale Domäne
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDI	Protein-Disulfidisomerase
PGN	Peptidoglykan
PKC	Protein-Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
TACE	<i>TNFα converting enzyme</i>
TBS	physiologischer Puffer mit Kochsalz (<i>tris buffered saline</i>)
TGFα	<i>transforming growth factor α</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	transmembran
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>
Triton-X-100	Polyoxyethylen-(8)-isooctylphenylether
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitan-Monolaurat
u. a.	unter anderem
V	Volt
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WT	Wildtyp
X	beliebiger Aminosäurerest
z. B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zinkion

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMO, R., SOKOL, S., SOONG, G., GOMEZ, M.I., PRINCE, A. **2004**. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30, 627–34.
- ADRAIN, C., ZETTL, M., CHRISTOVA, Y., TAYLOR, N., FREEMAN, M. **2012**. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science*, 335, 225–8.
- AKIRA, S., TAKEDA, K. **2004**. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 4, 499–511.
- AKIYAMA, Y., MAEGAWA, S. **2007**. Sequence features of substrates required for cleavage by GlpG, an *Escherichia coli* rhomboid protease. *Molecular microbiology*, 64, 1028–37.
- ALTHOFF, K., REDDY, P., VOLTZ, N., ROSE-JOHN, S., MÜLLBERG, J. **2000**. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor α . Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *European journal of biochemistry*, 267, 2624–31.
- AMOUR, A., SLOCOMBE, P.M., WEBSTER, A., BUTLER, M., KNIGHT, C.G., SMITH, B.J., STEPHENS, P.E., SHELLEY, C., HUTTON, M., DOCHERTY, A.J.P., MURPHY, G. **1998**. TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS letters*, 435, 39–44.
- ANDERSON, R.G.W., JACOBSON, K. **2002**. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, 296, 1821–5.
- ANDREEV, J., GALISTEO, M.L., KRANENBURG, O., LOGAN, S.K., CHIU, E.S., OKIGAKI, M., CARY, L. A, MOOLENAAR, W.H., SCHLESSINGER, J. **2001**. Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *The Journal of biological chemistry*, 276, 20130–5.
- ARRIBAS, J., ESSELENS, C. **2009**. ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Current pharmaceutical design*, 15, 2319–35.
- ASAKURA, M., KITAKAZE, M., TAKASHIMA, S., LIAO, Y., ISHIKURA, F., YOSHINAKA, T., OHMOTO, H., NODE, K., YOSHINO, K., ISHIGURO, H., ASANUMA, H., SANADA, S., MATSUMURA, Y., TAKEDA, H., BEPPU, S., TADA, M., HORI, M., HIGASHIYAMA, S. **2002**. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nature medicine*, 8, 35–40.
- BARTON, G.M., MEDZHITOV, R. **2003**. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300, 1524–5.

- BENNETT, T.A., EDWARDS, B.S., SKLAR, L.A., ROGELJ, S. **2000**. Sulfhydryl regulation of L-Selectin shedding: Phenylarsine oxide promotes activation-independent L-Selectin shedding from leukocytes. *The journal of immunology*, *164*, 4120–9.
- BERTENSHAW, G.P., NORCUM, M.T., BOND, J.S. **2003**. Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 2522–32.
- BEUTLER, B. **2004**. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, *430*, 257–63.
- BLACK, R.A., RAUCH, C.T., KOZLOSKY, C.J., PESCHON, J.J., SLACK, J.L., ... CERRETTI, D.P. **1997**. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, *385*, 729–33.
- BLAYDON, D.C., BIANCHERI, P., DI, W.-L., PLAGNOL, V., CABRAL, R.M., BROOKE, M.A., HEEL, D.A. VAN, RUSCHENDORF, F., TOYNBEE, M., WALNE, A., O'TOOLE, E., MARTIN, J.E., LINDLEY, K., VULLIAMY, T., ABRAMS, D.J., MACDONALD, T.T., HARPER, J.I., KELSELL, D.P. **2011**. Inflammatory Skin and Bowel Disease Linked to *ADAM17* Deletion. *The New England journal of medicine*, *365*, 1502–8.
- BLOBEL, C. **2005**. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, *6*, 32–43.
- BOCK, J., GULBINS, E. **2003**. The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts. *FEBS letters*, *534*, 169–74.
- BODE, W., GOMIS-RÜTH, F., STÖCKLER, W. **1993**. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS letters*, *331*, 134–40.
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R.T., BREITKREUTZ, D., HORNING, J., MARKHAM, A., FUSENIG, N.E. **1988**. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, *106*, 761–71.
- BOZKULAK, E.C., WEINMASTER, G. **2009**. Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Molecular and cellular biology*, *29*, 5679–95.
- BRADFORD, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248–54.
- BRIGHTBILL, H.D. **1999**. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science*, *285*, 732–6.

- BROU, C., BESSIA, C., LEBAIL, O., DOEDENS, J.R., CUMANO, A., ROUX, P., BLACK, R.A., ISRAE, A., MACROMOLE, P., DELTA, T., DROSOPHILA, S. **2000**. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling : The role of the Disintegrin-Metalloprotease TACE. *Molecular cell*, *5*, 207–16.
- BURNSTOCK, G., KRÜGEL, U., ABBRACCHIO, M.P., ILLES, P. **2011**. Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Progress in neurobiology*, *95*, 229–74.
- BUXBAUM, J.D., LIU, K., LUO, Y., SLACK, J.L., STOCKING, K.L., PESCHON, J.J., JOHNSON, R.S., CASTNER, B.J., CERRETTI, D.P., BLACK, R.A. **1998**. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *The Journal of biological chemistry*, *273*, 27765–7.
- CALL, M.E., WUCHERPFENNIG, K.W. **2005**. The T cell receptor: Critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annual review of immunology*, *23*, 101–25.
- CHALARIS, A., ADAM, N., SINA, C., ROSENSTIEL, P., LEHMANN-KOCH, J., ... ROSE-JOHN, S. **2010**. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *The Journal of experimental medicine*, *207*, 1617–24.
- CHALARIS, A., RABE, B., PALIGA, K., LANGE, H., LASKAY, T., FIELDING, C. A, JONES, S. A, ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J. **2007**. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, *110*, 1748–55.
- CHOURA, M., REBAÏ, A. **2011**. Structural analysis of hubs in human NR-RTK network. *Biology direct*, *6*, 49.
- CHRISTIAN, L.M. **2012**. The ADAM family: Insights into Notch proteolysis. *Fly*, *6*, 30–4.
- CONDON, T.P., FLOURNOY, S., SAWYER, G.J., BAKER, B.F., KISHIMOTO, T.K., BENNETT, C.F. **2001**. ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor- α and L-Selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense & nucleic acid drug development*, *11*, 107–116.
- COTTON, L.M., O'BRYAN, M.K., HINTON, B.T. **2008**. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocrine reviews*, *29*, 193–216.
- D'ALESSIO, A., ESPOSITO, B., GIAMPIETRI, C., ZIPARO, E., POBER, J.S., FILIPPINI, A. **2012**. Plasma membrane microdomains regulate TACE-dependent TNFR1 shedding in human endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, *16*, 627–36.

- DANG, M., DUBBIN, K., D'AIELLO, A., HARTMANN, M., LODISH, H., HERRLICH, A. **2011**. Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate-specific a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus. *The Journal of biological chemistry*, *286*, 17704–13.
- DAVIS, R.J. **1994**. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends in biochemical sciences*, *19*, 470–3.
- DE GIORGI, V., SESTINI, S., MASSI, D., GHERSETICH, I., LOTTI, T. **2007**. Keratinocyte growth factor receptors. *Dermatologic clinics*, *25*, 477–85.
- DEUPI, X., STANDFUSS, J., SCHERTLER, G. **2012**. Conserved activation pathways in G-protein-coupled receptors. *Biochemical Society transactions*, *40*, 383–8.
- DHOMEN, N.S., MARIADASON, J., TEBBUTT, N., SCOTT, A.M. **2012**. Therapeutic targeting of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Critical reviews in oncogenesis*, *17*, 31–50.
- DÍAZ-RODRÍGUEZ, E., MONTERO, J.C., ESPARÍS-OGANDO, A., YUSTE, L., PANDIELLA, A. **2002**. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Molecular biology of the cell*, *13*, 2031–44.
- DOEDENS, J.R., MAHIMKAR, R.M., BLACK, R. A. **2003**. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochemical and biophysical research communications*, *308*, 331–8.
- DONG, H., SHARMA, M., ZHOU, H.-X., CROSS, T.A. **2012**. Glycines: role in α -helical membrane protein structures and a potential indicator of native conformation. *Biochemistry*, *51*, 4779–89.
- DREYMÜLLER, D., MARTIN, C., KOGEL, T., PRUESSMEYER, J., HESS, F.M., HORIUCHI, K., UHLIG, S., LUDWIG, A. **2012**. Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. *EMBO molecular medicine*, *4*, 412–23.
- DRUBE, S., STIRNWEISS, J., VALKOVA, C., LIEBMANN, C. **2006**. Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from β 2-adrenergic receptor signalling. *Cellular signalling*, *18*, 1633–46.
- ESWARAKUMAR, V.P., LAX, I., SCHLESSINGER, J. **2005**. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, *16*, 139–49.
- EVANS, J. **2001**. Fertilin β and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays*, 628–39.

- EVANS, S., IRMADY, K., OSTROW, K., KIM, T., NYKJAER, A., SAFTIG, P., BLOBEL, C., HEMPSTEAD, B.L. **2011**. Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *The Journal of biological chemistry*, *286*, 29556–67.
- FAN, H., TURCK, C.W., DERYNCK, R. **2003**. Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor- α converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 18617–27.
- FISCHER, O.M., HART, S., GSCHWIND, A., PRENZEL, N., ULLRICH, A. **2004**. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and Heparin-binding epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology*, *24*, 5172–83.
- FLUHRER, R., MARTIN, L., KLIER, B., HAUG-KRÖPER, M., GRAMMER, G., NUSCHER, B., HAASS, C. **2012**. The α -helical content of the transmembrane domain of the British dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b). *The Journal of biological chemistry*, *287*, 5156–63.
- FRANZKE, C.-W., COBZARU, C., TRIANTAFYLLOPOULOU, A., LÖFFEK, S., HORIUCHI, K., THREADGILL, D.W., KURZ, T., ROOIJEN, N. VAN, BRUCKNER-TUDERMAN, L., BLOBEL, C.P. **2012**. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *The Journal of experimental medicine*, *209*, 1105–19.
- FREDHOLM, B.B., ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., DALY, J.W., HARDEN, T.K., JACOBSON, K.A., LEFF, P., WILLIAMS, M. **1994**. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacological reviews*, *46*, 143–56.
- FUNG, C.Y.E., JONES, S., NTRAKWAH, A., NASEEM, K.M., FARNDAL, R.W., MAHAUT-SMITH, M.P. **2012**. Platelet Ca^{2+} responses coupled to glycoprotein VI and Toll-like receptors persist in the presence of endothelial-derived inhibitors: Roles for secondary activation of P2X1 receptors and release from intracellular Ca^{2+} stores. *Blood*, *119*, 3613–21.
- GAO, L., CHAO, L., CHAO, J. **2010**. A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Experimental cell research*, *316*, 376–89.
- GARRINGTON, T.P., JOHNSON, G.L. **1999**. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology*, *11*, 211–18.
- GARTON, K.J., GOUGH, P.J., PHILALAY, J., WILLE, P.T., BLOBEL, C.P., WHITEHEAD, R.H., DEMPSEY, P.J., RAINES, E.W. **2003**. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM 17). *The Journal of biological chemistry*, *278*, 37459–64.

- GARTON, K.J., GOUGH, P.J., BLOBEL, C.P., MURPHY, G., GREAVES, D.R., DEMPSEY, P.J., RAINES, E.W. **2001**. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *The Journal of biological chemistry*, 276, 37993–38001.
- GOLDFARB, M. **2001**. Signaling by fibroblast growth factors: the inside story. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 106.
- GOMIS-RÜTH, F. **2003**. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Molecular biotechnology*, 24, 18–26.
- GOOZ, M. **2010**. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45, 146–69.
- GOSPODAROWICZ, D. **1974**. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, 249, 123–7.
- GSCHWIND, A., HART, S., FISCHER, O.M., ULLRICH, A. **2003**. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *The EMBO journal*, 22, 2411–21.
- GUINEA-VINIEGRA, J., ZENZ, R., SCHEUCH, H., HNISZ, D., HOLCMANN, M., BAKIRI, L., SCHONTHALER, H.B., SIBILIA, M., WAGNER, E.F. **2009**. TNF α shedding and epidermal inflammation are controlled by Jun proteins. *Genes & development*, 23, 2663–74.
- GUTWEIN, P., MECHTERSHEIMER, S., RIEDLE, S., STOECK, A., GAST, D., JOUMAA, S., ZENTGRAF, H., FOGEL, M., ALTEVOGT, D.P. **2003**. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB journal*, 17, 292–4.
- HÄCKER, H., REDECKE, V., BLAGOEV, B., KRATCHMAROVA, I., HSU, L.-C., WANG, G.G., KAMPS, M.P., RAZ, E., WAGNER, H., HÄCKER, G., MANN, M., KARIN, M. **2006**. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 439, 204–7.
- HAFEZI-MOGHADAM, A., THOMAS, K.L., PROROCK, A.J., HUO, Y., LEY, K. **2001**. L-Selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *The Journal of experimental medicine*, 193, 863–72.
- HARRIS, R.C., CHUNG, E., COFFEY, R.J. **2003**. EGF receptor ligands. *Experimental cell research*, 284, 2–13.
- HARTMANN, D., DE STROOPER, B., SERNEELS, L., CRAESSAERTS, K., HERREMAN, A., ANNAERT, W., UMANS, L., LÜBKE, T., LENA ILLERT, A., VON FIGURA, K., SAFTIG, P. **2002**. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics*, 11, 2615–24.

