
EINFLUSS VON ÄUßEREN FAKTOREN UND
INSULIN AUF DIE SHEDDING-AKTIVITÄT
DER PROTEASEN ADAM10 UND ADAM17

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

vorgelegt von
Lena Baumecker
Kiel, 2018

Erste Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Karina Reiß

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2018

Zum Druck genehmigt: 12.12.2018

gez. Prof. Dr. Frank Kempken, Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 PROTEOLYSE	1
1.2 DISINTEGRIN-ÄHNLICHE METALLOPROTEASEN	1
1.2.1 STRUKTUR VON ADAM10 UND ADAM17	2
1.2.2 FUNKTION VON ADAM10 UND ADAM17	3
1.2.3 REGULATION VON ADAM10 UND ADAM17	6
1.3 REGULATION VON ADAMs IM PATHOPHYSIOLOGISCHEN KONTEXT	11
1.3.1 ALZHEIMER-KRANKHEIT	11
1.3.2 KREBSERKRANKUNGEN & HEPATOZELLULÄRES KARZINOM	13
1.3.3 TYP-2-DIABETES MELLITUS & INSULIN-SIGNALWEG	15
<u>2 FRAGESTELLUNG</u>	<u>18</u>
<u>3 MATERIAL & METHODEN</u>	<u>19</u>
3.1 VERBRAUCHSMATERIAL	19
3.2 CHEMIKALIEN & REAGENZIEN	20
3.3 GERÄTE	23
3.4 ELISA	24
3.5 ANTIKÖRPER	25
3.5.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER	25
3.5.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	25
3.6 PLASMIDE	26
3.7 SOFTWARE	26
3.8 ZELLINIEN	26
3.9 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	28
3.9.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN	28
3.9.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG	29
3.9.3 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN	29
3.9.4 TRANSIENTE TRANSFEKTION	29
3.9.5 STIMULATION UND INHIBITION VON ZELLEN	30
3.9.6 INDUKTION VON INSULINRESISTENZ IN HEPG2-ZELLEN	31
3.9.7 BEHANDLUNG DER ZELLEN UNTER HYPOXIE	31
3.9.8 SHEDDING-EXPERIMENTE MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE-GEKOPPELTEN SUBSTRATEN	33
	I

3.9.9	ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	34
3.9.10	FLUORESZENZFÄRBUNG	34
3.9.11	MTT-BASIERTE ZELLVIABILITÄTSVERSUCHE	35
3.9.12	ZELLULÄRER ADHÄSIONSTEST	36
3.10	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
3.10.1	PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN	38
3.10.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	38
3.10.3	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	39
3.10.4	PROTEINTRANSFER DURCH <i>WESTERNBLOT</i>	40
3.10.5	IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DER TRANSFERIERTEN PROTEINE	41
3.10.6	STRIPPEN DER PVDF-MEMBRAN	41
3.11	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.11.1	KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	42
3.11.2	TRANSFORMATION VON CHEMISCH-KOMPETENTEN BAKTERIEN	42
3.11.3	DNA-ISOLATION AUS BAKTERIEN	43
3.11.4	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	43
3.12	STATISTIK	44

4 ERGEBNISSE **45**

4.1	EINFLUSS VON ÄUßEREN FAKTOREN AUF DIE REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS	45
4.1.1	GLUTAMAT HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS	45
4.1.2	DIE AKTIVITÄT DER ADAMS WIRD DURCH ALUMINIUM NICHT BEEINFLUSST	49
4.1.3	HOHE GLUCOSEKONZENTRATION FÜHRT ZU GESTEIGERTER PROTEINEXPRESSION DER ADAMS ABER NICHT ZU EINER ERHÖHTEN SHEDDING-AKTIVITÄT	51
4.2	EINFLUSS VON INSULIN AUF DIE REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS	53
4.2.1	INSULIN FÜHRT ZU EINER ERHÖHTEN FREISETZUNG VON ADAM-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN	54
4.2.2	INSULIN AKTIVIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS	56
4.2.3	INSULIN AKTIVIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG	58
4.2.4	INSULINRESISTENZ VERHINDERT DIE STIMULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DURCH INSULIN	60
4.2.5	INSULIN INDUZIERT DIE EXTERNALISIERUNG VON PHOSPHATIDYLSERIN	62
4.2.6	INSULIN-INDUZIERTER PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG IST ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG REGULIERT	64
4.2.7	PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG IST FÜR DIE ADAM-AKTIVIERUNG DURCH INSULIN NOTWENDIG	66
4.2.8	INSULIN-INDUZIERTER Abspaltung von Fraktalkin durch ADAM10 führt zu einer reduzierten Monozyten-Adhäsion	67
4.2.9	REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DURCH INSULIN UNTER HYPOXIE	70

5	<u>DISKUSSION</u>	76
5.1	ÄUßERE FAKTOREN BEEINFLUSSEN NICHT DIE ADAM-AKTIVITÄT	77
5.1.1	GLUTAMAT	77
5.1.2	ALUMINIUM	78
5.1.3	GLUCOSE	79
5.2	INSULIN REGULIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS	81
5.2.1	DER REGULATIONSMECHANISMUS DER INSULIN-VERMITTELTEN ADAM-AKTIVIERUNG	82
5.2.2	FUNKTIONELLE RELEVANZ DER INSULIN-INDUZIERTEN SHEDDING-AKTIVITÄT	86
5.2.3	HYPOXISCHES MIKROMILIEU REGULIERT DIE INSULIN-VERMITTELTE SHEDDING-AKTIVITÄT	88
5.3	AUSBLICK	92
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	94
7	<u>SUMMARY</u>	96
LITERATURVERZEICHNIS		I
PUBLIKATIONEN		XXI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		XXII
TABELLENVERZEICHNIS		XXIV
DANKSAGUNG		XXV
ERKLÄRUNG		XXVI
WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG		XXVII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AKT	Proteinkinasen B
ANO6	Anoctamin6
AP	Alkalische Phosphatase
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
A β	Amyloid β
BACE	<i>β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CANDIS	<i>Conserved ADAM17 dynamic interaction sequence</i>
CRD	Cysteinreiche Domäne
CX3CL1	<i>CX3C-chemokine ligand 1</i> (Fraktalkin)
CX3CR	Fraktalkin-Rezeptor
Da	Dalton
DD	Disintegrindomäne
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	Und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gravitationsbeschleunigung
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
GI	GI254023X – Präferenzieller ADAM10-Inhibitor
GLUT	Glucoserezeptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GW	GW280264X – ADAM10- und -17-Inhibitor
h	<i>Hour</i> - Stunde
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HIF	Hypoxie-induzierbare Faktoren
HR-	Hypoxie-Resonanz-
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
IO	Ionomycin

KO	<i>Knock-out</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	Metalloproteasendomäne
MEK	<i>Mitogen/extracellular signal-regulated kinase</i>
mGlut1	Metabolischer Glutamat-Rezeptor 1
MM	Marimastat
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPD	Membran-proximale Domäne
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p-	Phosphorylierte Form
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD	Prodomäne
PHD	Prolyl-Hydroxylase-Domäne-Enzyme
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i> - Onkoprotein
Ras	<i>Rat sarcoma</i> -Onkoprotein
rpm	<i>round per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell park memorial institute medium</i>
RT	Raumtemperatur
s-	<i>soluble</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SMase	<i>Sphingomyelinase</i>
TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TMD	Transmembran-Domäne
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
üN	über Nacht
VHL	Von Hippel-Lindau-Protein
WM	Wortmannin
WT	Wildtyp
ZD	Zytoplasmatische Domäne

1 EINLEITUNG

1.1 PROTEOLYSE

Der Vorgang der Proteolyse dient der Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase. Die Proteolyse zählt zu den bedeutendsten posttranslationalen Modifikationen, da sie eine irreversible Modifikation darstellt. Dabei schneiden proteolytisch-aktive Proteine, Proteasen oder Sheddasen genannt, andere Proteine und können so deren Aktivität regulieren. Es entstehen bei diesem Vorgang kleinere metabolisch-aktive Proteine. Es ist eine Vielfalt an Proteasen mit einer beeindruckenden Funktionsvielfalt beschrieben.¹ Eine Gruppe von Proteasen mit besonderer Bedeutung für viele physiologische sowie pathophysiologische Prozesse sind die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen.

1.2 DISINTEGRIN-ÄHNLICHE METALLOPROTEASEN

Die Mitglieder der Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen kurz ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) sind transmembrane Typ I-Glykoproteine, welche sich durch eine Disintegrin- und eine Metalloprotease-Domäne auszeichnen. Diese zwei Domänen ermöglichen es den ADAMs Transmembranproteine – ihre Substrate - an der Zelloberfläche zu schneiden. Innerhalb der Gruppe der Zink-abhängigen Metalloproteasen gehören die ADAMs zu den Metzinkinen. Charakteristisch für Vertreter der Metzinkine ist ein konservierter Methionin-Rest und ein Zinkbindungsmotiv mit drei Histidin-Resten (HExxHxxGxxH) im aktiven Zentrum und sie gliedern sich in vier Untergruppen: Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Astacine, Serralysine und Adamalysine, wobei ADAMs den Adamalysinen zugeordnet werden.^{2,3} Mitglieder der ADAM-Familie wurden bereits in einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen wie zB. in *Drosophila melanogaster*, in der Maus und im Mensch, dabei wurden im Menschen bisher 21 ADAM-Gene beschrieben. Darunter sind 13 ADAMs, die als proteolytisch-aktiv gelten (ADAM1, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33).⁴ Die am besten charakterisierten Vertreter der proteolytisch-aktiven Proteasen sind ADAM10 und ADAM17. Die *in vivo*-Funktionen dieser Sheddasen sind auf der einen Seite physiologischer Natur, so sind sie bei Prozessen wie der Signaltransduktion, Zellteilung, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Neurogenese und Angiogenese beteiligt. Auf der anderen Seite wurden die ADAMs auch mit pathophysiologischen Prozessen wie bei der Alzheimer'schen Erkrankung, der Modulation von Entzündungsreaktionen und mit der Entwicklung von Krebserkrankungen assoziiert.^{5,6}

1.2.1 STRUKTUR VON ADAM10 UND ADAM17

Strukturell werden die ADAMs durch verschiedene Domänen definiert, dabei weisen die Proteasen ADAM10 und ADAM17 eine hohe Ähnlichkeit auf. Beide Proteasen zählen zu den 'atypischen' ADAMs: Der N-Terminus beginnt mit einer Prodomäne (PD), gefolgt von der Metalloproteasen (MD)-, Disintegrin (DD)-, Cysteinreiche (CRD)-, der Transmembran (TMD)- sowie der zytoplasmatischen Domäne (ZD; Abbildung 1, 2).⁷ Die Prodomäne von ADAM10 ist als natürlicher Inhibitor der proteolytischen Aktivität beschrieben.⁸ Darauf folgt eine katalytisch-aktive Metalloprotease-Domäne, die die enzymatische Spaltung von Substraten vermittelt. Diese Domäne enthält das Zink-bindende Multi-Histidin-Motiv, welches ADAM10 und -17 von nicht katalytisch-inaktiven ADAMs unterscheidet.⁹ In ADAM17 wird ein Teil der DD-Domäne und die gesamte CRD-Domäne als membranproximale Domäne bezeichnet (MPD; Abbildung 1). Die MPD ist an der Regulation der proteolytischen Aktivität der Protease beteiligt, während das Substraterkennungsmotiv bei ADAM10 in der CRD-Domäne enthalten ist.¹⁰⁻¹² Darauf folgt eine *Stalk*-Domäne bei ADAM10, die kürzlich von unserer Arbeitsgruppe als Interaktionsdomäne mit der Plasmamembran identifiziert wurde (unveröffentlichte Daten). Die homologe Domäne in ADAM17 ist die *Conserved ADAM17 dynamic interaction sequence* (CANDIS).¹³ Für die CANDIS in ADAM17 wurde gezeigt, dass sie mit der Plasmamembran interagiert und an der Substrat-Erkennung beteiligt ist.^{13,14} Die Struktur von ADAM10 und ADAM17 endet am C-Terminus mit einer zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 1, 2).

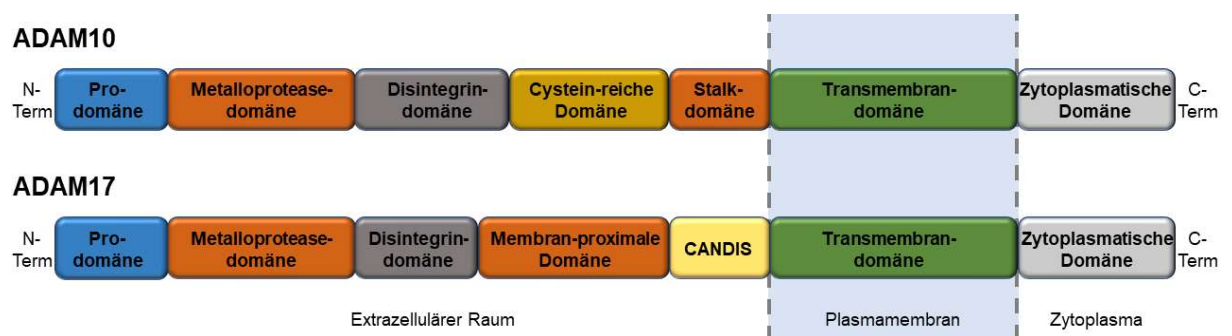


ABBILDUNG 1 - SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMÄNENSTRUKTUR VON ADAM10 UND -17

Die katalytisch-aktiven Mitglieder der ADAM-Familie bestehen aus einer Prodomäne, einer Metalloproteasen-, eine Disintegrin-, einer Cysteinreichen bzw. Membran-proximale-, einer flexible *Stalk* bzw. *conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence* (CANDIS)-, einer Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne. Bei ADAM10 und-17 handelt es sich um transmembrane Typ-I-Glykoproteine, der C-Terminus (C-Term) befindet sich im Zytoplasma während der N-Terminus (N-Term) in den extrazellulären Raum ragt. Die gestrichelten grauen Linien und der hellblaue Bereich stellen die Plasmamembran dar.

1.2.2 FUNKTION VON ADAM10 UND ADAM17

Die Hauptfunktion der ADAMs ist ihre proteolytische Aktivität. Die Auswirkung dieser Funktion definiert sich durch das zu prozessierende Substrat und den Aktivierungsstatus der Protease (Abbildung 2). Die Vielzahl an Substraten ist enorm, für ADAM10 und ADAM17 konnten bereits über 40 bzw. 80 beschrieben werden.¹⁵ Dabei handelt es sich sowohl um transmembrane Typ I- und II-Glykoproteine als auch um Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine, die stets im juxtamembranen Bereich geschnitten werden, wobei die Schnittstelle nicht durch eine übereinstimmende Sequenz definiert ist.¹⁶ Als Substrate wurden unter anderem Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren identifiziert. Darunter sind einige Substrate, die durch verschiedene Proteasen prozessiert werden können und andere, die spezifisch nur von einer Protease gespalten werden. Einige ausgewählte Substrate sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 1 – ADAM Substrate

Substrat	Protease	Funktion/Referenz
APP	ADAM10	Neuroprotektion ¹⁷
Betacellulin	ADAM10	Proliferation, Migration, Differenzierung ¹⁸
CX3CL1 (Fraktalkin)	ADAM10/17	Adhäsion, Chemoattraktant ¹⁹⁻²¹
Klotho	ADAM10/17	Glucosehomöostase, <i>Anti-Aging</i> ²²
L-Selektin (CD62L)	ADAM17	Adhäsion ²³
Notch	ADAM10	Embryonale Entwicklung ²⁴
TGF α	ADAM17	Proliferation, Migration, Differenzierung ²³
TNF α	ADAM17	Inflammation ^{25,26}
TNF α -Rezeptor Typ I	ADAM17	Anti-Inflammation ²⁷

Die hohe Anzahl von Substraten mit unterschiedlichen zellbiologischen Funktionen zeigt, dass ADAM10 und ADAM17 bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen entscheidende Rollen zugeschrieben werden.^{16,28,29}

ADAM17 wurde zunächst als *TNF alpha converting enzyme* (TACE) bekannt, da es die membrangebundene Proform des Zytokins *tumor necrosis factor* (TNF α) spaltet und somit das lösliche und aktive TNF α freisetzt,²⁵ das systemisch als proinflammatorisches Molekül wirkt und u.a. dazu führt, dass Immunzellen zum Entzündungsherd migrieren.

Weiterhin ist ADAM17 für die proteolytische Spaltung verschiedener Rezeptoren wie z.B. der TNF-Rezeptoren (TNFR) 1 und 2 verantwortlich. Die Regulation des TNFR an der Zelloberfläche kann zu unterschiedlichen Effekten führen: Auf der einen Seite führt die Abspaltung der Ektodomäne unter anderem zu einer Desensibilisierung der Zellen gegenüber TNF α . Auf der anderen Seite kommt es damit zu einer Abschwächung der Immunantwort.^{23,30,31}

Eine essentielle Rolle spielt ADAM17 auch bei der vom *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-vermittelten Signaltransduktion. Die Aktivierung des EGFRs hat eine Phosphorylierung der *mitogen activated protein* (MAP)-Kinasen *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) zur Folge, was wiederum zu Zellproliferation, Zellwachstum oder Differenzierung führt (siehe auch Abbildung 7).³² Die Liganden des EGF-Rezeptors sind als inaktive Vorläuferproteine in der Membran verankert. Nachdem diese durch ADAM10 oder -17 geschnitten und damit freigesetzt wurden, kommt es zur Aktivierung des EGF-Rezeptors.^{33,34}

In ADAM17-defizienten Mauslinien wird die Bedeutung von ADAM17 als hauptsächliche Sheddase von EGFR-Liganden offensichtlich: Die Mäuse weisen eine gestörte Entwicklung u.a. des Darms, der Augen oder des Herzens auf,²³ die vergleichbar mit dem Phänotyp der EGFR-defizienten Maus sind.^{35,36} Diese gravierenden Defekte sind letal und führen in der ADAM17-defizienten Maus zum Tod zwischen Embryonaltag E17,5 und der Geburt. Interessanterweise führt eine homozygote Deletion im ADAM17-Gen im Menschen, anders als bei Mäusen, nicht zu Letalität, aber zu schweren Haut- und Darmkrankheiten.³⁷

ADAM10 spielt eine essentielle Rolle während der frühen Embryogenese indem es den Notch-Signalweg kontrolliert.³⁸ Der Phänotyp von ADAM10-defizienten Mäusen ähnelt daher dem von Notch-defizienten.^{39,40} ADAM10-defiziente Mäuse sterben bereits am Embryonaltag E9,5 und weisen eine gestörte Entwicklung des Herzens und des Zentralnervensystems auf.⁴¹

Neben Notch spaltet ADAM10 auch das neurologisch-bedeutende *amyloid precursor protein* (APP), das in der Alzheimer-Krankheit eine essenzielle Rolle spielt (siehe Alzheimer-Krankheit).

Zudem ist ADAM10 als primäre Protease für Adhäsionsmoleküle beschrieben.⁴²⁻⁴⁴ Dabei kann die Aktivität von ADAM10 Zell-Zell-Kontakte und die Interaktion mit Immunzellen

regulieren. Das Shedding von dem Adhäsionsmolekül VE-Cadherin beispielsweise erhöht die Permeabilität von endothelialen Zellen und die Migration von T-Zellen.⁴² Außerdem ist Leukozyten (L)-Selektin, das auf Leukozyten exprimiert wird und von ADAM10 reguliert wird für das sogenannte *rolling*, der Initiierung der Zell-Zell-Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen, verantwortlich.⁴⁵

Ein weiteres Substrat, dem u.a. eine essenzielle Rolle in der Interaktion mit dem Immunsystem zukommt und in dieser Arbeit untersucht wurde, ist das transmembrane Chemokin CX3CL1 (Fraktalkin). In seiner Membran-gebundenen Form vermittelt es Zelladhäsion und ist auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Unter inflammatorischen Bedingungen ist Fraktalkin auf der Zelloberfläche hochreguliert.^{46,47} Der entsprechende Fraktalkin-Rezeptor (CX3CR1) ist u.a. auf Immunzellen wie Monozyten, natürlichen Killerzellen oder T-Lymphozyten exprimiert. Die Fraktalkin-Rezeptor-Interaktion übernimmt zusammen mit anderen Molekülen eine wichtige Funktion bei der Erkennung und Interaktion der Immunzellen an der Endothelwand. Die proteolytische Spaltung dieses Moleküls beeinflusst also die Immunzellrekrutierung bei inflammatorischen Prozessen. Sowohl ADAM10 als auch ADAM17 wurde die Fähigkeit zugeschrieben, Fraktalkin zu prozessieren.^{19,48} Die Interaktion mit dem Immunsystem ist allerdings nur eine der beschriebenen Funktionen von Fraktalkin, denn auch in Krebserkrankungen spielt es eine Rolle. Eine erhöhte Fraktalkin-Expression wurde mit einer verschlechterten Brustkrebs-Diagnose assoziiert.⁴⁹ Weiterhin ist der Fraktalkin-Rezeptor auch in Krebszellen exprimiert und positiv mit der Krebszellenüberlebensrate korreliert worden. Letzteres kann zur Folge haben, dass nicht nur Immunzellen zum Ort der Entzündung rekrutiert werden, sondern auch Tumorzellen.⁴⁶ Weiterhin fungiert das geschnittene und freigesetzte Fraktalkin als Chemoattraktant und kann, durch den Aufbau eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten, Immunzellen aber auch potenziell Tumorzellen heranziehen.^{50,51} Insgesamt zeigt Fraktalkin eine ambivalente Rolle mit anti-entzündlichen aber auch cancerogenen Funktionen. Am Beispiel von Fraktalkin und im Hinblick auf die große Vielfalt an Substraten wird deutlich, dass der proteolytische Prozess durch die ADAM-Proteasen einer genauen Regulation bedarf.

1.2.3 REGULATION VON ADAM10 UND ADAM17

Die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 können auf vielfältige Art reguliert werden: Angefangen bei der Transkription über die Maturierung und den Transport der Proteasen an die Zelloberfläche bis hin zu physiologischen und unphysiologischen Aktivatoren bzw. Inhibitoren.

ADAM10 und -17 werden als Proform, mit einer Prodomäne, exprimiert. Für ADAM10 wurde gezeigt, dass die Prodomäne als rekombinantes Protein an die katalytische Domäne binden und ADAM10-vermitteltes Shedding inhibieren kann.⁸ Auch die Prodomäne von ADAM17 wird als potenzieller Inhibitor angesehen, obwohl sie im Vergleich eine sehr viel geringere Affinität zur katalytisch-aktiven Domäne von ADAM17 aufweist^{52,53} (Abbildung 2). Die Prodomänen der ADAMs werden jeweils während des Transfers durch den Golgi-Apparat von Pro-Proteinkonvertasen geschnitten.^{7,54,55} Die Abspaltung der inhibitorischen Prodomäne, bei der die mature ADAM-Form entsteht, ist allerdings nicht ausreichend für die Aktivierung von ADAM10 und -17.^{56,57} Der Transport der ADAMs durch die verschiedenen Zellkompartimente und schließlich an die Zellmembran wird durch unterschiedliche Adaptorproteine unterstützt. Den Transport von ADAM17 begleiten sogenannte iRhoms, für die unter anderem gezeigt wurde, dass sie intrazelluläre Signale an ADAM17 weiterleiten können.^{58,59} Bei ADAM10 sind Tetraspanine mit der Protease assoziiert, die bei der Reifung und dem Transport an die Zelloberfläche eine Rolle spielen.^{60,61}

Sobald die Protease an der Zelloberfläche lokalisiert ist, kann sie ihre Substrate schneiden. Grundsätzlich wird zwischen konstitutivem und induzierbarem Shedding unterschieden. Die induzierbare Freisetzung kann durch unphysiologische und physiologische Stimuli ausgelöst werden. Physiologische Faktoren u.a. Wachstumsfaktoren, Zytokine, eine Reihe von äußeren Faktoren wie Substanzen aus der Nahrung oder ein hypoxisches Mikromilieu (siehe Einfluss von äußeren Faktoren auf die Regulation) sind beschrieben, die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 beeinflussen zu können. Unphysiologische Faktoren wie der Phorbolester PMA oder der Kalzium-Ionophor Ionomycin werden regelmäßig zur Aktivierung von ADAM-Proteasen verwendet.⁶² Dabei ist der Mechanismus dieser Stimulantien, der letztendlich die Proteasen regulieren, relativ divers und noch nicht vollständig geklärt. Ionomycin-Behandlung führt z.B. zu einem Ca^{2+} - Einstrom ins Zytoplasma, der zur Aktivierung der ADAMs führt. Dieser Vorgang ist allerdings wenig spezifisch und führen so zu einer Stimulation vieler ADAM-Proteasen.

Obwohl es wahrscheinlich erschien, dass der Aktivierungsmechanismus der ADAMs über die zytoplasmatische Domäne der ADAMs vermittelt wird, haben neueste Erkenntnisse dies widerlegt: Zum einen ist die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 und -17 nicht für die Aktivierung erforderlich.^{57,63} Zum anderen hat unsere Arbeitsgruppe für ADAM10 und -17 die Zellmembran als entscheidendes Regulationselement identifizieren können. Hier konnten wir zeigen, dass die Externalisierung von Phosphatidylserin an die äußere Zellmembran eine Interaktion mit den jeweiligen ADAM-Proteasen zur Folge hat, die den letztendlichen Shedding-Vorgang initiiert. Bisher konnte dieser Vorgang mit unterschiedlichen unphysiologischen Stimuli wie PMA oder Ionomycin beobachtet werden¹² (unveröffentlichte Daten; Abbildung 2). Bei der Stimulation mit Ionomycin konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Einstrom zu der Aktivierung von der Ca^{2+} -abhängigen Scramblase Anoctamin-6 (ANO6) führt.⁶⁴ ANO6 scambelt Phospholipide bidirektional und unspezifisch. Aufgrund der asymmetrischen Verteilung von Phosphatidylserin führt die Aktivierung von ANO6 zur Anreicherung von Phosphatidylserin in der äußeren Zellmembran und ist so für eine Interaktion mit den ADAM-Proteasen verfügbar.^{65,66}

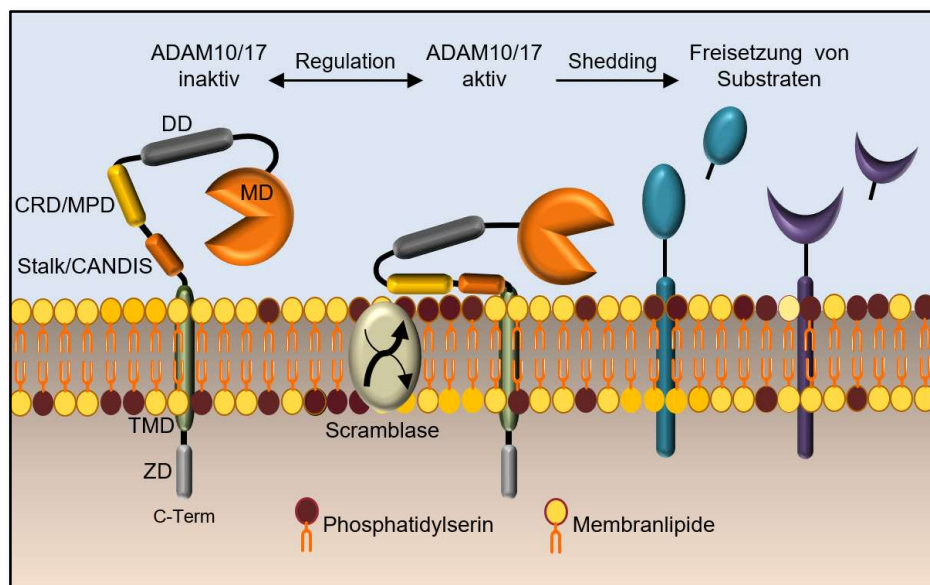


ABBILDUNG 2 – REGULATION VON ADAM10 UND -17 UND EKTODOMÄNEN-SHEDDING

ADAM10 und -17 an der Zellmembran bestehen aus einer Metalloprotease (MD)-, einer Disintegrin (DD)-, einer Cystein-reichen (CRD)- bzw. Membran-proximalen (MPD)-, einer *Stalk*- bzw. *conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence* (CANDIS)-, einer Transmembran (TMD)- und einer zytoplasmatischen Domäne (ZD). ADAM10 und -17 werden durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert bzw. inhibiert (Regulation). Bei der Aktivierung wird Phosphatidylserin (rote Lipidköpchen) mittels einer Scramblase an die äußere Zellmembran transloziert, dort interagiert die positiv-geladene Aminosäuren der MPD von ADAM17 bzw. *Stalk*-Domäne von ADAM10 mit dem negativ-geladenen Phosphatidylserin und es kommt zu einer konformellen Änderung der Proteasen, sodass der Shedding-Vorgang stattfinden kann. Dabei wird die Ektodomäne der Substrate in den extrazellulären Raum freigesetzt und das Fragment verbleibt in der Plasmamembran.

1.2.3.1 EINFLUSS VON ÄUßEREN FAKTOREN AUF DIE REGULATION

Es wurden bereits eine Vielzahl von äußeren Faktoren identifiziert, die einen Einfluss auf die ADAM-Aktivität aufweisen: Angefangen bei Faktoren aus Nahrung über Substanzen, die während einer Entzündung oder Krankheit freigesetzt werden bis hin zu dem Zell-Mikromilieu. Im Folgenden sind einige Beispiele aufgeführt.

Retinsäure, das Stoffwechselprodukt von Vitamin A (Retinol), das nicht körpereigen hergestellt werden kann, bindet als Transkriptionsfaktor an den ADAM10-Promotor. *In vitro* wurde eine gesteigerte ADAM10-mRNA-Expression beobachtet, die mit einer erhöhten APP-Prozessierung einhergeht. Daher wird Retinsäure eine potenzielle neuroprotektive Funktion im Hinblick auf die Alzheimer-Krankheit zugeschrieben.⁶⁷⁻⁶⁹

Ungesättigte Fettsäuren wurden als Stimulatoren der Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 beschrieben. Es wurde gezeigt, dass dies auf eine Erhöhung der Membranfluidität und damit eine bessere Substratverfügbarkeit zurückzuführen ist.⁷⁰ Dabei wurde gezeigt, dass eine Fischöl-reiche Ernährung zu vermehrter ADAM10- und -17-Aktivität führt und mit anti-atherosklerotischer Wirkung assoziiert ist.⁷¹

Zusätzlich zu Faktoren aus der Nahrung wurden auch Substanzen als Regulatoren identifiziert, die als Folge von Erkrankungen verstärkt auftreten. Ein Beispiel dafür ist die extrazelluläre *Sphingomyelinase* (SMase), die während Herz-Kreislaufkrankungen erhöhte Plasma- und Gewebslevel aufweist. Hier konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass SMase die ADAM17-Aktivität induziert und dadurch vermehrt TNF-Rezeptor 1 freigesetzt wird, wodurch es zu einer verminderten Sensibilität gegenüber TNF α kommt. Folglich wird die Schutzfunktion der Zellen gesteigert und SMase könnte eine protektive Rolle bei Herz-Kreislaufkrankungen haben.⁷²

Weiterhin kann das Mikromilieu die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 beeinflussen. In diesem Zusammenhang wird u.a. die Sauerstoffverfügbarkeit als regulierender Faktor kontrovers diskutiert: Die Untersuchungen zu dem Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit auf die Regulation der Proteasen ADAM10 und -17 liefern unterschiedliche Ergebnisse. Sauerstoff ist essentiell für das Überleben und dient als terminaler Elektronenakzeptor bei der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien wobei ATP entsteht. Eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit unterhalb einer kritischen Grenze wird allgemein als Hypoxie bezeichnet. Es gibt keine definierte Sauerstoffkonzentration, die einen hypoxischen Zustand beschreibt, denn der

physiologische Sauerstoffbedarf variiert von Gewebe zu Gewebe zwischen 1-11 %.⁷³ Die Sauerstoffverfügbarkeit in einem gesunden Kolorektal Trakt beträgt beispielsweise unter 1,5 % O₂,^{74,75} während in der Leber 4–8 % O₂ verfügbar ist.^{76,77} Daher wird von Hypoxie gesprochen, wenn die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) im Speziellen HIF-1 α in Zellen oder Geweben nachgewiesen werden können. HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert. Die β -Untereinheit wird im Zellkern exprimiert, während die α -Untereinheit im Zytoplasma unter Normoxie kontinuierlich abgebaut wird. Dabei wird die α -Untereinheit von sauerstoffabhängigen Prolyl-Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert.⁷⁸ Daraufhin bindet das von Hippel-Lindau-Protein und es kommt zur Ubiquitinierung und folglich zum proteolytischen Abbau. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung von HIF-1 verhindert, HIF-1 α stabilisiert und transloziert in den Zellkern, wo eine Dimerisierung mit der β -Untereinheit stattfindet. Das aktive HIF-1-Heterodimer bindet an Promotorregionen von Hypoxie-Resonanz (HR)-Genen. Bislang wurden mehr als 100 Gene beschrieben, die von HIFs induziert werden.⁷⁹ Um hypoxische Bedingungen *in vitro* zu simulieren können die sauerstoffabhängigen PHD inhibiert werden. Ein gängiger Inhibitor ist Cobaltchlorid (CoCl₂; Abbildung 3).⁸⁰ Durch die Inhibition der Hydroxylasen wird HIF-1 α stabilisiert und die HR-Gene werden exprimiert.

Interessanterweise tritt eine besonders niedrige Sauerstoffverfügbarkeit *in vivo* vor allem in Organen und Geweben von Typ-2-Diabetes mellitus-Patienten, Tumoren und Entzündungen auf.^{76,81–83} Diese wird durch ein gestörtes Gefäßnetzwerk, eine verringerte Blutversorgung oder eine unzureichende Neovaskularisation verursacht.⁸⁴ Da in diesen pathologischen Zusammenhängen auch eine Beteiligung der ADAMs beschrieben wurde, ist die Untersuchung der ADAM-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen besonders interessant.

Mehrere Studien legen nahe, dass ADAM17 von HIF-1 reguliert wird. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von ADAM17 in synovialen Zellen hochreguliert ist, dies korreliert mit einer erhöhten TNF α -Freisetzung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HIF-1 direkt an die Promotorregion von ADAM17 bindet.⁸⁵ Andere Studien unterstreichen, dass die Expression von ADAM17 durch Hypoxie induziert werden kann: Eine erhöhte Expression von ADAM17 in Tumoren wurde schon häufig beschrieben (siehe Krebserkrankungen & Hepatozelluläres Karzinom). In diesem Zusammenhang konnte eine Korrelation zwischen dem Grad der Hypoxie und der ADAM17-Expression hergestellt werden. Dabei führte eine moderate

Hypoxie (1 % O₂) zu einer leichten Erhöhung der ADAM17-Expression, unter 0,1 % O₂ führte zu einer sehr viel stärkeren Induktion der Expression von ADAM17.⁸⁶

Es gibt jedoch auch Studien, die eine andere Regulation der ADAMs unter Hypoxie postulieren. In der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SHSY-5Y führt eine chronische verringerte Sauerstoffverfügbarkeit (2,5 % O₂) zu einer verminderten Proteinexpression von ADAM10 und ADAM17, wohingegen die Expression der Beta-Sekretase BACE1 unverändert blieb. Dies korrelierte mit einer geringeren ADAM10-Aktivität. Auf die mRNA-Expression beider Metalloproteasen und BACE hatte die Hypoxie jedoch keinen Einfluss.⁸⁷ Weiterhin konnte im Hippocampus und im Neokortex von Ratten eine herunterregulierte mRNA-Expression von ADAM17 durch Hypoxie beobachtet werden. In anderen Hirnarealen konnte hingegen keine veränderte Expression festgestellt werden.⁸⁸

Diese Studien zeigen, dass sowohl der Grad, die Dauer als auch die Zell- bzw. Gewebeart, in der die Hypoxie auftritt, einen Einfluss auf die Regulation von ADAM10 und -17 haben.

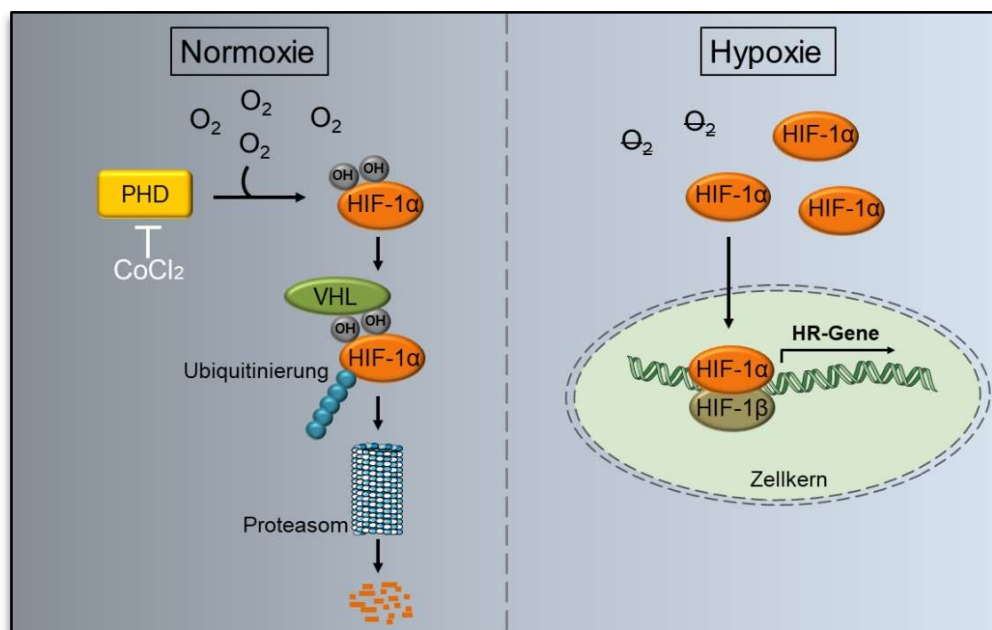


ABBILDUNG 3 – REGULATION VON HIF-1 DURCH SAUERSTOFFVERFÜGBARKEIT

Bei einer hohen Sauerstoffverfügbarkeit von z.B. 21 % O₂ (Normoxie) wird die α-Untereinheit des Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) 1 an zwei spezifischen Prolyl-Resten von den sauerstoffabhängigen Prolyl-Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Diese Hydroxylierung führt dazu, dass HIF-1α von dem von Hippel-Lindau-Protein (VHL) gebunden, ubiquitiniert und folglich proteolytisch abgebaut wird. Bei reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie) sind die PHD gehemmt und die α-Untereinheit von HIF-1 akkumuliert und wird in den Zellkern transportiert. Dort findet die Bindung mit der β-Untereinheit statt, das entstandene Heterodimer von HIF-1 reguliert als Transkriptionsfaktor Hypoxie-Resonanz (HR)-Gene. Durch den Einsatz von Cobaltchlorid (CoCl₂) werden die PHD inhibiert und hypoxische Bedingungen auch unter hoher Sauerstoffverfügbarkeit simuliert.

1.3 REGULATION VON ADAMS IM PATHOPHYSIOLOGISCHEN KONTEXT

Im Folgenden werden beispielhaft drei Erkrankungen vorgestellt, in denen die Regulation der ADAMs sehr wahrscheinlich entscheidend an den Symptomen und dem Krankheitsverlauf beteiligt ist.

1.3.1 ALZHEIMER-KRANKHEIT

Die Alzheimer-Krankheit ist eine fortschreitende, neurodegenerative Krankheit, die große Teile der Großhirnrinde und des Hippocampus betrifft und damit die am häufigsten vorkommende Form von Demenz verursacht. Die Prävalenz in der Bevölkerung von über 65 Jahren liegt bei 10-30 %. Dabei handelt es sich zumeist um die sporadische Form, bei der eine der Hauptcharakteristika die erhöhte Präsenz von A β (*β -amyloid*)-Fragmenten ist, die durch den Abbau von APP mittels BACE1 (*β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme*) entsteht. A β -Peptide lagern sich zu extrazellulären Alzheimer-typischen Plaques zusammen, die neurotoxische Effekte aufweisen.^{89,90} Die konkurrierende APP-Prozessierung mittels ADAM10 hingegen führt zu neuroprotektiven, nicht-amyloiden Abbauprodukt (APP α)⁹¹⁻⁹⁴ und damit spielt vor allem ADAM10 eine entscheidende Rolle bei der Reduktion der Bildung von A β -Peptiden.^{95,96} Damit ist die Regulation bzw. die Aktivierung von ADAM10 ein vielversprechender Therapieansatz^{97,98} und jüngste Studien konnten durch Inhibition von ADAM10 Linderung der pathologischen Symptome der Alzheimer-Krankheit nachweisen.^{97,99} Diese und viele weitere therapeutische Ansätze führen allerdings noch nicht zu einer signifikanten Verbesserung des Gesundheitszustandes von Alzheimer-Patienten.¹⁰⁰ Aus diesem Grund werden Faktoren untersucht, die schon während der Entstehung der Krankheit eine Rolle spielen könnten. Darunter wurden, neben genetischen Prädispositionen und dem Alter, auch eine Reihe von äußeren Faktoren identifiziert.¹⁰¹ Ein Faktor, der mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit assoziiert wird, kann unter dem Begriff „Lebensweise“ zusammengefasst werden: Eine Kombination aus hochkalorischer Nahrung, zu wenig physische Aktivität und dadurch resultierende Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas oder Typ-2-Diabetes mellitus (siehe Typ-2-Diabetes mellitus & Insulin-Signalweg) werden mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht.¹⁰² Ein konkreter Nahrungsbestandteil, der im Zusammenhang mit der Entstehung von Alzheimer diskutiert wird ist Glutamat.^{103,104} Glutaminsäure bzw. ihre Salze, die Glutamate, kommen natürlicherweise in Nahrungsmitteln vor, werden aber auch exzessiv als Geschmacksverstärker zugesetzt.¹⁰⁵ Körpereigenes Glutamat und das durch die Nahrung aufgenommene Glutamat werden

gleichermaßen vom Körper aufgenommen und verstoffwechselt. Die Aminosäure spielt als Neurotransmitter im Gehirn eine wichtige Rolle und ist dort an z. B. der Gewichtsregulierung oder der Gedächtnisbildung beteiligt.¹⁰⁶ Obwohl bei einer Glutamat-reichen Ernährung bisher keine erhöhte Glutamat-Konzentration im Gehirn festgestellt werden konnte,^{107,108} ist die Fähigkeit von Glutamat die Blut-Hirn-Schranke zu passieren umstritten. Besonders bei Patienten mit Vorbelastungen wie fortgeschrittenem Alter, einem Schlaganfall oder beginnender Alzheimer-Krankheit wird davon ausgegangen, dass sich die Charakteristika der Blut-Hirn-Schranke verändern und Glutamat in das Gehirn eindringen kann.^{109,110} Der Glutamat-Signalweg wurde schon häufig mit den pathologischen Vorgängen der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht.¹¹¹⁻¹¹³

Es wurde weiterhin gezeigt, dass Glutamat diverse Einflüsse auf die Regulation von ADAM10 und -17 hat. So wurde festgestellt, dass durch eine Kurzzeitstimulation Glutamat-Rezeptoren die Freisetzung von APP α -Fragmenten erhöht und die Bildung von A β -Peptiden reduziert wird. Diese Effekte basieren vermutlich auf einem erhöhten Transport und einer gesteigerten Shedding-Aktivität von ADAM10 an der Zelloberfläche.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Wenn der Glutamat-Rezeptor allerdings über längere Zeit (> 24 h) stimuliert wird, kommt es zu einer Inhibition der α -Sekretasen¹¹⁷ und einer Erhöhung der amyloidogenen Prozessierung von APP zu A β -Peptiden.¹¹⁸⁻¹²¹ Es lässt sich also kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Glutamat-Signalweg und der Regulation der ADAM-Sheddasen im Hinblick auf die Alzheimer-Krankheit zu erkennen und weitere Studien werden benötigt.

Ein weiterer Umweltfaktor, der seit längerer Zeit mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht und kontrovers diskutiert wird, ist Aluminium.¹²² Aluminiumverbindungen sind natürlicherweise in vielen Nahrungsmitteln enthalten. Sie werden allerdings auch in Antitranspirantien, als Adjuvans in Impfstoffen und bei der Hyposensibilisierung eingesetzt.¹²³ Inwiefern Aluminium aus der Umwelt vom Körper aufgenommen wird, ist sehr variabel: Über die Haut wird nur 0,01 - 0,06 % Aluminium aufgenommen.^{124,125} Die Absorption über den Magen-Darm-Trakt ist stark von unterschiedlichen Faktoren abhängig wie z.B. pH-Wert, Alter und Gesundheitszustand der Person.¹²⁶ Weiterhin kann Aluminium die Blut-Hirn-Schranke passieren und so in das Gehirn gelangen.¹²⁷ Aluminium hat die Eigenschaft Proteine zu komplexieren und wurde interessanterweise in einer erhöhten Konzentration in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden.¹²⁸ Weiterhin wurde gezeigt, dass Aluminium neurotoxische Effekte

aufweist^{129,130} und häufig mit A β -Peptiden komplexiert vorliegt.¹³¹ In Tierversuchen wurde die Entstehung von Alzheimer-Pathologien nach intraventrikulärer Administration von Aluminiumverbindungen beobachtet.^{132,133} Wang *et al.* zeigten 2014 zudem, dass die Applikation von Aluminium-Maltol zu einer Erhöhung von A β -Peptiden im Gehirn von Ratten führt. Die gesteigerte Präsenz von A β -Peptiden ging mit einer erhöhten BACE1-Proteinexpression und einer reduzierten Expression der α -Sekretasen (ADAM10, -17, -9) einher.¹³² Die Aktivität der einzelnen Sekretasen wurde in dieser Studie allerdings nicht untersucht. Da die Proteinexpression der Proteasen nicht zwangsläufig mit der Shedding-Aktivität korreliert, bleibt die Frage, ob Aluminium die Aktivität der ADAMs beeinflusst und damit potenziell zu der Alzheimer-Krankheit beiträgt, bisher unbeantwortet.

1.3.2 KREBSERKRANKUNGEN & HEPATOZELLULÄRES KARZINOM

Neben der Alzheimer-Krankheit sind vor allem Krebserkrankungen beschrieben, in denen ADAMs eine wichtige Rolle spielen könnten. Dabei ist bekannt, dass ADAM17 bei einer Reihe von Tumoren wie Brust-, Eierstock-, Nieren-, Darm-, Prostata-, Kolorektal- und Leberkrebs überexprimiert ist und korreliert mit einer schlechten Prognose.¹³⁴⁻¹³⁷ ADAM17 trägt durch die Freisetzung spezifischer Substrate wie der Wachstumsfaktoren HB-EGF oder TGF α über den EGFR-Signalweg zu der Tumorprogression bei.^{138,139} Interessanterweise zeigen Studien, dass die Hemmung der ADAM17-vermittelten Freisetzung von TGF α die Größe von Tumoren in Mäusen verringert.¹⁴⁰ Damit ist ADAM17 ein vielversprechendes Zielmolekül für therapeutische Ansätze und es wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung von Brustkrebszelllinien mit anti-ADAM17-Antikörpern zu einem Rückgang der Zellproliferation führt.¹⁴¹ Außerdem spaltet ADAM17 auch wichtige pro-inflammatorische Moleküle wie TNF α oder TNF-Rezeptor, die entzündliche Prozesse modulieren können, die meist mit Krebserkrankungen einhergehen.¹⁴²

Eine Überexpression von ADAM10 ist auch in einer Vielzahl von Tumorarten zu beobachten, darunter sind orale Plattenepithel-, Magen- und Leberkarzinome.^{143,144} Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von ADAM10 durch einen anti-ADAM10-Antikörper zu einer Reduktion des Tumorwachstums führt.^{145,146} Dabei wird dem ADAM10-Substrat Notch eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung zugeschrieben. In Krebsstammzellen wurde eine erhöhte Expression von ADAM10 im Zusammenhang mit einem verstärkten

Rolle für die Entstehung von HCC zu spielen (siehe Typ-2-Diabetes mellitus & Insulin-Signalweg).

Es wurde gezeigt, dass in HCC sowohl ADAM10 als auch -17 überexprimiert sind. Außerdem konnte die Relevanz der ADAMs durch entsprechende Inhibitionsversuche verdeutlicht werden. So wurde z. B. gezeigt, dass die Inhibition von ADAM17 zu verringerter Tumorentstehung und -invasion sowie Angiogenese führt.¹⁶⁶ Im Jahr 2013 veröffentlichten Yuan *et al.* eine Studie, die zeigte, dass durch Inhibition von ADAM10, die Proliferation, Invasion und Migration von der HCC-Zelllinie HepG2 eindeutig reduziert wurde.¹⁶⁷ Diese Studien legen nahe, dass ADAM10 und -17 potenziell eine wichtige Rolle bei der Regulation der Entwicklung von HCC spielen. Dennoch wurde der Regulierungsmechanismus der ADAM-Aktivität in HCC, und durch welche Faktoren er beeinflusst ist, noch nicht näher untersucht.

1.3.3 TYP-2-DIABETES MELLITUS & INSULIN-SIGNALWEG

Typ-2-Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist einer der häufigsten Krankheiten in der westlichen Welt. Die Krankheitsentstehung ist mit einer Reihe von äußeren Faktoren assoziiert wie der Ernährung oder physische Aktivität. T2DM wiederum ist als Risikofaktor für viele Krankheiten beschrieben wie koronare Herzerkrankungen, die Alzheimer-Krankheit oder Krebserkrankungen.^{168,169} Eine mögliche Ursache dieser Folgeerkrankungen ist ein erhöhter Blutzuckerspiegel, die sogenannte Hyperglykämie, die als Symptom von T2DM auftritt.¹⁷⁰ Hyperglykämie gilt als Hauptursache für Gewebsschäden in T2DM-Patienten und wurde als Ursache für koronare Herzkreislauferkrankungen und Krebserkrankungen bereits beschrieben.^{171,172} Als kompensatorische Reaktion auf die Hyperglykämie und die Insulinresistenz wird Insulin übermäßig in den β -Zellen des Pankreas produziert (Hyperinsulinämie), dies wird auch als mögliche Ursache für Folgeerkrankungen diskutiert. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Krebserkrankungen: Tumorzellen weisen eine erhöhte Expression von Insulinrezeptoren auf, wobei diese Zellen auch bei T2DM-Patienten keine Insulinresistenz entwickeln.¹⁷³ Die Dysregulation von Insulin führt zu hochregulierten Insulinsignalwegen in Krebszellen. Dies resultiert u.a. in verstärkter Glucoseaufnahme und erhöhtem Zellwachstum, Proliferation und Migration von Tumorzellen und ist mit einer verschlechterten Patientenüberlebensrate assoziiert.^{174,175} Neuste Erkenntnisse einer Zwillingsstudie zeigen, dass T2DM vor allem ein Risikofaktor für die Entwicklung von Rachen- Dünndarm- und Leberkarzinomen darstellt.¹⁷⁶

Die Frage, inwiefern eine erhöhte Glucosekonzentration oder Insulinkonzentration die Aktivität von ADAM10 und -17 im Kontext von T2DM beeinflusst, wurde schon einige Male adressiert: Im Generellen wurde gezeigt, dass ADAM17 eine essenzielle Rolle bei der Insulinresistenz von T2DM spielt, da durch Behandlung mit dem ADAM17-Inhibitor, die Insulinsensitivität im Mausmodell wiederhergestellt werden konnte.^{177,178} Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die renale ADAM17-Expression im diabetischen Mausmodell hochreguliert ist und ADAM17-vermittelte TNF α -Freisetzung durch Glucose in glatten Muskelzellen der Ratte aktiviert wird.^{179,180} Interessanterweise demonstrierten Li *et al.*, dass hohe Glucosekonzentrationen (30 mM) zu einer erhöhten Gen- sowie Proteinexpression von ADAM17 führen, die über den PI3K/AKT-Signalweg und die Aktivierung von HIF1- α reguliert sind.¹⁸¹

Über den Einfluss von einer hohen Glucosekonzentration auf die Aktivität von ADAM10 ist noch nicht viel bekannt. Bei der diabetischen Retinopathie wird die Akkumulation von A β -Peptiden in der Retina als mögliche Ursache diskutiert, die durch Verabreichung von Glucose gesteigert werden kann.^{182,183} Auf der anderen Seite konnte auch gezeigt werden, dass die Betacellulin-Freisetzung und die ADAM10-Expression in der Retina von Diabetes-Patienten erhöht ist.¹⁸⁴ Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine erhöhte Glucosekonzentration bei T2DM sowohl die Aktivität von BACE1 als auch von ADAM10 beeinflussen könnte.

Der Einfluss von einer Hyperinsulinämie auf die Regulation von ADAM10 und -17 wurde 2007 zum ersten Mal von Chen *et al.* beschrieben. Sie demonstrierten, dass eine erhöhte Insulinkonzentration (1 μ M) zu einer gesteigerten ADAM-vermittelten Klotho-Freisetzung führt.¹⁸⁵ Klotho wird von ADAM10 und -17 prozessiert und gilt als Regulator der Glucosehomöostase indem es u.a. den Insulinsignalweg blockiert mittels Inhibition der Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats (IRS) und dadurch die nachfolgende Aktivierung von PI3K und AKT verhindert (siehe auch Abbildung 4).¹⁸⁶

Zusammengefasst deutet die existierende Literatur daraufhin, dass die Regulation der Aktivität von ADAM10 und -17 eine wichtige Rolle in dem Insulinsignalweg bzw. bei der Glucosehomöostase im Kontext von T2DM spielen könnte.

Der Insulin-Signalweg ist komplex und umfasst eine Reihe von intrazellulären Signalmolekülen. Dieser findet vor allem in Adipozyten, glatten Muskelzellen und Hepatozyten statt, da diese Zellen die größte Anzahl an Insulinrezeptoren exprimieren.¹⁸⁷ Nach der Aktivierung, Dimerisierung und Autophosphorylierung des Insulinrezeptors

werden zwei Hauptsignalwege initiiert: Zum einen wird der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert, der zu Translokation von Glucose-Transportern an die Zelloberfläche führt und damit die Glucosehomöostase reguliert. Weiterhin ist dieser Signalweg in Glykogen- und Proteinsynthese involviert. Zum anderen wird der Ras/MAPK-Signalweg aktiviert, der zu Zellwachstum, Proliferation und Inflammation führt. Im physiologischen Kontext bei einer abgestimmten Glucose- und Insulinregulation gleichen sich diese beiden Signalwege gegenseitig aus.¹⁸⁸ Sobald es jedoch zu einer Dysregulation wie z.B. durch Hyperglykämie, daraus resultierende Insulinresistenz und Hyperinsulinämie kommt, nimmt der PI3K/AKT-Signalweg ab und der Ras/MAPK-Signalweg gewinnt die Überhand. Diese Verschiebung führt zu gesteigertem Zellwachstum, Proliferation und Inflammation und trägt auf lange Sicht zu schweren Folgeerkrankungen von T2DM-Patienten bei.¹⁸⁹

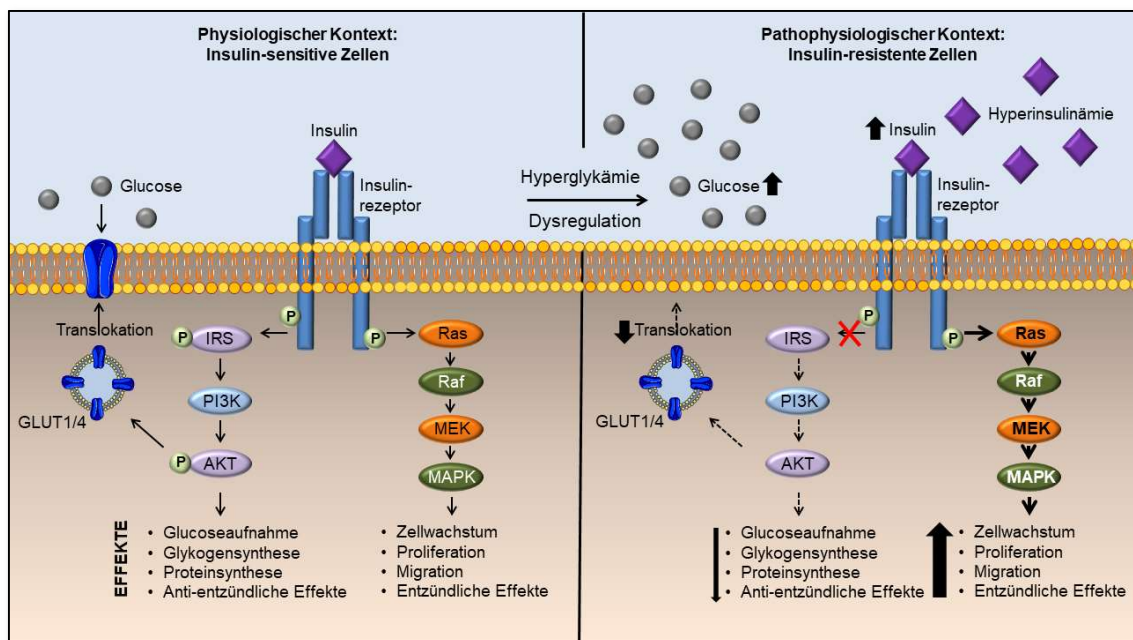


ABBILDUNG 4 – PHYSIOLOGISCHER UND PATHOPHYSIOLOGISCHER INSULIN-SIGNALWEG

In insulinempfindlichen Zellen führt die Aktivierung des Insulinrezeptors zu einem parallelen und ausgewogenen Insulin-Signalweg über den PI3K/AKT-Signalweg und den Ras/MAPK-Signalweg. Dabei führt der PI3K/AKT-Signalweg zu Glucoseaufnahme, Glykogen- und Proteinsynthese, während durch den Ras/MAPK-Signalweg proliferative und pro-inflammatorische Effekte vermittelt werden (links).

Insulinresistenz, die hauptsächlich durch Hyperglykämie hervorgerufen wird, ist durch die Beeinträchtigung der PI3K-abhängigen Signalübertragung und eine daraus resultierende kompensatorische Hyperinsulinämie zur Aufrechterhaltung der Euglykämie gekennzeichnet. Dies führt zu einer übermäßigen Stimulation des nicht betroffenen Ras/MAPK-Signalwegs (rechts).

AKT: Proteinkinase B; GLUT1/4: Glucoserezeptor 1 o. 4; IRS: Insulinrezeptor-Substrat; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase; Raf: *Rat fibrosarcoma*- Onkoprotein; Ras: *Rat sarcoma* -Onkoprotein.

2 FRAGESTELLUNG

In Anbetracht der Vielzahl an Erkrankungen, die mit einer Dysregulation der ADAM-Aktivität assoziiert werden, wird deutlich, dass die Regulation der Proteasen höchstwahrscheinlich eine essenzielle Rolle bei der Krankheitsentstehung innehat. Die Untersuchung der Regulationsmechanismen dieser Proteasen ist damit ein wichtiges Forschungsfeld.

Bei der Entstehung von Erkrankungen wie Alzheimer-Krankheit oder Typ-2-Diabetes mellitus spielen auch äußere Faktoren eine Rolle, die aus der Nahrung oder der Umgebung aufgenommen werden können. Die Frage, inwiefern diese Faktoren einen Einfluss auf die Regulation der ADAM-Aktivität und damit potenziell auf den Krankheitsverlauf haben, stand im Fokus dieser Arbeit.

Im ersten Teil wurde daher der Einfluss von ausgesuchten Faktoren auf die Aktivität von ADAM10 und -17 geprüft: Glutamat und Aluminiumverbindungen, die sowohl mit der Alzheimer-Krankheit als auch mit Krebserkrankungen assoziiert werden, wurden zunächst untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von Glucose, die in erhöhter Konzentration als Risikofaktor für die Entstehung von Typ-2-Diabetes mellitus beschrieben ist, auf die ADAM-Regulation analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit stand der Faktor Insulin im Fokus: Es wurde bereits beschrieben, dass Insulin die ADAM-Aktivität stimulieren kann. Die Untersuchungen mit Insulin zielten darauf ab, das vorhandene Wissen zu erweitern und den Regulierungsmechanismus zu verstehen. Dabei war die Kernfrage, ob eine Beteiligung der Zellmembran an der ADAM-Aktivierung durch Insulin von Bedeutung ist. Die Hypothese war, dass Insulin zu der Externalisierung von Phosphatidylserin an die äußere Zellmembran führt. Dort kommt es daraufhin zu einer Interaktion mit ADAM10 bzw. -17, die schließlich den Shedding-Vorgang initiiert. Darüber hinaus wurde die mögliche funktionelle Relevanz der Insulin-regulierten ADAM-Aktivität in Leberkrebszellen untersucht.