- HERRLICH, A., KLINMAN, E., FU, J., SADEGH, C., LODISH, H. **2008**. Ectodomain cleavage of the EGF ligands HB-EGF, neuregulin1- β , and TGF- α is specifically triggered by different stimuli and involves different PKC isoenzymes. *FASEB journal*, *22*, 4281–95.
- HORIUCHI, K., ZHOU, H.-M., KELLY, K., MANOVA, K., BLOBEL, C.P. **2005**. Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins β 1 and β 2. *Developmental biology*, *283*, 459–71.
- HORIUCHI, K., KIMURA, T., MIYAMOTO, T., TAKAISHI, H., OKADA, Y., TOYAMA, Y., BLOBEL, C.P. **2007a**. Cutting edge: TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *The journal of immunology*, *179*, 2686–9.
- HORIUCHI, K., LE GALL, S., SCHULTE, M., YAMAGUCHI, T., REISS, K., MURPHY, G., TOYAMA, Y., HARTMANN, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P. **2007b**. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Molecular biology of the cell*, *18*, 176–88.
- HUANG, B., ZHAO, J., LI, H., HE, K.-L., CHEN, Y., CHEN, S.-H., MAYER, L., UNKELESS, J.C., XIONG, H. **2005**. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer research*, *65*, 5009–14.
- HUMPHREYS, B.D., VIRGINIO, C., SURPRENANT, A., RICE, J., DUBYAK, G.R. **1998**. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: High selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Molecular pharmacology*, *54*, 22–32.
- HUOVILA, A.-P.J., TURNER, A.J., PELTO-HUIKKO, M., KÄRKKÄINEN, I., ORTIZ, R.M. **2005**. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in biochemical sciences*, *30*, 413–22.
- HUXLEY-JONES, J., CLARKE, T.-K., BECK, C., TOUBARIS, G., ROBERTSON, D.L., BOOT-HANDFORD, R.P. **2007**. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC evolutionary biology*, *7*, 63.
- IP, Y.T., DAVIS, R.J. **1998**. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Current opinion in cell biology*, *10*, 205–19.
- JACKSON, L., QIU, T., SUNNARBERG, S., CHANG, A., ZHANG, C., PATTERSON, C., LEE, D.C. **2003**. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *The EMBO journal*, *22*, 2704–16.
- JANES, P.W., SAHA, N., BARTON, W.A., KOLEV, M. V, WIMMER-KLEIKAMP, S.H., NIEVERGALL, E., BLOBEL, C.P., HIMANEN, J.-P., LACKMANN, M., NIKOLOV, D.B. **2005**. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, *123*, 291–304.

- JOHNSON, G., VAILLANCOURT, R.R. **1994**. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Current opinion in cell biology*, 6, 230–8.
- KATZEL, J.A., FANUCCHI, M.P., LI, Z. **2009**. Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *Journal of hematology & oncology*, 2.
- KIM, J., ADAM, R.M., FREEMAN, M.R. **2005**. Trafficking of nuclear heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor into an epidermal growth factor receptor-dependent autocrine loop in response to oxidative stress. *Cancer research*, 65, 8242–9.
- KOENEN, R.R., PRUESSMEYER, J., SOEHNLEIN, O., FRAEMOHS, L., ZERNECKE, A., SCHWARZ, N., REISS, K., SARABI, A., LINDBOM, L., HACKENG, T.M., WEBER, C., LUDWIG, A. **2009**. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*, 113, 4799–809.
- KOFF, J.L., SHAO, M.X.G., UEKI, I.F., NADEL, J.A. **2008**. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 294, L1068–75.
- KRAULIS, P.J. **1991**. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 24, 946–50.
- KURISAKI, T., MASUDA, A., SUDO, K., SAKAGAMI, J., HIGASHIYAMA, S., MATSUDA, Y., NAGABUKURO, A., TSUJI, A., NABESHIMA, Y., ASANO, M., IWAKURA, Y., SEHARA-FUJISAWA, A. **2003**. Phenotypic analysis of Meltrin α (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin α in adipogenesis and myogenesis. *Molecular and cellular biology*, 23, 55–61.
- KUWAHARA, I., LILLEHOJ, E.P., KOGA, T., ISOHAMA, Y., MIYATA, T., KIM, K.C. **2007**. The signaling pathway involved in neutrophil elastase stimulated MUC1 transcription. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 37, 691–8.
- KVEIBORG, M., FRÖHLICH, C., ALBRECHTSEN, R., TISCHLER, V., DIETRICH, N., HOLCK, P., KRONQVIST, P., RANK, F., MERCURIO, A.M., WEWER, U.M. **2005**. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer research*, 65, 4754–61.
- LAEMMLI, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–5.
- LE GALL, S.M., MARETZKY, T., ISSUREE, P.D.A., NIU, X.-D., REISS, K., SAFTIG, P., KHOKHA, R., LUNDELL, D., BLOBEL, C.P. **2010**. ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *Journal of cell science*, 123, 3913–22.

- LE GALL, S.M., BOBÉ, P., REISS, K., HORIUCHI, K., NIU, X.-D., LUNDELL, D., GIBB, D.R., CONRAD, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P. **2009**. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , L-selectin, and tumor necrosis factor α . *Molecular biology of the cell*, *20*, 1785–94.
- LEMBERG, M.K., MARTOGGIO, B. **2002**. Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Molecular cell*, *10*, 735–44.
- LENERTZ, L.Y., GAVALA, M.L., HILL, L.M., BERTICS, P.J. **2009**. Cell signaling via the P2X7 nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking. *Purinergic signalling*, *5*, 175–87.
- LEONARD, J., LIN, F., MILLA, M. **2005**. Chaperone-like properties of the prodomain of TNF α -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *The Biochemical journal*, *805*, 797–805.
- LE QUÉMENT, C., GUÉNON, I., GILLON, J.-Y., VALENÇA, S., CAYRON-ELIZONDO, V., LAGENTE, V., BOICHOT, E. **2008**. The selective MMP-12 inhibitor, AS111793 reduces airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *British journal of pharmacology*, *154*, 1206–15.
- LI, S.C., DEBER, C.M. **1994**. A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments. *Nature structural biology*, *1*, 368–73.
- LI, X., FAN, H. **2004**. Loss of ectodomain shedding due to mutations in the metalloprotease and cysteine-rich/disintegrin domains of the tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE). *The Journal of biological chemistry*, *279*, 27365–75.
- LI, X., PÉREZ, L., PAN, Z., FAN, H. **2007**. The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell research*, *17*, 985–98.
- LICHTENTHALER, S.F. **2013**. iRHOM2 takes control of rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*, *1–3*.
- LORENZEN, I., TRAD, A., GRÖTZINGER, J. **2011**. Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochemical and biophysical research communications*, *415*, 330–6.
- LORENZEN, I., LOKAU, J., DÜSTERHÖFT, S., TRAD, A., GARBERS, C., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S., GRÖTZINGER, J. **2012**. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS letters*, *586*, 1093–1100.
- LURJE, G., LENZ, H. **2010**. EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology*, *77*, 400–10.

- MARETZKY, T., EVERS, A., ZHOU, W., SWENDEMAN, S.L., WONG, P.-M., RAFII, S., REISS, K., BLOBEL, C.P. **2011**. Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nature communications*, 2.
- MASCIA, F., MARIANI, V., GIROLOMONI, G., PASTORE, S. **2003**. Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *The American journal of pathology*, 163, 303–12.
- MATTHEWS, V., SCHUSTER, B., SCHÜTZE, S., BUSSMEYER, I., LUDWIG, A., HUNDHAUSEN, C., SADOWSKI, T., SAFTIG, P., HARTMANN, D., KALLEN, K.-J., ROSE-JOHN, S. **2003**. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Journal of biological chemistry*, 278, 38829–39.
- MAZZOCCA, A., COPPARI, R., DE FRANCO, R., CHO, J.-Y., LIBERMANN, T.A., PINZANI, M., TOKER, A. **2005**. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer research*, 65, 4728–38.
- MCILWAIN, D.R., LANG, P. A, MARETZKY, T., HAMADA, K., OHISHI, K., MANEY, S.K., BERGER, T., MURTHY, A., DUNCAN, G., XU, H.C., LANG, K.S., HÄUSSINGER, D., WAKEHAM, A., ITIE-YOUTEN, A., KHOKHA, R., OHASHI, P.S., BLOBEL, C.P., MAK, T.W. **2012**. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science*, 335, 229–32.
- MCKAY, M.M., MORRISON, D.K. **2007**. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 26, 3113–21.
- MCMANARA, N., GALLUP, M., SUCHER, A., MALTSEVA, I., MCKEMY, D., BASBAUM, C. **2006**. AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34, 653–60.
- MEMPEL, M., VOELCKER, V., KÖLLISCH, G., PLANK, C., RAD, R., GERHARD, M., SCHNOPP, C., FRAUNBERGER, P., WALLI, A.K., RING, J., ABECK, D., OLLERT, M. **2003**. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor κ B controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *The Journal of investigative dermatology*, 121, 1389–96.
- MENDELSON, K., SWENDEMAN, S., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P. **2010**. Stimulation of platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFR β and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 285, 25024–32.

- MERLOS-SUÁREZ, A., RUIZ-PAZ, S., BASELGA, J., ARRIBAS, J. **2001**. Metalloprotease-dependent protransforming growth factor- α ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 276, 48510–7.
- MIFUNE, M., OHTSU, H., SUZUKI, H., NAKASHIMA, H., BRAILOIU, E., DUN, N.J., FRANK, G.D., INAGAMI, T., HIGASHIYAMA, S., THOMAS, W.G., ECKHART, A.D., DEMPSEY, P.J., EGUCHI, S. **2005**. G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *The Journal of biological chemistry*, 280, 26592–9.
- MILLA, M.E., LEESNITZER, M.A., MOSS, M.L., CLAY, W.C., CARTER, H.L., MILLER, A.B., SU, J.L., LAMBERT, M.H., WILLARD, D.H., SHEELEY, D.M., KOST, T.A., BURKHART, W., MOYER, M., BLACKBURN, R.K., PAHEL, G.L., MITCHELL, J.L., HOFFMAN, C.R., BECHERER, J.D. **1999**. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). *The Journal of biological chemistry*, 274, 30563–70.
- MOON, H., NA, H.-Y., CHONG, K.H., KIM, T.J. **2006**. P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunology letters*, 102, 98–105.
- MOSS, M.L., JIN, S.L., MILLA, M.E., BICKETT, D.M., BURKHART, W., ... BECHERER, J.D. **1997**. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 385, 733–6.
- MOSS, M.L., LAMBERT, M.H. **2002**. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays in biochemistry*, 38, 141–53.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GÜNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P.C., ROSE-JOHN, S. **1993**. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European journal of immunology*, 23, 473–80.
- MYERS, T.J., BRENNAMAN, L.H., STEVENSON, M., HIGASHIYAMA, S., RUSSELL, W.E., LEE, D.C., SUNNARBORG, S.W. **2009**. Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor- α shedding. *Molecular biology of the cell*, 20, 5236–49.
- NAGLICH, J.G., METHERRALL, J.E., RUSSELL, D.W., EIDELS, L. **1992**. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell*, 69, 1051–61.
- NEBRED, A.R., PORRAS, A. **2000**. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends in biochemical sciences*, 25, 257–60.
- ODA, K., KITANO, H. **2006**. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Molecular systems biology*, 2.

- OHTSU, H., DEMPSEY, P.J., FRANK, G.D., BRAILOIU, E., HIGUCHI, S., SUZUKI, H., NAKASHIMA, H., EGUCHI, K., EGUCHI, S. **2006**. ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *26*, 133–7.
- PAGE, R.C., KIM, S., CROSS, T. A. **2008**. Transmembrane helix uniformity examined by spectral mapping of torsion angles. *Structure*, *16*, 787–97.
- PAHL, R., BRUNKE, G., STEUBESAND, N., SCHUBERT, S., BÖTTNER, M., WEDEL, T., JÜRGENSEN, C., HAMPE, J., SCHÄFER, H., ZEISSIG, S., SCHREIBER, S., ROSENSTIEL, P., REISS, K., ARLT, A. **2011**. IL-1 β and ADAM17 are central regulators of β -defensin expression in *Candida* esophagitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *300*, 547–53.
- PASTORE, S., MASCIA, F., MARIOTTI, F., DATTILO, C., MARIANI, V., GIROLOMONI, G. **2005**. ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. *The journal of immunology*, *174*, 5047–56.
- PEDUTO, L., REUTER, V.E., SEHARA-FUJISAWA, A., SHAFFER, D.R., SCHER, H.I., BLOBEL, C.P. **2006**. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene*, *25*, 5462–6.
- PEDUTO, L., REUTER, V.E., SHAFFER, D.R., SCHER, H.I., BLOBEL, C.P. **2005**. Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. *Cancer research*, *65*, 9312–9.
- PÉREZ, L., KERRIGAN, J.E., LI, X., FAN, H. **2007**. Substitution of methionine 435 with leucine, isoleucine, and serine in tumor necrosis factor α converting enzyme inactivates ectodomain shedding activity. *Biochemistry and cell biology*, *85*, 141–9.
- PESCHON, J.J., SLACK, J.L., REDDY, P., STOCKING, K.L., SUNNARBORG, S.W., ... BLACK, R.A. **1998**. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, *228*, 1281–4.
- PICCINI, A., CARTA, S., TASSI, S., LASIGLIÉ, D., FOSSATI, G., RUBARTELLI, A. **2008**. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *PNAS*, *105*, 8067–72.
- PIVARCSI, A., BODAI, L., RÉTHI, B., KENDERESSY-SZABÓ, A., KORECK, A., SZÉLL, M., BEER, Z., BATA-CSÖRGOO, Z., MAGÓCSI, M., RAJNAVÖLGYI, E., DOBOZY, A., KEMÉNY, L. **2003**. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *International immunology*, *15*, 721–30.
- PLOTNIKOV, A.N., HUBBARD, S.R., SCHLESSINGER, J., MOHAMMADI, M. **2000**. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*, *101*, 413–24.

- PRENZEL, N., ZWICK, E., DAUB, H., LESERER, M., ABRAHAM, R., WALLASCH, C., ULLRICH, A. **1999**. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, *402*, 2–6.
- RATCHFORD, A.M., BAKER, O.J., CAMDEN, J.M., RIKKA, S., PETRIS, M.J., SEYE, C.I., ERB, L., WEISMAN, G.A. **2010**. P2Y2 nucleotide receptors mediate metalloprotease-dependent phosphorylation of epidermal growth factor receptor and ErbB3 in human salivary gland cells. *The Journal of biological chemistry*, *285*, 7545–55.
- REDDY, P., SLACK, J.L., DAVIS, R., CERRETTI, D.P., KOZLOSKY, C.J., BLANTON, R.A., SHOWS, D., PESCHON, J.J., BLACK, R.A. **2000**. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 14608–14.
- REISS, K., SAFTIG, P. **2009**. The “A Disintegrin And Metalloprotease”(ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology*, *20*, 126–37.
- RIO, C., BUXBAUM, J.D., PESCHON, J.J., CORFAS, G. **2000**. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 10379–87.
- ROBBINS, D.J., CHENG, M., ZHEN, E., VANDERBILT, C.A., FEIG, L.A., COBB, M.H. **1992**. Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *PNAS*, *89*, 6924–8.
- ROBINSON, M.J., COBB, M.H. **1997**. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology*, *9*, 180–6.
- ROSE-JOHN, S., HEINRICH, P.C. **1994**. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *The Biochemical journal*, *300*, 281–90.
- ROUPÉ, K.M., NYBO, M., SJÖBRING, U., ALBERIUS, P., SCHMIDTCHEN, A., SØRENSEN, O.E. **2010**. Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, *130*, 1167–77.
- SAFTIG, P., REISS, K. **2011**. The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *European journal of cell biology*, *90*, 527–35.
- SAHIN, U., WESKAMP, G., KELLY, K., ZHOU, H., HIGASHIYAMA, S., PESCHON, J., HARTMANN, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P. **2004**. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology*, *164*, 769–79.
- SAITO, Y., BERK, B.C. **2001**. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *33*, 3–7.