Weiterführend sollten die Erkenntnisse über die Regulation der ADAM-Aktivität durch Insulin in pathologischem Kontext validiert werden: Die Regulation der ADAMs durch Insulin wurde daher unter hypoxischen Bedingungen untersucht, die in Geweben von T2DM-Patienten und Krebsgeweben vorherrschen.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 VERBRAUCHSMATERIAL

Tabelle 2 - Verbrauchsmaterial

12-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Zellkulturplatten, lumox®	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einfrier-Behälter Nalgene® Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA, Emsdetten
Gel-Blotting-Papiere Whatman 1,5mm	Carl Roth, Karlsruhe
Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten, 96-Well, flacher Boden, ELISA	Greiner Bio One, Kremsmünster
Objektträger superfrost® plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 1000, 200, 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
<i>PureYield™</i> Midipräparation-Kit	Promega, Wisconsin
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Roti®-PVDF-Membran, 0,45 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen, T75	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen ø 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, 16cm, 25cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellzählkammern, SD100	Nexcelom Bioscience, Lawrence
Zentrifugenröhrchen, 50 ml und 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.2 CHEMIKALIEN & REAGENZIEN

Tabelle 3 - Chemikalien und Reagenzien

1,10-Phenanthrolin	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Darmstadt
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Natick
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, Natick
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Aluminiumchlorid (AlCl ₃)	Merck, Darmstadt
Aluminiumchlorid-Maltol (AlCl ₃ -Maltol)	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Annexin V – Alexa fluor 568	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Biofreeze Einfriermedium	Biochrom; Teil von Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Bio-Rad Laboratories, München
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM)	Sigma-Aldrich, Natick
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Cobaltchlorid (CoCl ₂)	Merck, Darmstadt
Complete, Protease-Inhibitor-Mix	Roche, Penzberg
Diazabicyclooctane (DABCO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas; Teil von Thermo Fisher Scientific, Waltham
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham

DMEM, ohne Glucose	Thermo Fisher Scientific, Waltham
ECL™ Select Western Blotting Detection Reagenzien	GE Healthcare, Waukesha
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Cölbe
Fraktalkin, human rekombinant	Cell guidance systems, Cambridge
GI254023X (GI)	GlaxoSmithKline, London
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaminsäure (L-)	Sigma-Aldrich, Natick
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
GW280264X (GW)	GlaxoSmithKline, London
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hypoxie-Gasgemisch 1% O ₂ , 10% CO ₂ , 89% N ₂	AIR LIQUIDE, Düsseldorf
ImjectAlum™ Adjuvans	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Insulin, Insuman® Rapid	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Ionomycin (IO)	Calbiochem; Teil von Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagen aus Rattenschwanz	Roche, Penzberg
Lactadherin, bovine	Haematologic Technologies, Essex
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumhydroxide (MgOH ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt

Marimastat (MM)	Tocris Bioscience, UK
Methanol (MeOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol® 4-88	Calbiochem; Teil von Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
O-Phospho-L-Serin (OPS)	Sigma-Aldrich, Natick
p-Nitrophenylphosphat (pNPP) Tabletten	Sigma-Aldrich, Natick
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin, 100x	PAA Laboratories, Cölbe
Phosphatase-Inhibitor-Mix, PhosStop	Roche, Penzberg
Phosphocholin (PC)	Sigma-Aldrich, Natick
Proteinmarker, Color Protein Standard, Broad Range	New England BioLabs, Hitchin
Proteinquantifizierungsreagenz (Pierce™ 660nm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Transfektionsreagenz, Turbofect	Fermentas; Teil von Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tricin	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe

Trypanblau	Sigma-Aldrich, Natick
Trypsin, 2,5 %	Biochrom; Teil von Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA, 10x	PAA Laboratories, Cölbe
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Turbofect, Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe
Wortmannin (WM)	Merck, Darmstadt

3.3 GERÄTE

Tabelle 4 - Geräte

-80°C-Schrank Forma 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Absaug-Pumpe, BVC professional	Vacuubrand, Wertheim
Absorption-Reader EL800	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Analysewaage S-603	Denver Instruments, Göttingen
Analysewaage XS205	Mettler Toledo, Gießen
Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Durchflussmessgerät, Flow Meter	Billups-Rotheberg, Del Mar
Einkanalpipetten	Brand, Wertheim
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert mit Kamera 200M und Filter A350/A488/A595	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenz-Reader, Infinite® M Plex	Tecan Trading, Männerdorf
Fotodokumentationsanlage, BioDocII	Biometra, Jena
Heizblock, <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Hypoxie-Kammer, <i>Modular incubator chamber</i>	Billups-Rotheberg, Del Mar
Kippschüttler, <i>Unitwist RT</i>	Uniequip, Planegg
Lichtmikroskop, invers	Hund, Wetzlar

Luftsauerstoff-Messgerät, COX-100	GHM Messtechnik, Erolzheim
Magnetrührer CB162	Bibby Scientific, Staffordshire
Multi-Imagingsystem Fusion FX7	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue™ Gelsystem Mini Twin S	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
pH-Meter ph211	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Rollentisch, RS-TR10	Phoenix Instruments, Garbsen
Spannungsgeber EV231	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Spectrophotometer, Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Sterilwerkbank	Köttermann, Uetze/ Hänigsen
Vortexer, <i>Vortex Genie</i>	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasseraufbereitungssystem TKA GenPure	TKA, Niederelbert
Wasserbad GFL1004	GFL, Burgwedel
Zellzählgerät, Cellometer® Auto 1000	Nexcelom Bioscience, Lawrence
Zentrifuge 5417R, Festwinkelrotor F45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424, Festwinkelrotor F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R, Ausschwingrotor A-4-62	Eppendorf, Hamburg

3.4 ELISA

Tabelle 5 - ELISA

Human CX3CL1/Fraktalkin DuoSet	R&D Systems, Minnesota
Human TGF-alpha DuoSet	R&D Systems, Minnesota
Human TNF RI/TNFRSF1A DuoSet	R&D Systems, Minnesota

3.5 ANTIKÖRPER

3.5.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 6 - Primäre Antikörper

Bezeichnung/ Antigen	Firma	Immunisierte Spezies	Verdünnung WB
ADAM10, AB19026	Merck, Darmstadt	Kaninchen	1:1000
ADAM17, AB19027	Merck, Darmstadt	Kaninchen	1:1000
AKT	Cell Signaling Technology, Frankfurt	Kaninchen	1:1000
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Dallas	Kaninchen	1:1000
HIF1-alpha	BD Biosciences, New York	Maus	1:500
Insulin Rezeptor β (IR β)	Cell Signaling Technology, Frankfurt	Maus	1:1000
ERK	Cell Signaling Technology, Frankfurt	Kaninchen	1:1000
N-Cadherin	BD Biosciences, New York	Maus	1:500
Phospho-AKT (pAKT; S473)	Cell Signaling Technology, Frankfurt	Kaninchen	1:1000
Phospho-ERK (pERK; T202/Y204)	Cell Signaling Technology, Frankfurt	Kaninchen	1:1000
Tubulin	Sigma-Aldrich, Natick	Maus	1:500

3.5.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 7 - Sekundäre Antikörper

Bezeichnung/ Antigen	Firma	Gekoppelt mit	Verdünnung WB
Ziege- α -Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove	<i>Horseradish peroxidase (HRP)</i>	1:10000
Ziege- α -Maus IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove	<i>Horseradish peroxidase (HRP)</i>	1:10000

3.6 PLASMIDE

Tabelle 8 - Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Bezug
Betacellulin-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York)
TGF-alpha-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York)

3.7 SOFTWARE

Tabelle 9 - Software

Adobe Photoshop CS4 Extended	Adobe Systems, San Jose
AxioVision 4.8.2	Carl Zeiss, Jena
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Kalifornien
FluoView FV10-ASW 4	Olympus, Chelmsford
Fusion 15.17	Vilber Lourmat, Eberhardzell
ImageJ 1.47m	NIH, Baltimore
Mendeley 1.8.3	Mendeley, London
Microsoft Office 365	Microsoft, Washington

3.8 ZELLINIEN

COS-7

Die COS-7-Zelllinie (COS7) stammte aus Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die mit dem SV-40 Virus transformiert wurden.

H4

H4 ist eine epitheliale, neuronale Zelllinie, die aus dem Gehirn eines 37-jährigen kaukasischen Mannes mit einem Neurogliom gewonnen wurde.

HaCaT

Die *Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes* (HaCaT) Zellen sind spontan immortalisierte, nicht-kanzerogene Keratinozyten. Die Zelllinie entstand im

deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg ¹⁹⁰ aus kultivierten Keratinozyten eines 62-jährigen Mannes.

HepG2

HepG2 ist eine epitheliale Leberzellkarzinom-Zelllinie, die aus dem Lebergewebe eines 15-jährigen kaukasischen Amerikaners mit einem Leberzellkarzinom gewonnen wurde.

HT-29

HT-29 (HT29) ist eine kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie mit epithelialen Eigenschaften, die aus einem primären kolorektalen Adenokarzinom 2. Grades einer 44-jährigen kaukasischen Frau gewonnen wurde.

HuH-7

HuH-7 (HuH7) ist eine epitheliale Leberzellkarzinom-Zelllinie, die 1982 von einem Lebertumor bei einem 57-jährigen japanischen Mann entnommen wurde ¹⁹¹.

SH-SY5Y (SHSY)

Die epitheliale neuronale Zelllinie SH-SY5Y (SHSY) wurde aus dem Rückenmark eines 4-jährigen kaukasischen Mädchens mit einem Neuroblastom gewonnen.

THP-1

Die monozytäre Zelllinie THP-1 (THP1) wurde aus Monozyten von einem einjährigen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen ¹⁹². Es handelt sich um Suspensionszellen, die verwendet werden, um *in vitro* Eigenschaften von Monozyten zu untersuchen.

3.9 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.9.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Sämtliche Zellen wurden bei 37 °C unter 5 % CO₂ und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert. Mit Ausnahme der THP1-Zellen wurden in dieser Arbeit ausschließlich adhärente Zellen verwendet, die in Zellkulturschalen (ø 10 cm) mit 10 ml DMEM-Medium mit Zusätzen kultiviert wurden. Die verwendeten Medien wurden steril bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA mehrere Minuten bei 37°C inkubiert, bis sie sich von der Zellschale ablösten. Um das proteolytisch aktive Trypsin abzustoppen, wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium mit Zusätzen aufgenommen und bei 200 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium mit Zusätzen resuspendiert und subkultiviert. Die THP1-Zellen sind Suspensionszellen und wurden in Kulturflaschen mit 50 ml RPMI-Medium mit Zusätzen kultiviert. Bei einer zu hohen Zelldichte wurde die gewünschte Menge an Zellsuspension abgenommen wie bei den adhären Zellen zentrifugiert und ein Teil der Zellen in frischen 50 ml RPMI-Medium mit Zusätzen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für Stimulationsversuche wurde zunächst die Konzentration der Zellsuspension mittels eines Zellzählgeräts bestimmt (siehe 3.9.2) und die Zellen wurden in einer Konzentration von 3 x 10⁵ Zellen pro Well-Vertiefung in 12-Well-Zellkulturplatten oder 96-Well-lumox®-Platten in einer Konzentration von 1 x 10⁵ Zellen pro Well-Vertiefung ausgesät.

Kulturmedium mit Zusätzen	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in DMEM- oder RPMI-Kulturmedium
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	1-fach Trypsin-EDTA in PBS

3.9.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Für die Zellzahlbestimmung wurden die adhärennten Zellen, wie bereits beschrieben, mittels Trypsin-EDTA abgelöst und mit 5 ml Kulturmedium mit Zusätzen versetzt. Die Zellsuspension wurde mit einer Trypanblau-Lösung (0,2 %) 1:1 vermischt und in eine Zellzählkammer pipettiert. Die Färbung mit Trypanblau ermöglicht es, lebende von toten Zellen zu unterscheiden, da tote Zellen aufgrund ihrer zerstörten Membran blau angefärbt werden. Lebende Zellen bleiben farblos. Die Zellzählkammer wurde in das Zellzählgerät gegeben und das entsprechende Programm für die Zelllinie ausgewählt. Das Programm errechnet die Gesamt-Zellzahl sowie die Konzentration lebender Zellen in der Suspension. Für die Aussaat wurden ausschließlich die Zahlen lebender Zellen verwendet.

3.9.3 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN

Zur langfristigen Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff (-196 °C) konserviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 – 100 % mit Hilfe von Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst, in 5 ml Kulturmedium mit Zusätzen aufgenommen und bei 200 ×g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (Biofreeze) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einem Zell-Einfrier-Behälter (Nalgene®, Mr. Frosty), der mit Isopropanol gefüllt war und eine schonende Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/min gewährleistete, für 2 Tage bei - 80 °C gelagert, bevor sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zur endgültigen Lagerung überführt wurden.

Nach der Entnahme von Zellen aus dem Stickstoffbehälter, wurden diese schnellstmöglich im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium mit Zusätzen aufgenommen und in eine Zellkulturschale überführt. 24 Stunden nach dem Auftauen wurde das Medium erneuert.

3.9.4 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Die Transfektion von Zellen mit Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe der Lipofektion, die durch die Verwendung des Transfektionsreagenz Turbofect herbeigeführt wurde. Das Pipettierschema für einen Transfektionsansatz ist unten aufgeführt. Der fertige Transfektionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektion

erfolgte in 12-Well-Zellkulturplatten, in denen die Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro 12-Well-Vertiefung einen Tag zuvor ausgesät wurden. Das Medium wurde abgenommen und pro Vertiefung wurden 100 μl Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben, danach wurde mit 500 μl Kulturmedium ohne Antibiotika aufgefüllt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für die unterschiedlichen Stimulations- oder Inhibitionsversuche verwendet.

Serumfreies Medium	Plasmid	Turbofect
100 μl	1 μg (z.B. AP-Substrat)	3 μl

3.9.5 STIMULATION UND INHIBITION VON ZELLEN

Für Stimulationsversuche wurden Zellen in der Konzentration von 2 bzw. 3×10^5 Zellen pro 12-Well-Vertiefung in Zellkulturplatten oder auf Deckgläschen ausgesät je nach Zelllinie und deren Proliferationsverhalten. Die Stimulation erfolgte normalerweise am darauffolgenden Tag. Für die Stimulation mit Insulin wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit Kulturmedium ohne Zusätze für weitere 24 Stunden versorgt, um die Zellen zu sensibilisieren und zu gewährleisten, dass Rückstände von Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium mit Zusätzen verbraucht waren. Die anschließende Stimulation erfolgte ebenfalls in Kulturmedium ohne Zusätzen. Bei Einsatz von Inhibitoren wurden diese 15 min vor Beginn der Stimulation hinzugegeben, so dass die Ziel-Moleküle zu Beginn der Stimulation bereits inhibiert waren und die Inhibition über den gesamten Stimulationszeitraum aufrechterhalten wurde. Für die einzelnen Stimulanzien und Inhibitoren wurden entsprechende Lösungsmittelkontrollen eingesetzt.

Die Stimulation wurde beendet indem die Überstände abgenommen und Lysepuffer (100 μl pro 12-Well) zu den Zellen gegeben wurde. Bis zur Aufarbeitung wurden die Platten bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren (siehe 3.10.1). Die Überstände wurden durch Zentrifugation ($4\text{ }^\circ\text{C}$, $12.000 \times g$, 5 min) von unlöslichen Zellbestandteilen befreit und entweder sofort für den ELISA (siehe 3.9.9) oder Shedding Experimente mit der Alkalischen Phosphatase (siehe 3.9.8) verwendet oder bis zur späteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.9.6 INDUKTION VON INSULINRESISTENZ IN HEPG2-ZELLEN

Insulinresistenz (IR) wurde in HepG2-Zellen induziert, um die Bedeutung der Inhibition des Insulin-Signalwegs auf die Shedding-Aktivität der ADAMs zu untersuchen. Die HepG2-Zellen wurden in einer 12-Well-Platte (3×10^5 Zellen/ Well) oder auf Deckgläschen ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ Well) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 100 nM Insulin in Kulturmedium ohne Zusätze oder als Kontrolle nur mit Kulturmedium ohne Zusätze (insulinsensitive Zellen) behandelt. Nach 24 Stunden wiesen die HepG2-Zellen eine IR auf und wurden für Inhibitions- und Stimulationsversuche verwendet (siehe 0).

3.9.7 BEHANDLUNG DER ZELLEN UNTER HYPOXIE

Um den Einfluss von verringerter Luftsauerstoffzufuhr – der sogenannten Hypoxie – auf die Regulation der Shedding-Aktivität der ADAMs zu untersuchen, wurden zwei Methoden verwendet.

Zum einen wurde Cobalt(II)-chlorid (CoCl_2) eingesetzt. CoCl_2 inhibiert sauerstoffabhängige Enzyme, die unter normoxischen Bedingungen den Transkriptionsfaktor *Hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 α) degradieren. Folglich kommt es zu Akkumulation von HIF-1 α und zur Simulation eines hypoxischen Mikromilieus. Dafür wurden die HepG2-Zellen, die einen Tag zuvor ausgesät wurden, mit 200 μM CoCl_2 behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen ggf. weiterhin mit Insulin für 30 min stimuliert.

Zum anderen wurde eine spezielle Hypoxie-Kammer verwendet, in die man beliebige Gasgemische einleiten kann. Die Hypoxie-Kammer wurde vor jeder Verwendung mit 70 % Isopropanol unter der Sterilwerkbank desinfiziert und die Zellen, die einen Tag zuvor in einer 12-Well-Platte ausgesät wurden, in der Hypoxie-Kammer platziert. Um eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre während des Experiments zu gewährleisten, wurde eine Schale mit destilliertem Wasser am Boden der Hypoxie-Kammer platziert. Außerdem wurden die freigebliebenen Vertiefungen in der 12-Well-Platte mit Kulturmedium ohne Zusätze gefüllt. Dies diente zum einen dem Erhalt der wasserdampfgesättigten Atmosphäre in der Hypoxie-Kammer, zum anderen wurde dieses Kulturmedium ohne Zusätze für die anschließende Stimulation der Zellen verwendet, um eine mögliche Reoxygenierung durch den Sauerstoff aus dem Kulturmedium ohne Zusätze, das in einer normoxischen Umgebung (21 % O_2) gelagert wurde, zu verhindern.

Danach wurde die Hypoxie-Kammer an den Hypoxie-Tank angeschlossen und mit Hilfe eines Durchflussmessgerätes (*Flow Meter*) und über ein Filtersystem wurde das hypoxische Gasgemisch in die Kammer eingeleitet. Die Sauerstoffkonzentration des aus der Hypoxie-Kammer ausströmenden Gases wurde durch ein Luftsauerstoffmessgerät bestimmt. Sobald die gewünschte Sauerstoffkonzentration (z.B. 1,5 % oder 3 % O₂) das Volumen der gesamten Hypoxie-Kammer einnahm, und damit auch die, des ausströmenden Gases, wurde die Hypoxie-Kammer luftdicht verschlossen. Die Hypoxie-Kammer wurde in einem Inkubator bei 37 °C platziert und nach 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen wieder entnommen. Dabei wurde mittels des Luftsauerstoffmessgeräts überprüft, ob das ausströmende Gas bei der Öffnung der Hypoxie-Kammer nach wie vor die gewünschte Sauerstoffkonzentration hatte. Die Zellen wurden dann zügig behandelt z.B. mit Insulin stimuliert. Um eine Reoxygenierung zu verhindern, wurde für den Stimulationsansatz das vorgelegte, sauerstoffarme Kulturmedium ohne Zusätze aus der Hypoxie-Kammer verwendet. Daraufhin wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben in der Hypoxie-Kammer unter hypoxische Bedingungen gebracht. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen der Hypoxie-Kammer entnommen, die Überstände wurden abgenommen und Lysepuffer wurde zu den Zellen gegeben. Bis zur Aufarbeitung wurden die Platten bei -80 °C eingefroren (siehe 3.10.1). Die Überstände wurden durch Zentrifugation (4 °C, 12.000 xg, 5 min) von unlöslichen Zellbestandteilen befreit und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die unter normoxischen Verhältnissen (21 % O₂) behandelt wurden. Zum Nachweis der Hypoxie wurde das Protein HIF-1 α mittels *Westernblot*-Analyse detektiert.

Hypoxie-Gasgemisch	1% O ₂
	10% CO ₂
	89 % N ₂

3.9.8 SHEDDING-EXPERIMENTE MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE-GEKOPPELTEN SUBSTRATEN

Um die proteolytische Aktivität der Sheddasen ADAM10 und -17 zu bestimmen, wurden alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelte Substrate verwendet. Diese sind Substrate, die an ihrer extrazellulären Domäne mit einer alkalischen Phosphatase fusioniert sind und in Zelllinien transfiziert wurden (siehe 3.9.4). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in 400 µl Kulturmedium ohne Zusätze stimuliert (siehe 3.9.5). Nach der Stimulationszeit wurde der Überstand abgenommen und 200 µl vorgekühlter Lysepuffer (s.u.) wurde für 30 min zu den Zellen gegeben. 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 Gesamt-AP-Aktivität im Zellkulturüberstand und 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 gemessen (EL800 - BioTek). Zur Kontrolle wurden auch untransfizierte Zellen gemessen und deren Wert als Hintergrund von den Werten der transfizierten Zellen subtrahiert. Schließlich wurden die Werte zu der unbehandelten Kontrolle normiert.

Zell-Lysepuffer für Alkaline Phosphatase (AP)- Experimente	1 mM EDTA 10 mM 1,10-Phenanthrolin 2,5 % (v/v) Triton-X-100 in H ₂ O
Alkaline Phosphatase (AP)-Puffer pH 9,5	100 mM NaCl 100 mM Tris 20 mM MgCl ₂
Substratlösung	1 Tablette p-NPP in AP-Puffer (\cong 1mg/ml)

3.9.9 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Der *Sandwich*-ELISA ist eine Methode, um spezifisch Proteine in einer Probe nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde der ELISA verwendet, um spezifisch endogene ADAM10- bzw. 17-Substrate im Überstand von behandelten Zellen zu detektieren. Durch die unterschiedlichen Substratmengen im Überstand kann man Rückschlüsse auf die Aktivität der ADAMs ziehen. Der Nachweis erfolgte in Mikrotiterplatten über Bindung des nachzuweisenden Proteins an einen immobilisierten Antikörper und die nachfolgende Bindung eines zweiten, Antigen-spezifischen Biotin-gekoppelten Antikörpers. Nach anschließender Inkubation mit *Streptavidin-horseradish peroxidase* (HRP) erfolgt die Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins durch die Zugabe und Umsetzung eines chromogenen Peroxidase-Substrates (Tetramethylbenzidin, TMB) und eine photometrische Messung der Farbentwicklung.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich DuoSet ELISA Kits der Firma R&D verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Zusammensetzung der benötigten Puffer für die Durchführung ist unten aufgelistet. Die Absorption wurde bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen (EL800 - BioTek) und die Werte wurden zu der unbehandelten Kontrolle normiert.

Wasch-Puffer	0,05 % Tween20 in PBS
Reagenz-Lösung Steril filtriert	1 % BSA in PBS
Stopp- Lösung	2 M NH_2O_2

3.9.10 FLUORESZENZFÄRBUNG

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzfärbung eingesetzt, um die zelluläre Lokalisation von Phosphatidylserin mit Hilfe von AnnexinV an der äußeren Zellmembran zu bestimmen. Dazu wurden verschiedene Zelllinien auf sterilen Deckgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz zwischen 60-70 % stimuliert z.T. mit vorheriger Inhibition. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln: Das Medium wurde abgenommen und 20 µl einer Lösung aus AnnexinV-Alexa Fluor™ 568 in Annexin-*Binding*-Puffer (ABP; 1:20) wurde auf die Zellen gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT, wurden die Zellen zweimal mit ABP-Puffer gespült und mit 3 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen und mit destilliertem Wasser gespült. Schließlich wurden die Deckgläschen mit Hilfe einer

Einbettungslösung, welche DAPI enthielt (s.u), auf Objektträgern fixiert. Die Proben wurden bei 4°C gelagert bis zur Visualisierung der Färbung mittels des konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Fluoview FV1000, Olympus) mit einem UPLSAPO 60 x Öl-Immersion-Objektives und 2-fach Vergrößerung. AnnexinV-Alexa Fluor™ 568 wurde bei 578 nm angeregt und die Emission wurde bei 603 nm gemessen. Die DAPI-Färbung, die spezifisch DNA anfärbt und damit die Visualisierung der Zellkerne ermöglicht, wurde bei einer Excitation von 358 nm und einer Emission von 461 nm gemessen. Alle Aufnahmen wurden unter den selben Laser- und Detektions-Einstellungen gemacht.

Annexin-<i>Binding</i>-Puffer (ABP)-Puffer pH 7,4	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2.5 mM CaCl ₂
Einbettungslösung	Mowiol 10% DABCO 0,1% DAPI

3.9.10.1 FLUORESCENZ-SIGNAL QUANTIFIZIERUNG

Die Bildanalyse wurde mit dem Programm ImageJ 1.47m durchgeführt. Die Fluoreszenz-Fläche der AnnexinV-Alexa Fluor™ 568-Färbung wurde bestimmt und zu der Zellzahl korreliert. Die Zellzahl wurde anhand von der DAPI-Färbung der Zellkerne erhoben. Für jede Probe wurden drei unabhängige Deckgläschen mit je neun Aufnahmen von unterschiedlichen Bereichen analysiert. Der Mittelwert des Fluoreszenz-Bereichs jedes Deckgläschens wurde für die statistische Auswertung herangezogen und die Werte wurden zu der unbehandelten Kontrolle normiert.

3.9.11 MTT-BASIERTE ZELLVIABILITÄTSVERSUCHE

Der MTT-Test wird verwendet, um die metabolische Aktivität von Zellen, die mit deren Viabilität korreliert, zu bestimmen. Dabei wird die Reduktion von MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazodium bromide) zu Formazan durch vitale Zellen gemessen.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro 12-Well-Vertiefung in Zellkulturplatten ausgesät und mit der angegebenen Konzentration von ImjectAlum™ in Kulturmedium ohne Zusätze für unterschiedliche Zeitspannen behandelt. Unbehandelte

und mit 2,5 % Triton-X behandelte Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Anschließend wurde das Medium durch 800 µl MTT-Lösung ersetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

In dieser Zeit setzten vitale Zellen MTT zu Formazan um, das wiederum formt Kristalle, die durch die Zugabe von 800 µl von 10 % Triton-X in Isopropanol aufgelöst wurden. Schließlich wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen und die Absorptionswerte wurden zu der unbehandelten Kontrolle normiert.

MTT-Lösung

0,5 mg/ml MTT in 10 % Kulturmedium
und 90 % PBS

3.9.12 ZELLULÄRER ADHÄSIONSTEST

Der Adhäsionstest wurde verwendet, um die funktionelle Relevanz der ADAM10-vermittelten Freisetzung des Adhäsionsmolekül Fraktalkin von der Zelloberfläche von HepG2-Zellen zu untersuchen. Fraktalkin bindet den Fraktalkin-Rezeptor (CX3CR1), der von Immunzellen wie Monozyten, natürlichen Killerzellen oder T-Zellen exprimiert wird. Die monozytäre THP1-Zelllinie wurde daher stellvertretend für CX3CR1-exprimierende Immunzellen für den Adhäsionstest verwendet.

Für den Adhäsionstest wurden die lumox® 96-Well-Zellkulturplatten verwendet, da diese Platten lichtundurchlässige Wände haben und damit eine Fluoreszenzsignal-Messung ohne Hintergrundsignal möglich ist. Außerdem besitzen diese Platten aber auch einen transparenten Boden, der eine mikroskopische Beurteilung der Konfluenz der HepG2-Zellen ermöglicht und nach dem Adhäsionstest wurde so auch die Adhäsion der THP1-Zellen mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops überprüft. Um die Anhaftung der HepG2-Zellen während des Adhäsionsversuchs zu gewährleisten, wurden die Platten mit dem Strukturprotein Kollagen beschichtet. Dafür wurden 50 µl pro Vertiefung mit 20 µg/ml Kollagen in 0,02 M HCl-Lösung gefüllt und kurz zentrifugiert, damit die Lösung den Boden der Mikrotiterplatte bedeckte. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Platte dreimal mit PBS gespült. Dann wurden 1×10^5 HepG2-Zellen pro 96-Well-Vertiefung in der lumox®-Zellkulturplatte ausgesät. Einen Tag nach der Aussaat wurden die HepG2-Zellen mit Kulturmedium ohne Zusätze oder mit 10 µg/ml LPS für 24 Stunden behandelt. LPS induziert die Fraktalkin-Expression und diente damit als positive Kontrolle für den Adhäsionstest. Nach 24 Stunden wurden die HepG2-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren für 15 min vorinkubiert und dann mit Insulin für 30 min

stimuliert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Parallel wurden die THP1-Zellen mit 5 μM des membrangängigen Farbstoffs Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) in PBS bei 37 °C für 30 min inkubiert. Das farblose Calcein-AM wurde nach Acetoxymethylester-Hydrolase durch intrazelluläre Esterasen in grün fluoreszierendes Calcein umgesetzt, damit waren die THP1-Zellen Fluoreszenzmarkiert. Daraufhin wurden die THP1-Zellen dreimal in PBS gewaschen, um das verbleibende Calcein-AM zu entfernen. Anschließend wurden die THP1-Zellen in RPMI-Medium (mit 1% FKS) aufgenommen. Die THP1-Zellsuspension wurde entweder direkt zu den HepG2-Zellen gegeben in einer Konzentration von 5×10^4 THP1-Zellen pro 96-Well-Vertiefung. Oder die THP1-Zellen wurden zur Kontrolle mit 1 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem humanen Fraktalkin für 15 min inkubiert und dann zu den HepG2 Zellen gegeben. Die THP1-Zellsuspension verblieb bei 37 °C für eine Stunde auf der HepG2-Zellschicht, in dieser Zeit adhärten die THP1-Zellen an den HepG2-Zellen. Nach der Inkubationszeit wurden die nicht-adhären THP1-Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Adhärenz der THP1-Zellen wurde im Fluoreszenz-Mikroskop überprüft und anschließend wurde die Fluoreszenz-Intensität bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 530 nm gemessen (Fluoreszenz-Reader, Infinite® M Plex, Tecan) und die Werte wurden zur unbehandelten Kontrolle normiert (Abbildung 5).

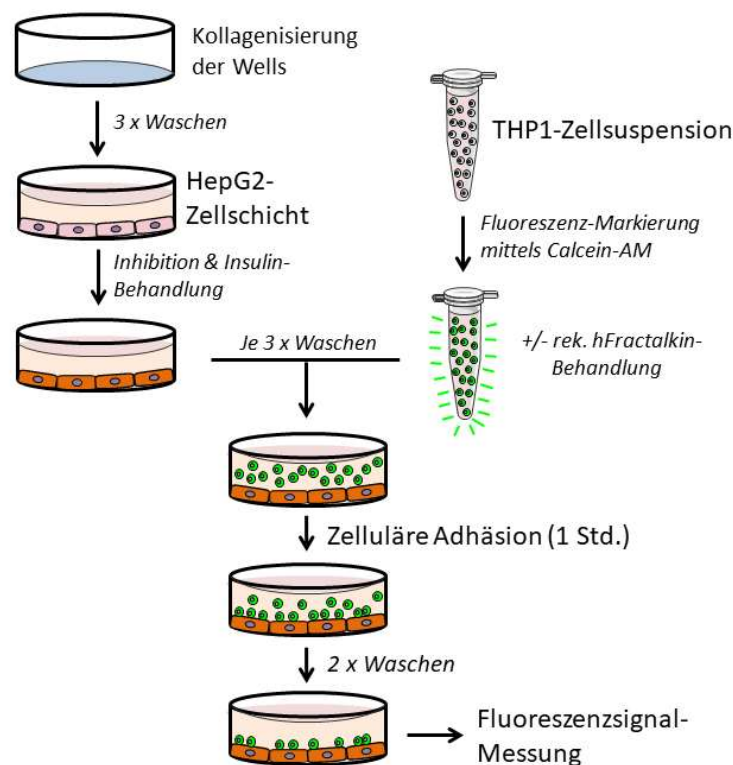


ABBILDUNG 5 – SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DURCHFÜHRUNG DES ADHÄSIONSTESTS

3.10 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.10.1 PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN

Für die *Westernblot*-Analyse ist eine Proteinextraktion aus den Zellen erforderlich. Die Herstellung der Zelllysate erfolgte auf Eis, um eine Proteindegradierung zu verhindern. Pro 12-Well-Vertiefung wurden gekühlte 100 µl Zell-Lysepuffer zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mindestens zweimal eingefroren und aufgetaut, um eine mechanische Zerstörung der Zellen zu erwirken. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und zentrifugiert (4 °C, 12.000 xg, 5 min), um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Schließlich wurde der Überstand, der nun die Proteine enthielt, in ein neues Reagenzgefäß überführt und bei -20 °C für eine spätere Verwendung gelagert oder der Proteingehalt wurde direkt im Anschluss bestimmt (siehe 1.10.2).

Zell-Lysepuffer
für *Westernblot*-Analyse

5 mM Tris
1 mM EGTA,
250 mM Saccharose
1 % (v/v) Triton-X-100
10 mM 1,10-Phenantrolin*
1 x Complete Protease inhibitor mix*
1 x PhosStop Phosphatase inhibitor mix*
*wurden frisch dazu gegeben

3.10.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Um gleiche Proteinmengen für die *Westernblot*-Analyse verwenden zu können, wurden der Proteingehalt jeder Probe quantifiziert. Dafür wurden jeweils 6 µl des zu bestimmenden Zelllysates mit 100 µl Proteinquantifizierungsreagenz (Thermo Scientific Pierce 660 nm Protein Assay) in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und vermischt. Die Absorption wurde bei 620 nm gemessen. Als Leerkontrolle diente Proteinquantifizierungsreagenz mit Zell-Lysepuffer, dieser Hintergrundwert wurde von den Proben abgezogen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde dann basierend auf einer BSA-Standard-Reihe berechnet. In der Regel wurden 50 µg Protein einer jeden Probe verwendet. Die entsprechende Menge an Zelllysate wurde im Verhältnis 5:1 mit 6 x SDS-Probenpuffer (s.u.) in Reagenzgefäßen vermischt und unter leichtem Schütteln für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch das Detergenz SDS erhalten alle Proteine eine stark

negative Ladung und ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis. Anschließend wurden die Proben entweder gleich für die Gelelektrophorese verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6 x SDS-Probenpuffer pH 6,8	0,75 M Tris
	12 % SDS
	6,54 M Glycerin
	6 mM EDTA
	120 mM DTT
	0,15 % Bromphenolblau

3.10.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes in denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAGE) wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE eingesetzt und nach dem von Laemmli beschriebenen Verfahren durchgeführt (Laemmli,1970). Das Gel besteht dabei aus zwei Gelschichten, dem oberen Sammelgel, das die Proteingemische fokussiert und dem unteren Trenngel, das die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe ermöglicht. Die Gele unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Acrylamid-Konzentration und ihres pH-Wertes. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele und der dazugehörigen Puffer ist hier aufgeführt:

Sammelgel-Puffer pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Trenngel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
APS	10 % (w/v) APS in H ₂ O
Sammelgel 4,5 %	0,835 ml Rotiphorese Gel 30 1,25 ml Sammelgel-Puffer 2,9 ml H ₂ O 15 µl TEMED 30 µl APS

Trenngel 10 %	3,33 ml Rotiphorese Gel 30
	2,5 ml Trenngel-Puffer
	4 ml H ₂ O
	30 µl TEMED
	60 µl APS

Das Gel wurde direkt vor der Elektrophorese mit Hilfe eines vertikalen Gelsystems (Peqlab) gegossen und nach der Polymerisierung in der Elektrophorese-Apparatur platziert. Die Apparatur wurde mit SDS-Laufpuffer befüllt, sodass die Auftragstaschen des Gels vollständig mit Puffer bedeckt waren. Die Taschen wurden mit Puffer ausgespült, um das vollständige Befüllen zu gewährleisten. Dann wurden die aufzutrennenden Proben in je eine Tasche pipettiert. Zusätzlich wurden 6 µl eines Proteinmarkers (*Color Protein Standard, Broad Range, New England*) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 30 Minuten bei 70 V und wurde bei 90 V fortgesetzt, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

SDS-Laufpuffer pH 8,8 - 8,9	25,1 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS

3.10.4 PROTEINTRANSFER DURCH *WESTERNBLOT*

Nach der Elektrophorese wurden die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische auf eine feste Matrix mit Hilfe der *Westernblot*-Methode übertragen und immobilisiert. Die Matrix bestand hier aus einer proteinbindenden 0,45 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran und als Verfahren wurde die Methode des *Tank blottings* verwendet. Dafür wurden zunächst Filterpapiere (Whatmann) in Transferpuffer getränkt, die PVDF-Membran jeweils einige Minuten in 100 %igem Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Schließlich wurde das Gel und die PVDF-Membran zwischen je zwei Filterpapiere in eine Filtermatte gelegt, so in die *Tankblot*-Apparatur eingespannt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 150 mA für 120 min.

Transferpuffer pH 8,5	192 mM Glycin
	25 mM Tris
	10 % Methanol

3.10.5 IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DER TRANSFERIERTEN PROTEINE

Nach dem *Westernblot*, wurde die PVDF-Membran 1 h in einer 5 % igen Milchpulver-Lösung inkubiert, dabei wurden die freien Proteinbindungsstellen abgesättigt und eine spezifische Antikörper-Bindung ermöglicht. Anschließend folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (siehe 3.5.1) in 5 % iger Milchpulver-Lösung für entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C je nach Herstellerangaben. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBST-Puffer, um ungebundene Antikörper zu entfernen, erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (siehe 3.5.2) für 1 h in TBST-Puffer bei Raumtemperatur. Die so markierten Proteine wurden nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer für je 10 min durch eine *horseradish peroxidase*-katalysierte Chemilumineszenzreaktion detektiert. Hierfür wurde das *ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe der Fusion Chemilumineszenzkamera (PeqLab).

TBS-Puffer pH 7,4	20 mM Tris
	140 mM NaCl
	10 mM EDTA
TBST-Puffer	0,1 % (v/v) Tween20 in TBS-Puffer
5 %ige Milchpulver-Lösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer

3.10.6 STRIPPEN DER PVDF-MEMBRAN

Um verschiedene Proteine auf einer Membran detektieren zu können, wurde die gebundenen Antikörper zunächst von der Membran gelöst. Dieser Vorgang wird als *stripping* bezeichnet. Dafür wurde die PVDF-Membran mit einem detergenzhaltigen *stripping*-Puffer für 20 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBST-Puffer gewaschen und erneut für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver-Lösung inkubiert. Daraufhin konnte die Membran mit einem neuen Primärantikörper markiert werden.

Stripping-Puffer pH 6,7	62,5 mM Tris
	2% (w/v) SDS
	0,7 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

3.11 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.11.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

Um DNA-Fragmente oder ganze Gene in großem Maßstab zu amplifizieren, wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli XL1 blue* (E-Coli) verwendet. E-Coli hat die Eigenschaft extrazelluläre DNA aufzunehmen (Transformation) und DNA in Form extrachromosomaler, zirkulärer Plasmide zu propagieren. Die transformierte Plasmid-DNA enthielt außerdem ein Abschnitt, der für eine Antibiotikaresistenz kodiert, so konnten erfolgreich-transformierte Bakterien in einem Wachstumsmedium selektiert werden. Eine Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium (s.u.). Zur Amplifikation der Bakterien wurden in der Regel 250 ml LB-Medium mit gepickten Bakterienklonen (siehe 3.11.2) oder mit aufgetauten Bakterien aus der Lagerung bei -80 °C in Einfriermedium (s.u.) angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm angezogen. Zur langfristigen Lagerung bei -80 °C wurden die Bakterien in Einfriermedium resuspendiert in Kryoröhrchen überführt und schockgefroren.

LB-Medium	171 mM NaCl
	10% (w/v) Trypton/Pepton
	5% (w/v) Hefeextrakt
Einfriermedium für Bakterien	25 % Glycerin in LB-Medium

3.11.2 TRANSFORMATION VON CHEMISCH-KOMPETENTEN BAKTERIEN

Für die Transformation chemisch kompetenter *E-Coli* mit Plasmid-DNA wurden diese auf Eis aufgetaut und für 1 Stunde mit 1 bis 10 ng Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 40 sek bei 42 °C im Thermoblock erhitzt. Die folgenden 5 min auf Eis dienten der Aufnahme der Plasmid-DNA. Danach folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde in 250 µl antibiotikafreiem SOC-Medium bei 37 °C. Im Anschluss wurden 100 µl der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten, welche mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt wurden, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kultivierung einzelner Bakterienklone wurden diese von der entsprechenden LB-Agarplatte gepickt und für die Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA (siehe 3.11.3) in 250 ml mit Ampicillin versetztem LB-Medium bei 37 °C über Nacht aerob kultiviert.

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-Agarplatten	171 mM NaCl
	1 % (w/v) Trypton/Pepton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1,5 % (w/v) Agar-Agar
	0,1 mg/ml Ampicillin

3.11.3 DNA-ISOLATION AUS BAKTERIEN

Nach der Amplifikation der transformierten oder aufgetauten E-Coli wurde die Plasmid-DNA isoliert. Hierfür wurde das *PureYield*TM Midiprep-Kit (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Aus 250 ml der Bakterienkultur, die über Nacht angezogen wurde, wurde nach dem *PureYield*TM Midiprep-Kit die isolierte Plasmid-DNA in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration wurde bestimmt.

3.11.4 DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem charakteristischen Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, photometrisch bestimmt. Um die Reinheit der Proben zu überprüfen und eventuelle Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, erfolgte außerdem eine Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Reine DNA hat ein Verhältnis E₂₆₀/E₂₈₀ von 1,7 bis 1,9. Für die Berechnung der DNA wurde zugrunde gelegt, dass ~50 µg doppelsträngige DNA/ml eine Absorption von 1 aufweisen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Spektrophotometers *NanoDrop 1000* (Peqlab).

3.12 STATISTIK

Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) inklusive *Bonferroni's Multiple Comparison* Post-Hoc-Test statistisch analysiert. Alternativ wurden die Daten auch mittels *Student's t-Test* berechnet, wenn nur zwei Datengruppen vorhanden waren. Bei allen Werten mit mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) bestimmt und abgebildet. Zwei Datengruppen wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag (p-Wert < 0,05). Statistisch signifikant erhöhte Unterschiede wurden mit einem Stern (*) und signifikant reduzierte Unterschiede mit einer Raute (#) gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede wurden mit n.s. kenntlich gemacht. Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 7.0 verwendet.

4 ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Teil beschäftigt sich mit dem Einfluss verschiedener äußerer Faktoren - hauptsächlich aus der Nahrung - auf die Regulation der Aktivität von ADAM10 und -17. Der zweite Teil beinhaltet die Untersuchung des Einflusses von Insulin auf die Shedding-Aktivität sowie die weiterführende Untersuchung des Regulationsmechanismus und beschreibt die mögliche funktionelle Relevanz dieses Vorgangs. Schließlich werden erste Ergebnisse des Einflusses von Insulin auf die Aktivität der ADAMs in einem hypoxischen Mikromileu betrachtet. Der Einfluss der genannten Faktoren wurde in verschiedenen Zelllinien untersucht, die je nach Transfektionseffizienz, Expression von endogenen ADAM-Substraten oder physiologischer Relevanz herangezogen wurden.

4.1 EINFLUSS VON ÄUßEREN FAKTOREN AUF DIE REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS

Der Einfluss von äußeren Faktoren auf verschiedenste Krankheiten wie Krebserkrankungen, Typ-2-Diabetes mellitus oder neurodegenerative Erkrankungen wird schon lange und kontrovers diskutiert.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Ein erstes Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob die Substanzen Glutamat, Aluminium oder Glucose einen Einfluss auf die Regulation der Aktivität von ADAM10 und -17 besitzen.

4.1.1 GLUTAMAT HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS

Zahlreichen Studien zeigen einen Zusammenhang von Glutamat mit Tumorentwicklung und mit der Alzheimer-Krankheit auf.^{159,196} Das am häufigsten verwendete Glutamat, das Mononatriumglutamat (E621), ist das Salz der L-Glutaminsäure und liegt im Körper dissoziiert vor, daher wurde im Folgenden die Bedeutung von der L-Glutaminsäure auf die Aktivität von ADAM10 und -17 untersucht.

Um den Einfluss von L-Glutaminsäure auf die ADAM-Aktivität zu untersuchen und um zwischen den beiden bekanntesten Vertretern der Proteasen-Familie, ADAM10 und ADAM17, zu unterscheiden, wurden Shedding-Experimente mit alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppelten ADAM-Substraten durchgeführt. Das ADAM17-spezifische Substrat TGF-alpha (TGF- α -AP) und das ADAM10-spezifische Substrat Betacellulin (BTC-AP)

wurde jeweils in COS7-Zellen transfiziert. Wird das Substrat durch ADAM10 oder -17 von der Zelloberfläche abgespalten, wird die Ektodomäne und somit die alkalische Phosphatase in den Überstand freigesetzt, wo deren Aktivität photometrisch bestimmt werden kann. Die Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von L-Glutaminsäure (1-5 mM) für unterschiedliche Zeitspannen (10 min– 48 Stunden) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Überstand und im Zelllysat detektiert. Der prozentuale Anteil der im Überstand befindlichen AP-Aktivität von der Gesamt-Aktivität wurde für jede Probe bestimmt und zu dem Wert der unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die L-Glutaminsäure-behandelten Zellen wiesen keine veränderte Shedding-Aktivität nach 24 h auf, da kein Unterschied in der Substrat-Freisetzung festgestellt werden konnte, weder für das ADAM17-Substrat TGF- α -AP noch für das ADAM10-Substrat BTC-AP (Abbildung 6). Diese Beobachtung wurde sowohl in Kurzzeit-Versuchen mit einer Inkubationszeit von 10 min bis 4 h (nicht abgebildet) wie auch in Langzeit-Versuchen (24, 48 h) gemacht. Als Kontrolle wurden COS7-Zellen mit einem beschriebenen ADAM-Aktivator, dem Ionophor Ionomycin (IO) für 30 min stimuliert. IO bewirkt, mittels Ca^{2+} -Influx in das Zytoplasma und einer darauffolgenden Externalisierung von Phosphatidylserin an die äußere Zellmembran, eine Aktivierung von ADAM10 und -17¹² (unveröffentlichte Daten). Die IO-Stimulation bestätigte, dass die COS7-Zellen stimulierbar waren und L-Glutaminsäure unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 hatte (Abbildung 6).

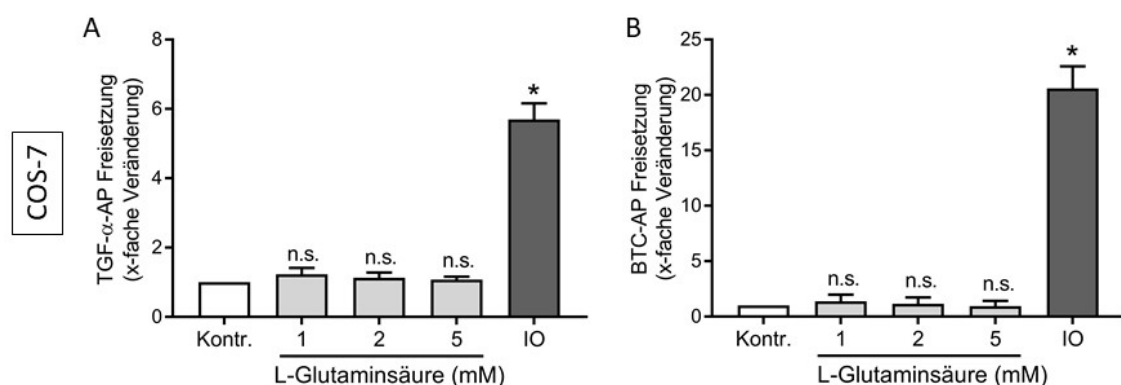


ABBILDUNG 6 - SHEDDING-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON L-GLUTAMINSÄURE AUF DIE REGULATION DER AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17.

COS7-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem TGF-alpha (TGF- α -AP; A) oder Betacellulin (BTC-AP; B) transfiziert und für 24 h mit 1-5 mM L-Glutaminsäure behandelt oder als Stimulationskontrolle für 30 min mit 1 μM Ionomycin (IO). Dargestellt ist die relative Shedding-Rate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* = signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (Kontr.) und n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; \pm SD; Bonfferoni-Test; *P \leq 0,05.

Weiterhin wurde die Freisetzung von den endogenen ADAM17-Substraten TGF- α in der Keratinozytenzelllinie HaCaT und TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) in der humanen Neuroglioma-Zelllinie H4 bestimmt. Dafür wurden die HaCaT- bzw. H4-Zellen mit L-Glutaminsäure (1-5 mM) behandelt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Menge der freigesetzten ADAM17-Substrate mittels ELISA in dem Überstand jeder Probe bestimmt und zu dem Wert der unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die getesteten L-Glutaminsäure-Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die ADAM17-vermittelte Substrat-Freisetzung, weder unter konstitutiven Bedingungen noch unter Stimulation durch Ionomycin (Abbildung 7 A, B). Zur vollständigen Untersuchung wurde schließlich die Aktivierung des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Signalwegs untersucht. Durch das ADAM17-vermittelte Shedding von EGFR-Liganden, können diese an den EGFR binden und dadurch die Aktivierung der ERK-Signalkaskade initiieren¹⁹⁷ (Abbildung 7 C). Um festzustellen, ob L-Glutaminsäure einen Einfluss auf die Aktivierung der ADAM17-abhängigen EGFR-Signalkaskade hat, wurden HaCaT-Zellen für 24 Stunden mit L-Glutaminsäure behandelt. Die Zelllysate wurden anschließend mittels *Westernblot*-Analyse mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die zwischen der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form von ERK unterscheiden. L-Glutaminsäure zeigte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von ERK, damit ist auszuschließen, dass L-Glutaminsäure die ADAM17-Aktivität beeinflusst (Abbildung 7 D). Marimastat (MM) ist ein Breitband-Metalloproteasen-Inhibitor und hemmt damit auch die ADAM17-Aktivität. In diesem Versuch diente MM als negative Kontrolle und demonstriert, dass die Phosphorylierung von ERK (pERK) unter inhibierter ADAM17-Aktivität reduziert ist (Abbildung 7 C, D).

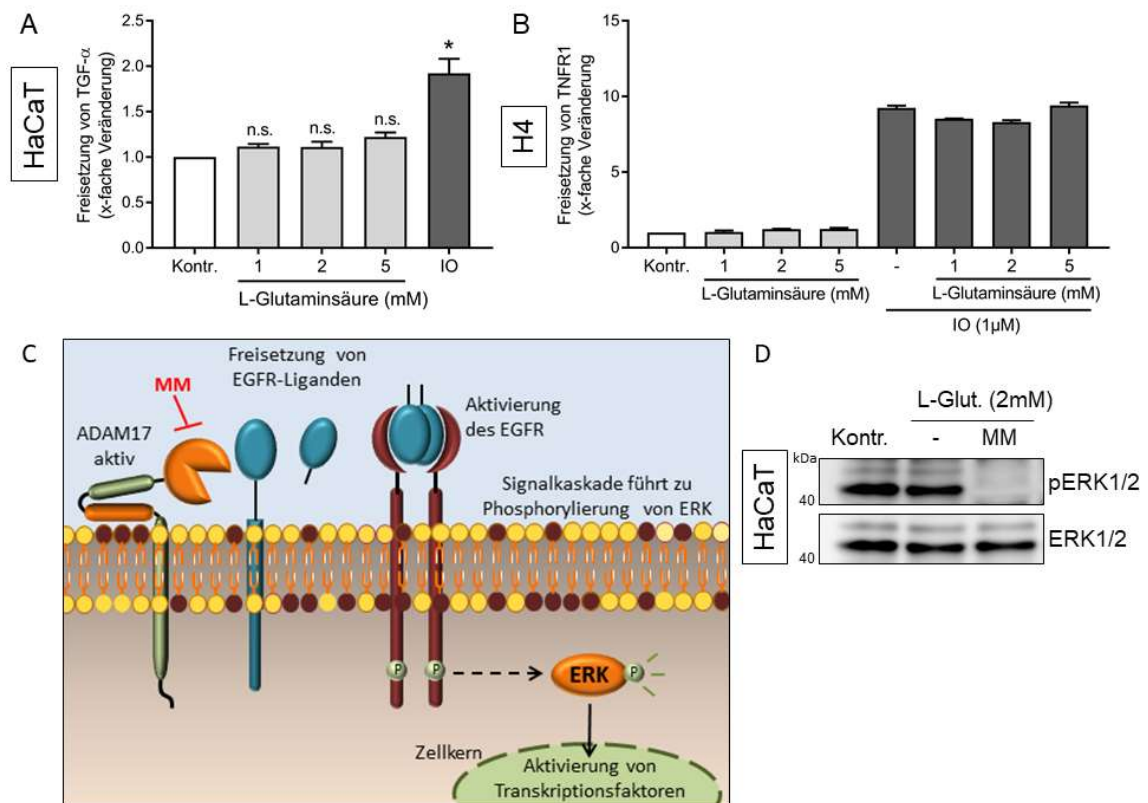


ABBILDUNG 7 - EXPERIMENTE ZUR ENDOGENEN SUBSTRATFREISETZUNG DURCH ADAM17 SOWIE ZUR AKTIVIERUNG DES EGF-REZEPTORS DURCH L-GLUTAMINSÄURE.

HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit 1-5 mM L-Glutaminsäure behandelt oder als Stimulationskontrolle für 30 min mit 1 μ M Ionomycin (IO). Die Freisetzung des endogenen ADAM17-Substrats TGF- α (TGF- α) wurde im Überstand mittels ELISA detektiert (A). Dargestellt ist die relative TGF- α -Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (Kontr.) und n.s. für eine nicht signifikante Veränderung. n = 3; \pm SD; Bonfferoni-Test; *P \leq 0,05.

Die Neuroglioma-Zelllinie H4 wurde für 24 h mit 1-5 mM L-Glutaminsäure behandelt und zusätzlich mit 1 μ M Ionomycin für 30 min stimuliert. Das endogene ADAM17-Substrat TNFR 1 wurde mittels ELISA im Überstand detektiert (B). Dargestellt ist die relative TNFR1-Freisetzung im Vergleich zur behandelten Kontrolle (Kontr.) als Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten. n=2; \pm SD.

Die schematische Darstellung der Signalkaskaden des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) zeigt die Aktivierung des Signalwegs. Aktives ADAM17 ist in der Lage EGFR-Liganden freizusetzen. Durch Marimastat (MM) kann die Aktivität von ADAM17 gehemmt werden. EGFR-Liganden vermitteln die Dimerisierung und intrazelluläre Autophosphorylierung des EGFR (P), dies aktiviert eine Proteinkaskade (gestrichelter Pfeil), welche letztlich zur Phosphorylierung von der MAP-Kinase ERK führt und schließlich zur Proliferation und Migration der Zelle (C).

HaCaT-Zellen wurden mit oder ohne 10 μ M Marimastat (MM) für 15 min vorbehandelt und anschließend für 24 h mit 2 mM L-Glutaminsäure (L-Glut.) inkubiert. Die Proben wurden mit einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit einem phospho-ERK- (pERK) oder ERK-Antikörper analysiert. Es ist ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten abgebildet (D).

In der Gesamtheit zeigten die Ergebnisse, dass L-Glutaminsäure unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 oder -17 hat.

4.1.2 DIE AKTIVITÄT DER ADAMS WIRD DURCH ALUMINIUM NICHT BEEINFLUSST

Ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Aluminium und der Alzheimer-Krankheit und mit der Inzidenz von Krebserkrankungen insbesondere von Brustkrebs wurde schon häufig diskutiert.^{160,198–200} Nicht zuletzt, da Aluminium die Haut sowie die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann und in Ablagerungen in Alzheimer-typischen Plaques in Gehirnen von Patienten gefunden wurde.²⁰¹ Aluminium-Verbindungen wie z.B. Aluminiumchlorid sind sowohl in fast allen Lebensmitteln enthalten als auch in Kosmetika wie Deodorants. Außerdem werden Aluminium-Verbindungen wie Aluminiumhydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$) als Adjuvans bei Impfungen verwendet, dabei stimuliert $\text{Al}(\text{OH})_3$ zusammen mit dem injizierten Immunogen die Immunantwort und regt somit die Antikörper-Produktion an.²⁰²

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob Aluminium-Verbindungen die ADAM-Shedding-Aktivität beeinflussen können.

Zunächst wurde der Einfluss von Aluminiumchlorid (AlCl_3) als Reinstoff und als Verbindung mit Maltol (AlCl_3 -Maltol) untersucht. AlCl_3 ist ein Bestandteil der Nahrung, dabei macht AlCl_3 0,2 bis 1,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht in der Woche aus, das entspricht für einen 60 kg schweren Erwachsenen einer täglichen Aufnahme von 1,7 bis 13 mg Aluminium.^{203,204} Verschiedene Konzentrationen von AlCl_3 wurden mittels Shedding-Experimenten getestet und zeigten keinen Einfluss auf die ADAM17-vermittelte Freisetzung von TGF- α -AP und auch nicht auf die ADAM10-vermittelte BTC-AP-Freisetzung in COS7-Zellen (Abbildung 8).

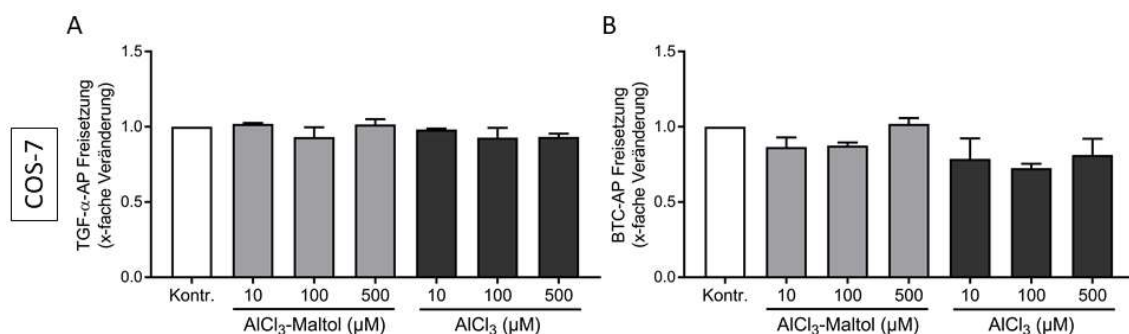


ABBILDUNG 8 - SHEDDING-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON ALUMINIUMCHLORID (AlCl_3) AUF DIE AKTIVITÄT VON ADAM10- UND -17.

COS7-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem TGF-alpha (TGF- α -AP; A) oder Betacellulin-AP (BTC-AP; B) transfiziert und für 24 h mit 10-500 μM AlCl_3 -Maltol oder AlCl_3 behandelt. Dargestellt ist die relative Shedding-Rate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.) als Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten. $n = 2$; \pm SD.

Weiterhin wurde der Einfluss von ImjectAlum™ auf die Shedding-Aktivität von ADAM10- und -17 untersucht. ImjectAlum™ besteht aus einer Suspension aus $\text{Al}(\text{OH})_3$ und Magnesiumhydroxide ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) und wird als Impf-Adjuvans verwendet.²⁰⁵ In COS7-Zellen war keine Veränderung der Aktivität zu beobachten: Sowohl die Freisetzung von TGF- α -AP als auch von BTC-AP blieb unverändert in ImjectAlum™-behandelten Zellen (Abbildung 9 A). In der neuronalen Zelllinie SHSY hingegen zeichnete sich ein inhibitorischer Trend ab: Die Freisetzung von TGF- α -AP sowie von BTC-AP war mit erhöhter ImjectAlum™-Konzentration verringert (Abbildung 9 B). Aufgrund des morphologisch-auffallenden Erscheinungsbildes der SHSY-Zellen, wurde der Versuch wiederholt und die Zellen wurden mit Hilfe des MTT-Tests auf Viabilität geprüft. Der MTT-Test zeigte, dass mit erhöhter ImjectAlum™-Konzentration die Zellviabilität abnahm (Abbildung 9 D). Damit war der vermeintlich inhibitorische Effekt von ImjectAlum™ auf die ADAM-Aktivität vermutlich auf die Zelltoxizität von ImjectAlum™ zurückzuführen. Die Zellviabilität der COS7-Zellen wurde ebenfalls unter ImjectAlum™ getestet. Hier konnte allerdings kein Effekt von ImjectAlum™ auf die Viabilität der Zellen festgestellt werden (Abbildung 9 C).

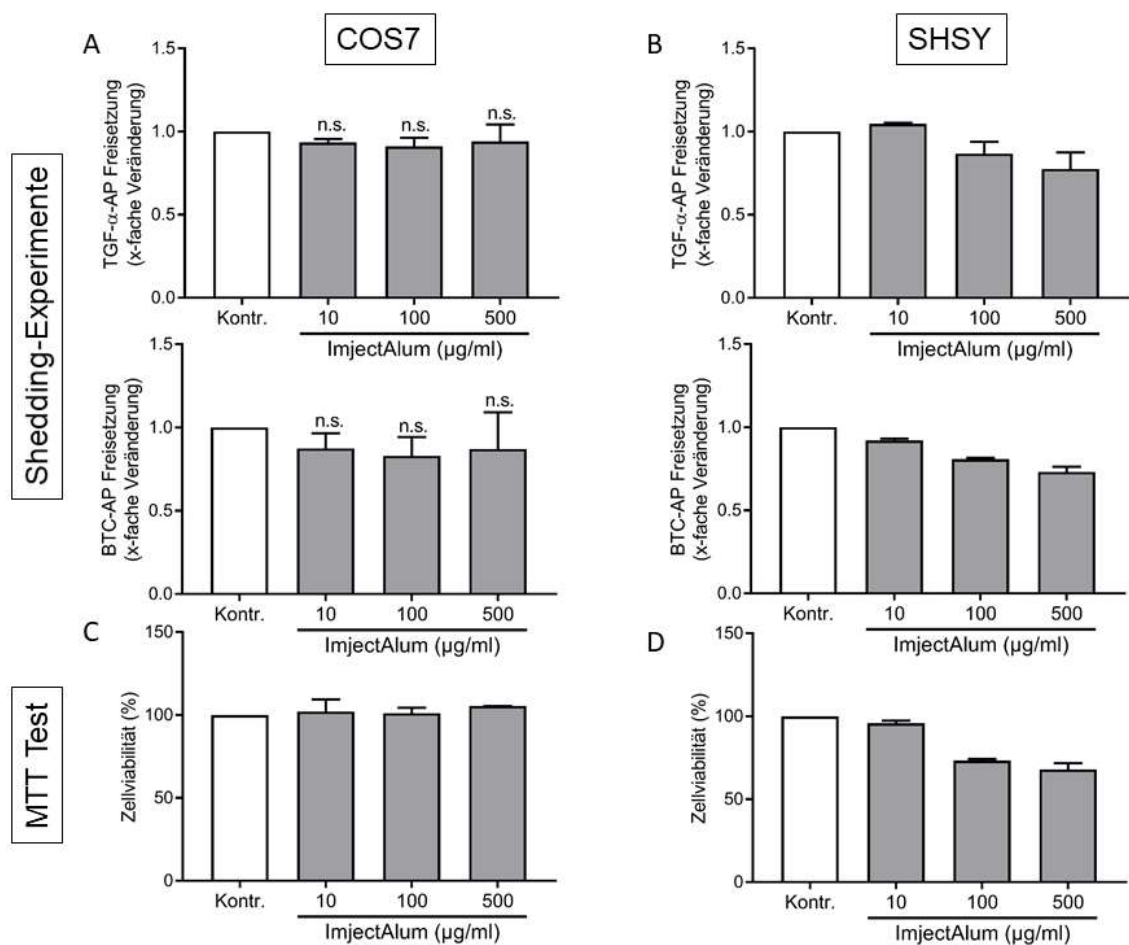


ABBILDUNG 9 - SHEDDING-EXPERIMENTE UND MTT-TESTS ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON IMJECTALUM™ AUF DIE AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17 SOWIE AUF DIE ZELLVIABILITÄT.

COS7- und SHSY-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem TGF-alpha (TGF- α -AP) oder Betacellulin- AP (BTC-AP) transfiziert und für 24 h mit 10-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ImjectAlumTM behandelt (A, B). Dargestellt ist die relative Shedding-Rate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.) als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (Kontr.) und n.s. für eine nicht signifikante Veränderung. n = 3; \pm SD; Bonfferoni-Test; *P \leq 0,05 (A); n = 2 (B).

Um eine zytotoxische Wirkung von ImjectAlumTM zu untersuchen, wurde ein Zellviabilitätsversuch (MTT-Test) durchgeführt (C, D).

Dargestellt ist die relative Zahl in Prozent (%) der lebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.) als Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten; n = 2.

In der Summe weisen die Experimente daraufhin, dass Aluminium-Verbindungen keinen Einfluss auf die ADAM-vermittelte Substratfreisetzung und damit auf die Shedding-Aktivität haben.

4.1.3 HOHE GLUCOSEKONZENTRATION FÜHRT ZU GESTEIGERTER PROTEINEXPRESSION DER ADAMs ABER NICHT ZU EINER ERHÖHTEN SHEDDING-AKTIVITÄT

Eine erhöhte Glucosekonzentration in Blut und Geweben - sogenannte Hyperglykämie - ist als Symptom bei Diabetes-Patienten beschrieben und gilt als wesentliche Ursache für Gewebsschäden während des Krankheitsverlaufs. Hyperglykämie ist daher als Risikofaktor mit vielen weiteren Erkrankungen wie Krebserkrankungen, koronaren Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der Alzheimer-Krankheit assoziiert.^{171,172}

Um eine Aussage über die Regulation der Aktivität der ADAM-Proteasen unter verschiedenen Glucosekonzentrationen, von der Hypoglykämie über die physiologischen Glucosekonzentration bis hin zu diabetischen Verhältnissen, treffen zu können, wurde in den folgenden Experimenten Glucosekonzentrationen von 0,55 bis 25 mM verwendet.²⁰⁶ Im Fokus standen die Auswirkungen auf die ADAM-Proteinexpression und der Einfluss auf die Shedding-Aktivität.