- SANDERSON, M.P., ERICKSON, S.N., GOUGH, P.J., GARTON, K.J., WILLE, P.T., RAINES, E.W., DUNBAR, A.J., DEMPSEY, P.J. **2005**. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *The Journal of biological chemistry*, *280*, 1826–37.
- SCHÄFER, B., MARG, B., GSCHWIND, A., ULLRICH, A. **2004a**. Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 47929–38.
- SCHÄFER, B., GSCHWIND, A., ULLRICH, A. **2004b**. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*, *23*, 991–9.
- SCHAUWIENOLD, D., SASTRE, A.P., GENZEL, N., SCHAEFER, M., REUSCH, H.P. **2008**. The transactivated epidermal growth factor receptor recruits Pyk2 to regulate Src kinase activity. *The Journal of biological chemistry*, *283*, 27748–56.
- SHELLER, J., CHALARIS, A., GARBERS, C., ROSE-JOHN, S. **2011**. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in immunology*, *32*, 380–7.
- SCHLESSINGER, J. **2004**. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, *306*, 1506–7.
- SCHLÖNDORFF, J., BECHERER, J., BLOBEL, C. **2000**. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). *The Biochemical journal*, *138*, 131–8.
- SCHMITT, J.M., STORK, P.J. **2000**. β 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 25342–50.
- SCHNEIDER, M.R., WERNER, S., PAUS, R., WOLF, E. **2008**. Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *The American journal of pathology*, *173*, 14–24.
- SEALS, D.F., COURTNEIDGE, S.A. **2003**. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development*, *17*, 7–30.
- SELLERI, S., ARNABOLDI, F., PALAZZO, M., GARIBOLDI, S., ZANOBBIO, L., OPIZZI, E., SHIRAI, Y.F., BALSARI, A., RUMIO, C. **2007**. Toll-like receptor agonists regulate β -defensin 2 release in hair follicle. *The British journal of dermatology*, *156*, 1172–7.
- SENGSTAKE, S., BONEBERG, E.-M., ILLGES, H. **2006**. CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. *International immunology*, *18*, 1171–8.
- SHARMA, K., KUMAR, C., KÉRI, G., BREITKOPF, S.B., OPPERMAN, F.S., DAUB, H. **2010**. Quantitative analysis of kinase-proximal signaling in lipopolysaccharide-induced innate immune response. *Journal of proteome research*, *9*, 2539–49.

- SKOVRONSKY, D.M., MOORE, D.B., MILLA, M.E., DOMS, R.W., LEE, V.M. **2000**. Protein kinase C-dependent α -secretase competes with β -secretase for cleavage of amyloid- β precursor protein in the trans-golgi network. *The Journal of biological chemistry*, 275, 2568–75.
- SMITH, M.F., MITCHELL, A., LI, G., DING, S., FITZMAURICE, A.M., RYAN, K., CROWE, S., GOLDBERG, J.B. **2003**. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 278, 32552–60.
- SOMMER, A., FRIES, A., CORNELSEN, I., SPECK, N., KOCH-NOLTE, F., GIMPL, G., ANDRÄ, J., BHAKDI, S., REISS, K. **2012**. Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *The Journal of biological chemistry*, 287, 23678–89.
- SOOND, S.M., EVERSON, B., RICHES, D.W.H., MURPHY, G. **2005**. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of cell science*, 118, 2371–80.
- SØRENSEN, O.E., THAPA, D.R., ROUPÉ, K.M., VALORE, E. V, SJÖBRING, U., ROBERTS, A.A., SCHMIDTCHEN, A., GANZ, T. **2006**. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of clinical investigation*, 116, 1878–85.
- STERCHI, E.E., STÖCKER, W., BOND, J.S. **2008**. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine*, 29, 309–28.
- STEBESAND, N., KIEHNE, K., BRUNKE, G., PAHL, R., REISS, K., HERZIG, K.-H., SCHUBERT, S., SCHREIBER, S., FÖLSCH, U.R., ROSENSTIEL, P., ARLT, A. **2009**. The expression of the β -defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF- κ B and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of *Candida* esophagitis. *BMC immunology*, 10, 36.
- STONE, A.L., KROEGER, M., SANG, Q.X. **1999**. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. *Journal of protein chemistry*, 18, 447–65.
- SUMIKAWA, Y., ASADA, H., HOSHINO, K., AZUKIZAWA, H., KATAYAMA, I., AKIRA, S., ITAMI, S. **2006**. Induction of β -defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. *Microbes and infection*, 8, 1513–21.
- SUNNARBORG, S.W., HINKLE, C.L., STEVENSON, M., RUSSELL, W.E., RASKA, C.S., PESCHON, J.J., CASTNER, B.J., GERHART, M.J., PAXTON, R.J., BLACK, R.A., LEE, D.C. **2002**. Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *The Journal of biological chemistry*, 277, 12838–45.

- SWENDEMAN, S., MENDELSON, K., WESKAMP, G., HORIUCHI, K., DEUTSCH, U., SCHERLE, P., HOOPER, A., RAFII, S., BLOBEL, C.P. **2008**. VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circulation research*, *103*, 916–8.
- TAÏEB, N., YAHY, N., FANTINI, J. **2004**. Rafts and related glycosphingolipid-enriched microdomains in the intestinal epithelium: bacterial targets linked to nutrient absorption. *Advanced drug delivery reviews*, *56*, 779–94.
- TAKEDA, S. **2009**. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Seminars in cell & developmental biology*, *20*, 146–52.
- TAKEDA, K., AKIRA, S. **2005**. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*, *17*, 1–14.
- TAKEDA, S., IGARASHI, T., MORI, H., ARAKI, S. **2006**. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *The EMBO journal*, *25*, 2388–96.
- TELLIER, E., CANAULT, M., REBSOMEN, L., BONARDO, B., JUHAN-VAGUE, I., NALBONE, G., PEIRETTI, F. **2006**. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Experimental cell research*, *312*, 3969–80.
- THATHIAH, A., BLOBEL, C.P., CARSON, D.D. **2003**. Tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17 mediates MUC1 shedding. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 3386–94.
- TOCHOWICZ, A., GOETTIG, P., EVANS, R., VISSE, R., SHITOMI, Y., PALMISANO, R., ITO, N., RICHTER, K., MASKOS, K., FRANKE, D., SVERGUN, D., NAGASE, H., BODE, W., ITOH, Y. **2011**. The dimer interface of the membrane type 1 matrix metalloproteinase hemopexin domain: crystal structure and biological functions. *The Journal of biological chemistry*, *286*, 7587–600.
- TOKUMARU, S., SAYAMA, K., SHIRAKATA, Y., KOMATSUZAWA, H., OUHARA, K., HANAKAWA, Y., YAHATA, Y., DAI, X., TOHYAMA, M., NAGAI, H., YANG, L., HIGASHIYAMA, S., YOSHIMURA, A., SUGAI, M., HASHIMOTO, K. **2005**. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *The journal of immunology*, *175*, 4662–8.
- TSAKADZE, N.L., SITHU, S.D., SEN, U., ENGLISH, W.R., MURPHY, G., SOUZA, S.E.D. **2006**. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *The Journal of biological chemistry*, *281*, 3157–64.
- TSAN, M., GAO, B. **2004**. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of leukocyte biology*, *76*, 514–9.

- URBAN, S., FREEMAN, M. **2003**. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Molecular cell*, *11*, 1425–34.
- VAN WART, H.E., BIRKEDAL-HANSEN, H. **1990**. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *PNAS*, *87*, 5578–82.
- WALCHECK, B., HERRERA, A.H., ST HILL, C., MATTILA, P.E., WHITNEY, A.R., DELEO, F.R. **2006**. ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. *European journal of immunology*, *36*, 968–76.
- WANG, Y., HERRERA, A.H., LI, Y., BELANI, K.K., WALCHECK, B. **2009**. Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. *The journal of immunology*, *182*, 2449–57.
- WETZKER, R., BÖHMER, F. **2003**. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, *4*, 651–7.
- WHITE, P.M., STONE, J.S., GROVES, A.K., SEGIL, N. **2012**. EGFR signaling is required for regenerative proliferation in the cochlea: conservation in birds and mammals. *Developmental biology*, *363*, 191–200.
- WIEDOW, O., HARDER, J., BARTELS, J., STREIT, V., CHRISTOPHERS, E. **1998**. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, *248*, 904–9.
- WILLEMS, S.H., TAPE, C.J., STANLEY, P.L., TAYLOR, N. A, MILLS, I.G., NEAL, D.E., MCCAFFERTY, J., MURPHY, G. **2010**. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *The Biochemical journal*, *428*, 439–50.
- WISNIEWSKA, M., GOETTIG, P., MASKOS, K., BELOUSKI, E., WINTERS, D., HECHT, R., BLACK, R., BODE, W. **2008**. Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex. *Journal of molecular biology*, *381*, 1307–19.
- XU, P., DERYNCK, R. **2010**. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell*, *37*, 551–66.
- XU, P., LIU, J., SAKAKI-YUMOTO, M., DERYNCK, R. **2012**. TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Science signaling*, *5*.
- XUE, L., LUCOCQ, J. **1998**. ERK2 signalling from internalised epidermal growth factor receptor in broken A431 cells. *Cellular signalling*, *10*, 339–48.

- YAHATA, Y., SHIRAKATA, Y., TOKUMARU, S., YANG, L., DAI, X., TOHYAMA, M., TSUDA, T., SAYAMA, K., IWAI, M., HORIUCHI, M., HASHIMOTO, K. **2006**. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *The Journal of biological chemistry*, 281, 13209–16.
- YAN, Y., SHIRAKABE, K., WERB, Z. **2002**. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *The Journal of cell biology*, 158, 221–6.
- YE, J., DAVÉ, U.P., GRISHIN, N. V, GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. **2000**. Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *PNAS*, 97, 5123–8.
- ZHANG, Z., OLIVER, P., LANCASTER, J.R., SCHWARZENBERGER, P.O., JOSHI, M.S., CORK, J., KOLLS, J.K. **2001**. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor α -converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB journal*, 15, 303–5.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Matthias Leippe** dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, das Gutachten für diese Arbeit zu übernehmen. Vielen Dank für das Interesse an meiner Arbeit, für die Unterstützung bei den Vorbereitungen für meinen Forschungsaufenthalt in New York und für die Anregungen, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg stets vorangebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Karina Reiß** für die angenehme Betreuung und die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas. Vielen Dank für das großartige Arbeitsumfeld, für all die praktischen und hilfreichen Ratschläge, für das Vertrauen und für die Möglichkeit auch manchmal eigene Wege zu gehen.

Ein riesengroßes Dankeschön auch an **Carl Blobel** und **Thorsten Marezky** für die freundliche Aufnahme im New Yorker Labor und die Möglichkeit, internationale Forschungsluft zu schnupern. Dieser Aufenthalt war sowohl fachlich als auch persönlich enorm lehrreich für mich und die Erfahrungen, die ich dort sammeln durfte sind unbezahlbar und unvergesslich.

Ein besonderer Dank gebührt den Reiss-Schrecken **Björn Ahrens, Maria Sperrhacker, Nancy Speck, Anselm Sommer** und **Felix Kordowski**. Es war stets ein „*Gefühl der Hochstimmung*“ mit sechs Buchstaben mit euch zu arbeiten.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern des sechsten Stocks der Dermatologie für die nette Atmosphäre im Labor danken. Ein besonders herzlicher Dank gilt dabei **Britta Hansmann** dafür, dass sie mir Asyl in ihrem Büro gewährt hat und immer ein offenes Ohr für meine kleineren und größeren Problemchen hatte. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei **Uli Gerstel**, der nie müde wurde Erklärungen für all das Unerklärliche in der Wissenschaft mit mir zu suchen.

Zu guter Letzt danke ich **meiner Familie** für ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Astrid Evers, dass ich die vorliegende Arbeit -abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen akademischen Betreuer- selbständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

MARETZKY, T., **EVERS, A.**, ZHOU, W., SWENDEMAN, S.L., WONG, P.-M., RAFII, S., REISS, K., BLOBEL, C.P. 2011. Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nature communications*, 2, 229.

Darüberhinaus wurde ein weiteres Manuskript, das Daten aus dieser Arbeit enthält zur Publikation vorbereitet:

EVERS, A., KORDOWSKI, F., PASCHKE, M., APARICIO, S., GERSTEL, U., ARLT, A., REISS, K. 2013. TLR ligands stimulate ADAM-dependent EGFR signalling via P2 receptor activation in keratinocytes.

Kiel, April 2013

Astrid E. Evers

LEBENS LAUF

Name	Astrid Elisabeth Evers
geboren am	24. März 1984
in	Lüneburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulausbildung

Ab 03/2009	Doktorarbeit an der Klinik für Dermatologie des UKSH Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Reiß unter externer Betreuung von Prof. Dr. M. Leippe Titel: Transaktivierung des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (ADAMs)
03/2008 – 12/2008	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung Zoophysiologie bei Prof. Dr. M. Leippe Titel: Proteasen als intrazelluläre Zielstrukturen für Substanzen mit cytotoxischer Wirkung gegen den Malariaerreger <i>Plasmodium falciparum</i>
10/2003 – 02/2009	Biologiestudium (Zellbiologie & Mikrobiologie), CAU Kiel

Schulbildung

24.06.2003	Abitur
1994 - 2003	Orientierungsstufe & Gymnasium , Scharnebeck
1990 - 1994	Grundschule , Brietlingen

AN HANG



ARTICLE

Received 10 Dec 2010 | Accepted 9 Feb 2011 | Published 8 Mar 2011

DOI: 10.1038/ncomms1232

Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17

Thorsten Maretzky^{1,*}, Astrid Evers^{2,*}, Wenhui Zhou¹, Steven L. Swendeman¹, Pui-Mun Wong³, Shahin Rafii^{3,4}, Karina Reiss² & Carl P. Blobel^{1,3,4}

The fibroblast growth factor receptor 2-IIIb (FGFR2b) and the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) are tyrosine kinases that can promote cell migration and proliferation and have important roles in embryonic development and cancer. Here we show that FGF7/FGFR2b-dependent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR)/ERK1/2 signalling and cell migration in epithelial cells require stimulation of the membrane-anchored metalloproteinase ADAM17 and release of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF). Moreover, VEGF-A/VEGFR2-induced migration of human umbilical vein endothelial cells also depends on EGFR/ERK1/2 signalling and shedding of the ADAM17 substrate HB-EGF. The pathway used by the FGF7/FGFR2b signalling axis to stimulate shedding of substrates of ADAM17, including ligands of the EGFR, involves Src, p38 mitogen-activated protein-kinase and PI3K, but does not require the cytoplasmic domain of ADAM17. Based on these findings, ADAM17 emerges as a central component in a triple membrane-spanning pathway between FGFR2b or VEGFR2 and EGFR/ERK1/2 that is required for cell migration in keratinocytes and presumably also in endothelial cells.