Da berichtet wurde, dass die ADAM17-mRNA-Expression in der Niere von Diabetes-Patienten erhöht ist,²⁰⁷ wurde zunächst die Expression von ADAM10 und -17 unter steigenden Glucosekonzentrationen (0,55-25 mM) mittels *Westernblot*-Analyse untersucht. Dabei war zu beobachten, dass die Proteinexpression beider Proteasen mit steigender Glucosekonzentration zunimmt (Abbildung 10 A). Diese Beobachtung wurde nach 24 und 48 h und in verschiedenen Zelllinien gemacht; hier ist beispielhaft die Proteinexpression nach 24 h in der neuronalen Zelllinie SHSY abgebildet. Es wurde eine erhöhte Proteinexpression der Pro-Form sowie der maturen Form von ADAM17 nachgewiesen. Bei ADAM10 konnte nur die Pro-Form, die bei etwa 100 kDa zu sehen

ist, abgebildet werden. Das Fehlen der maturen Form von ADAM10, die bei 70 kDa zu erwarten ist, ist vermutlich auf die Autoproteolyse von ADAM10 zurückzuführen, da kein ADAM10-spezifischer Inhibitor im Lysepuffer verwendet wurde.²⁰⁸ Die Pro-Form von ADAM10 wies bei steigender Glucosekonzentration, eine zunehmende Molekülmasse auf (Abbildung 10 A). Diese Beobachtung könnte auf eine erhöhte Glykosylierung von ADAM10 zurückzuführen sein. Das Phänomen der erhöhten Glykosylierung unter Hyperglykämie ist für viele Proteine in Diabetes-Patienten beschrieben. Dabei ist bemerkenswert, dass die meisten Proteine durch die Glykosylierung funktionell reguliert sind.^{209,210}

Daraufhin stellte sich die Frage, ob die erhöhte Proteinexpression beider Proteasen bzw. die veränderte Glykosylierung von ADAM10 einen Einfluss auf die Aktivität zur Folge hat. Es stellte sich jedoch mittels Shedding-Experimenten heraus, dass unterschiedliche Glucosekonzentrationen die Aktivität sowie von ADAM10 als auch von ADAM17 nicht beeinflussten (Abbildung 10 B).

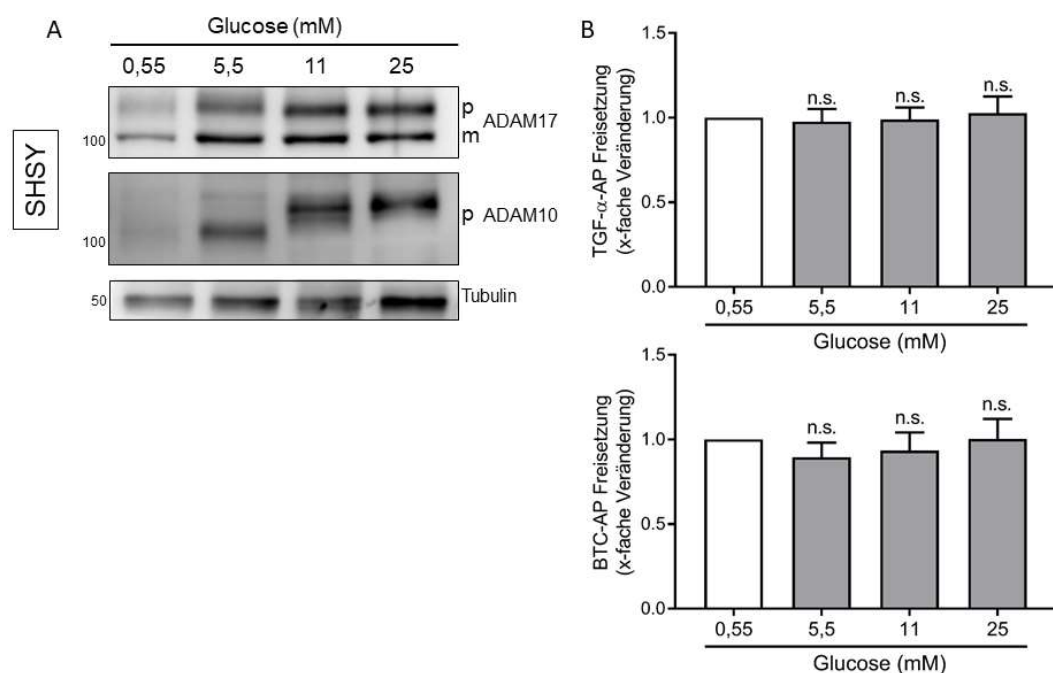


ABBILDUNG 10 - DETEKTION DER PROTEINEXPRESSION UND SHEDDING-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON GLUCOSE AUF DIE REGULATION DER AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17.

SHSY-Zellen wurden mit 0,55-25 mM Glucose für 24 h behandelt. Die Proben wurden mit einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit einem ADAM10-, ADAM17- oder Tubulin-Antikörper analysiert. Die Pro-Form (p) von ADAM10 und -17 und die mature (m) Form von ADAM17 waren zu detektieren. Die Tubulin-Färbung diente als Ladekontrolle.

Ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (A).

SHSY-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem TGF-alpha (TGF-α-AP) oder Betacellulin (BTC-AP) transfiziert und für 24 h mit 5,5-25 mM Glucose behandelt.

Dargestellt ist die relative Shedding-Rate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. n.s. = nicht signifikante Veränderung im Vergleich zu 0,55 mM Glucose. n = 3; ± SD; Bonferroni-Test; *p ≤ 0,05.

Es bleibt zu bemerken, dass eine erhöhte ADAM-Proteinexpression in diesem Fall nicht zu einer erhöhten Protease-Aktivität führt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Aktivität von ADAM10 und -17 primär durch einen anderen Mechanismus reguliert ist.

Im Zusammenhang mit diesen Experimenten wurde auch Insulin als Initiator der Glucoseaufnahme eingesetzt. Interessanterweise zeigte Insulin einen Einfluss auf die Aktivität der Proteasen ADAM10 und -17 und wurde daher weiterführend untersucht.

4.2 EINFLUSS VON INSULIN AUF DIE REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS

Insulin ist der wichtigste Regulator der Glucose-Homöostase im Körper, daher können kleinste Abweichungen der Insulinproduktion oder in dem Insulin-Signalweg zu verheerenden Folgen führen; das prominenteste Beispiel ist die Entwicklung von Diabetes mellitus.^{211,212} Eine Vielzahl von äußeren Faktoren sind mit der Entstehung von Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) assoziiert wie z.B. eine hochkalorische Ernährung, eine erhöhte Menge an Fettgewebe und geringe körperliche Aktivität^{171,213} und können zu einer verringerten Insulinrezeptorsensitivität auch Insulinresistenz genannt führen.^{188,212} Die verminderte Glucose-Aufnahme der Zellen durch die Insulinresistenz führt zu einer erhöhten Insulinproduktion durch die β -Zellen im Pankreas. Dieses Phänomen wird auch als Hyperinsulinämie bezeichnet.²¹³ Nach langfristiger gestörter Insulinregulation kommt es zu T2DM, das wiederum als Risikofaktor mit einer Vielzahl von Folge-Krankheiten assoziiert ist, wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit, Krebs- und koronaren Herz-Kreislaufkrankungen.^{171,172,214}

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Frage in den Mittelpunkt gestellt, ob und in welcher Weise Insulin die Aktivität von ADAM10 und -17 beeinflusst. Im Fokus standen hierbei aufgrund der physiologischen Relevanz vor allem die Leberkarzinom-Zelllinie HepG2.

4.2.1 INSULIN FÜHRT ZU EINER ERHÖHTEN FREISETZUNG VON ADAM-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN

Zunächst galt es die Frage nach der Regulation der Shedding-Aktivität von ADAM17 unter Insulin zu beantworten. Dafür wurden HepG2-Zellen mit dem ADAM17-spezifischen Substrat TGF- α -AP transfiziert und für unterschiedliche Zeitspannen (10 min, 30 min, 1 h, 2 h) mit 100 nM Insulin inkubiert. Insulin bindet innerhalb kürzester Zeit (< 5 min) an den Insulinrezeptor und initiiert verschiedene Signalkaskaden.²¹² Eine signifikante Erhöhung der TGF- α -AP-Freisetzung wurde nach 30 min Inkubationszeit erreicht (Abbildung 11 A), die sich über längere Inkubationszeiten nicht weiter veränderte (1 h und 2 h; Daten nicht abgebildet). Daher wurden fortan 30 min als Inkubationszeit verwendet. Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Vorgang um ein Zelltyp-abhängiges Phänomen handelt, wurden Zelllinien mit unterschiedlichen Ursprüngen verwendet, wie die kolorektale Zelllinie HT29 oder die Neurogliom-Zelllinie H4. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Insulin-Konzentrationen für 30 min behandelt und mittels ELISA wurde die Freisetzung von dem endogenen ADAM17-Substrat TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) im Zellüberstand bestimmt (Abbildung 11 B-D). Es war zu beobachten, dass die Substrat-Freisetzung mit zunehmender Insulinkonzentration anstieg. Damit ließen die Experimente vermuten, dass Insulin wie bei den HepG2-Zellen die Aktivität von ADAM17 konzentrationsabhängig stimuliert und zeigten, dass 100 nM Insulin ausreichen, um eine signifikante Erhöhung der Freisetzung von TNFR1 durch ADAM17 zu initiieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen Zelltyp-unabhängigen Vorgang handelte, da der Effekt in allen verwendeten Zelllinien zu beobachten war. Es stellte sich nun die Frage, ob auch die Freisetzung von ADAM10-spezifischen Substraten durch Insulin beeinflusst wird.

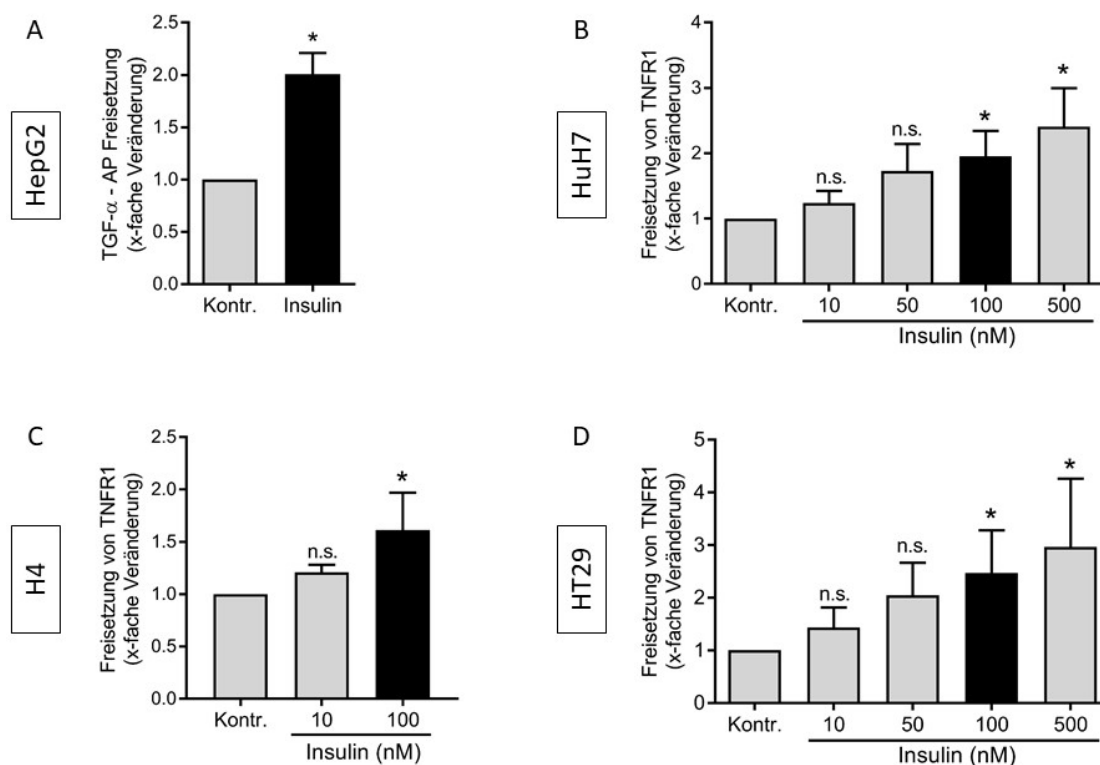


ABBILDUNG 11 - INSULIN INDUZIERT KONZENTRATIONSBABHÄNGIG DIE FREISETZUNG VON ADAM17-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN

HepG2-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem TGF-alpha (TGF- α -AP) transfiziert und für 30 min mit 100 nM Insulin inkubiert. Dargestellt ist die relative Shedding-Rate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (A). HuH7-, H4-, und HT29-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Insulin (10-500 nM) für 30 min inkubiert und die Konzentration des freigesetzten TNF-Rezeptors 1 (TNFR1) im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung des TNFR1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (B-D). * = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; * $p \leq 0,05$.

Für die Untersuchung des Einflusses von Insulin auf die Freisetzung von ADAM10-spezifischen Substraten, wurden zunächst HepG2-Zellen mit Betacellulin-AP transfiziert und für 30 min mit 100 nM Insulin behandelt. Nach der Inkubationszeit konnte eine signifikante Erhöhung der Freisetzung von Betacellulin-AP durch ADAM10 gemessen werden (Abbildung 12 A). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass auch die Protease ADAM10 durch Insulin aktiviert wird. Zur genaueren Untersuchung wurde die Freisetzung des endogenen ADAM10-Substrates Fraktalkin unter verschiedenen Insulinkonzentrationen (10-500 nM) im Überstand detektiert. Ansteigende Insulinkonzentration führte zu erhöhter Freisetzung von Fraktalkin (Abbildung 12 B). Bei den Experimenten stellte sich heraus, dass für eine signifikante Erhöhung der Fraktalkin-Freisetzung 50 nM Insulin genügt. Um eine ausreichende Menge an freigesetztem Substrat beider Proteasen zu gewährleisten, wurden die Zellen in den folgenden Experimenten mit 100 nM Insulin stimuliert.

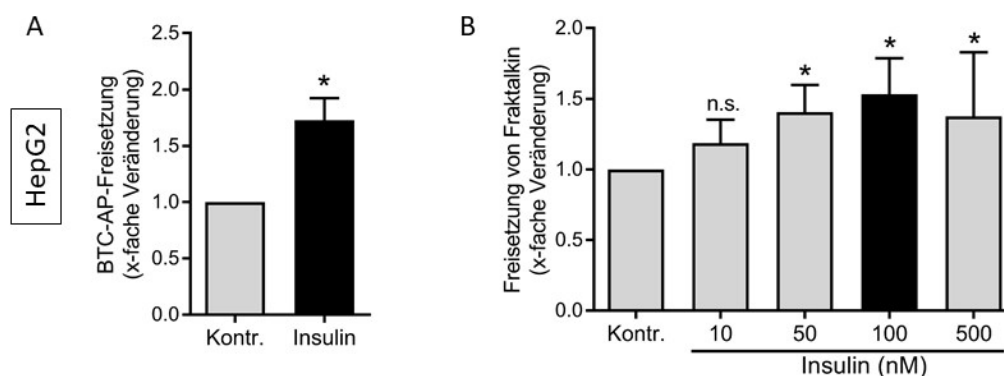


ABBILDUNG 12 - INSULIN INDUZIERT KONZENTRATIONSBHÄNGIG DIE FREISETZUNG VON ADAM10-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN

HepG2-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Betacellulin (BTC-AP) transfiziert und für 30 min mit 100 nM Insulin inkubiert. Dargestellt ist die relative Shedding-Rate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (A). HepG2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Insulin (10-500 nM) für 30 min inkubiert und die Konzentration des freigesetzten Fraktalkin im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (B). * = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; * $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend war festzuhalten, dass sowohl ADAM17- als auch ADAM10-Substrate unter Insulinbehandlung freigesetzt werden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Proteasen unter Insulinbehandlung aktiviert werden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden in folgenden Experimenten ADAM-Inhibitoren verwendet.

4.2.2 INSULIN AKTIVIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS

Prinzipiell können Substrate unter bestimmten Bedingungen auch von unterschiedlichen Proteasen geschnitten werden. Beispielsweise wurde Fraktalkin sowohl als Substrat von ADAM10 als auch von ADAM17 beschrieben.²¹⁵ Um zu untersuchen, ob die beobachtete gesteigerte Substrat-Freisetzung unter Insulin durch die Aktivität von ADAM10 und -17 vermittelt wurde, wurden verschiedene ADAM-Inhibitoren eingesetzt. Die Wirkung dieser Inhibitoren gab Aufschluss darüber, welche Proteasen tatsächlich bei der Freisetzung der endogenen Substrate involviert waren. Es wurden Marimastat (MM), ein Breitband-Metalloproteasen-Inhibitor, ein ADAM10 und -17 Inhibitor (GW) und ein präferenzialer ADAM10-Inhibitor (GI) verwendet. Die Insulin-induzierte Fraktalkin-Freisetzung in den HepG2-Zellen war signifikant reduziert unter Verwendung von Marimastat, GW und GI (Abbildung 13 A). Der inhibitorische Effekt von GI, dem ADAM10-Inhibitor, war vergleichbar mit dem Effekt von Marimastat bzw. GW. Diese

Beobachtung zeigte, dass ADAM10 hauptsächlich für die Freisetzung von Fraktalkin unter Insulin-Stimulation verantwortlich ist.

Die Insulin-induzierte Freisetzung von TNFR1 in den HuH7-, H4- und HT29-Zellen wurde unter Verwendung von Marimastat und GW signifikant gehemmt, nicht aber unter dem ADAM10-Inhibitor GI (Abbildung 13 B-D). Die Ergebnisse gaben Aufschluss darüber, dass ADAM10 bei der Freisetzung von TNFR1 unter Insulin-Stimulation keine Rolle spielt. Weiterhin konnte man sagen, dass die Aktivität von ADAM17 durch Insulin aktiviert wird.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass GW einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt wie Marimastat in HuH7-Zellen hatte und in diesem Kontext vermutlich die hauptverantwortliche Metalloprotease ist. In den H4- und HT29-Zellen hingegen hatte Marimastat einen stärkeren inhibitorischen Effekt als GW, was darauf schließen ließ, dass noch andere Metalloproteasen an der Freisetzung von TNFR1 unter Insulin in diesen Zelltypen involviert sein könnten.

Durch den Einsatz der Inhibitoren ließ sich für die Insulin-induzierte Freisetzung von endogenen Substraten zusammenfassend sagen, dass Fraktalkin von ADAM10 und TNFR1 durch ADAM17 freigesetzt wird.

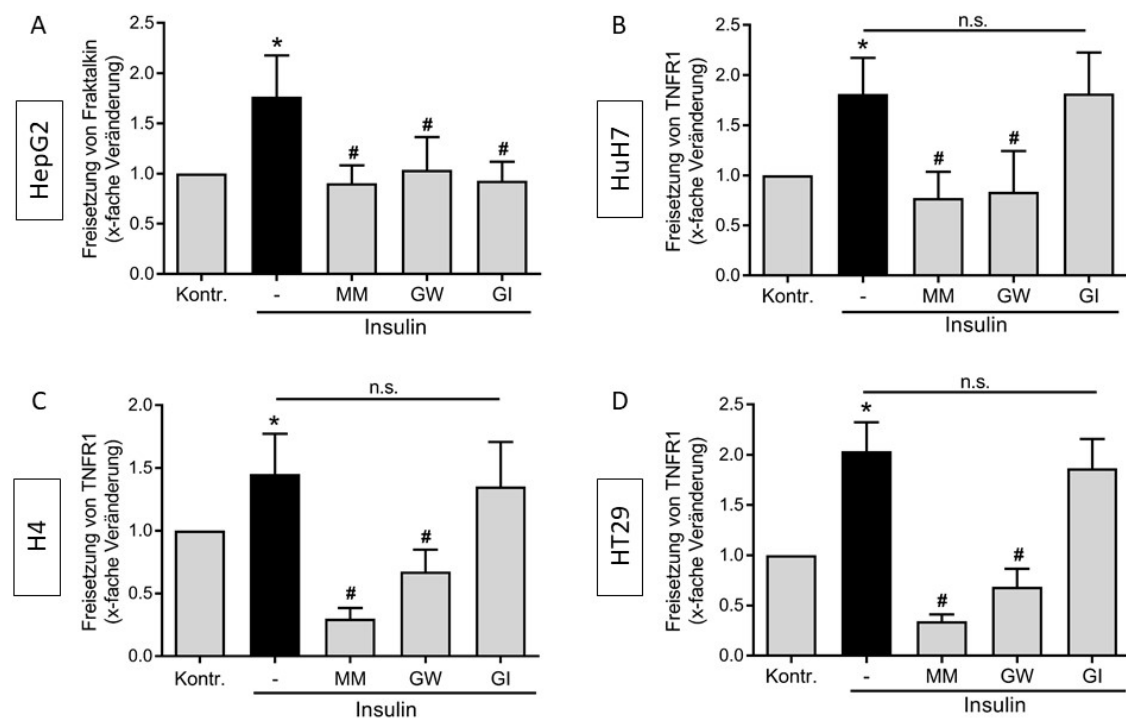


ABBILDUNG 13 - ADAM-INHIBITOREN HEMMEN DIE INSULIN-INDUZIERTE FREISETZUNG VON SUBSTRATEN

HepG2-, HuH7-, H4- und HT29-Zellen wurden jeweils mit Marimastat (MM; 10 μ M), dem ADAM10 und -17-Inhibitor GW280264X (GW; 3 μ M) oder dem ADAM10-Inhibitor GI254023X (GI; 3 μ M) für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Die Konzentration des freigesetzten Fraktalkin (A) bzw. des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1; B-D) wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin bzw. TNFR1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.) als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); # = signifikante Reduktion im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (ohne Inhibitor); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; * $p \leq 0,05$.

4.2.3 INSULIN AKTIVIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG

Nachdem gezeigt wurde, dass Insulin die Aktivität von ADAM10 und -17 reguliert, wurde nun der Signalweg dieses Vorgangs näher untersucht.

Der Insulin-Signalweg beginnt mit der Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor, das führt zu Rezeptor-Dimerisierung und zu einer intrazellulären Autophosphorylierung des Rezeptors. Daraufhin wird das Insulinrezeptorsubstrat (IRS) phosphoryliert und *downstream* werden unterschiedliche Signalkaskaden initiiert. Einer der wichtigsten Signalkaskaden in Bezug auf die Glucose-Homöostase ist der sogenannte PI3K/AKT-Signalweg. Dieser Signalweg ist über die Aktivierung der PI3K vermittelt, die wiederum über mehrere Adapterproteine zur Phosphorylierung von AKT (pAKT) führen. Phosphoryliertes AKT führt schließlich zur Translokation von Glucose-Transportern an die Zelloberfläche und damit zur Regulation des Glucose-Haushalts (siehe Abbildung 4). Daher wurde der PI3K/AKT-Signalweg im Hinblick auf die Regulation der ADAMs durch Insulin angenommen. Um dies zu überprüfen wurde Wortmannin (WM), ein PI3K-Inhibitor verwendet. Zur Kontrolle einer ausreichenden Inhibition von PI3K durch Wortmannin, wurde die Phosphorylierung von dem *downstream*-regulierten Protein AKT mittels *Westernblot*-Analyse detektiert. Unter Insulinstimulation war eine eindeutige Zunahme der Phosphorylierung von AKT in den Zelllinien HepG2, HuH7 und HT29 zu detektieren (Abbildung 14 A-C). Bei gleichzeitigem Einsatz von Wortmannin und Insulin konnte in allen Zelllinien eine eindeutige Reduktion der Phosphorylierung von AKT beobachtet werden (Abbildung 14 A-D). In den H4-Zellen war schon in der unbehandelten Kontrolle eine hohe Phosphorylierung von AKT zu beobachten, sodass es unter Insulin zu keiner weiteren eindeutigen Zunahme der Phosphorylierung von AKT kam (Abbildung 14 D). Daher konnte eine Aktivierung des Insulin-Signalwegs in den H4-Zellen nicht eindeutig

nachgewiesen werden und die Zellen wurden in den folgenden Experimenten nicht weiterverwendet.

Neben der Proteindetektion, wurde außerdem die Freisetzung der endogenen Substrate von ADAM10 bzw. -17 im Überstand der Zellen gemessen. Hier zeigte sich, dass die Freisetzung der Substrate unter Insulin bei gleichzeitiger PI3K-Inhibition in allen getesteten Zelllinien signifikant reduziert war (Abbildung 14 E-H).

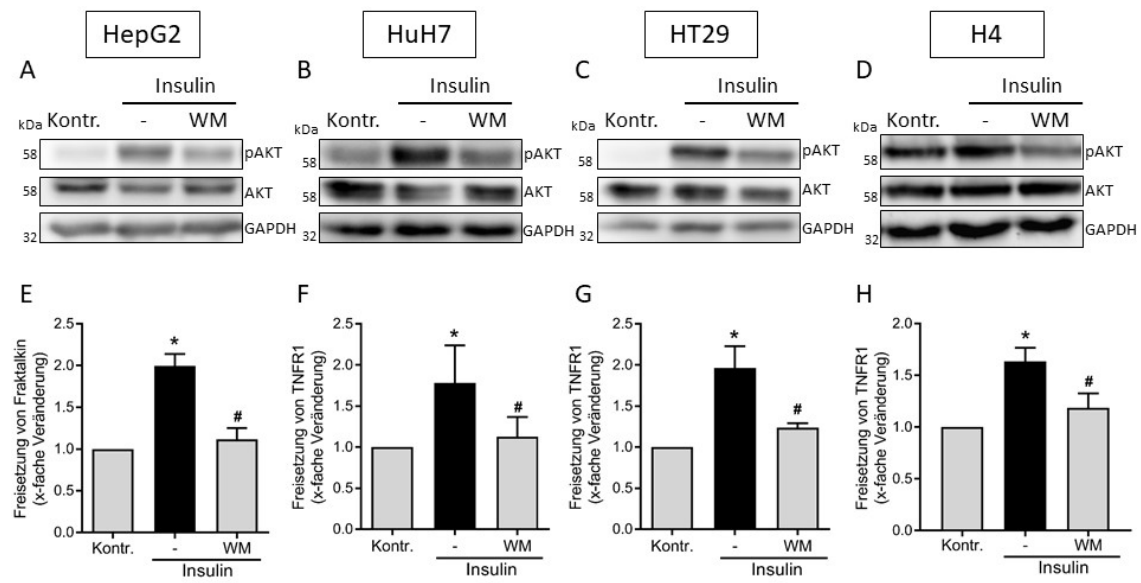


ABBILDUNG 14 – INSULIN AKTIVIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM 10 UND -17 ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG

HepG2-, HuH7-, HT29- und H4-Zellen wurden mit oder ohne Wortmannin (WM; 50 nM) für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Die Proben wurden mit einer 10% -igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von AKT und dessen Phosphorylierungsstatus (pAKT) wurden mittels *Westernblot*-Analyse detektiert. Die AKT- und die GAPDH-Färbung dienten als Ladekontrollen.

Ein repräsentativer *Westernblot* von jeweils drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (A-D).

Die Konzentration des freigesetzten Fraktalkins (E) bzw. des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1; F-H) im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin bzw. TNFR1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); # = signifikante Reduktion im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (ohne Inhibitor). n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und post hoc-Tests; *p ≤ 0,05.

Der Einsatz des PI3K-Inhibitors Wortmannin lieferte erste Erkenntnisse, dass der Mechanismus der Insulin-induzierten Aktivität von ADAM10 und -17 über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert sein könnte.

4.2.4 INSULINRESISTENZ VERHINDERT DIE STIMULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DURCH INSULIN

Um den Aktivierungsmechanismus noch eingehender zu untersuchen, wurde neben dem PI3K-Inhibitor Wortmannin, auch ein zelluläres Insulinresistenz-Modell etabliert. Dieses Modell bot die Möglichkeit, den Mechanismus in einem physiologischeren Kontext, ohne den Einsatz von synthetischen Inhibitoren, zu untersuchen. Die Zellen wurden dafür mit Insulin (Insulinresistenz) oder zur Kontrolle mit Medium ohne Zusätzen (insulinsensitiv) für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut für 30 min mit Insulin stimuliert. Um die Insulinresistenz zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung von AKT mittels *Westernblot*-Analyse detektiert. In den insulinsensitiven Zellen kam es zu einer Erhöhung der AKT-Phosphorylierung unter Insulin, während in den insulinresistenten Zellen keine Phosphorylierung von AKT durch Insulinstimulation möglich war (Abbildung 15 A-C). Weiterhin wurde die Proteinexpression der Pro-Form (p) sowie der maturen Form (m) von ADAM10 (A10) und ADAM17 (A17) überprüft. Hier war keine Veränderung der Expression in insulinresistenten Zellen zu beobachten (Abbildung 15 A-C). Damit konnte eine veränderte Regulation der Shedding-Aktivität basierend auf einer beeinflussten Proteinexpression der Proteasen unter Insulinresistenz ausgeschlossen werden. Schließlich wurde die Expression des Insulinrezeptors β (IR β) detektiert. Interessanterweise konnte man eine verminderte Proteinexpression des Insulinrezeptors β in den insulinresistenten Zellen feststellen (Abbildung 15 A-C). Die verminderte Proteinexpression des Insulinrezeptors β könnte eine Folge der Langzeitinkubation mit Insulin sein und damit gleichzeitig zu der Entwicklung der Insulinresistenz beitragen.

Um zu überprüfen welche Auswirkungen die Insulinresistenz auf die Shedding-Aktivität der ADAMs hatte, wurde auch die Freisetzung der endogenen Substrate von ADAM10 bzw. -17 im Überstand der Zellen gemessen. Hierbei war zu beobachten, dass die Freisetzung der Substrate unter Insulinstimulation in insulinsensitiven Zellen signifikant erhöht war, während in insulinresistenten Zellen keine Erhöhung der Substratfreisetzung unter Insulinstimulation gemessen werden konnte (Abbildung 15 D-F). Diese Ergebnisse unterstrichen die vorherigen Beobachtungen, die zeigten, dass die Insulin-induzierte Stimulation der Aktivität über AKT reguliert ist.