¹Arthritis and Tissue Degeneration Program, Hospital for Special Surgery at Weill Medical College, Cornell University, Caspary Research Building, 535 E 70th Street, New York, New York 10021, USA. ²Department of Dermatology and Allergology, University Hospital Schleswig Holstein, Campus Kiel, Schittenhelmstrasse 7, Kiel D-24105, Germany. ³Cell Biology and Genetics Program, Weill Medical College, Cornell University, New York, New York 10021, USA. ⁴Departments of Medicine and Physiology, Biophysics and Systems Biology, Weill Medical College, Cornell University, New York, New York 10021, USA. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.P.B. (email: blobelc@hss.edu).

ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms1232

Activation of the fibroblast growth factor receptor 2-IIIb (FGFR2b) by the fibroblast growth factor 7 (FGF7), also referred to as keratinocyte growth factor, is known to stimulate phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1/2 and to regulate the proliferation and migration of epithelial cells^{1–3}, yet much remains to be learned about the underlying mechanism. Previous studies have shown that the cell surface metalloproteinase ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase 17) responds to stimulation by tyrosine kinases such as the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) or G-protein coupled receptors, resulting in the release of ligands of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and activation of ERK1/2 signalling^{4–7}. ADAM17 has also emerged as a crucial physiological regulator of EGFR signalling during development, mainly because mice lacking ADAM17 resemble mice lacking the EGFR^{8,9} or certain EGFR-ligands. Specifically, *Adam17*^{−/−} mice have open eyes at birth (also seen in *Tgfa*^{−/−} and *hb-egf*^{−/−} mice^{10–12}), defects in cardiovascular morphogenesis with thickened and misshapen heart valves (also found in *hb-egf*^{−/−} mice and in animals with a knock-in mutation in the cleavage site of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)^{13–17}), and defects in branching morphogenesis in the developing mammary gland (also observed in mice lacking amphiregulin¹⁸). Thus, EGFR signalling is impaired in *Adam17*^{−/−} mice, most likely because the soluble active forms of these EGFR-ligands are not generated at sufficient levels to stimulate EGFR when ADAM17 is deleted. The main goal of the current study was to evaluate what role, if any, ADAM17 has in the activation of EGFR/ERK1/2 in keratinocytes and in promoting their migration in response to FGF7/FGFR2b signalling^{19,20}. In addition, as ADAM17 is known to be required for cross talk between the VEGFR2 and ERK1/2 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)⁴, we were interested in determining the functional consequences of this cross talk, and therefore tested whether ADAM17 is required for the migration of HUVECs in response to activation of VEGF-A/VEGFR2 signalling.

Our results uncovered a crucial role for ADAM17 in the FGF7/FGFR2b-dependent stimulation of the EGFR/ERK1/2 signalling pathway and of cell migration in primary human and mouse keratinocytes as well as in HaCaTs, a human keratinocyte cell line. Moreover, we found that the VEGF-A-stimulated migration of HUVECs also depends on activation of a metalloproteinase and of the EGFR/ERK1/2 signalling axis. Our results suggest that ADAM17 is responsible for mediating the transactivation of the EGFR/ERK1/2 signalling pathway by two distinct receptor tyrosine kinases, FGFR2b and VEGFR2.

Results

Stimulation of ERK1/2 by FGFR2b requires a metalloproteinase.

To determine whether FGFR2b-dependent phosphorylation of ERK1/2 in keratinocytes requires activation of a metalloproteinase, we tested how the hydroxamate metalloproteinase inhibitor marimastat (MM) affects ERK1/2 phosphorylation at different time points after addition of FGF7 to primary human keratinocytes (Fig. 1a,b) or HaCaT cells, a human keratinocyte cell line (Fig. 1c,d). Following addition of FGF7, ERK1/2 phosphorylation was observed within 5 min and persisted for at least 60 min in both cell types (Fig. 1a,c shows representative western blots, and Fig. 1b,d shows densitometric quantification of three western blots for each cell type). Interestingly, the FGF7-dependent phosphorylation of ERK1/2 was completely prevented by MM in primary human keratinocytes and HaCaT cells, even as early as 5 min after addition of FGF7 (Fig. 1a–d). This suggested that FGFR2b stimulated ERK1/2 by the activation of a metalloproteinase, and not through an intracellular signalling pathway²¹. In this respect, FGFR2b/ERK1/2 cross talk in keratinocytes differs significantly from the stimulation of ERK1/2 by VEGF-A/VEGFR2 in HUVECs, which

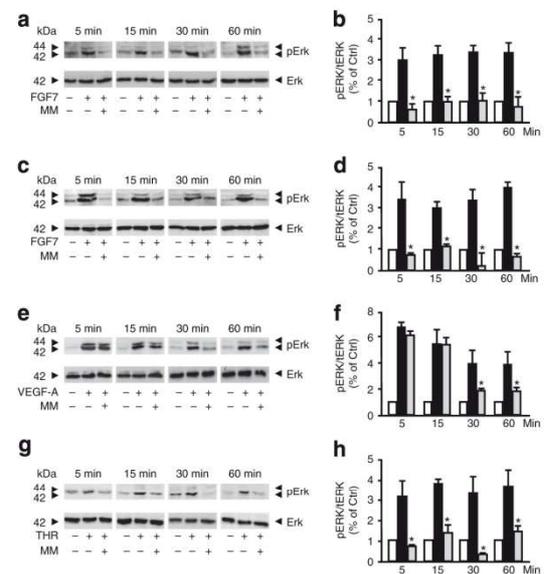


Figure 1 | Metalloproteinase-dependent cross talk between FGFR2b or the VEGFR2 and EGFR/ERK-signalling. A time course of ERK1/2 phosphorylation is shown for primary human keratinocytes (a, b) or HaCaT cells (c, d) treated with or without 20 ng ml^{−1} FGF7; for HUVECs treated with or without 25 ng ml^{−1} VEGF-A (e, f) or for mEFs treated in the presence or absence of 2 U ml^{−1} thrombin (THR) (g, h), in each case with or without addition of 5 μM marimastat (MM) to the treated sample, as indicated. Representative western blot analyses of ERK1/2 phosphorylation at different time points are shown in (a, c, e, g), with an immunoblot of total ERK1/2 included as loading control, and the results of a densitometric quantification of ERK1/2 phosphorylation relative to total ERK are in (b, d, f, h). An asterisk indicates a significant decrease in ERK1/2 phosphorylation in the stimulated sample in the presence of 5 μM MM compared with in the absence of MM. White bars: unstimulated cells, black bars: stimulated cells, grey bars: stimulated cells in the presence of MM. n = 3 for all densitometric quantifications; ± s.e.m.; Student's t-test *P ≤ 0.05.

consists of an early component that is not sensitive to MM, and a late component that is sensitive to MM (Fig. 1e,f; see also ref. 4). Thus, a major distinction between the stimulation of ERK1/2 by the tyrosine kinases FGFR2b and VEGFR2 is that VEGF-A/VEGFR2 can initially activate ERK1/2 via cross talk that is insensitive to metalloproteinase inhibition and therefore most likely intracellular, whereas FGFR2b apparently lacks the ability to stimulate ERK1/2 without the involvement of a metalloproteinase, at least in primary human keratinocytes and HaCaT cells (similar results were obtained with primary murine keratinocytes, see below). The activation of ERK1/2 by the tyrosine kinase receptor FGFR2b thus resembles the cross talk between several G-protein coupled receptors and ERK1/2, which also depends entirely on activation of metalloproteinases^{7,22}. To corroborate this point, we treated mouse embryonic fibroblasts (mEFs) with thrombin to stimulate the G-protein coupled protease-activated receptor 1 (PAR1), which has previously been shown to activate ERK1/2 via stimulation of a metalloproteinase and EGFR²³. We found a very similar time course and MM-sensitivity of ERK1/2 activation as we had observed in primary human keratinocytes or HaCaT cells treated with FGF7 (Fig. 1g,h). Thus, the FGF7/FGFR2b-dependent activation of ERK1/2 between 5 and 60 min

after addition of FGF7 appears to rely predominantly, if not entirely, on a metalloproteinase.

FGFR2b and VEGFR2 stimulate shedding of HB-EGF. We next tested whether activation of FGFR2b or VEGFR2 triggers the release of EGFR-ligands in stimulated primary human keratinocytes or HUVECs, respectively. Previous studies had demonstrated that activation of the VEGFR2 by VEGF-A stimulates ADAM17 to release ligands of EGFR in a variety of different cell types, but these studies relied on transfected alkaline phosphatase (AP)-tagged EGFR-ligands as a readout⁴. We therefore decided to use conditioned supernatants from FGF7-treated primary human keratinocytes to stimulate A431 cells (an EGFR-overexpressing cell line²⁴) to provide evidence for the release of endogenous EGFR ligands from human keratinocytes. When the conditioned supernatants of human keratinocytes that had been stimulated with FGF7 for 5–60 min were applied to A431 cells, we observed an increase in ERK1/2 phosphorylation in the A431 cells, with the supernatant of unstimulated human keratinocytes serving as control (Fig. 2a,b). In all cases, supernatants of FGF7-stimulated human keratinocytes conditioned in the presence of MM elicited only background levels of ERK1/2 phosphorylation in the A431 cells (note that all conditioned supernatants were adjusted to the same concentration of MM before addition to A431 cells to rule out that this metalloproteinase inhibitor affects ERK1/2 activation in A431 cells). Moreover, stimulation of ERK1/2 phosphorylation in A431 by conditioned supernatants of human keratinocytes treated with FGF7 could be reduced by the mutant diphtheria toxin CRM197, which selectively inactivates the human form of HB-EGF²⁵, by the EGFR-kinase inhibitor AG1478 and the EGFR-function blocking antibody Cetuximab (Fig. 2c,d), further corroborating that activation of the EGFR by the conditioned supernatants is crucial for ERK1/2 phosphorylation in A431 cells. Identical experiments with conditioned supernatants of VEGF-A-treated HUVECs showed a comparable metalloproteinase-dependent activation of ERK1/2 in A431 cells, with activation of ERK1/2 elicited by supernatants of HUVECs that had been treated with VEGF-A for as little as 5 min (Fig. 2e,f). The ERK1/2 phosphorylation in A431 cells triggered by supernatants of VEGF-A-treated HUVECs could also be blocked by CRM197, AG1478 and Cetuximab (Fig. 2g,h). Finally, we found that treatment of A431 cells with VEGF-A or FGF7 did not stimulate ERK1/2 phosphorylation, ruling out that the activation of ERK1/2 in these cells was stimulated directly by the VEGF-A or FGF7 present in the conditioned supernatants (Fig. 2i,j).

FGF7-stimulated keratinocyte migration requires ADAM17. To assess the functional relevance of metalloproteinase-dependent EGFR/ERK1/2 signalling in FGF7-stimulated keratinocytes, we performed *in vitro* scratch wound healing assays with HaCaT cells (Fig. 3) or primary human keratinocytes (Supplementary Fig. S1) in the presence or absence of MM or Cetuximab. Untreated HaCaT cells or primary human keratinocytes did not repair scratch wounds after 12 h (Fig. 3a, Supplementary Fig. S1a). FGF7-stimulated migration of HaCaT cells and primary human keratinocytes could be blocked by MM and Cetuximab (Fig. 3a, Supplementary Fig. S1a). The inhibition of FGF7-dependent cell migration by MM could be rescued by addition of human HB-EGF (Fig. 3a, Supplementary Fig. S1a), which is known to require processing by the membrane-anchored metalloproteinase ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase 17)^{13,14,26–28}. However, HB-EGF did not rescue the inhibition by Cetuximab, as this blocks binding of HB-EGF to the EGFR (Fig. 3a, Supplementary Fig. S1a, a quantification of the results of three separate experiments is shown in Fig. 3b and Supplementary Fig. S1b, respectively). A western blot analysis of similarly treated cultures demonstrated that addition of FGF7 increased

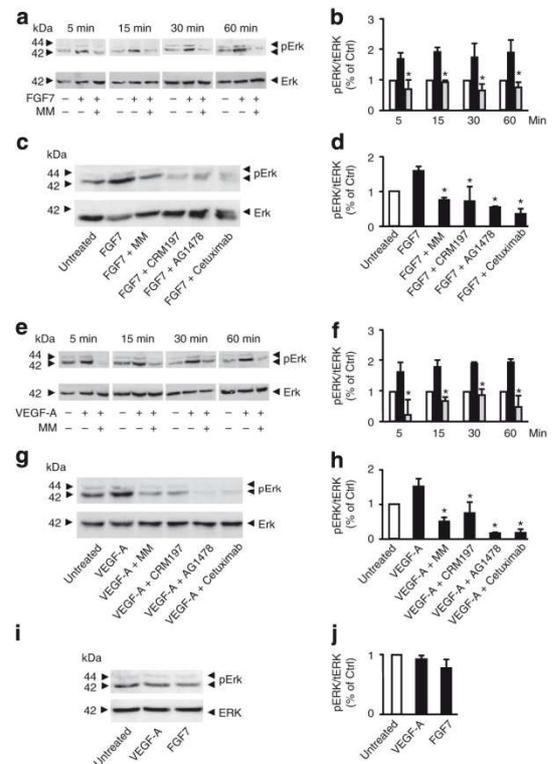


Figure 2 | Conditioned supernatants from FGF7-stimulated human primary keratinocytes or VEGF-A-stimulated HUVECs activate ERK1/2.

Western blot of ERK1/2 phosphorylation in A431 cells treated with conditioned supernatants of primary human keratinocytes that had been incubated for 5–60 min in the presence or absence of 20 ng ml⁻¹ FGF7, with or without 5 μM MM (a) and densitometric quantification of ERK1/2 phosphorylation relative to total ERK (b, white bar: no FGF; black bar: FGF7; grey bar: FGF7 plus marimastat). Representative immunoblot of ERK1/2 phosphorylation in A431 cells treated for 10 min with conditioned supernatants of primary human keratinocytes that were incubated for 10 min with control medium, or with medium containing FGF7, or FGF7 and 5 μM MM, or 10 μg ml⁻¹ of the mutant diphtheria toxin CRM197, or 1 μM of the EGFR-kinase inhibitor AG1478, or 10 μg ml⁻¹ of the EGFR-function blocking antibody Cetuximab (C225), respectively (c), and densitometric quantification (d). Representative immunoblot of ERK1/2 phosphorylation elicited in A431 cells by a 10-min treatment with conditioned supernatants of HUVECs that were cultured in the presence or absence of 25 ng ml⁻¹ VEGF-A, or VEGF-A and 5 μM MM for various amounts of time, as indicated (e), and densitometric quantification (f, white bar: no VEGF; black bar: VEGF; grey bar: VEGF plus marimastat). Western blot of ERK1/2 phosphorylation in A431 cells treated for 10 min with conditioned supernatants from HUVECs cultured for 10 min with or without VEGF-A, or with VEGF-A and MM, CRM197, AG1478, or Cetuximab (g), and densitometric quantification (h). Representative immunoblot of ERK1/2 phosphorylation in A431 cells treated with VEGF-A or FGF7 (i) and densitometric quantification of three separate blots (j). An asterisk indicates significantly decreased ERK1/2 phosphorylation in the stimulated sample in the presence of various inhibitors compared with the absence of those inhibitors, as indicated. n = 3 for all densitometric quantifications; ± s.e.m.; Student's *t*-test *P < 0.05.

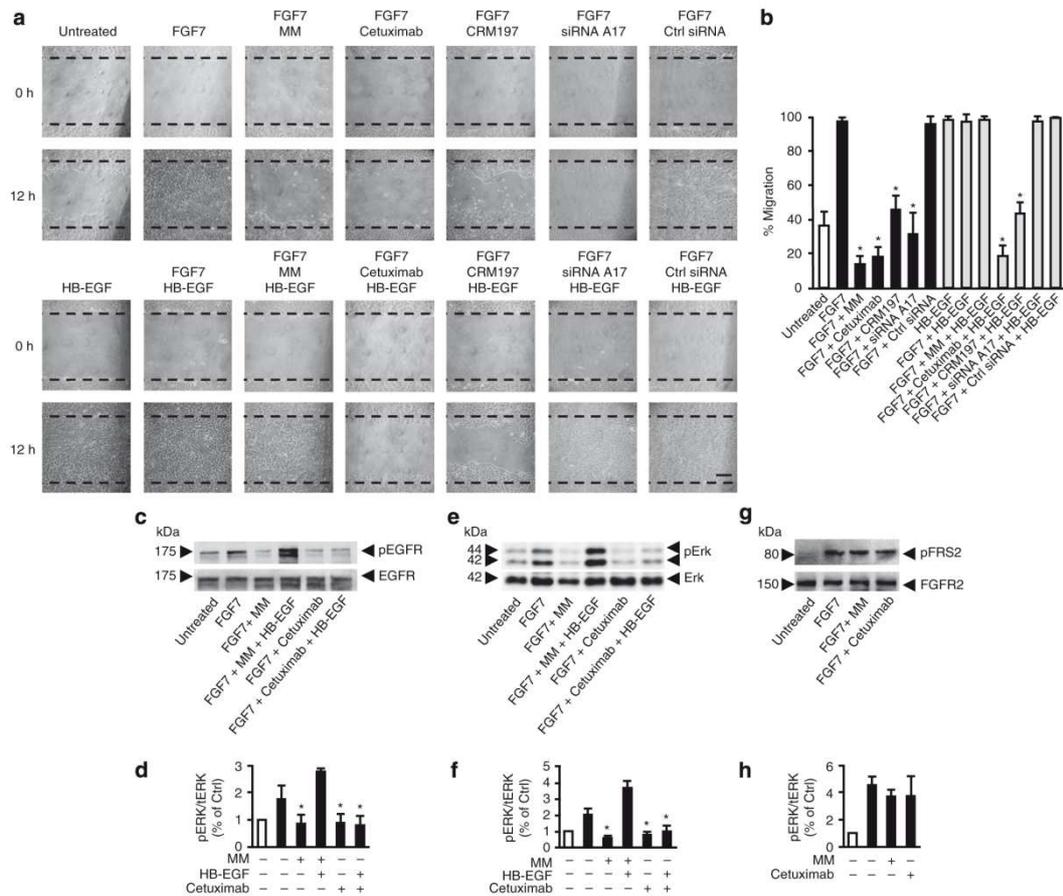


Figure 3 | FGF7-stimulated epithelial cell migration depends on ADAM17 and EGFR. (a) HaCaT cells were treated with or without FGF7 (50 ng ml⁻¹) or HB-EGF (50 ng ml⁻¹) in the presence or absence of MM (5 μM), Cetuximab (10 μg ml⁻¹), CRM197 (10 μg ml⁻¹), siRNA against ADAM17 or control siRNA (50 nM). A cell-free area was introduced with a pipette tip, and micrographs were taken at 0 and 12 h after scratch wounding. One representative of three independent experiments is shown. Scale bar, 100 μm. (b) Quantification of the results of three separate *in vitro* scratch wound assays. Asterisks (*) indicate a significant decrease compared with FGF7-treated samples. Western blot analysis of the effect of MM and Cetuximab on the FGF7 stimulated EGFR phosphorylation in HaCaT cells (c) and densitometric quantification (d). Cells were pre-incubated for 15 min with MM (5 μM) or Cetuximab (10 μg ml⁻¹) and then stimulated with FGF7 or FGF7/HB-EGF. (e, f) Representative immunoblot of ERK1/2 phosphorylation in FGF7-stimulated HaCaT cells in the presence or absence of MM or Cetuximab (e), and quantification of ERK1/2 phosphorylation (f). Western blot of lysates of FGF7-stimulated HaCaT cells show that neither MM nor Cetuximab significantly affect the stimulation of the FGFR2b target FRS2 (g) and densitometric quantification (h). White bars: no stimulation, black bars: stimulation with FGF7. An asterisk indicates a significant decrease in ERK1/2 phosphorylation in the stimulated sample in the presence of various inhibitors compared with the absence of inhibitors. n = 3 for all densitometric quantifications; ± s.e.m; Student's t-test *P < 0.05.

phosphorylation of EGFR (Fig. 3c,d) and ERK1/2 in HaCaT cells (Fig. 3e,f) and of ERK1/2 in primary human keratinocytes (Supplementary Fig. S1c,d), which could be prevented in both cell types if FGF7 was applied together with MM or Cetuximab. Moreover, EGFR and ERK1/2 phosphorylation was strongly stimulated by adding HB-EGF to cultures treated with FGF7 and MM, whereas HB-EGF did not activate EGFR or ERK1/2 in the presence of Cetuximab (Fig. 3c–f, only ERK1/2 phosphorylation of primary human keratinocytes is shown in Supplementary Fig. S1c,d). Neither MM nor Cetuximab had any detectable effect on the phosphorylation of the FGFR2b target FRS2 in HaCaTs, arguing against direct effects of MM or Cetuximab on the activation of FGFR2b by FGF7 (Fig. 3g,h).

Additional scratch wound healing experiments performed with HaCaT cells in the presence of FGF7 showed that CRM197 also significantly decreased cell migration (Fig. 3a). The requirement of HB-EGF for FGF7-stimulated migration of HaCaT cells raised the possibility that the HB-EGF sheddase ADAM17 (refs 13,14,26–28) is a critical intermediate in the signalling pathway between the FGF7/FGFR2b and EGFR/ERK1/2. To test this possibility, HaCaT cells were treated with anti-ADAM17 short interfering RNA (siRNA), which blocked FGF7-stimulated cell migration, whereas treatment with control siRNA did not (Fig. 3a). HB-EGF could rescue the defect in cell migration caused by treatment of FGF7-stimulated cells with ADAM17 siRNA, but could not rescue migration of cells treated with CRM197 (Fig. 3a). A quantification of the scratch

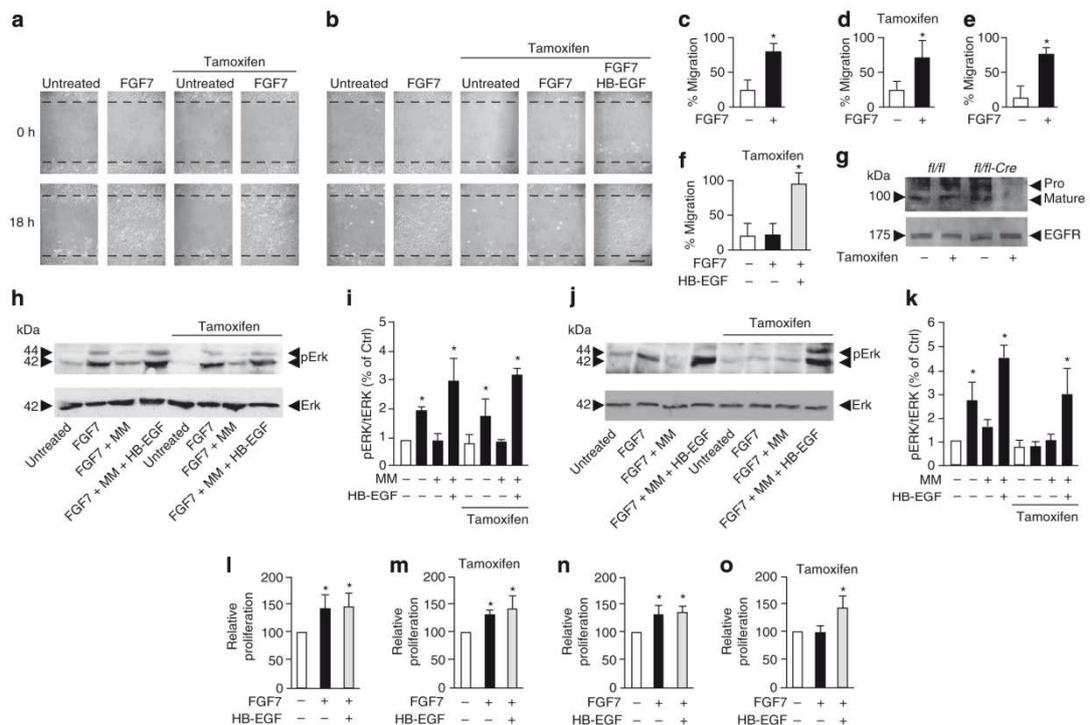


Figure 4 | Tamoxifen-induced inactivation of ADAM17 reduces FGF7-stimulated keratinocyte migration and proliferation. Primary keratinocytes from mice with two floxed *Adam17* alleles, but no Tamoxifen-inducible Cre (*Adam17*^{flox/flox}) (a) or from Tamoxifen-inducible conditional knockout mice for ADAM17 (*Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre}) (b) were treated with 1 μM Tamoxifen for 48 h and then cultured in keratinocyte growth medium for 12 h. Subsequently a scratch wound was introduced and the cultures were treated with or without FGF7 (50 ng ml⁻¹) or HB-EGF (50 ng ml⁻¹). Micrographs were taken at 0 and 18 h after scratch wounding. Scale bar, 100 μm. Quantification of three separate *in vitro* scratch wound assays with untreated primary *Adam17*^{flox/flox} keratinocytes (c), Tamoxifen-treated primary *Adam17*^{flox/flox} keratinocytes (d), untreated primary *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} keratinocytes (e) or Tamoxifen-treated primary *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} keratinocytes (f). Asterisks (*) indicate a significant increase in cell migration in the treated samples compared with untreated controls. The cells were collected after 60 h and analysed for ADAM17 expression by western blot (g). (h–k) ERK1/2 phosphorylation in primary keratinocytes from *Adam17*^{flox/flox} control mice (h, i) or *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} mice (j, k) treated with or without Tamoxifen for 48 h. Representative western blots are depicted in h and j, and the corresponding densitometric quantifications of ERK1/2 phosphorylation in western blots of three separate experiments are shown in i and k. After 6 h recovery from Tamoxifen treatment, the cells were incubated with or without FGF7 (20 ng ml⁻¹) or HB-EGF (50 ng ml⁻¹) in the presence or absence of MM (5 μM). Total ERK1/2 served as loading control. (l–o) Proliferation of primary *Adam17*^{flox/flox} keratinocytes (l), Tamoxifen-treated primary *Adam17*^{flox/flox} keratinocytes (m), primary *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} keratinocytes (n) or Tamoxifen-treated primary *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} keratinocytes (o) incubated with or without FGF7 (20 ng ml⁻¹) or HB-EGF (50 ng ml⁻¹), as indicated. White bars: no stimulation, black bars: stimulation with FGF7, grey bars: stimulation with FGF7 and HB-EGF. An asterisk indicates a significant decrease in ERK1/2 phosphorylation in the stimulated sample with inhibitors compared with the sample without inhibitors. *n* = 3; ±s.e.m.; Student's *t*-test **P* ≤ 0.05.

wound healing results described above in three independent experiments is shown in Figure 3b. A western blot analysis of HaCaT cells confirmed that FGF7-stimulated ERK1/2 phosphorylation was blocked by CRM197 (Supplementary Fig. S2a) by siRNA against ADAM17, but not by control siRNA (Supplementary Fig. S2b). An immunoblot for ADAM17 confirmed that the siRNA treatment strongly reduced expression of ADAM17, whereas treatment with control siRNA had no effect compared with untreated cells (Supplementary Fig. S2c). Finally, we corroborated that Cetuximab did not block the FGF7-stimulated activation of ADAM17 in HaCaT cells, using shedding of transforming growth factor-α (TGFα) as a readout (Supplementary Fig. S2d).