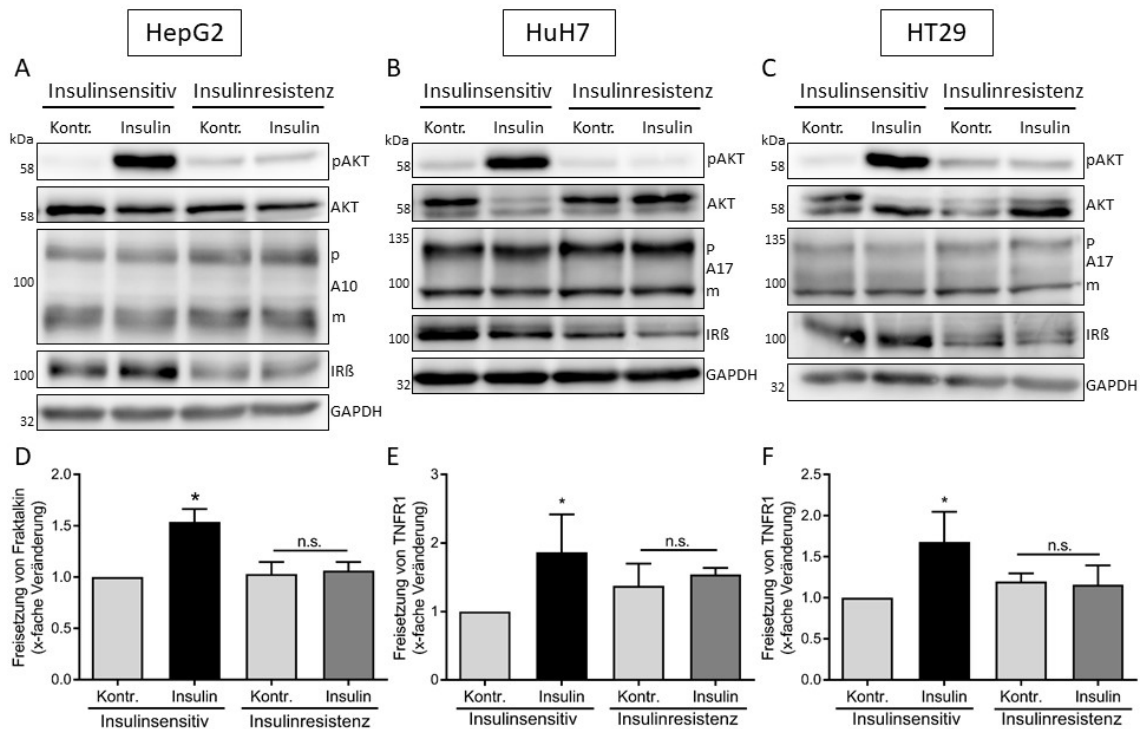


ABBILDUNG 15 - INSULINRESISTENZ VERHINDERT DIE STIMULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17 DURCH INSULIN

HepG2-, HuH7- und HT29-Zellen wurden jeweils mit 100 nM Insulin für 24 h inkubiert um Insulinresistenz zu induzieren. Zur Kontrolle wurden Zellen in Kulturmedium ohne Zusätze für 24 h inkubiert (Insulinsensitiv). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Die Proben wurden mit einer 10% -igen *SDS-PAGE* aufgetrennt und die Expression von AKT, dessen Phosphorylierungsstatus (pAKT) sowie die Expression ADAM10 (A10), ADAM17 (A17) und dem Insulinrezeptor β (IR β) wurden mittels *Westernblot*-Analyse detektiert. Von ADAM10 und -17 sind jeweils die Pro-Form (p) und mature Form (m) detektiert worden. Die AKT- und die GAPDH-Färbungen dienen als Ladekontrollen.

Ein repräsentativer *Westernblot* von jeweils drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (A-C).

Die Konzentration des freigesetzten Fraktalkin (D) bzw. des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1; E-G) im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin bzw. TNFR1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und post hoc-Tests; * $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend wurde durch den Einsatz eines synthetischen Inhibitors sowie durch die Verwendung eines zellulären Insulinresistenz-Modells gezeigt, dass der Mechanismus, der zu der Insulin-induzierten Shedding-Aktivität der ADAMs führt über den Insulinrezeptor β , die PI3K-Aktivität und die Phosphorylierung von AKT reguliert ist.

4.2.5 INSULIN INDUZIERT DIE EXTERNALISIERUNG VON PHOSPHATIDYLSERIN

In jüngster Zeit wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neuer Aktivierungsmechanismus von ADAM10 (unveröffentlichte Daten) und ADAM17¹² beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass positiv-geladene Regionen der Domänen der Proteasen ADAM10 und -17 mit dem negativ-geladenen Phosphatidylserin extrazellulär an der Plasmamembran interagieren, wodurch der Shedding-Vorgang initiiert wird. In den Studien wurden verschiedene beschriebene ADAM-Stimulanzen wie Ionomycin, PMA, Melittin oder der *Fibroblast growth factor 7* untersucht und es wurde gezeigt, dass es unter all diesen Stimulanzen zu einer temporären Externalisierung von Phosphatidylserin kommt.¹²

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Externalisierung von Phosphatidylserin auch bei der Aktivierung der ADAMs durch Insulin involviert ist. Dabei wurde der Fokus auf die Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 gelegt, da diese wie oben erwähnt von physiologischer Relevanz ist.

Zunächst wurden HepG2-Zellen mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (10-500 nM) behandelt und mit Annexin V, das spezifisch an extrazelluläres Phosphatidylserin bindet und mit einem rot-fluoreszierenden Marker (Alexa 568) gekoppelt ist, gefärbt. Simultan mit steigender Insulinkonzentration nahm dabei auch die rot-fluoreszierende Fläche der AnnexinV-Färbung zu (Abbildung 16 A, B). Diese Beobachtung zeigte, dass unter Insulinbehandlung der Gehalt an Phosphatidylserin an der äußeren Plasmamembran der HepG2-Zellen zunahm. Eine Erhöhung der Phosphatidylserin-Externalisierung unter Insulinbehandlung konnte auch in den anderen Zelllinien HuH7 und HT29 beobachtet werden (Abbildung 16 C, D).

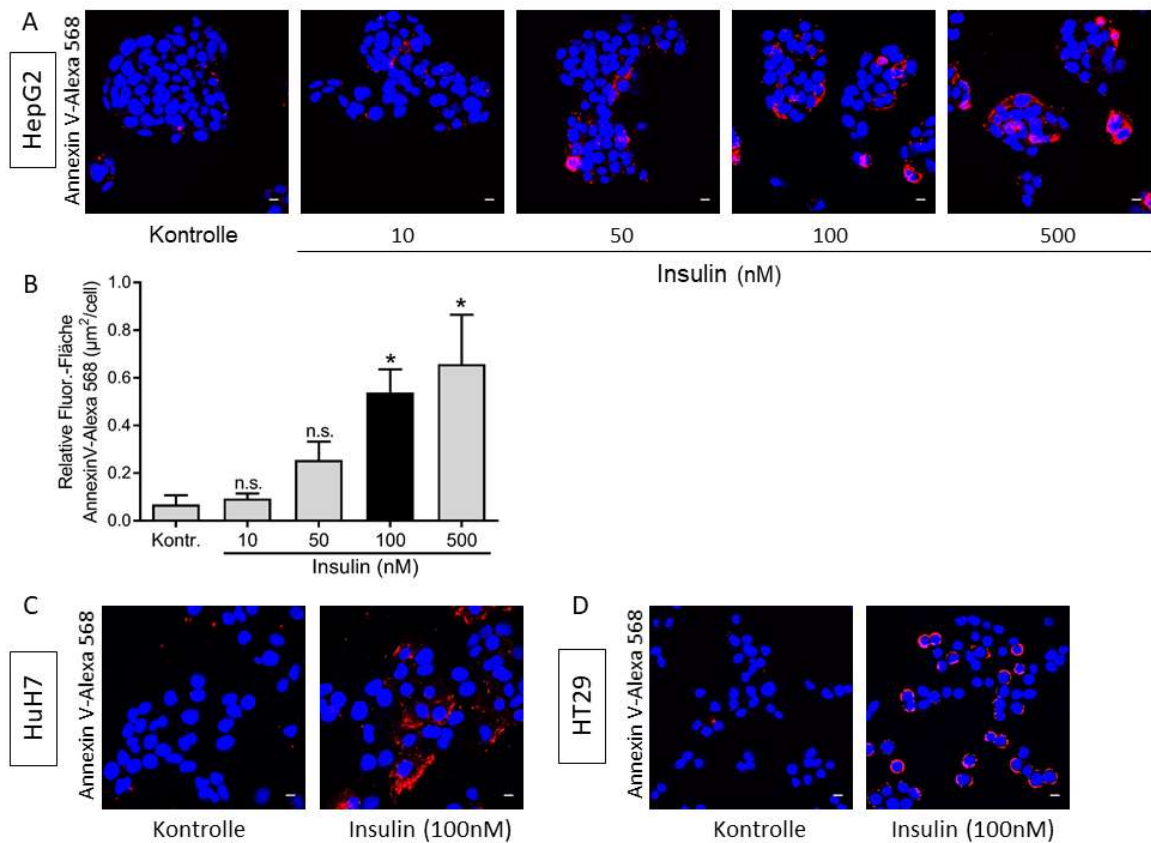


ABBILDUNG 16 – INSULIN INDUZIERT KONZENTRATIONSABHÄNGIG DIE EXTERNALISIERUNG VON PHOSPHATIDYLSERIN

HepG2-Zellen wurden mit 10-500 nM Insulin für 30 min behandelt und mit AnnexinV-568 (rot) sowie mit DAPI (blau) gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten (A). Phosphatidylserin ist rot markiert und die Zellkerne sind blau dargestellt.

Die Fluoreszenzfläche der AnnexinV-568-Färbung wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt und zu der Anzahl der Zellen relativiert.

Dargestellt ist die relative Fluoreszenzfläche (Rel. Fluor.-Fläche) von AnnexinV-568 als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (B).

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; * $p \leq 0,05$.

HuH7- und HT29-Zellen wurden jeweils mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert und mit AnnexinV-568 (rot) sowie mit DAPI (blau) gefärbt und wie oben beschrieben detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten (C, D). Der Maßstabsbalken zeigt 10 μm .

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Externalisierung von Phosphatidylserin durch Insulin konzentrationsabhängig hervorgerufen wird. In vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass ADAM10- und ADAM17-spezifische Substrate unter Insulin konzentrationsabhängig freigesetzt wurden (siehe 4.2.1). Diese zwei Beobachtungen lassen vermuten, dass die Externalisierung von Phosphatidylserin unter Insulin bei der Aktivierung der Proteasen eine Rolle spielen könnte.

4.2.6 INSULIN-INDUZIERTE PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG IST ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG REGULIERT

Um den Zusammenhang von der Insulin-induzierten ADAM-Aktivierung und der gleichzeitigen Externalisierung von Phosphatidylserin weiter zu untersuchen, wurde die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs auch für die Externalisierung von Phosphatidylserin analysiert.

Zu diesem Zweck wurden die HepG2-Zellen mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin behandelt und der Gehalt von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche bestimmt. Es zeigte sich, dass der Phosphatidylserin-Gehalt an der Zelloberfläche durch die Inhibition von PI3K unter Insulin im Vergleich zu der Stimulationskontrolle (Insulin ohne Inhibitor) signifikant reduziert war (Abbildung 17 A, B). Dieses erste Ergebnis ließ vermuten, dass der PI3K/AKT-Signalweg auch für die Externalisierung von Phosphatidylserin unter Insulin eine zentrale Rolle spielt.

Zur weiteren Untersuchung wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin unter Insulin in insulinresistenten HepG2-Zellen gemessen. Dafür wurde das Insulinresistenz-Modell verwendet: In den Zellen wurde wie zuvor beschrieben Insulinresistenz induziert (siehe 4.2.4) und die Externalisierung von Phosphatidylserin wurde bestimmt. Während in insulinsensitiven Zellen eine signifikante Erhöhung des Phosphatidylserin-Gehalts durch Insulinstimulation zu messen war, konnte hingegen bei insulinresistenten Zellen keine Veränderung des Phosphatidylserin-Gehalts durch die Stimulation mit Insulin detektiert werden (Abbildung 17 C, D). Diese Ergebnisse unterstrichen die vorherige Beobachtung und bestätigten die zentrale Rolle des PI3K/AKT-Signalwegs für die Externalisierung von Phosphatidylserin unter Insulinstimulation.

An diesem Punkt war festzustellen, dass nicht nur die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17, sondern auch die Externalisierung von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche durch Insulin induziert werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide Vorgänge über denselben PI3K/AKT-Signalweg reguliert sind. Nun war zu beweisen, dass diese beiden Vorgänge auch kausal miteinander verbunden sind.

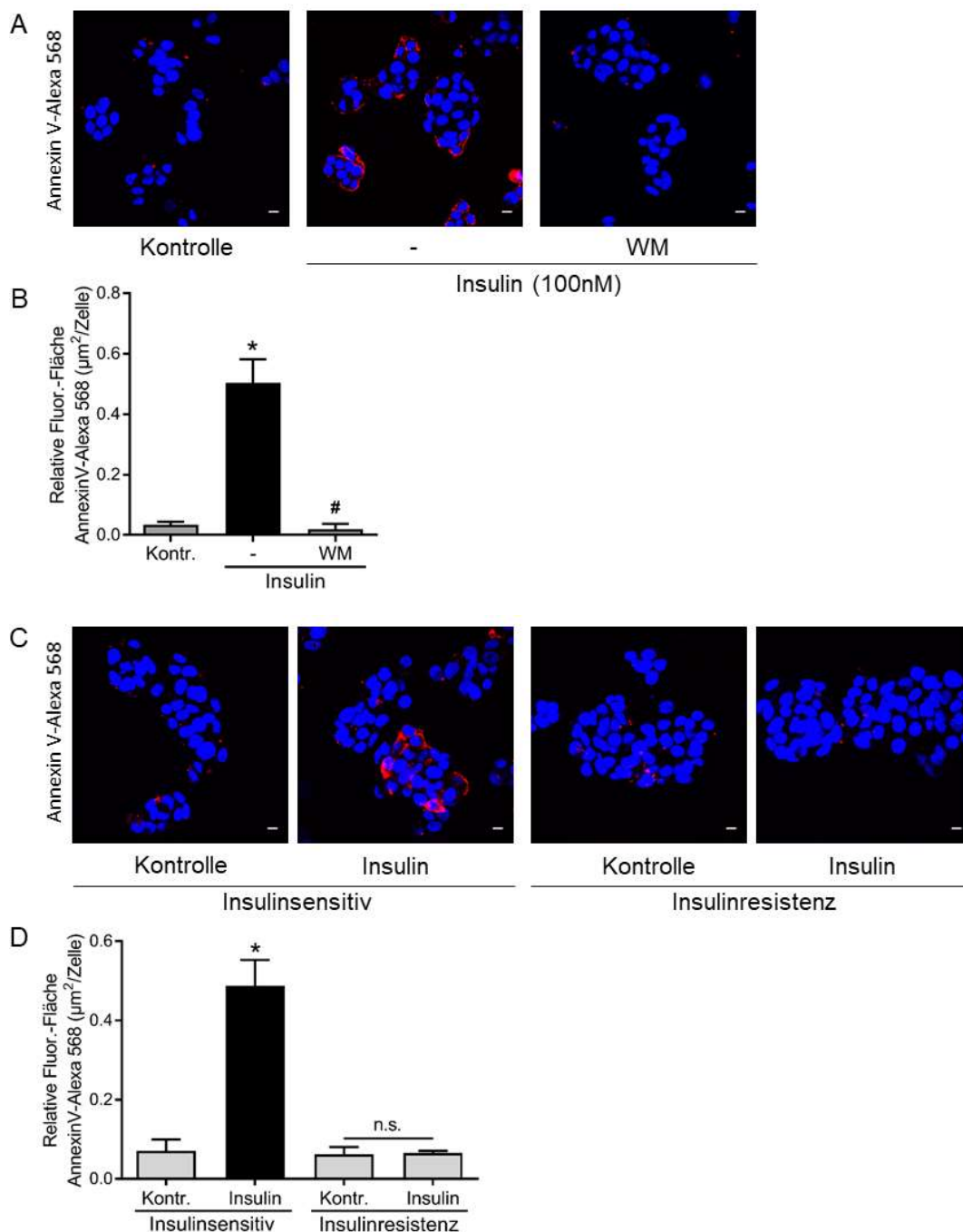


ABBILDUNG 17 – PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG DURCH INSULIN IST ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG REGULIERT

HepG2-Zellen wurden mit Wortmannin (WM; 50 nM) für 15 min vorinkubiert und mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V-Alexa 568 (rot) sowie mit DAPI (blau) gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (A).

Zur Induktion der Insulinresistenz wurden HepG2-Zellen jeweils mit 100 nM Insulin für 24 h inkubiert (Insulinresistenz). Zur Kontrolle wurden Zellen in Kulturmedium ohne Zusätze für 24 h inkubiert (Insulinsensitiv). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert und wie oben beschrieben gefärbt (C). Phosphatidylserin ist rot, und die Zellkerne sind blau dargestellt. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten (A, C). Der Maßstabsbalken zeigt 10 µm.

Die Fluoreszenzfläche der Annexin V-Alexa 568-Färbung wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt und zu der Anzahl der Zellen relativiert. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzfläche von Annexin V-Alexa 568 pro Zelle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (B, D)

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); # = signifikante Reduktion im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (ohne Inhibitor); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; *p ≤ 0,05.

4.2.7 PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG IST FÜR DIE ADAM-AKTIVIERUNG DURCH INSULIN NOTWENDIG

Um der Frage nach einem direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ADAM10 und der Externalisierung von Phosphatidylserin durch Insulin nachzugehen, wurde eine mögliche Protein-Interaktion untersucht.

Auf der einen Seite wurde die mögliche Interaktionsdomäne von ADAM10 inhibiert. Dafür wurde die Substanz O-Phospho-L-Serin (OPS) verwendet. OPS ist die negativ-geladene Kopfgruppe von Phosphatidylserin und bindet kompetitiv die positiv-geladene Aminosäuren der *Stalk*-Domäne von ADAM10, die für die Interaktion mit Phosphatidylserin verantwortlich ist und verhindert so die Interaktion zwischen der Membran und ADAM10 (unveröffentlichte Daten; Abbildung 18 A). Die HepG2-Zellen wurden mit OPS und zur Kontrolle mit der Kopfgruppe von Phosphocholin (PC) behandelt und mit Insulin stimuliert. Die Freisetzung von Fraktalkin in den Überstand der Zellen zeigte, dass die Inkubation von OPS bei gleichzeitiger Insulinstimulation zu einer signifikanten Reduktion der Shedding-Aktivität von ADAM10 im Vergleich zur Insulinstimulation ohne Inhibitor führte. Während bei der Behandlung mit PC keine Veränderung der Aktivität zu beobachten war (Abbildung 18 B). Dieses Ergebnis gab den ersten Hinweis, dass es vermutlich zu einer Interaktion von Phosphatidylserin und ADAM10 unter Insulinstimulation kommt, die für die Shedding-Aktivität notwendig ist.

Auf der anderen Seite wurde Phosphatidylserin, welches an die Zelloberfläche externalisiert wurde mit bovinem Laktadherin blockiert, um die mögliche Interaktion mit ADAM10 zu verhindern. Laktadherin ist ein körpereigenes Protein, das eine Phosphatidylserin-Bindungsdomäne besitzt und damit spezifisch an Phosphatidylserin-reiche Regionen der Zellmembran bindet²¹⁶ (Abbildung 18 A). HepG2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Laktadherin (0,1-1 μ M) behandelt und mit Insulin stimuliert. Mit steigender Laktadherin-Konzentration war eine verminderte Freisetzung von Fraktalkin unter Insulinstimulation zu detektieren (Abbildung 18 B). Damit wurde gezeigt, dass es möglich ist, durch die Blockierung von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, die Insulin-induzierte Aktivität von ADAM10 zu inhibieren.

Die beiden Versuche konnten so aus zwei Perspektiven demonstrieren, dass die Externalisierung von Phosphatidylserin durch Insulin für die Stimulation der Shedding-Aktivität von ADAM10 notwendig ist.

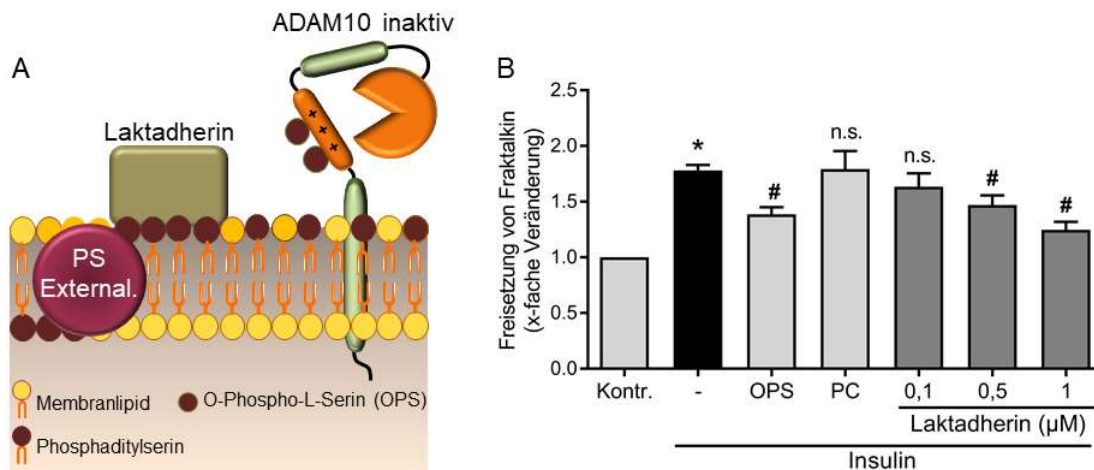


ABBILDUNG 18 – PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG DURCH INSULIN IST FÜR DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM10 NOTWENDIG

Die schematische Darstellung für die Untersuchung der Interaktion zwischen Phosphatidylserin und ADAM10: Auf der einen Seite bindet O-Phospho-L-Serin (OPS) an der positiv-geladenen Regionen der *Stalk*-Domäne von ADAM10 und verhindert so die Interaktion mit der Zellmembran. Auf der anderen Seite bindet Laktadherin Phosphatidylserin, welches an die Zelloberfläche externalisiert wurde (PS External.) und blockiert so die Interaktion mit ADAM10 (A).

HepG2-Zellen wurden mit 30 mM OPS, zur Kontrolle mit 30 mM Phosphocholin (PC) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Laktadherin (0,1-1 μ M) für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 100 nM Insulin stimuliert. Die Konzentration des freigesetzten Fraktalkins im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); # = signifikante Reduktion im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (ohne Inhibitor); n.s. = nicht signifikante Veränderung im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; * $p \leq 0,05$.

4.2.8 INSULIN-INDUZIERTER Abspaltung von Fraktalkin durch ADAM10 führt zu einer reduzierten Monozyten-Adhäsion

Nachdem gezeigt wurde, dass Insulin ADAM10 und -17 aktiviert und der zugrunde liegende Mechanismus z. T. untersucht war, stellte sich nun die Frage nach der möglichen funktionellen Relevanz dieses Vorgangs. Die Insulin-induzierte Aktivierung von ADAM10 in den HepG2-Zellen führte zu einer erhöhten Freisetzung von Fraktalkin. Das membranständige Fraktalkin wurde in Endothelzellen als Adhäsionsmolekül beschrieben und bindet den CX3C-Rezeptor 1.²¹⁷ Dieser wird vor allem von Immunzellen wie Monozyten, so auch von der monozytären Zelllinie THP1 exprimiert, aber auch von Lymphozyten wie natürlichen Killerzellen, B- und T-Zellen.^{218,219} Die Fraktalkin-Expression ist unter inflammatorischen Bedingungen stark erhöht,⁴⁷ damit wird die Rekrutierung und Zelladhäsion von Immunzellen durch Bindung an den CX3C-Rezeptor 1 ermöglicht, diese Vorgänge führen schließlich zur Erkennung und Eliminierung der betroffenen Zelle.^{218,220} Folglich spielt die Fraktalkin-vermittelte Zelladhäsion eine wichtige Rolle bei der Immunantwort.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Regulation der ADAM10-Aktivität durch Insulin und die damit verbundene Freisetzung von membranständigem Fraktalkin in den HepG2-Zellen einen Einfluss auf die Zelladhäsion von Monozyten hat.

Zur Untersuchung wurde der Adhäsionstest verwendet (siehe Zellulärer Adhäsionstest): HepG2-Zellen wurden mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und anschließend mit Insulin stimuliert. Daraufhin wurden die HepG2-Zellen mit Fluoreszenz-markierten THP1-Zellen kokultiviert und anschließend wurde die zelluläre Adhäsion der THP1-Zellen an den HepG2-Zellen bestimmt. Unter Insulinstimulation ohne Inhibitoren war eine signifikante Reduktion der Zelladhäsion zu beobachten. Bei dem gleichzeitigen Einsatz von den Inhibitoren MM, GW, GI, WM und dem Phosphatidylserin-Blocker Laktadherin (Lakt.) konnte keine Veränderung der Zelladhäsion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektiert werden (Abbildung 19 A). Damit wurde gezeigt, dass es unter Insulinbehandlung zu einer reduzierten THP1-Zelladhäsion an den HepG2-Zellen kam. Dieser Vorgang war ADAM10-abhängig, da bei gleichzeitiger Behandlung mit dem ADAM10-Inhibitor GI, vergleichbar mit Marimastat und GW, die reduzierte THP1-Zelladhäsion durch Insulin vollständig aufgehoben wurde. Weiterhin konnte durch den Einsatz von Wortmannin gezeigt werden, dass die THP1-Zelladhäsion über den PI3K/AKT-Signalweg reguliert war. Außerdem konnte durch die Verwendung von Laktadherin demonstriert werden, dass auch die Externalisierung von Phosphatidylserin bei der Regulation von der THP1-Zelladhäsion nötig war.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete THP1-Zelladhäsion spezifisch über Fraktalkin vermittelt ist, wurde rekombinantes Fraktalkin eingesetzt. Dafür wurden die THP1-Zellen, vor der Kokultivierung mit den HepG2-Zellen, mit rekombinantem humanen Fraktalkin (rek. Frakt.) inkubiert und so wurde der CX3C-Rezeptor 1 abgesättigt. Hier zeigte sich, dass Insulin ohne rekombinantes Fraktalkin (- rek. Frakt.) die THP1-Zelladhäsion signifikant hemmte. Während bei der Insulinbehandlung unter Absättigung des CX3C-Rezeptors 1 durch rekombinantes Fraktalkin (+ rek. Frakt.) keine veränderte Fraktalkin-Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten war (Abbildung 19 B). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es schon unter konstitutiven Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der THP1-Zelladhäsion zwischen den unstimulierten Proben ohne bzw. mit rekombinantem Fraktalkin kam (Abbildung 19 B). Das sprach dafür, dass die THP1-Zelladhäsion unter konstitutiven Bedingungen maßgeblich über Fraktalkin vermittelt ist. Aufschlussreich für die Fragestellung, ob Fraktalkin auch unter Insulinstimulation hauptsächlich für die

THP1-Zelladhäsion verantwortlich ist, war vor allem, dass keine Veränderung der THP1-Zelladhäsion zwischen den Insulin-behandelten Proben ohne bzw. mit rekombinatem Fraktalkin festgestellt werden konnte (Abbildung 19 B). Damit wurde gezeigt, dass die Insulin-induzierte Reduktion der THP1-Zelladhäsion tatsächlich über Fraktalkin vermittelt ist.

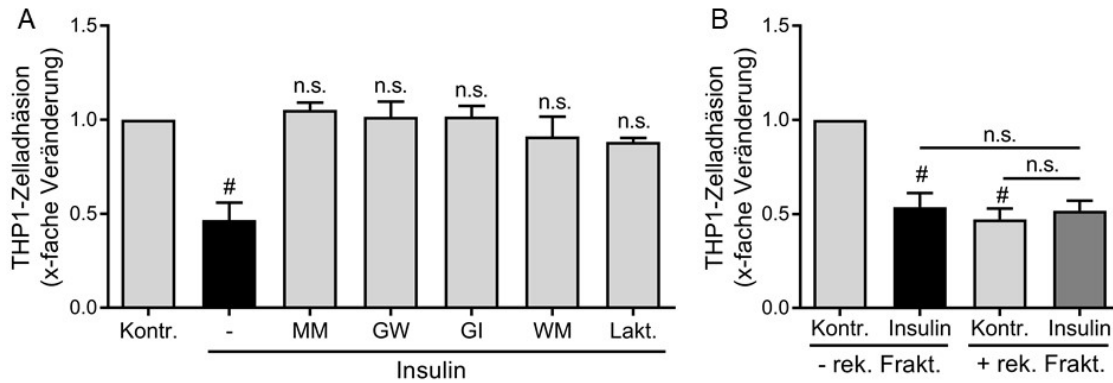


ABBILDUNG 19 – INSULIN-STIMULIERTE FRAKTALKIN-FREISETZUNG DURCH ADAM10 FÜHRT ZU REDUZIERTER THP1-ZELLADHÄSION

HepG2-Zellen wurden mit dem Breitband-Metalloproteasen-Inhibitor Marimastat (MM; 10 μ M), dem ADAM10 und -17-Inhibitor GW280264X (GW; 3 μ M), dem ADAM10-Inhibitor GI254023X (GI; 3 μ M), dem PI3K-Inhibitor Wortmannin (WM; 50nM) oder mit dem Phosphatidylserin-Blocker Laktadherin (Lakt.; 1 μ M) für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Parallel wurden die THP1-Zellen mit 5 μ M Calcein-AM für 15 min Fluoreszenz-markiert und anschließend für 1 h mit HepG2-Zellen kokultiviert (A).

Für die Bestimmung der Fraktalkin-Spezifität wurden die THP1-Zellen nach der Fluoreszenz-Markierung mit 1 μ g/ml rekombinatem humanen Fraktalkin (rek. Frakt.) für 15 min behandelt und anschließend mit den - mit oder ohne Insulin behandelten - HepG2-Zellen kokultiviert (B).

Die Adhäsion der THP1-Zellen an den HepG2-Zellen wurde mittels Fluoreszenzsignal-Messung bestimmt und zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.) relativiert. Dargestellt ist die relative THP1-Zelladhäsion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

= signifikante Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); n.s. = nicht signifikante Veränderung zur unbehandelten Kontrolle. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; *p \leq 0,05.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Zelladhäsionsversuche, dass Insulin durch die Stimulation von ADAM10 und der damit verbundenen Freisetzung von membranständigem Fraktalkin zu einer verminderten Adhäsion von Monozyten an HepG2-Zellen führt. Dieser Vorgang könnte möglicherweise für die Leberkarzinomzelle von funktioneller Relevanz sein, da die reduzierte Adhäsion von Monozyten an der Krebszelle zu einer eingeschränkten Immunantwort führen könnte. In Tumoren herrscht eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit die auch als Hypoxie bezeichnet wird. Daher wurde weiterführend der Einfluss eines hypoxischen Mikromilieus auf die Insulin-induzierte Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 untersucht.

4.2.9 REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT DURCH INSULIN UNTER HYPOXIE

Eine erniedrigte Sauerstoffverfügbarkeit ist je nach Gewebsart physiologisch und schwankt zwischen 1-11 % Sauerstoffgehalt (O₂) im Körper. Interessanterweise wurde in Tumoren und Organen und Geweben von Typ-2-Diabetes-Patienten eine besonders geringe Sauerstoffkonzentration beschrieben, da es dort Regionen gibt, die z.B. nicht ausreichend mit Blutgefäßen versorgt sind.^{82,221} In verschiedenen Tumorarten wurde gezeigt, dass eine veränderte Regulation der Protease ADAM10 und ADAM17 vorliegt.^{143,222} Zudem gibt es Hinweise, dass ADAM10 und -17 durch Hypoxie-induzierte Faktoren (HIFs) reguliert werden können.^{87,181,223,224} Die Auswirkungen auf die Regulation der Shedding-Aktivität scheint allerdings Zell- bzw. Gewebe-abhängig zu sein.

Im Folgenden wurden erste Ergebnisse erzielt, die der Frage nachgingen, ob Hypoxie einen Einfluss auf die Insulin-induzierte Aktivität von ADAM10 und -17 hat. Dabei wurde auch getestet, ob hypoxische Bedingungen einen Einfluss auf den Insulin-Signalweg in Leberkarzinom-Zelllinien haben.

Um ein hypoxisches Mikromilieu zu erzeugen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Zum einen wurde als Inhibitor Cobaltchlorid (CoCl₂) eingesetzt. Zum anderen wurde eine Hypoxie-Kammer genutzt, in der die Zellen unter definierte Sauerstoffkonzentrationen von 1,5 % und 3 % inkubiert und untersucht wurden.