Conditional inactivation of ADAM17 in murine keratinocytes. As a next step, we wished to provide genetic evidence for a

role of ADAM17 in FGF7-stimulated keratinocyte migration. For this purpose, primary keratinocytes were isolated from Tamoxifen-inducible conditional knockout mice for ADAM17 (*Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre}) or control mice that carried two floxed alleles of ADAM17, but not the Tamoxifen inducible Cre-driver (*Adam17*^{flox/flox}, see Methods). In scratch wound healing assays, treatment with FGF7 for 18 h increased the migration of control primary keratinocytes from *Adam17*^{flox/flox} mice, regardless of whether they had been treated with Tamoxifen (Fig. 4a). However, migration of Tamoxifen-treated keratinocytes from *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} mice was only weakly stimulated by FGF7, whereas the response of untreated *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} keratinocytes was comparable with that of control *Adam17*^{flox/flox} keratinocytes (Fig. 4b). Cell migration of Tamoxifen-treated keratinocytes from *Adam17*^{flox/flox/CAG-Cre} mice could be stimulated by addition of

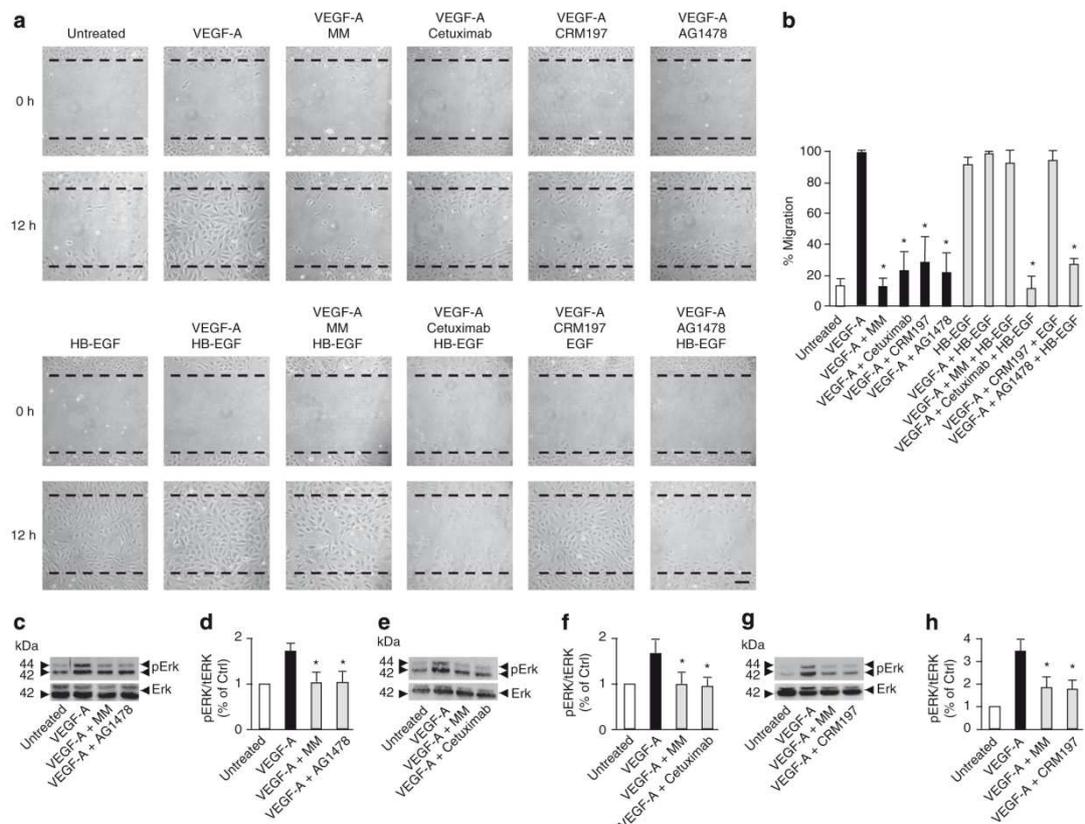


Figure 5 | VEGF-A-stimulated migration of HUVECs depends on a metalloproteinase and activation of EGFR. (a) Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with or without VEGF-A (25 ng ml⁻¹) or HB-EGF (50 ng ml⁻¹) in the presence or absence of 5 μM MM, 10 μg ml⁻¹ Cetuximab, 10 μg ml⁻¹ CRM197 or 1 μM AG1478. A scratch wound was introduced with a pipette tip, and micrographs of the same area on the tissue culture plate were taken at 0 and 12 h after wounding. VEGF-A-stimulated migration was blocked by MM, Cetuximab, CRM197 and AG1478. Addition of HB-EGF could rescue the migration of cells treated with VEGF-A and MM, and EGF could rescue migration of cells treated with VEGF-A and CRM197 (note that EGF was used in this sample because CRM197 inactivates human HB-EGF but not EGF²⁵). One representative of three independent experiments is shown. Scale bar, 100 μm. (b) Quantification of the results of three separate *in vitro* scratch wound assays. (c–h) Western blot of phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2 in lysates of HUVECs treated with VEGF-A for 15 min in the presence or absence of MM or AG1478 (c), Cetuximab (e) or CRM197 (g). Quantification of the results in (c, e, g) is shown in (d, f, h), respectively. Asterisks (*) indicate a significant decrease compared with the VEGF-A- or HB-EGF-treated samples in the presence of any of the compounds listed above. n = 3 for all densitometric quantifications; ± s.e.m; Student's t-test *P ≤ 0.05.

HB-EGF (Fig. 4b; a quantification of the results from three separate experiments is shown in Fig. 4c–f). A western blot analysis confirmed that Tamoxifen treatment efficiently reduced the expression of ADAM17 in keratinocytes from *Adam17flox/flox/CAG-Cre* mice, whereas it had no effect on controls from *Adam17flox/flox* mice (Fig. 4g). In cross talk experiments like those shown in Figure 1, FGF7 treatment activated ERK1/2 in a MM-sensitive manner in *Adam17flox/flox* controls, and this response was not significantly affected by pretreatment with Tamoxifen (Fig. 4h,i). However, in *Adam17flox/flox/CAG-Cre* keratinocytes, ERK1/2 phosphorylation in response to FGF7 was only seen in untreated cells, but not in cells that were pretreated with Tamoxifen to induce excision of ADAM17 (Fig. 4j,k). Addition of HB-EGF resulted in ERK1/2 phosphorylation in *Adam17flox/flox* control cells and *Adam17flox/flox/CAG-Cre* cells incubated with FGF7 and MM, regardless of whether they had been pretreated with Tamoxifen (Fig. 4h–k), demonstrating that deletion of ADAM17 did not affect the ability of EGFR to respond to HB-EGF. Finally, the FGF7-stimulated proliferation of Tamoxifen-

treated or untreated *Adam17flox/flox* control keratinocytes over a time course of 72 h was comparable (Fig. 4l,m), whereas the FGF7-stimulated proliferation of Tamoxifen-treated primary mouse keratinocytes from *Adam17flox/flox/CAG-Cre* mice was strongly reduced compared with that of otherwise identical cells that were not treated with Tamoxifen (Fig. 4n,o). The proliferation of Tamoxifen-treated *Adam17flox/flox/CAG-Cre* keratinocytes could be stimulated by HB-EGF, demonstrating that EGFR-dependent proliferation was not affected (Fig. 4o).

VEGF-A-stimulated migration of HUVECs depends on HB-EGF. When similar experiments were performed with HUVEC cells, a strong inhibition of VEGF-A-stimulated cell migration by treatment with MM for 12 h was observed, and this block in cell migration could be rescued by addition of HB-EGF (Fig. 5a). Pretreatment of HUVECs with Cetuximab, CRM197 or AG1478 also strongly reduced VEGF-A-stimulated migration. The inhibition of cell migration could be reversed by addition of EGF following

CRM197 treatment (please note that CRM197 does not bind to EGF), whereas HB-EGF did not rescue the inhibition by Cetuximab or AG1478 (Fig. 5a, a quantification of the results of three independent experiments is shown in Fig. 5b). Western blot analysis of ERK1/2 phosphorylation in VEGF-A-stimulated HUVECs demonstrated that AG1478, Cetuximab and CRM197 blocked ERK1/2 phosphorylation as efficiently as MM (Fig. 5c–h).

ADAM17 is activated by FGFR2b. To provide additional insights into the mechanism underlying the FGF7-stimulated release of EGFR-ligands, we evaluated the proteolytic release of AP-tagged HB-EGF, a substrate for ADAM17, from Cos-7 cells cotransfected with FGFR2b. We observed a significant dose-dependent increase in the shedding of HB-EGF from Cos-7 cells stimulated with 0.1–20 ng ml⁻¹ FGF7 (Fig. 6a). These results further corroborate that the FGF7/FGFR2b signalling axis activates ADAM17. When similar experiments were performed with Cos-7 cells expressing the ADAM10-substrate betacellulin (BTC)¹⁴, no FGF7-stimulated increase in shedding of BTC was observed, even at the highest concentration of FGF7 (20 ng ml⁻¹, Fig. 6b), indicating that ADAM10 is not activated by FGF7/FGFR2b signalling under these conditions.

To further confirm that FGFR2b stimulates shedding of HB-EGF by activating ADAM17, we performed similar experiments in *Adam17*^{-/-} mEFs. When *Adam17*^{-/-} mEFs were cotransfected with FGFR2b, HB-EGF and an inactive form of ADAM17 containing an E to A point mutation in its catalytic site, FGF7 was unable to stimulate HB-EGF shedding (Fig. 6c, white bars). When wild-type ADAM17 was cotransfected with FGFR2b and HB-EGF into *Adam17*^{-/-} cells, this increased constitutive shedding and restored the FGF7-induced shedding of HB-EGF (Fig. 6c, grey bars). A recent study has suggested that phosphorylation of the cytoplasmic domain of ADAM17 by mitogen-activated protein (MAP)-kinase is required for ADAM17-mediated ectodomain shedding²⁹. However, a mutant ADAM17 lacking its cytoplasmic domain, and therefore all potential cytoplasmic phosphorylation sites, was able to rescue FGF7-stimulated shedding of HB-EGF equally well as wild-type ADAM17, arguing against a role of the cytoplasmic domain of ADAM17 in its activation by FGF7/FGFR2b (Fig. 6c, black bars). On the other hand, when the transmembrane domain of ADAM17 was replaced with that of one of its substrates, CD62L, this prevented the response of ADAM17 to FGF7 (Fig. 6c, light grey bars), as also previously described for other activators of ADAM17 (ref. 30). Finally, stimulation of Cos-7 cells with FGF7 increased shedding of three other ADAM17 substrates, CD40, TGF α and tumour-necrosis factor- α (TNF α ; Fig. 6d). Very similar findings were obtained when an essentially identical set of experiments was performed using TGF α as a substrate to monitor the activity of ADAM17 (Supplementary Fig. S3a,b). Taken together, these results demonstrate that FGF7/FGFR2b activates ADAM17, but not ADAM10.

FGFR2b stimulates ADAM17 via a downstream signalling cascade. To elucidate the signalling pathways involved in the FGF7/FGFR2b-dependent activation of ADAM17, we tested how various inhibitors of intracellular signalling affected the FGF7-stimulated shedding of HB-EGF (Fig. 6e) or TGF α (Supplementary Fig. S3c). The Src-family kinase inhibitors PP2 and Dasatinib significantly reduced constitutive and FGF7-stimulated shedding of HB-EGF and TGF α , whereas the inactive control compound PP3 did not. Moreover, the p38 MAP-kinase inhibitor SB202190 and the PI3-kinase inhibitor LY294002 blocked FGF7-stimulated shedding of HB-EGF and TGF α without significantly reducing its constitutive shedding, whereas the MEK1/2 inhibitor U0126 and the EGFR-selective AG1478 had no significant effect on constitutive or FGF7-stimulated shedding. These results suggest that the activation of ADAM17 by FGFR2b depends on Src, the p38 MAP-kinase and the PI3-kinase, but does not require MEK1/2 or EGFR signalling.

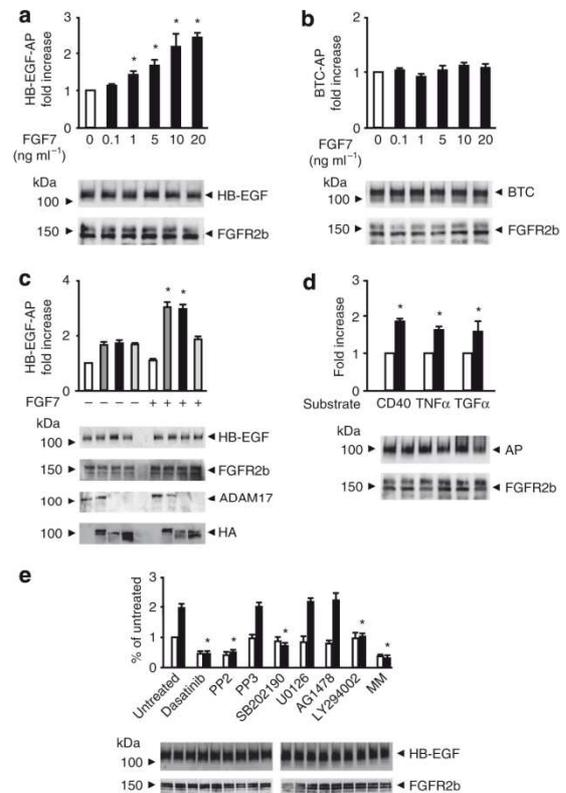


Figure 6 | FGF7/FGFR2b signalling activates ADAM17. (a) To measure activation of ADAM17 by FGF7/FGFR2b, Cos-7 cells were transfected with the alkaline phosphatase (AP)-tagged ADAM17-substrate HB-EGF¹⁴ and FGFR2b, and stimulated with 0.1–20 ng ml⁻¹ FGF7. (b) To assess the response of ADAM10 to stimulation by FGF7/FGFR2b, similar experiments were performed with the AP-tagged ADAM10-substrate betacellulin (BTC)¹⁴. (c) Shedding of HB-EGF from *Adam17*^{-/-} cells expressing FGFR2b and inactive ADAM17E>A (white bar), wild-type ADAM17 (dark grey bar), ADAM17 Δ -cyto lacking its cytoplasmic domain (black bar) or ADAM17-CD62L with the transmembrane domain of CD62L³⁰ (light grey bar), treated with or without FGF7. The western blots show controls for expression of FGFR2b, and of ADAM17E>A and ADAM17wt, detected with anti-cytoplasmic domain antibodies⁴⁷ and wild-type ADAM17, ADAM17 Δ -cyto and ADAM17-CD62L, detected by western blot for an HA tag at the carboxy-terminus of these constructs. Please note that expression of ADAM17 Δ -cyto is usually weaker than ADAM17wt, even though it can fully rescue *Adam17*^{-/-} mEFs^{27,30,49}. (d) Shedding of the ADAM17-substrates CD40, TNF α and TGF α from Cos-7 cells co-transfected with FGFR2b in the absence or presence of FGF7 (white and dark bars, respectively). (e) Effect of signalling inhibitors on HB-EGF shedding from FGF7-stimulated Cos-7 cells transfected with FGFR2b. Constitutive and FGF7-stimulated shedding (white and dark bars, respectively) was assessed either without further additions or in the presence of 10 μ M of the Src-family kinase inhibitors Dasatinib or PP2, or the inactive PP2 analog PP3, the p38 MAP-kinase inhibitor SB202190 (10 μ M), the MEK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M), the EGFR inhibitor AG1478 (1 μ M), the PI3-kinase inhibitor LY294002 (10 μ M) or MM (5 μ M). Panels a, b, d and e include controls to document comparable expression of alkaline phosphatase-tagged substrates and of FGFR2b. In a, c and d, an asterisk indicates significantly increased shedding in FGF7-treated cells compared with untreated controls. In e, an asterisk indicates a significant decrease in FGF7-stimulated shedding in the presence of an inhibitor compared with cells treated with FGF7 only. $n=3$, \pm s.e.m.; Student's *t*-test * $P\leq 0.05$.

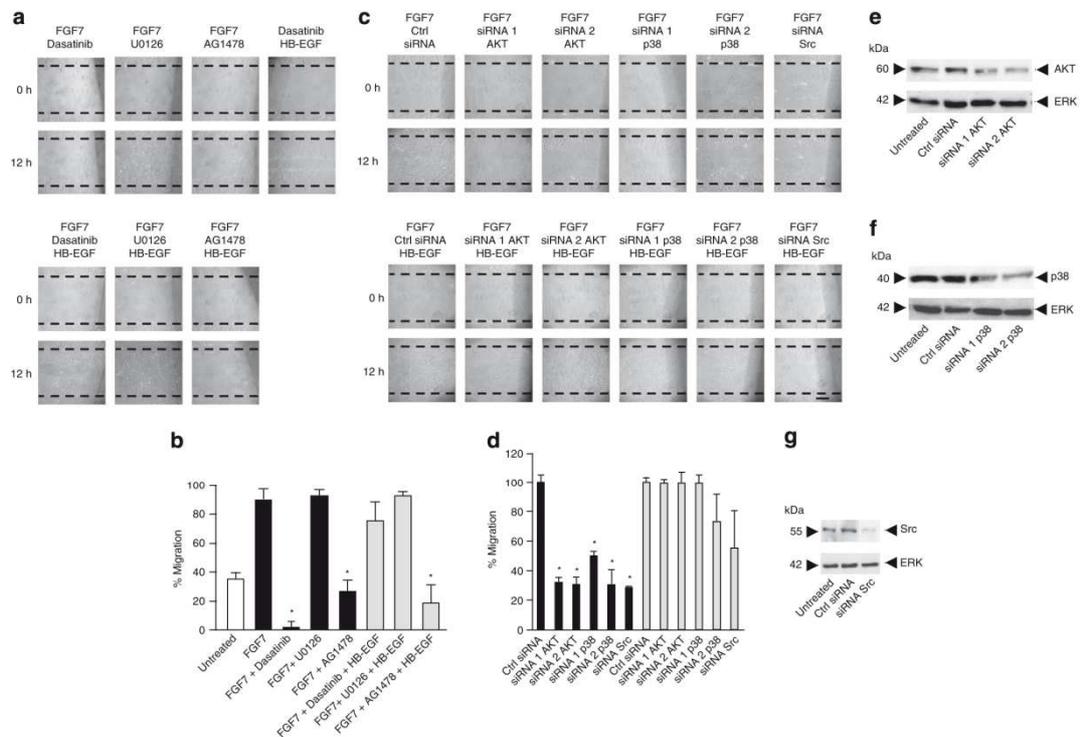


Figure 7 | Evaluation of the role of various signalling pathways in FGF7-stimulated migration of HaCaT cells. (a) HaCaT cells were treated with or without 50 ng ml⁻¹ FGF7 or 50 ng ml⁻¹ HB-EGF in the presence or absence of the Src kinase inhibitor Dasatinib (10 μM), the MEK1/2 inhibitor U0126 (10 μM) or the EGFR-kinase inhibitor AG1478 (1 μM). A cell-free area was introduced with a pipette tip, and migration was evaluated after 12 h. One representative example of cells at 0 and 12 h from three independent experiments is shown. Scale bar, 100 μm. **(b)** Quantification of the results of three separate scratch-wound assays using the inhibitors described in **a**. **(c)** In experiments like those described in **a**, the involvement of AKT, p38 MAP-kinase and Src in FGF7-stimulated HaCaT migration was assessed by transfection with siRNA against these molecules in the presence or absence of HB-EGF. The quantification of three separate experiments is shown in **d**. Asterisks (*) indicate a significant decrease in scratch wound healing compared with the FGF7-treated samples without inhibitors. Black bars: treated with FGF7; grey bars: treated with FGF7 and HB-EGF. **(e–g)** Western blot analysis of the expression of AKT **(e)**, p38 MAP-kinase **(f)** and Src **(g)** corroborates the reduction in expression of these proteins following treatment with the corresponding siRNAs, as indicated, with a blot for ERK serving as loading control. *n* = 3, ± s.e.m.; Student's *t*-test **P* ≤ 0.05.

Experiments in *Src*^{-/-} cells rescued with the inactive Src(K295A) or c-Src independently verified that c-Src is required for the FGF7-stimulated shedding of HB-EGF or TGFα from these cells (Supplementary Fig. S4a,b).

When we tested how the inhibitors that block activation of ADAM17 by FGFR2b affect migration of HaCaT cells, we found that Dasatinib and AG1478 blocked FGF7-stimulated migration, whereas the MEK1/2 inhibitor U0126 did not (Fig. 7a, a quantification of three separate experiments is shown in Fig. 7b). The inhibitory effect of Dasatinib could only be partially reversed by addition of HB-EGF, in contrast to the effect of AG1478. Dasatinib weakly inhibited HB-EGF-stimulated migration of HaCaT cells, demonstrating that it also has a direct effect on the EGFR pathway (Fig. 7a). Finally, we found that siRNA against AKT, p38 MAP-kinase or Src blocked FGF7-stimulated migration of HaCaT cells (Fig. 7c). The block of FGF7-stimulated cell migration by siRNA against AKT or p38 MAP-kinase could be rescued by HB-EGF, whereas the block by siRNA against Src could not (Fig. 7c, quantification of three separate experiments shown in Fig. 7d). Separate control experiments corroborated the reduction in the expression of AKT, p38 MAP-kinase and c-Src in HaCaT cells treated with the respective siRNAs (Fig. 7e–g).

FGFR2b is shed by ADAM10. Finally, as the shedding of VEGFR2 by ADAM17 is activated by VEGF-A⁴, we wanted to determine whether FGFR2b is itself shed, and if so, identify the responsible sheddase and test whether it responds to stimulation with FGF7. In shedding experiments with FGFR2b in cells lacking ADAM10 or ADAM17 we identified ADAM10 as the principal sheddase for FGFR2b (Supplementary Fig. S5). However, as ADAM10 is not activated by FGFR2b (see above), FGF7 stimulation most likely does not trigger the shedding of FGFR2b itself. Instead, FGFR2 activates ADAM17, leading to the release of HB-EGF and activation of the EGFR/ERK1/2 pathways and cell migration in keratinocytes.

Discussion

The main goal of this study was to probe how the receptor tyrosine kinase FGFR2b activates ERK1/2 signalling and cell migration. Using gain- and loss-of-function studies together with pharmacological inhibitors, we found that stimulation of FGFR2b in primary keratinocytes and HaCaT cells trigger ADAM17-dependent release of EGFR-ligands into the culture supernatants of these cells. Moreover, we demonstrated that a signalling axis that depends on ADAM17 > HB-EGF > EGFR is crucial for the activation of cell migration in keratinocytes by FGF7. These results suggest that the

well-established role of EGFR in skin homeostasis and wound healing³¹ could also depend on the release of EGFR-ligands by ADAM17, which will be addressed in future studies using conditional knockout mice lacking ADAM17 in the skin. Moreover, the finding that a metalloproteinase and the HB-EGF > EGFR signalling pathway is also necessary for VEGF-A-stimulated migration of HUVEC cells *in vitro* could help to explain the reduced pathological neovascularization observed in mice lacking the principal HB-EGF sheddase ADAM17 in endothelial cells³² and the impaired vessel formation in ADAM17-deficient mice³³.

The cross talk between FGFR2b and ERK1/2 is the first example, to our knowledge, of a tyrosine kinase receptor-dependent ERK1/2 phosphorylation that relies entirely on stimulation of ADAM17. By comparison, activation of the VEGFR2 triggers ERK1/2 phosphorylation by at least two mechanisms, the first leading to an initial strong activation of ERK1/2 that is not dependent on ADAM17 and that overshadows the metalloproteinase-dependent component in the first few minutes, and a second that only becomes apparent 15 min after addition of VEGF-A to HUVECs and that involves activation of ADAM17 (ref. 4). The activity of the metalloproteinase-dependent component in the first minutes could nevertheless be visualized when the conditioned supernatants from VEGF-A-treated HUVECs were applied to A431 cells, which provided a readout for the presence of soluble EGFR ligands in these supernatants. In these experiments, the time course and MM-sensitivity of ERK1/2 phosphorylation elicited in A431 cells by supernatants from VEGF-A-treated HUVECs was comparable to that triggered by FGF7-stimulated human keratinocytes. In both cases, the metalloproteinase-dependent release of EGFR-ligands into the culture supernatants was activated rapidly, within 5 min of addition of the growth factor.

Previous studies have shown that several other activators of keratinocyte migration and/or proliferation, such as PAR1, the angiotensin II type 1 receptor or the anti-microbial peptide Cathelicidin hCAP18/LL-37, also depend on HB-EGF and activation of EGFR^{34–36}. As ADAM17 has emerged as the (patho)physiologically relevant sheddase for HB-EGF in cell-based assays and in heart valve development *in vivo*^{13,14,28}, it is tempting to speculate that these other stimuli of keratinocyte migration also function via an activation of ADAM17. Consistent with this hypothesis, ADAM17 is known to be activated by a variety of distinct stimuli, including thrombin/PAR1 and TNF α ³⁰, angiotensin II³⁷, LPS/Toll-like receptor 4 (ref. 38) and G-protein coupled receptors⁵. However, even though ADAM17 is evidently activated by a variety of different signalling pathways, the mechanism underlying its rapid activation by FGF7 and other stimuli remains to be established. Several studies have implicated cytoplasmic phosphorylation of ADAM17 in its activation^{29,39,40}, yet our results suggest that the activation of ADAM17 by FGF7/FGFR2b does not depend on its cytoplasmic domain. Instead, the transmembrane domain of ADAM17 is critical for its ability to respond to stimulation by FGFR2b, which is consistent with the findings of a recent study that analysed the activation of ADAM17 by stimuli such as lysophosphatidic acid, thrombin, TNF α and EGF³⁰.

Taken together, the results presented here provide evidence for a triple membrane spanning signalling pathway, in which stimulation of the receptor tyrosine kinases FGFR2b or VEGFR2 activates ADAM17, followed by release of HB-EGF and activation of EGFR (see model in Fig. 8). Moreover, our results demonstrate that the activation of ADAM17 by FGFR2b depends on Src, PI3-kinase and p38 MAP-kinase. Interestingly, previous studies have shown that Src, which can activate ADAM17 (ref. 41), and PI3-kinase are important for FGF7-stimulated keratinocyte migration¹², suggesting that this also depended on the activation of ADAM17. Thus, ADAM17 has emerged as a critical component of the cross talk between the receptor tyrosine kinases FGFR2b and VEGFR2 and the EGFR/ERK1/2 pathways with a key role in stimulating cell migration elicited by the FGF7/FGFR2b and VEGF-A/VEGFR2 signalling pathways.

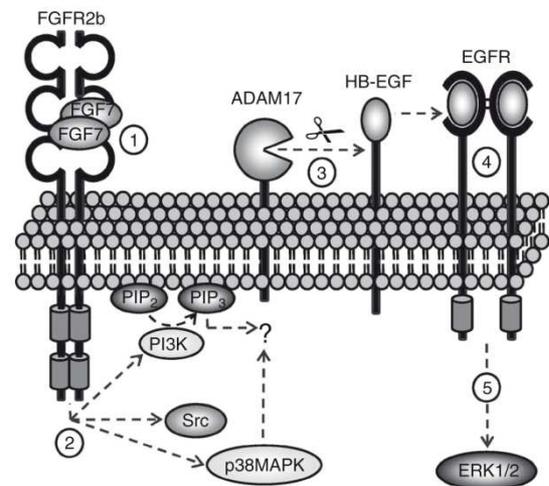


Figure 8 | A model for transactivation of the EGFR/ERK1/2 signalling pathway by FGF7/FGFR2b. Binding of FGF7 to FGFR2b (1) stimulates ADAM17 in a manner that can be blocked by inhibitors of Src kinases, p38 MAP-kinase and of phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase, which is responsible for the conversion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) (2). Stimulation of ADAM17 by FGF7 requires its transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain. Activation of ADAM17 triggers release of membrane proteins that include the EGFR-ligand HB-EGF (3), which activates EGFR (4) and ERK1/2 (5), thereby promoting FGF7-stimulated cell migration in keratinocytes. Both FGFR2b and EGFR are known to have critical roles in skin repair and inflammation of the skin^{21,57}.

Methods

Primary cells and cell lines. Cos-7 cells were from ATCC. HUVECs (provided by S.R.) were cultured on gelatin-coated plates in EC medium: M199 (Bio-Whittaker), 20% fetal bovine serum, 90 U ml⁻¹ heparin and 20 ng ml⁻¹ endothelial growth factor supplement (Sigma). The human keratinocyte line HaCaT⁴³ was from N. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany). *Adam10*^{-/-} mEFs were from Dr Paul Saftig (University of Kiel, Kiel, Germany), *Src*^{-/-} mEFs were from Dr Xin-Yun Huang (Cornell University, New York) and *Adam17*^{-/-} mEFs were from CB's lab^{38,44,45}. Primary human foreskin keratinocytes (PromoCell) were cultured in keratinocyte growth medium-2 (KGM-2; PromoCell). Primary mouse keratinocytes were isolated and cultured in KGM-2 supplemented with 20 ng ml⁻¹ murine EGF and 8 ng ml⁻¹ Cholera toxin (Sigma). To generate ADAM17-deficient primary keratinocytes, B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1⁺)5Amc/J mice containing a Tamoxifen-inducible Cre expressed under the control of the chicken beta actin promoter/enhancer (Jackson Labs, referred to as CAG-Cre throughout) were crossed with mice carrying floxed alleles of ADAM17 (ref. 38). The littermate-offspring of matings between *Adam17*^{fllox/fllox}/CAG-Cre and *Adam17*^{fllox/fllox} mice were used for isolation of primary keratinocytes as follows: 12-week-old mice were euthanized, and their tail was removed and disinfected for 5 min in Triadine (Triad Disposables). After washing in 70% ethanol the skin was removed and cut into small pieces, which were spread dermal side down on sterile Whatman paper and incubated in serum-free DMEM with 1% trypsin for 90 min at 37 °C. The epidermis was separated from the dermis, transferred to PBS, 10% FCS and the resulting cell suspension was passed through a 40 μm cell-filter and centrifuged for 5 min at 200 g. The sedimented cells were resuspended in KGM-2, seeded in Collagen-coated six-well plates (Becton-Dickinson) and used at a confluence of 80–90%. The medium was changed every second day. All animal experiments were approved by the Internal Animal Use and Care Committee of the Hospital for Special Surgery. All other cell lines were grown in DMEM supplemented with antibiotics and 5% FCS.