4.2.9.1 COCL₂-INDUZIERTER HYPOXIE FÜHRT ZU EINGESCHRÄNKTEM METABOLISCHEN INSULIN-SIGNALWEG UND INHIBITION DER INSULIN-VERMITTELTEN SHEDDING-AKTIVIERUNG DER ADAMS

Für die Untersuchung der Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 sowie der Insulinsignalweiterleitung unter hypoxischen Bedingungen wurde zu Beginn CoCl₂ verwendet. CoCl₂ hat die Eigenschaft hypoxische Bedingungen in der Zelle zu simulieren, indem es die Sauerstoff-abhängigen PHD-Enzyme inhibiert. Dies führt dazu, dass HIF-1 α , der unter normoxischer Sauerstoffkonzentration fortlaufend proteolytischem Abbau unterliegt, stabilisiert wird. HIF-1 α wiederum bindet an HIF-1 β , nach nukleärer Translokation wirkt der entstandene HIF-Komplex im Zellkern als Transkriptionsfaktor und reguliert HR-Gene (siehe Abbildung 3). Aus diesem Grund wird

CoCl₂ häufig genutzt, um hypoxische Bedingungen in der Zelle zu simulieren. Die HepG2- und HuH7-Zellen wurden daher mit CoCl₂ über Nacht inkubiert und anschließend mit Insulin stimuliert. Zum Nachweis für die erfolgreiche Induktion von Hypoxie, wurde das stabilisierte Protein HIF-1 α in den Zellen mittels *Westernblot*-Analyse nachgewiesen. Hier zeigte sich, dass HIF-1 α nach einer Inkubation mit 200 μ M CoCl₂ über Nacht ausreichend stabilisiert und damit zu detektieren war (Abbildung 20 A, B). Weiterhin wurde die Proteinexpression von ADAM10 und -17 detektiert. Hier zeigte sich, dass es unter CoCl₂-induzierter Hypoxie zu keiner veränderten Expression der Proteasen kam (Abbildung 20 A, B). Dementsprechend konnte eine Regulation der Shedding-Aktivität aufgrund veränderter Proteinexpression der Proteasen ausgeschlossen werden. Interessanterweise konnte in beiden Zelllinien eine verminderte Phosphorylierung von AKT (pAKT) nach Insulinstimulation unter Hypoxie beobachtet werden. Die Proteinexpression des Insulinrezeptors β (IR β) blieb hingegen unverändert und konnte daher als Ursache für eine verminderte AKT-Phosphorylierung ausgeschlossen werden (Abbildung 20 A, B).

Neben der Proteinexpressionsanalyse, wurde auch die Freisetzung von den ADAM10- bzw. ADAM17-Substraten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und mit zusätzlicher Insulinstimulation bestimmt. Hierbei war überraschenderweise zu beobachten, dass die Insulinstimulation unter normoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung der ADAM-Substrate führte, während die Insulinstimulation unter hypoxischen Bedingungen zu keiner veränderten Substrat-Freisetzung führte (Abbildung 20 C, D). Damit beeinflussen hypoxische Bedingungen scheinbar die Stimulierbarkeit der Shedding-Aktivität unter Insulinstimulation. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Hypoxie allein keinen Einfluss auf die Freisetzung der ADAM-Substrate hatte, da unter konstitutiven Bedingungen - ohne Insulinstimulation – keine Veränderung der Freisetzung auftrat. Damit scheint die proteolytische Aktivität der Proteasen nicht durch Hypoxie beeinflusst zu sein.

Die ersten Ergebnisse unter CoCl₂-induzierter Hypoxie deuteten darauf hin, dass Hypoxie einen inhibierenden Effekt auf die Insulinsignalweiterleitung hat. Von besonderem Interesse war die Beobachtung, dass die Stimulation der Aktivität von ADAM10 und -17 durch Insulin unter Hypoxie komplett aufgehoben war. Diese ersten Ergebnisse wurden weitergehend unter Verwendung einer Hypoxie-Kammer untersucht.

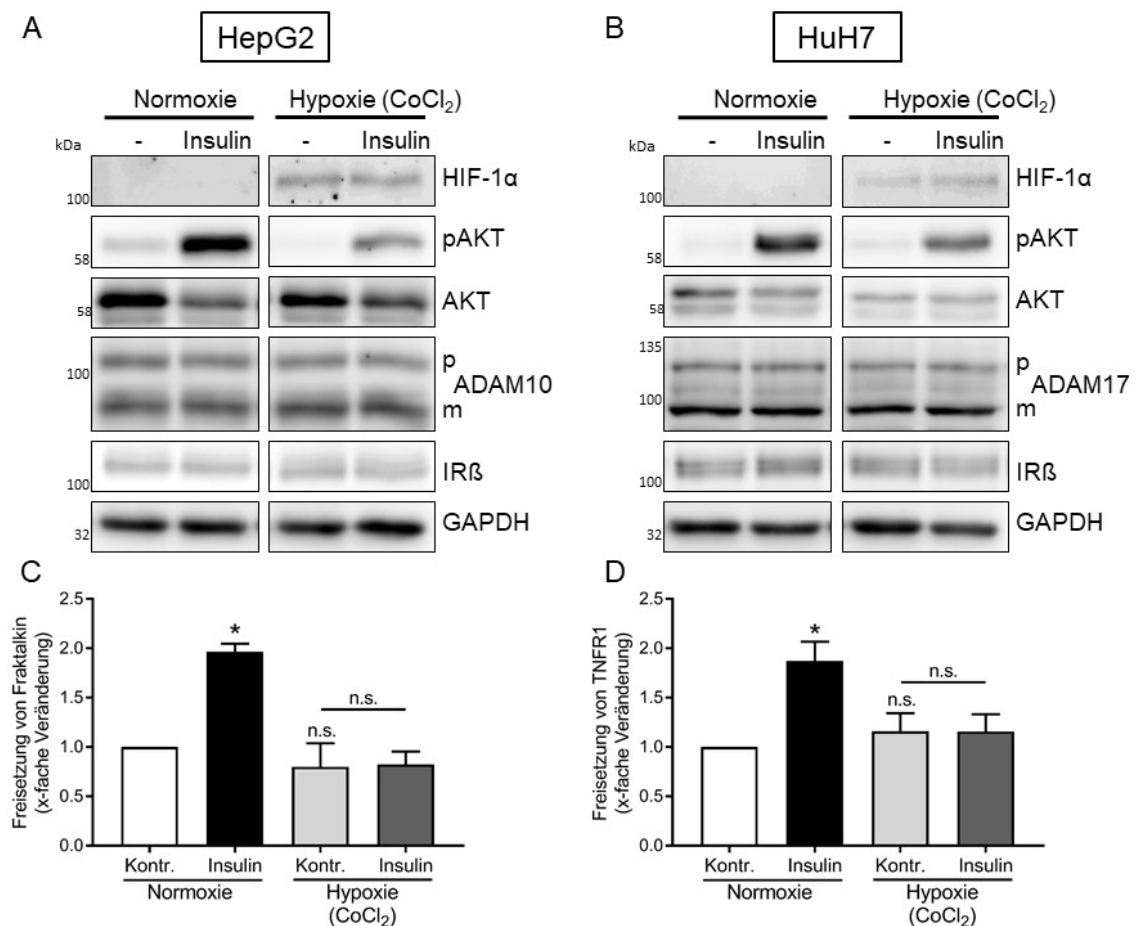


ABBILDUNG 20 – HYPOXIE DURCH COCl₂ FÜHRT ZU REDUZIERTER INSULINSIGNALWEITERLEITUNG UND EINGESCHRÄNKTER STIMULIERBARKEIT DER SHEDDASEN DURCH INSULIN

HepG2- und HuH7- Zellen wurden jeweils mit 200 μ M Cobaltchlorid (CoCl₂) für 24 h inkubiert, um hypoxische Bedingungen zu simulieren (Hypoxie (CoCl₂)). Zur Kontrolle wurden Zellen in Kulturmedium ohne Zusätze bei einer Luftsauerstoffkonzentration von 21 % inkubiert (Normoxie). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Die Proben wurden mit einer 10 % -igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von AKT, dessen Phosphorylierungsstatus (pAKT) sowie die Expression von dem Hypoxie- induziertem Faktor-1alpha (HIF-1 α), ADAM10, ADAM17 und dem Insulinrezeptor β (IR β) wurden mittels *Westernblot*-Analyse detektiert. Von ADAM10 und -17 sind jeweils die Pro-Form (p) und mature Form (m) detektiert worden. Die AKT- und GAPDH-Färbung dienen als Ladekontrollen.

Ein repräsentativer *Westernblot* von jeweils drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet (A, B).

Die Konzentration des freigesetzten Fraktalkins (C) bzw. des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1; D) im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin bzw. TNFR1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

* = signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontr.); n.s. = nicht signifikante Veränderung. n = 3; Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und post hoc-Tests; *p \leq 0,05.

4.2.9.2 METABOLISCHER INSULIN-SIGNALWEG IST UNTER HYPOXIE IN ABHÄNGIGKEIT DER INKUBATIONSZEIT UNTERSCHIEDLICH REGULIERT

Die Experimente mit dem Inhibitor CoCl_2 lieferten überraschende erste Ergebnisse in Bezug auf die veränderte Stimulierbarkeit der Shedding-Aktivität unter Hypoxie. Nachteile von CoCl_2 sind zum einen, dass es ab einer Konzentration von $250 \mu\text{M}$ zytotoxische Wirkung gezeigt hat^{225,226} und dass die Inhibition der PHDs nur einen Teilaspekt von einer Hypoxie ausmacht. Es sind auch metabolische Effekte und viele weitere Mediatoren beschrieben, die unter hypoxischen Bedingungen reguliert sind.²²⁷ Um eine Hypoxie, wie sie beispielsweise in Tumoren oder Entzündungen vorkommt, zu untersuchen, wurde in den Folgeexperimenten eine Hypoxie-Kammer eingesetzt, in der die Zellen unter definierten Sauerstoffkonzentrationen behandelt werden konnten.

Die Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Ludwig an dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der RWTH Aachen durchgeführt. Aus zeitlichen Gründen konnten nur die HepG2-Zellen in der Hypoxie-Kammer getestet werden. Die HepG2-Zellen wurden bei 1,5 % und 3 % O_2 (Hypoxie) und zur Kontrolle unter normoxischen Bedingungen (Normoxie; 21 % O_2) für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Insulin stimuliert und die Expression von AKT sowie dessen Phosphorylierungsstatus (pAKT) und die Expression des Insulinrezeptors β (IR β) mittels *Westernblot*-Analyse bestimmt (Abbildung 21 A, B, E). Hier zeigte sich, dass es zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT (pAKT) bei Insulinstimulation unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Normoxie kam (Abbildung 21 A, B). Diese Beobachtungen wiesen auf eine eingeschränkte Insulinsignalweiterleitung hin und bestätigten die vorherigen Versuche mit CoCl_2 -induzierter Hypoxie. Allerdings konnten diese Beobachtungen nur bei Hypoxie mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden gemacht werden. Bei einer längeren Inkubationszeit unter Hypoxie von 48 Stunden kam es zu einer gegenteiligen Beobachtung: Hier führten die hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT unter Insulinstimulation (Abbildung 21 E). Das wiederum sprach für eine Induktion des Insulinsignalwegs unter langwierigen hypoxischen Bedingungen.

Um zu überprüfen welche Auswirkungen die Hypoxie auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 hatte, wurde die Freisetzung von Fraktalkin im Überstand der Zellen gemessen. Hierbei war zu beobachten, dass die Fraktalkin-Freisetzung bei Insulinstimulation unter Normoxie deutlich erhöht war, während unter allen getesteten

hypoxischen Bedingungen (1,5 %, 3 % O₂) und Inkubationszeiten (24 h, 48 h) keine eindeutige Erhöhung der Freisetzung durch Insulin zu beobachten war (Abbildung 21 C, D, F). Diese Beobachtungen unterstrichen auf der einen Seite die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen und bestätigten, dass Hypoxie die Stimulation der Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 durch Insulin inhibiert. Auf der anderen Seite scheint es in diesem Fall keine Korrelation zwischen der Insulinsignalweiterleitung über den AKT-Signalweg und der Shedding-Aktivität der ADAMs durch Insulin zu geben, da die eingeschränkte Shedding-Aktivität unter Insulin und Hypoxie unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus von AKT auftrat.

An dieser Stelle muss gesagt werden, dass die Versuche in der Hypoxiekammer aufgrund von Zeitmangel nur einmal durchgeführt werden konnten, daher sind jegliche Schlussfolgerungen aus diesen Versuchen spekulativ. Problematisch ist vor allem, dass die Stabilisierung von HIF-1 α bei den Versuchen in der Hypoxiekammer nicht detektiert werden konnte und damit hypoxische Bedingungen nicht eindeutig nachzuweisen waren. Die Versuche müssen reproduziert und validiert werden bevor weitere Aussagen über den Zusammenhang von Hypoxie, Insulinsignalweiterleitung und deren Einfluss auf die Aktivität der ADAMs getroffen werden können.

Für die Versuche mit Hypoxie insgesamt kann unter Vorbehalt festgehalten werden, dass eine verringerte Sauerstoffkonzentration in der Umgebung die Stimulation der Shedding-Aktivität von ADAM10 und ADAM17 durch Insulin beeinflusst.

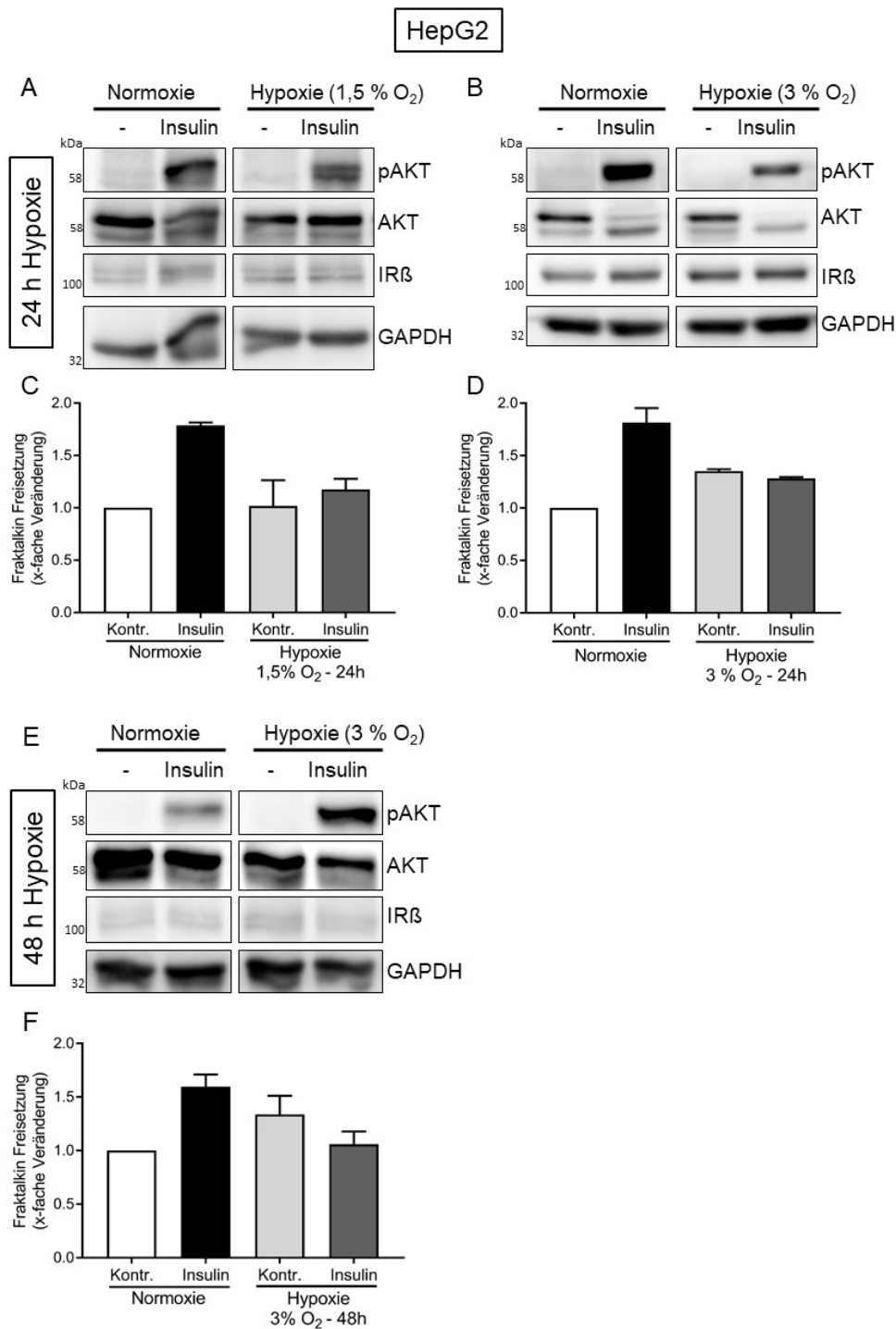


ABBILDUNG 21 – UNTERSCHIEDLICHE INKUBATIONSZEITEN IN DER HYPOXIE-KAMMER FÜHREN ZU VERSCHIEDENEN ERGEBNISSEN IN BEZUG AUF DEN AKT-SIGNALWEG UNTER INSULIN

HepG2- Zellen wurden unter einer Sauerstoffkonzentration von 1,5 % (A, C) oder 3 % (B, D-F) in der Hypoxie-Kammer inkubiert für 24 h (A-D) bzw. 48 h (E, F) inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen in Kulturmedium ohne Zusätzen bei einer Luftsauerstoffkonzentration von 21 % für 24 h inkubiert (Normoxie). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Die Proben wurden mit einer 10 % -igen *SDS-PAGE* aufgetrennt und die Expression von AKT, dessen Phosphorylierungsstatus (pAKT) sowie die Expression von dem Insulinrezeptor β (IR β) wurden mittels *Westernblot*-Analyse detektiert. Die AKT- und GAPDH-Färbungen dienten als Ladekontrollen.

Die Konzentration des freigesetzten Fraktalkin im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die relative Freisetzung von Fraktalkin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung von Doppelwerten aus einem Experiment; n=1.

5 DISKUSSION

Die Faktoren Glutamat, Aluminium und Glucose werden mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie z.B. mit der Alzheimer-Krankheit, Krebserkrankungen oder Typ-2-Diabetes mellitus. In diesen Erkrankungen ist z.T. auch eine veränderte Shedding-Aktivität der Proteasen ADAM10 und -17 beschrieben worden. Das erste Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob diese Faktoren in der Lage sind die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 zu beeinflussen.

Es konnte gezeigt werden, dass Glutamat und Aluminiumverbindungen keinen Einfluss auf die ADAM-vermittelte Substrat-Freisetzung der Proteasen unter den getesteten Versuchsbedingungen aufwiesen. Eine gesteigerte Glucosekonzentration führte zu einer erhöhten Proteinexpression von ADAM10 und -17, diese hatte allerdings keine Auswirkung auf die Shedding-Aktivität der Proteasen.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war den Regulationsmechanismus der ADAM-vermittelten Substratfreisetzung durch Insulin, das zuvor als ADAM-Stimulator beschrieben wurde, weiter aufzuklären mit dem Fokus auf eine mögliche Beteiligung der Zellmembran. Hier konnte gezeigt werden, dass Insulin über den PI3K/AKT-Signalweg zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin führte. Phosphatidylserin interagiert an der äußeren Zellmembran mit ADAM10 bzw. -17, daraufhin kommt es zur Aktivierung des Shedding-Vorgangs. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang die mögliche funktionelle Relevanz der Insulin-regulierten Shedding-Aktivität in Leberkrebszellen untersucht werden. Die Insulin-induzierte ADAM10-Aktivität führte zu der Abspaltung des Adhäsionsmoleküls Fraktalkin in HepG2-Zellen. Das hatte eine reduzierte Monozyten-Adhäsion zur Folge.

Überraschenderweise wurde in weiterführenden, vorläufigen Untersuchungen beobachtet, dass in einem hypoxischen Mikromilieu, welches in Organen und Geweben von Diabetes-Patienten und Krebsgeweben vorherrscht, die proteolytische Aktivität der ADAMs nicht durch Insulin beeinflusst wird.

5.1 ÄUßERE FAKTOREN BEEINFLUSSEN NICHT DIE ADAM-AKTIVITÄT

5.1.1 GLUTAMAT

Glutamat ist natürlicherweise in einer Vielzahl von Lebensmitteln enthalten und wird als Geschmacksverstärker in einer hohen Konzentration Lebensmitteln zugesetzt.^{103,105} Als Neurotransmitter übernimmt Glutamat im Zentralnervensystem essenzielle Aufgaben wie z.B. die Gedächtnisbildung.¹⁰⁶ In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Konzentration von Glutamat schon häufig mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit und auch mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht.^{104,157,159} Ob dabei Glutamat auch die Shedding-Aktivität der ADAMs beeinflusst und damit zu pathologischen Prozessen beiträgt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Der Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels wie es z.B. durch das Ionophor Ionomycin hervorgerufen wird, ist ein bekannter Mechanismus die Shedding-Aktivität der ADAM-Proteasen zu induzieren.²²⁸ Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Glutamat-Rezeptors N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) *in vitro* zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle führt.^{159,229} Im Einklang damit zeigen Daten von Marezky *et al.*, dass die Behandlung mit 50 μ M NMDA in primären Neuronen zur ADAM10-vermittelten Freisetzung von L1 führt.⁶³ Weiterhin wurde durch Stimulation eines anderen Glutamat-Rezeptortyps, dem Kainat-Rezeptor, in humanen B-Zellen beobachtet, dass die RNA-Expression von ADAM10 hochreguliert ist. Dies ging mit einer erhöhten Freisetzung des ADAM10-Substrates CD23 einher. Hierbei wurde eine Konzentration von 2-5 mM L-Glutaminsäure eingesetzt um die Zellen zu stimulieren.²³⁰

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit vergleichbare L-Glutaminsäure-Konzentrationen von 1-5 mM getestet. Allerdings konnte kein Effekt auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 oder -17 in unterschiedlichen Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 6, 7). Dieses kontroverse Ergebnis könnte mit den verwendeten Zelllinien zusammenhängen und auf einen Zell-spezifischen Effekt zurückzuführen sein. Sturgill *et al.* haben eine ADAM10-vermittelte CD23-Freisetzung durch Glutamat in humanen B-Zellen beobachtet, welche in dieser Arbeit nicht verwendet wurden. Es stellt sich die Frage, ob die verwendeten Zelllinien, COS-7 und HaCaT eine zu geringe Expression von Glutamat-Rezeptoren aufweisen,^{231,232} um einen vergleichbaren Effekt hervorzurufen. Glutamat-Rezeptoren sind gewebespezifisch unterschiedlich exprimiert z.B. ist in neuronalen Zellen eine hohe Expression von Glutamat-Rezeptoren beschrieben.²³³ Aus diesem Grund wurde auch die

Neuroglioma-Zelllinie H4 getestet.²³⁴ Allerdings konnte auch in der neuronalen Zelllinie kein Effekt auf die Shedding-Aktivität durch Glutamat festgestellt werden (Abbildung 7). Es bleibt zu diskutieren, ob die Glutamat-induzierte ADAM10-Aktivierung, wie von Sturgill *et al.* beschrieben, spezifisch durch den Kainat-Rezeptor vermittelt wird. Um dies abschließend zu klären, müsste in zukünftigen Experimenten die Expression von Kainat-Rezeptoren in den verwendeten Zelllinien überprüft werden. Nichtsdestotrotz ist unter den getesteten Bedingungen davon auszugehen, dass Glutamat keinen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 hat.

5.1.2 ALUMINIUM

Aluminium-Verbindungen wie Aluminiumchlorid (AlCl_3) sind natürlicherweise in Nahrungsmitteln enthalten, werden aber auch in Kosmetika, als Impf-Adjuvans oder bei der Hyposensibilisierung eingesetzt.^{123,204} In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, die die Exposition von Aluminium mit der Alzheimer-Krankheit und mit Krebserkrankungen v.a. Brustkrebs in Verbindung gebracht haben.^{122,161,235} In der Entstehung der genannten Krankheiten spielt auch die Dysregulation von den Proteasen ADAM10 und -17 eine Rolle. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde noch nicht untersucht, ob Aluminiumverbindungen die ADAM-vermittelte Substrat-Freisetzung beeinflussen können und möglicherweise auf diese Art zu den beschriebenen pathophysiologischen Prozessen beitragen.

In humanem Brustgewebe konnte eine Konzentration von etwa 100 μM AlCl_3 nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Mandriota *et al.* 2016, dass 100 μM AlCl_3 in der Lage ist *in vivo* epitheliale Zellen in Krebszellen zu transformieren.¹⁶¹ Basierend darauf wurden die Aluminiumverbindungen AlCl_3 und AlCl_3 -Maltol in den Konzentration von 10-500 μM auf ihren Einfluss auf die Shedding-Aktivität der Proteasen untersucht. AlCl_3 -Maltol wurde verwendet, da für diese Verbindung eine verbesserte Bioverfügbarkeit im Gehirn im Mausmodell gemessen wurde.²³⁶ Es wurde festgestellt, dass sowohl AlCl_3 als auch AlCl_3 -Maltol keinen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 oder -17 unter den getesteten Bedingungen aufwiesen (Abbildung 8).

Das als Impf-Adjuvans verwendete Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) induziert die Immunantwort indem es u.a. die Antikörper-Produktion anregt.^{202,237} In immunologischen Studien wird häufig ImjectAlumTM verwendet, das $\text{Al}(\text{OH})_3$ enthält. In

der Literatur wird ImjectAlum™ in der Regel mit einer Konzentration von etwa 100 µg/ml eingesetzt.²³⁸ Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von ImjectAlum™ mit Konzentrationen von 10-500 µg/ml getestet.

Hier konnte in COS7-Zellen kein Effekt auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 durch ImjectAlum™ beobachtet werden (Abbildung 9). In der neuronalen Zelllinie SHSY hingegen war zunächst ein inhibitorischer Effekt ab einer Konzentration von 100 µg/ml ImjectAlum™ zu vermuten, da eine Reduktion der Freisetzung der ADAM10- und -17-Substrate zu beobachten war. In monozytären Zellen wurde allerdings ein zytotoxischer Effekt durch ImjectAlum™ beschrieben.^{238,239} Aus diesem Grund wurde die Viabilität der Zellen unter ImjectAlum™-Behandlung getestet. Es stellte sich heraus, dass etwa 30 % der SHSY-Zellen die Behandlung ab 100 µg/ml ImjectAlum™ nicht überlebten (Abbildung 9). Demnach ist der vermeintlich inhibitorische Effekt durch ImjectAlum™ höchstwahrscheinlich auf die Zytotoxizität von ImjectAlum™ und eine entsprechend reduzierte Zellzahl zurückzuführen und nicht auf einen Einfluss auf die Shedding-Aktivität der ADAM-Proteasen. Interessanterweise wurde in den COS7-Zellen kein zytotoxischer Effekt beobachtet. Dies spricht für eine höhere Sensibilität der neuronalen Zellen gegenüber ImjectAlum™.

Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse dafür, dass die ADAM-Proteasen nicht durch Aluminiumverbindungen beeinflusst werden und demnach wahrscheinlich nicht an den möglichen Aluminium-vermittelten pathologischen Vorgängen beteiligt sind.

5.1.3 GLUCOSE

Eine gesteigerte Glucosekonzentration (Hyperglykämie) tritt als Symptom von Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) auf und wird als mögliche Ursache für Folgeerkrankungen wie koronarer Herzerkrankungen oder Krebserkrankungen diskutiert,^{170,176} da beschrieben wurde, dass eine erhöhte Glucosekonzentration zu entzündlichen Prozessen und Gewebeschäden in T2DM-Patienten führen kann.^{171,172}

Inwiefern die Shedding-Aktivität der ADAMs durch Glucose beeinflusst wird und damit möglicherweise an den pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist, wurde bisher noch nicht abschließend geklärt.

Der Blutzuckerspiegel wird anhand verschiedener Tests bewertet: Zum einen wird der Nüchtern-Blutzuckerwert bestimmt, dabei wird eine Glucosekonzentration unter 5,5 mM

als physiologisch bewertet; zwischen 5,5 und 6,9 mM wird von einer eingeschränkten Glucosetoleranz gesprochen; ab 7 mM wird der Befund als pathologisch eingestuft. Weiterhin wird standardmäßig ein oraler Glucosetoleranz-Test durchgeführt. Dabei wird, nach Glucose-Verabreichung von 100 g, die Blutglucosekonzentration über die Zeit bestimmt. Man spricht von einer Glucosekonzentration im Normbereich, wenn der Glucosespiegel nach zwei Stunden nicht über 7,8 mM ansteigt. Als pathologisch eingestuft wird ein Anstieg über 11,1 mM. Eine derartige Situation ist bei Diabetes-Patienten zu beobachten.²⁴⁰ Um die Regulation der ADAM-vermittelten Substrat-Freisetzung durch Glucose umfassend zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit hypoglykämische (0,55 mM), physiologische (5,5 mM) und hyperglykämische bzw. diabetische (11 und 25 mM) Glucosekonzentrationen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Glucosekonzentrationen zu einem Anstieg der Proteinexpression von ADAM10 und -17 führen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit bestehender Literatur, in der eine erhöhte Expression von ADAM10 und -17 durch eine gesteigerte Glucosekonzentration in Diabetes-Patienten und im diabetischen Mausmodell beschrieben wurde.^{28,181}

Allerdings konnte in dieser Arbeit keine gesteigerte Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 durch veränderte Glucosekonzentrationen beobachtet werden (Abbildung 10). Diese Ergebnisse sind z.T. konträr zu veröffentlichten Studien, in denen beispielsweise von Reddy *et al.* 2009 beschrieben wurde, dass Glucose zu einer gesteigerten ADAM17-vermittelten TNF α -Freisetzung in glatten Muskelzellen der Ratte führt.^{179,180} Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, wobei die erwähnten Studien im Mausmodell durchgeführt wurden, während in dieser Arbeit *in vitro* gearbeitet wurde und damit die Aussagekraft limitiert ist.

Nichtsdestotrotz wurde bereits beschrieben, dass eine erhöhte Expression von ADAM10 und -17 nicht zwangsläufig zu einer gesteigerten Shedding-Aktivität führt, dies wurde durch die durchgeführten Versuche bestätigt. Es liegt also nahe zu spekulieren, dass die Regulation der ADAM-Aktivität auch durch andere Mechanismen reguliert ist.

5.2 INSULIN REGULIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT DER ADAMS

Die Hauptfunktion von Insulin ist die Regulation des Stoffwechsels, insbesondere durch die Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase. Dabei ist Insulin das einzige Hormon im Körper, das in der Lage ist den Blutzucker zu senken. Dieser Vorgang wird über die Vermittlung von Glucose-Transportern an die Zelloberfläche hauptsächlich über den metabolischen PI3K/AKT-Signalweg reguliert.²⁴¹ Leber-, Muskel- und Fettzellen exprimieren eine hohe Zahl an Insulinrezeptoren. Daher gelten die entsprechenden Gewebe als Hauptzielorgane von Insulin,¹⁸⁷ in denen innerhalb kurzer Zeit eine große Menge an Glucose aufgenommen und in Form von Glykogen gespeichert oder in Energie umgewandelt wird.^{242,243} Eine weitere zentrale Funktion von Insulin ist die Regulation von Zellwachstum und Proliferation über den mitogenen Ras/MAPK-Signalweg.²⁴⁴ Dieser Signalweg ist ebenso wie die Insulinrezeptor-Expression in Tumoren hochreguliert und der Einsatz von Insulin-Präparaten oder -Analoga wie bei der Behandlung von Diabetes mellitus steht daher immer wieder in Diskussion die Tumorentwicklung zu begünstigen.^{174,189,245} Klinische Studien zu diesem Thema sind allerdings nicht trivial, da Diabetes mellitus und die damit einhergehende Dysregulation des Glucose-Stoffwechsels an sich schon als Risikofaktor für Krebserkrankungen beschrieben wurde.¹⁷⁵ Die Unterscheidung zwischen Primär-Erkrankung und Behandlung im Hinblick auf Folgeerkrankungen ist komplex und zu diesem Zeitpunkt nicht zu beantworten.