Growth factors and inhibitors. Recombinant human heparin-binding EGF (HB-EGF), Thrombin, Human vascular endothelial growth factor (VEGF-A), Murine epidermal growth factor (EGF), and murine and human Fibroblast Growth Factor 7 (FGF7, also referred to as keratinocyte growth factor) were from R&D Systems. PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), the EGFR tyrosine kinase inhibitor Thyrphostin

ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms1232

(AG1478) and the mutant diphtheria toxin CRM197 were from Sigma. The MEK1/2 inhibitor U0126, the p38 MAP-kinase inhibitor SB202190, the Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002, the Calcium ionophore, Ionomycin and the Src-family kinase inhibitor PP2 and its inactive analogue PP3 were from EMD Chemicals. Dasatinib was from Mark Moasser. The metalloproteinase inhibitor MM was from Ouathek Ouerfelli, Sloan-Kettering Institute, New York, New York⁴⁶. The EGFR-function blocking antibody Cetuximab (C225) was from Merck.

Antibodies. Rabbit anti-phospho ERK1/2, anti-phospho FRS2, anti-phospho EGFR, anti-EGFR, anti-Src and anti-AKT were from Cell Signaling Technology. Rabbit anti-ERK2, anti-p38 and anti-GAPDH were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-FGFR2 antibodies were from Sigma and Anti-HA antibodies from Covance. Rabbit polyclonal anti-ADAM17 cytosolic antibodies were from CB's laboratory⁴⁷.

Expression vectors. The expression vectors for ADAM10 and ADAM10E>A were from Dr Paul Saftig⁴⁸, for ADAM17 from Dr Gillian Murphy (University of Cambridge, UK). The expression constructs for ADAM17E>A, ADAM17Δ-cyto, ADAM17-CD62l^{27,30,49}, full-length and AP-tagged FGFR2b^{50,51}, AP-tagged CD40 (ref. 4), TNFα⁵² and TGFα⁵⁴ were from CB's laboratory.

Transfection and ectodomain shedding assay. Fibroblasts and HaCaTs were transfected with Lipofectamine2000, and Cos-7 cells were transfected with Lipofectamine^{44,53}. For shedding experiments (performed one day after transfection), cells were washed with OptiMEM, which was replaced after 1 h by fresh OptiMEM with or without the indicated inhibitors or stimuli, and then incubated for 30 min to 4 h (ref. 14). The AP activity in the supernatant and cell lysates was measured at A405 after incubation with the AP substrate 4-nitrophenyl phosphate^{43,54}. No AP activity was present in conditioned media of non-transfected cells. Three identical wells were prepared, and the ratio between the AP activity in the supernatant and the cell lysate plus supernatant were calculated for normalization. Each experiment was performed in three tissue culture wells, and repeated at least three times.

Small interfering RNA transfection. For silencing of ADAM17, HaCaTs were grown to 40–50% confluency and transfected with 2 μl Stealth Small Interfering RNA (siRNA) duplex (HSS186-181, Invitrogen) using Lipofectamine 2000. For silencing of AKT, p38 MAP-kinase or Src, HaCaTs were grown to 40–50% confluency and transfected with 50 nM Stealth siRNA duplex (#6211, #6510, #6564, #6243 or #6568, Cell Signaling Technology or sc-29228 Santa Cruz Biotechnology) using TransIT-TKO (Mirus). Random Stealth siRNA duplexes coding for non-functional RNAs served as controls. After 60 h incubation at 37 °C, the cells were starved in Opti-MEM for 8 h and used in scratch wound assays. Afterwards the cells were processed for western blot analysis to analyze knockdown efficiency.

Western blot analysis. Cells were lysed on ice in Tris-buffered saline (TBS) Triton-X100 (1%), 1 mM EDTA, 1,10-Phenanthroline (10 mM), Protease inhibitor cocktail and Phosphatase-inhibitor (Roche Applied Science). Comparable amounts of protein were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (BioTrace, Pall Corporation). These were blocked with 3% skim milk in TBS, then incubated with primary antibodies, washed in 0.1% Tween-TBS and bound primary antibodies were detected with Peroxidase-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit antibodies (Promega) using the ECL detection system (Amersham Biosciences) and a Chemdoc image analyzer (BioRad). To generate the control blots for expression of ERK1/2, separate western blots were prepared and probed as indicated, with the exception of the control blots in Figures 2, 3e, 4g and 5c,e,g and Supplementary Figures S1c and S2c, which were incubated in stripping reagent (100 mM 2-mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) at 55 °C for 30 min and then re-probed with anti ERK1/2 antibody.

In vitro scratch wound-healing assays. All cells used for *in vitro* scratch wound-healing assays (primary mouse or human keratinocytes, HaCaTs or HUVECs) were seeded in 12-well plates and cultured until they reached confluence. A scratch wound was introduced with a 200 μl pipette tip. After washing with PBS the cells were incubated with or without the indicated inhibitors or stimuli. After different periods of time, cells at the same positions along the scratch wound (marked with an indelible marker) were photographed using an Inverted phase-contrast microscope (Nikon, Eclipse TS100), and NIH Image J software was used for quantification of scratch wound assays⁵⁵.

Cell proliferation assay. Primary mouse keratinocytes from *Adam17lox/lox* control mice or *Adam17lox/lox/CAG-Cre* mice were treated with or without 1 μM Tamoxifen for 48 h and then seeded at 2 × 10⁴ cells per well in 96-well plates. After 1 day, cells were treated with FGF7, HB-EGF or left untreated. The media was removed after 72 h and replenished with fresh, untreated media and a MTS [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium] assay was performed following the manufacturer's instructions (Promega).

EGFR ligand release assay. Primary human keratinocytes or HUVECs on 6-well plates were treated with either FGF7 or VEGF-A, respectively, and incubated in

the presence or absence of different inhibitors for 5–60 min in Optimum medium. Conditioned supernatants (500 μl) were removed and incubated for 10 min with A431 cells, which express high levels of EGFR/ErB1 (ref. 56). The A431 cells were serum-starved overnight before the addition of the conditioned supernatants. For the experiments with AG1478 (1 μM) or the EGFR-blocking antibody Cetuximab (10 μg ml⁻¹), these compounds were pre-incubated with A431 cells for 10 min in Optimum before adding the conditioned media from stimulated cells, which was adjusted to 1 μM AG1478 or 10 μg ml⁻¹ Cetuximab as indicated. All conditioned supernatants were adjusted to the same concentration of MM (5 μM) before addition to A431 cells to control for effects of this metalloproteinase inhibitor on A431 cells.

Statistical analysis. All values are expressed as means ± standard error of the mean. The standard error values indicate the variation between mean values obtained from at least three independent experiments. Statistics following a Student *t* distribution were generated using the *t*-test. *P* values of <0.05 were considered as statistically significant.

References

- Gamady, A., Koren, R., Ron, D., Liberman, U. A. & Ravid, A. Vitamin D enhances mitogenesis mediated by keratinocyte growth factor receptor in keratinocytes. *J. Cell Biochem.* **89**, 440–449 (2003).
- Finch, P. W. & Rubin, J. S. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv. Cancer Res.* **91**, 69–136 (2004).
- Uzan, B., Figeac, F., Portha, B. & Movvassat, J. Mechanisms of KGF mediated signaling in pancreatic duct cell proliferation and differentiation. *PLoS One* **4**, e4734 (2009).
- Swendeman, S. *et al.* VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ. Res.* **103**, 916–918 (2008).
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M. & Ullrich, A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* **22**, 2411–2421 (2003).
- Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A. & Ullrich, A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1203–1208 (2003).
- Schafer, B., Gschwind, A. & Ullrich, A. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* **23**, 991–999 (2004).
- Luetke, N. C. *et al.* The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev.* **8**, 399–413 (1994).
- Sibilia, M. & Wagner, E. F. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* **269**, 234–238 (1995).
- Peschon, J. J. *et al.* An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281–1284 (1998).
- Luetke, N. C. *et al.* TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* **73**, 263–278 (1993).
- Mine, N., Iwamoto, R. & Mekada, E. HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development. *Development* **132**, 4317–4326 (2005).
- Jackson, L. F. *et al.* Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* **22**, 2704–2716 (2003).
- Sahin, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR-ligands. *J. Cell. Biol.* **164**, 769–779 (2004).
- Iwamoto, R. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 3221–3226 (2003).
- Yamazaki, S. *et al.* Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J. Cell. Biol.* **163**, 469–475 (2003).
- Chen, B. *et al.* Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat. Genet.* **24**, 296–299 (2000).
- Sternlicht, M. D. *et al.* Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM10-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development* **132**, 3923–3933 (2005).
- Dlugosz, A. A. *et al.* Keratinocyte growth factor receptor ligands induce transforming growth factor alpha expression and activate the epidermal growth factor receptor signaling pathway in cultured epidermal keratinocytes. *Cell Growth Differ.* **5**, 1283–1292 (1994).
- Koivisto, L., Jiang, G., Hakkinen, L., Chan, B. & Larjava, H. HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3α. *Exp. Cell Res.* **312**, 2791–2805 (2006).
- de Giorgi, V., Sestini, S., Massi, D., Ghersetich, I. & Lotti, T. Keratinocyte growth factor receptors. *Dermatol. Clin.* **25**, 477–485, vii (2007).
- Prenzel, N. *et al.* EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402** (1999).
- Arora, P., Cuevas, B. D., Russo, A., Johnson, G. L. & Trejo, J. Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene* **27**, 4434–4445 (2008).

24. Ullrich, A. *et al.* Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418–425 (1984).
25. Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. & Mekada, E. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 1015–1019 (1995).
26. Blobel, C. P. ADAMs: key players in EGFR-signaling, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **6**, 32–43 (2005).
27. Horiuchi, K. *et al.* Substrate selectivity of EGF-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 176–188 (2007).
28. Sunnarborg, S. W. *et al.* Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J. Biol. Chem.* **277**, 12838–12845 (2002).
29. Xu, P. & Derynck, R. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol. Cell* **37**, 551–566 (2010).
30. Le Gall, S. M. *et al.* ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell. Sci.* **123**, 3913–3922 (2010).
31. Schneider, M. R., Werner, S., Paus, R. & Wolf, E. Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am. J. Pathol.* **173**, 14–24 (2008).
32. Weskamp, G. *et al.* Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes. *Circ. Res.* **106**, 932–940 (2010).
33. Canault, M., Certel, K., Schatzberg, D., Wagner, D. D. & Hynes, R. O. The lack of ADAM17 activity during embryonic development causes hemorrhage and impairs vessel formation. *PLoS One* **5**, e13433 (2010).
34. Gao, L., Chao, L. & Chao, J. A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Exp. Cell Res.* **316**, 376–389 (2010).
35. Yahata, Y. *et al.* A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J. Biol. Chem.* **281**, 13209–13216 (2006).
36. Tokumaru, S. *et al.* Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J. Immunol.* **175**, 4662–4668 (2005).
37. Ohtsu, H. *et al.* ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, e133–e137 (2006).
38. Horiuchi, K. *et al.* Cutting edge: TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J. Immunol.* **179**, 2686–2689 (2007).
39. Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. & Murphy, G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J. Cell. Sci.* **118**, 2371–2380 (2005).
40. Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L. & Pandiella, A. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2031–2044 (2002).
41. Maretzky, T., Zhou, W., Huang, X.-Y. & Blobel, C. P. A transforming Src mutant increases the bioavailability of EGF-ligands via stimulation of the cell surface metalloproteinase ADAM17. *Oncogene* **30**, 611–618 (2011).
42. Ceccarelli, S. *et al.* Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **313**, 1758–1777 (2007).
43. Boukamp, P. & Fusenig, N. E. 'Trans-Differentiation' from epidermal to mesenchymal/myogenic phenotype is associated with a drastic change in cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *J. Cell. Biol.* **120**, 981–993 (1993).
44. Hartmann, D. *et al.* The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615–2624 (2002).
45. Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. & Huang, X. Y. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **102**, 635–646 (2000).
46. Maretzky, T. *et al.* Characterization of the catalytic activity of the membrane-anchored metalloproteinase ADAM15 in cell-based assays. *Biochem. J.* **420**, 105–113 (2009).
47. Schlöndorff, J., Becherer, J. D. & Blobel, C. P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). *Biochem. J.* **347** (Part 1), 131–138 (2000).
48. Weskamp, G. *et al.* ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat. Immunol.* **7**, 1393–1298 (2006).
49. Le Gall, S. *et al.* ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as TGF α , L-Selectin and TNF α . *Mol. Biol. Cell* **20**, 1785–1794 (2009).
50. Peduto, L., Reuter, V. E., Shaffer, D. R., Scher, H. I. & Blobel, C. P. Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. *Cancer Res.* **65**, 9312–9319 (2005).
51. Maretzky, T. *et al.* Src stimulates fibroblast growth factor receptor-2 shedding by an ADAM15 splice variant linked to breast cancer. *Cancer Res.* **69**, 4573–4576 (2009).
52. Zheng, Y., Schlöndorff, J. & Blobel, C. P. Evidence for regulation of the tumor necrosis factor α -convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J. Biol. Chem.* **277**, 42463–42470 (2002).
53. Zheng, Y., Saftig, P., Hartmann, D. & Blobel, C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to TNF α shedding and of the function of the TNF α ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNF α convertase (TACE/ADAM17). *J. Biol. Chem.* **279**, 42898–42906 (2004).
54. Sahin, U. *et al.* In *Epidermal Growth Factor: Methods and Protocols Vol. 327 Methods in Molecular Biology* (eds Patel, T. B. & Bertics, P. J.) 99–113 (Humana Press, 2006).
55. Maretzky, T. *et al.* ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 9182–9187 (2005).
56. Cooper, J. A., Scolnick, E. M., Ozanne, B. & Hunter, T. Epidermal growth factor receptor metabolism and protein kinase activity in human A431 cells infected with Snyder-Theilen feline sarcoma virus or Harvey or Kirsten murine sarcoma virus. *J. Virol.* **48**, 752–764 (1983).
57. Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. & Girolomoni, G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1365–1374 (2008).

Acknowledgments

Experiments on FGFR2b cross talk in keratinocytes were supported by NIH GM64750 to C.P.B. and the work on HUVECs by S.L.S. was supported by NIH EY015719 to C.P.B., T.M. was supported by the Emerald Foundation, and K.R. by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 877, and the Cluster of Excellence 'Inflammation at interfaces'. We also thank Elin Mogollon for excellent technical assistance. This investigation was conducted in part in a facility constructed with support from Research Facilities Improvement Program Grant Number C06-RR12538-01 from the National Center for Research Resources, NIH.

Author contributions

T.M., A.E., W.Z., S.L.S., P.-M.W. and K.R. were involved in performing experiments, S.R. provided primary HUVECs, and T.M., K.R. and C.P.B. provided conceptual input and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Maretzky, T. *et al.* Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat. Commun.* **2**:229 doi: 10.1038/ncomms1232 (2011).