Die Insulinausschüttung erfolgt oszillierend: Alle drei bis sechs Minuten wird Insulin in die Blutbahn abgegeben. Nach Glucoseaufnahme (75 g) kann der Insulinspiegel auf 50-200 $\mu\text{U/l}$ (360-1430 pM) ansteigen. Bei einer Insulinresistenz wird die Insulinausschüttung gesteigert, um eine Hypoglykämie in den Zellen zu verhindern und damit kommt es zu einer Hyperinsulinämie. Der Insulinspiegel im Blut steigt dabei über 20 $\mu\text{U/l}$ (\sim 140 pM) an. In schweren Resistenzfällen können dauerhafte Insulinspiegel über 100 $\mu\text{U/l}$ (\sim 695 pM) auftreten.^{246,247}

In *in vitro*-Studien wie von Salento *et al.* und Chen *et al.*, die zeigten, dass Insulin die Shedding-Aktivität der ADAMs beeinflusst, wurde eine Insulinkonzentration von 1 μM verwendet.^{248,249}

In dieser Arbeit wurden Insulinkonzentrationen von 10-500 nM gewählt, zum einen damit die Daten mit der bestehenden Literatur vergleichbar sind und zum anderen um näher an dem physiologischen Insulinspiegel zu liegen. Es konnte beobachtet werden, dass Insulin

bereits mit einer Konzentration von 100 nM die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 signifikant stimuliert (Abbildung 11-13). Dabei war jedoch auch schon ein Effekt mit 10 nM Insulin zu beobachten, der spekulieren lässt, dass auch *in vivo* ein Insulin-induzierbare ADAM-Aktivierung möglich ist (Abbildung 11, 12). Diese höhere Sensitivität im Vergleich zu den Daten von Chen *et al.* könnte darauf zurückzuführen sein, dass andere Zelllinien verwendet wurden: Die hier verwendeten humanen Krebszelllinien (HepG2, HuH7 und HT-29) weisen eine hohe Expression des Insulinrezeptors auf. Chen *et al.* hingegen verwendeten die aus dem Affen stammende Fibroblasten-Zelllinie COS-7, für die in anderen Studien eine niedrige Insulinrezeptor-Expression beschrieben wurde.²⁵⁰

In den verwendeten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass endogene Substrate durch die Insulin-vermittelte ADAM-Aktivierung freigesetzt werden. Unter Insulin-Behandlung wird in HUH7-, H4- und HT29-Zellen der TNF-Rezeptor 1 durch ADAM17 geschnitten und in HepG2-Zellen wird durch ADAM10-Aktivierung Fraktalkin freigesetzt. Dies erweitert die bisherigen Studien, die den Insulin-Effekt auf die ADAM-Proteasen mit Hilfe transfizierter Substrate Klotho und APP gezeigt haben.^{248,249}

5.2.1 DER REGULATIONSMECHANISMUS DER INSULIN-VERMITTELTEN ADAM-AKTIVIERUNG

Ein Hauptfokus der Untersuchungen dieser Arbeit lag in der weiteren Aufklärung des Regulationsmechanismus der Insulin-vermittelten ADAM-Aktivierung. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Zellmembran eine wesentliche Rolle spielt.

Unter physiologischen Bedingungen sind die Phospholipide, aus denen sich die Plasmamembran zusammensetzt, asymmetrisch angeordnet. Dabei befinden sich Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin hauptsächlich in der inneren Zellmembran; Sphingomyelin und Phosphatidylcholin dagegen an der extrazellulären Membran. Die Aufhebung dieser Asymmetrie durch PS-Externalisierung an die äußere Zellmembran ist als ein Merkmal der Apoptose und als molekulares Signal für Phagozyten bekannt.²⁵¹ Neben der umfassend beschriebenen Rolle bei der Apoptose ist eine transiente PS-Externalisierung auch als wesentliches Signal in verschiedenen anderen Prozessen z.B. bei der Aktivierung von Lymphozyten, Befruchtung oder Knochenmineralisierung beschrieben.²⁵²⁻²⁵⁴ Diese Prozesse zeigen, dass die PS-Exposition auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen ein wichtiges Signal

darstellt. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die PS-Exposition ein essenzielles regulatorisches Signal für die ADAM10- und -17-vermittelte Substratfreisetzung ist (unveröffentlichte Daten).¹²

Mit Hilfe einer AnnexinV-Färbung konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Insulin konzentrationsabhängig zu einer Externalisierung von PS an die äußere Zellmembran führt (Abbildung 16). Damit ist Insulin der erste physiologische Stimulus, für den dieser Aktivierungsmechanismus von ADAM10 und -17 beschrieben werden konnte. Für die Identifizierung dieses Mechanismus wurden bisher hauptsächlich unphysiologische Stimuli wie Ionomycin, Melittin oder PMA verwendet. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die negativ-geladene Kopfgruppe von PS mit der positiv-geladenen membran-proximalen Domäne (MPD) von ADAM17 bzw. mit der *Stalk*-Domäne von ADAM10 interagiert. Diese Interaktion führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der jeweiligen Protease, die den Shedding-Vorgang initiiert (unveröffentlichte Daten).¹²

Um sicherzustellen, dass die Interaktion von PS und ADAM10 unter Insulinbehandlung stattfindet, wurde Laktadherin eingesetzt. Laktadherin ist ein körpereigenes Protein mit einer PS-Bindungsdomäne, mit der es spezifisch an PS-reiche Regionen an der äußeren Zellmembran bindet. Diese Eigenschaft des Laktadherin wurde hier genutzt, um als kompetitiver Inhibitor für eine mögliche ADAM-Interaktion mit PS zu fungieren.²⁵⁵ Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Laktadherinkonzentration, die ADAM10-vermittelte Substrat-Freisetzung abnahm (Abbildung 18). Dies bestätigt, dass die Interaktion zwischen PS und ADAM10 unter Insulinbehandlung essenziell für den Shedding-Vorgang ist.

Weitere Untersuchungen des Aktivierungsmechanismus ergaben, dass der hauptverantwortliche Signalweg, der sowohl zur ADAM-Aktivierung als auch zur PS-Externalisierung führt, über PI3K und AKT vermittelt ist. Für diese Untersuchungen wurde die Shedding-Aktivität (Abbildung 14) und die PS-Externalisierung (Abbildung 17) nach Insulin-Stimulation unter der Anwesenheit von dem PI3K-Inhibitor Wortmannin analysiert. Diese Erkenntnisse bestätigen die bestehende Literatur, die den metabolischen PI3K/AKT-Signalweg für die Vermittlung der Shedding-Aktivität beschreiben.^{185,249}

Eine Ausnahme stellt hier die Neuroglioma-Zelllinie H4 dar, in der unter Insulin-Behandlung zwar eine erhöhte Freisetzung von dem ADAM17-Substrat TNF-Rezeptor 1 festgestellt werden konnte. Allerdings scheint dies in dieser Zelllinie nicht auf den

PI3K/AKT-Signalweg zurückzuführen zu sein, denn Insulin führte nicht zu einer Zunahme von phosphoryliertem AKT (Abbildung 14). Auffällig war dabei, dass die Phosphorylierung von AKT in den unstimulierten Zellen schon relativ hoch war, sodass es auch möglich ist, dass eine weitere Zunahme von phosphorylierten AKT durch Insulin technisch nicht zu detektieren war. Eine andere Möglichkeit ist, dass in neuronalen Zellen ein anderer Signalweg zu der Stimulation von ADAM17 durch Insulin führt. Im Gegensatz dazu zeigt die Studie von Solano *et al.*, dass in der Neuroblastoma-Zelllinie SHSY Insulin über den PI3K/AKT-Signalweg zu einer gesteigerten APP-Freisetzung führt.²⁴⁹ Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise durch die Verwendung von unterschiedlichen Zelllinien zu erklären. In zukünftigen Experimenten würde es sinnvoll sein, die Beteiligung anderer Insulin-Signalwege in den H4-Zellen zu untersuchen, wie z.B. die des mitogenen Insulinsignalwegs. Dafür wäre der Einsatz von Inhibitoren der Ras/MAPK-Signalkaskade wie z.B. der Ras-Inhibitor Salirasib vorzuschlagen.²⁵⁶

Die Untersuchung der Beteiligung aller durch Insulin-induzierten Signalwege im Hinblick auf die Shedding-Aktivität der ADAMs ist auch für die anderen Zelllinien sinnvoll. Jedoch hatte Wortmannin in den übrigen getesteten Zelllinien (HT-29, HuH7 und HepG2) einen starken Effekt, der vergleichbar mit der unstimulierten Kontrolle war. Daher ist davon auszugehen, dass der PI3K/AKT-Signalweg in den verwendeten Kolorektal- und hepatozellulären Krebszellen der Hauptsignalweg für die PS-Externalisierung und ADAM-Aktivierung durch Insulin ist.

Darüber hinaus wurde die These, dass die Insulin-vermittelte ADAM-Aktivierung über den PI3K/AKT-Signalweg reguliert ist, nochmals durch ein Insulinresistenz-Modell bestätigt (Abbildung 15, 17). Dieses Modell hat den Vorteil, dass kein Inhibitor eingesetzt werden muss, sondern basiert auf der Absättigung und Herunterregulation des Insulin-Rezeptors. Es konnte beobachtet werden, dass bei einer derartigen Insulinresistenz, die Phosphorylierung von AKT nach Insulin-Behandlung nicht mehr stattfindet (Abbildung 15). Bei insulinresistenten Zellen war keine Insulin-induzierte ADAM-Aktivierung mehr zu beobachten, ebenso wenig wie die Externalisierung von PS. Diese Beobachtungen sind nicht auf eine veränderte ADAM-Expression zurückzuführen, denn diese blieb in insulinresistenten Zellen unverändert. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs sowie die des Insulinrezeptors für den Insulin-vermittelten Aktivierungsmechanismus von ADAM10 und -17.

Hierbei ist zu bemerken, dass die klinische Insulinresistenz meist nicht eine totale Insulinresistenz darstellt, sondern viel mehr eine herabgesetzte Insulinsensitivität, die je nach Patient und Krankheitsstatus variiert.^{247,257} Es ist also nicht davon auszugehen, dass *in vivo* eine ebenso starke Regulation der ADAM-Aktivierung durch die Insulinresistenz auftritt wie in dem verwendeten *in vitro*-Modell. Nichtsdestotrotz ist es interessant zu spekulieren, dass die betroffenen Insulin-unsensitiven Zellen, wie sie z.B. bei Diabetes mellitus-Patienten vorkommen, eine herabgesetzte Shedding-Aktivität der ADAMs aufweisen könnten. Diese Dysregulation der ADAM-Proteasen könnte mitverantwortlich für eine Reihe von Folgeerkrankungen sein. Denkbar wäre hier beispielsweise eine erhöhte Produktion von A β -Peptiden durch eine verminderte ADAM10-vermittelte APP-Spaltung im Gehirn. Dies würde das Risiko für die Alzheimer-Krankheit erhöhen, so wie es in Diabetes-Patienten bereits beschrieben ist.^{258,259} Weiterhin könnte man spekulieren, dass eine herabgesetzte ADAM17-vermittelte Substrat-Freisetzung zu einer Dysregulation der Immunantwort durch die verminderte Freisetzung des TNF-Rezeptors führt. In HT29 und HuH7-Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es unter Insulinresistenz zu einer verminderten Freisetzung des TNF-Rezeptors 1 kommt. Damit wären die betroffenen Zellen sensitiver für pro-apoptotische Signale und entzündliche Prozesse wie sie in Geweben und Organen von Diabetes-Patienten beobachtet werden.²⁶⁰ Zu dieser Annahme passen klinische Studien, die zeigen, dass freigesetztes TNFR1 mit Organversagen, Gewebeschäden und einer verschlechterten Überlebensrate von Diabetes-Patienten korreliert und TNFR1 als prognostischen Marker für Typ-2-Diabetes vorschlagen.^{261,262}

An dieser Stelle ist es wichtig zu unterscheiden, dass in Tumorzellen in der Regel keine Insulinresistenz auftritt, da sie eine stark erhöhte Anzahl an Insulinrezeptoren exprimieren.¹⁷⁵ Darüber hinaus sind in Krebszellen hochregulierte Insulin-Signalwege beschrieben.¹⁸⁹ Daher ist *in-vivo* nicht von einer Herunterregulation der Shedding-Aktivität auszugehen, sondern viel eher von einer durch Insulin-induzierten erhöhten Aktivität in Krebszellen. Diese Annahme deckt sich mit einer Vielzahl an Publikationen, die eine erhöhte Shedding-Aktivität in verschiedenen Krebsarten beschreiben.^{263,264} Eine Insulin-vermittelte Aktivierung von ADAM10- und -17-Substraten wie z.B. EGFR-Liganden hätte in diesem Zusammenhang gravierende Folgen, da die Bindung dieser Liganden an die EGF-Rezeptoren zu Zellwachstum und Proliferation der Krebszellen führt.^{18,265}

5.2.2 FUNKTIONELLE RELEVANZ DER INSULIN-INDUZIERTEN SHEDDING-AKTIVITÄT

Die mögliche funktionelle Relevanz der Insulin-vermittelten Freisetzung von Fraktalkin durch ADAM10 in Leberkrebszellen wurde weiterführend untersucht. Leberkrebszellen sind in diesem Zusammenhang von besonderer physiologischer Relevanz, da die Leber ein Hautzielorgan von Insulin darstellt.¹⁸⁷

Fraktalkin bindet als Adhäsionsmolekül den Fraktalkin-Rezeptor (CX3CR1), der auf Immunzellen exprimiert ist. Damit kommt Fraktalkin eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem Immunsystem zu: Es wurde gezeigt, dass bei entzündlichen Prozessen die Fraktalkin-Expression hochreguliert ist, das zur Erkennung und Eliminierung der entsprechenden Zelle durch Immunzellen wie z.B. Monozyten oder Lymphozyten führt.^{46,47} In diesem Zusammenhang wurde auch beschrieben, dass membranständiges Fraktalkin in der Lage ist natürliche Killerzellen zu aktivieren, die die Eliminierung der betroffenen Zelle einleiten.^{266,267} Die Untersuchung von Fraktalkin ist weiterhin von Interesse, da dessen Expression mit Krebserkrankungen und T2DM assoziiert wurde.^{49,268} Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Fraktalkin-Rezeptor in Krebszellen hochexprimiert ist.⁴⁶

Die Adhäsionseigenschaft des ungeschnittenen, membranständigen Fraktalkins wurde in folgenden Experimenten zu Nutze gemacht: Darauf basierend wurde ein Adhäsionstest etabliert. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass Insulin, durch die ADAM10-vermittelte Freisetzung von Fraktalkin, zu einer verminderten Adhäsion von monozytären THP1-Zellen führt (Abbildung 19). Dieser Effekt konnte, durch den Einsatz von rekombinantem Fraktalkin, auf die spezifische Bindung von Fraktalkin mit dem CX3CR1 zurückgeführt werden. Außerdem konnte, durch den Einsatz von entsprechenden Inhibitoren, der vorher beschriebene Insulin-vermittelte Aktivierungsmechanismus von ADAM10 (MM/GW/GI) über den PI3K/AKT-Signalweg (Wortmannin) und PS-Externalisierung (Laktadherin) validiert werden (Abbildung 19).

Obwohl für Fraktalkin beschrieben wurde, dass es sowohl von ADAM10 als auch von ADAM17 prozessiert werden kann,^{19,48} zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass unter Insulin-Stimulation ADAM10 die hauptverantwortliche Protease für die Freisetzung von Fraktalkin ist, da der ADAM10-spezifische Inhibitor GI einen vergleichbaren Effekt wie Marimastat und der ADAM10- und -17-spezifische Inhibitor GW aufweist (Abbildung 13, 19).

Basierend auf diesen Ergebnissen ergibt sich folgende mögliche funktionelle Relevanz: Insulin führt über den PI3K/AKT-Signalweg zu einer PS-Externalisierung. PS bindet an der äußeren Zellmembran ADAM10 und es kommt zur Aktivierung der Protease. Anschließend wird, durch ADAM10-vermittelt, vermehrt Fraktalkin von der Oberfläche der Leberkarzinomzelle freigesetzt, wodurch die CX3CR1-exprimierenden monozytären THP1-Zellen nicht mehr an die Leberkrebszelle binden können (Abbildung 22).

Es liegt nahe zu spekulieren, dass es durch die verminderte Adhäsion auch zu einer reduzierten Erkennung und Eliminierung der Leberkrebszellen durch Immunzellen kommen könnte. Damit könnten diese Prozesse dazu beitragen, dass Leberkrebszellen der Immunantwort entfliehen.

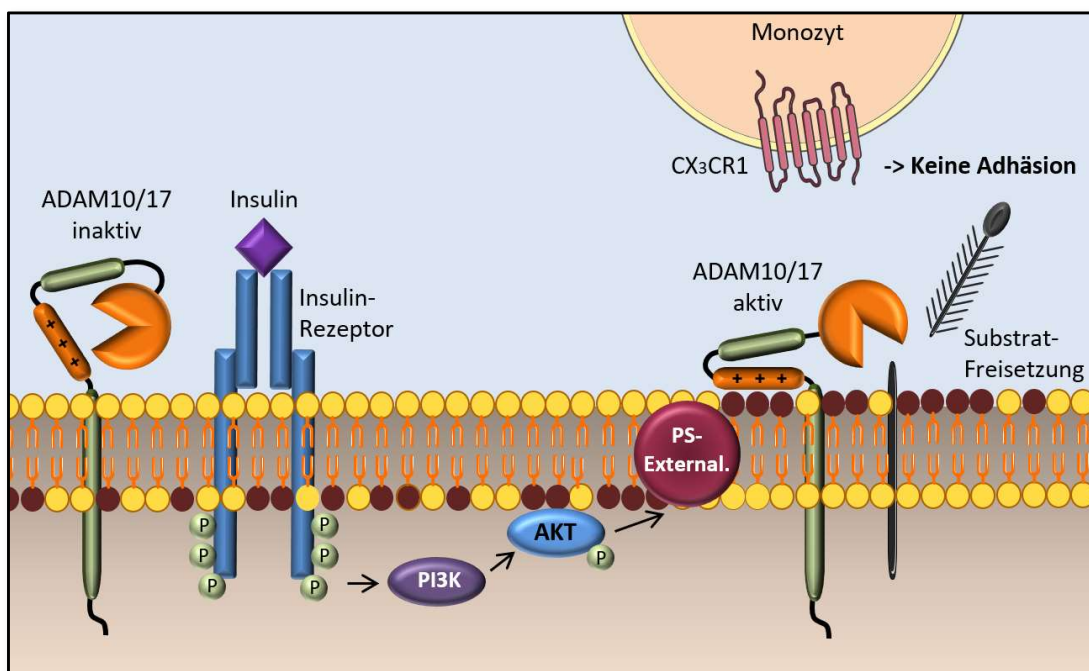


ABBILDUNG 22 – SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SHEDDING-AKTIVIERUNG DURCH INSULIN UND DIE FUNKTIONELLE RELEVANZ

Eine Limitation des Adhäsionstests ist, dass es sich hierbei um ein statisches Modell handelt. *In vivo* sind die Immunzellen zum großen Teil im Blutstrom enthalten und es wirken Scherkräfte auf den Adhäsionsprozess, die nicht durch das verwendete Modell abgebildet werden. Außerdem sind noch weitere Proteine wie beispielsweise Integrine und Selektine an der Adhäsion von Immunzellen beteiligt.²⁶⁹ In dem hier verwendeten Versuchsaufbau zeigt der Einsatz von rekombinantem Fraktalkin jedoch, dass Fraktalkin hauptsächlich die Adhäsion der THP1-Zellen an den HepG2-Zellen vermittelt. Es bleibt zu zeigen wie hoch die Beteiligung von Fraktalkin an dem Adhäsionsprozess *in vivo* ist. So zeigt z.B. die Studie von Kerfoot *et al.*, dass die Adhäsionswirkung von Fraktalkin

allein im Blutstrom mit Scherkräften nicht ausreichend für eine Zelladhäsion ist und postuliert, dass andere Proteine die Adhäsion zusammen mit Fraktalkin regulieren.²¹⁸ Entsprechende Versuche, die die Insulin-regulierte Immunzellen-Adhäsion unter Einbeziehung der Scherkräfte im Blutstrom abbilden, stehen noch aus.

Eine andere interessante Frage ist die nach der Funktion des durch Insulin freigesetzten Fraktalkins. Proteolytisch-freigesetztes Fraktalkin fungiert als Chemoattraktant und führt dazu, dass CX3CR1-exprimierende Zellen an den Ort der Freisetzung geleitet werden.^{50,51} Dies kann auf der einen Seite pro-inflammatorische Wirkungen haben, da Immunzellen zum Ort der Krebserkrankung wandern. Auf der anderen Seite wurde eine erhöhte CX3CR1-Expression in Tumorzellen beschrieben, die ebenfalls durch den chemotaktischen Konzentrationsgradienten angelockt werden könnten. Um diese Vermutungen zu überprüfen, könnten Migrationsversuche durchgeführt werden, in denen analysiert wird zu welchem Grad Immunzellen, aber auch Krebszellen, in der Lage sind zu Insulin-behandelten Leberkrebszellen zu wandern.

5.2.3 HYPOXISCHES MIKROMILIEU REGULIERT DIE INSULIN-VERMITTELTE SHEDDING-AKTIVITÄT

Das Mikromilieu von Geweben und Organen beeinflusst die zellulären Prozesse. Es wird geprägt durch Faktoren wie der extrazellulären Matrix, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren.²⁷⁰ Ein weiterer Faktor, der das zelluläre Mikromilieu ausmacht, ist die Sauerstoffverfügbarkeit, die je nach Gewebe und Organ zwischen 1-11 % O₂ liegt.⁷³ Dabei tritt eine besonders niedrige Sauerstoffverfügbarkeit in Organen und Geweben von Typ-2-Diabetes mellitus-Patienten durch Veränderungen und Schäden an den Blutgefäßen auf, die zu einer Minderversorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen führt, wobei nicht nur Herz, Nieren, Leber und Gehirn, sondern auch die unteren Extremitäten (Unterschenkel, Füße) betroffen sind. Dies beeinträchtigt insbesondere bei Nervenfunktionsstörungen die Wundheilung und führt zur Entwicklung des diabetischen Fußsyndroms.⁸³ Außerdem tritt Hypoxie in Tumorgewebe auf, verursacht beispielsweise durch ein gestörtes Gefäßnetzwerk oder unzureichende Neovaskularisation.⁸⁴ Inwiefern die Expression und Shedding-Aktivität der ADAM-Proteasen durch eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst wird, ist jedoch bislang kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Insulin-vermittelte Aktivierungsmechanismus der ADAM-Proteasen in einem hypoxischen Mikromilieu weitergehend untersucht.

Überraschenderweise wurde in den ersten Versuchen unter Hypoxie, in denen die Zellen mit CoCl_2 simuliert wurden, beobachtet, dass die Regulation der Shedding-Aktivität durch Insulin im Vergleich zu den Ergebnissen in einem normoxischen Mikromilieu verändert ist: Die ADAM-vermittelte Substrat-Freisetzung war unter den getesteten Hypoxie-Bedingungen nicht durch Insulin stimulierbar. Außerdem kam es zu einer reduzierten Phosphorylierung von AKT durch Insulin unter Hypoxie. Dabei ist eine veränderte Expression des Insulinrezeptors unter Hypoxie nicht für die verminderte Insulin-vermittelte Phosphorylierung von AKT verantwortlich, da die Proteinexpression vergleichbar zu der unter normoxischen Bedingungen war (Abbildung 20). Diese Beobachtungen sind im Einklang mit der Studie von Taniguchi *et al.*, die 2013 beschrieb, dass der PI3K/AKT-Signalweg bei Insulinstimulation unter hypoxischen Bedingungen herunterreguliert ist.²⁷¹ Auf der anderen Seite widersprechen diese Ergebnisse einer Reihe von Publikationen, die beschreiben, dass in Tumorgeweben die Insulin-Signalwege hochreguliert sind.^{174,189,245}

Weiterhin ist zu vermuten, dass der Einfluss von Hypoxie auf die veränderte Stimulierbarkeit der Proteasen durch Insulin nicht auf eine veränderte Proteinexpression der ADAMs zurückzuführen ist, da diese unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen vergleichbar war. Einvernehmlich damit konnte gezeigt werden, dass die Shedding-Aktivität unter konstitutiven Bedingungen unter Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen unverändert blieb. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit einer Reihe von Studien, die eine veränderte mRNA-Expression von ADAM10 und -17 unter hypoxischen Bedingungen beschrieben haben. Die Studien zeigen allerdings kein einheitliches Bild der Regulation der Proteasen-Expression: Unter reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit wurden sowohl hoch- und herunterregulierte als auch unveränderte ADAM-Expressionen identifiziert,^{85,86,272} die je nach Gewebe- bzw. Zelltyp und hypoxischem Zustand variieren. Auszuschließen ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht, ob die Oberflächen-Expression der ADAM-Proteasen unter den getesteten Hypoxie-Bedingungen verändert ist. Dieses könnte beispielsweise durch einen veränderten Transport unter hypoxischen Bedingungen verursacht sein könnte.

Nichtsdestotrotz deuten die gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass die verminderte Shedding-Aktivität der ADAMs auf einen reduzierten PI3K/AKT-Signalweg unter

Hypoxie zurückzuführen ist. Es bleibt zu analysieren, ob dieser Effekt – wie unter Normoxie – über die PS-Externalisierung reguliert ist.

Um hypoxische Bedingungen *in vitro* zu untersuchen wird standardmäßig CoCl_2 verwendet.⁸⁰ Allerdings ist der Einsatz des Inhibitors umstritten, da zum einen ab einer Konzentration von über 250 μM CoCl_2 zelltoxische Wirkung festgestellt wurde.²²⁶ Zum anderen sind die zellulären Prozesse, die unter Hypoxie verändert sind, nur eingeschränkt durch den Einsatz von Prolyl-Hydroxylasen-Inhibitoren wie CoCl_2 nachstellbar: Es finden unter hypoxischen Bedingungen noch viele weitere Vorgänge statt, wie beispielsweise die Anpassung der Zellen durch Umstellung der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung auf die Glykolyse, die Angiogenese aber auch metabolische Modulationen wurden beschrieben.⁵⁸ Daher können die Experimente mit CoCl_2 nur erste Hinweise auf mögliche Veränderungen unter hypoxischen Bedingungen liefern.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Hypoxie-Kammer verwendet, in der die Insulin-vermittelte ADAM-Aktivierung unter kontrollierten Sauerstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten untersucht werden sollte. Hier konnten aus Zeitgründen nur vorläufige Ergebnisse erzielt werden ($n=1$). Überraschenderweise zeigten diese eine unterschiedliche Regulation des metabolischen Insulinsignalwegs unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. So konnten die Ergebnisse der vorherigen Versuche mit CoCl_2 in der Hypoxie-Kammer mit einer Sauerstoffkonzentration von 1 % und 3 % O_2 nach 24 Stunden Inkubationszeit validiert werden: Insulin-Behandlung führte zu einer reduzierten Stimulierbarkeit des PI3K/AKT-Signalwegs, das mit einer eingeschränkten Stimulierbarkeit der Shedding-Aktivität durch Insulin einher ging. Allerdings zeigte sich ein anderes Bild bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit 3 % O_2 : Hier konnte unter Hypoxie ein verstärkter PI3K/AKT-Signalweg nach der Insulin-Behandlung beobachtet werden, der überraschenderweise nicht mit einer Stimulation der ADAM-vermittelten Substrat-Freisetzung einherging (Abbildung 21). Auch hier konnten die Effekte nicht auf Unterschiede in der Insulinrezeptor-Expression zurückgeführt werden, denn diese war unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen vergleichbar. Eine mögliche veränderte Expression der ADAM-Proteasen bei den unterschiedlichen Inkubationszeiten unter verminderter Sauerstoffverfügbarkeit müsste in Folgeexperimenten noch weiter analysiert werden.

Basierend auf den Ergebnissen mit der Hypoxie-Kammer können zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Schlüsse gezogen werden, da der Nachweis der Hypoxie in Form einer

Detektion von HIF-1 α noch aussteht. Dieser fehlende Nachweis ist wahrscheinlich auf technische Probleme zurückzuführen, die es in zukünftigen Experimenten zu optimieren gilt: HIF-1 α wird innerhalb weniger Minuten degradiert,²⁷³ sodass während der Tätigkeiten außerhalb der Hypoxie-Kammer wie bei der Stimulation der Zellen oder nach Beendigung des Versuchs zügig gearbeitet werden sollte. Außerdem wäre der Einsatz eines Proteasom-Inhibitors oder CoCl₂ im Lysepuffer der Zellen sinnvoll, um die Degradierung von HIF-1 α während der Lyse zu verhindern.

Auch wenn auf weitere oben genannte Untersuchungen aus Zeitgründen leider verzichtet werden musste, weisen die bislang gewonnenen Daten auf eine veränderte Insulin-vermittelte Regulation von ADAM10 und ADAM17 bei verringerter Sauerstoffverfügbarkeit hin. Dies ist insbesondere relevant für Fragestellungen, die sich mit der Rolle von ADAM10 und ADAM17 in Tumoren und diabetischem Gewebe beschäftigen, da diese Bereiche *in vivo* oftmals von einer Hypoxie betroffen sind.

5.3 AUSBLICK

Im Hauptteil dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Insulin über den metabolischen Signalweg unter Beteiligung der Zellmembran in Form von Phosphatidylserin-Externalisierung zur Aktivierung des Shedding-Vorgangs von ADAM10 und ADAM17 führt. In insulinresistenten Zellen konnte eine verminderte Phosphatidylserin-Externalisierung und Shedding-Aktivität der ADAM-Proteasen durch Insulin beobachtet werden. Wohingegen in Leberkrebszellen gezeigt werden konnte, dass Insulin zu einer verminderten Monozyten-Adhäsion führt.

Im Hinblick auf Tumore konnte bereits beschrieben werden, dass sowohl die Expression von Insulinrezeptoren, die Aktivität nachgeschalteter Insulin-Signaltransduktion, Phosphatidylserin-Externalisierung als auch die Shedding-Aktivität der ADAM-Proteasen erhöht sind.^{134,274,275} Die Daten dieser Arbeit implizieren somit einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Insulinsignalweg und der Aktivität von ADAM10 und ADAM17 für die Tumorbildung.

Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten Proben aus klinischen Studien mit Wirkstoffen, die den metabolischen Insulin-Signalweg inhibieren im Hinblick auf die Freisetzung von ADAM-Substraten und die Phosphatidylserin-Externalisierung analysiert werden. Zurzeit werden z.B. unterschiedliche PI3K-Inhibitoren als potenzielles Krebs-Medikament getestet.²⁷⁶ Als weiterführende Untersuchung im Kontext der Behandlung mit PI3K-Inhibitoren wäre zum einen die Freisetzung von ADAM-spezifischen Substraten in Serum der Patienten wie z.B. TNFR1 oder Fraktalkin vorzuschlagen. Zum anderen könnte man Phosphatidylserin auf Zelloberflächen der Tumore und gesundem Gewebe als Kontrolle der Patienten vor und nach PI3K-Inhibitor-Behandlung analysieren. Die Identifizierung von Phosphatidylserin könnte z.B. mit Hilfe des Phosphatidylserin-erkennenden Peptids 1 (PSP1) durchgeführt werden, denn PSP1 wurde als Phosphatidylserin-Marker für die molekulare Bildgebung *in vivo* und als sensitiver im Vergleich zu AnnexinV beschrieben.^{277,278}

Außerdem ist von Interesse die Ergebnisse dieser Arbeit auf ihre funktionelle Relevanz *in vivo* weiterführend zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Insulin-vermittelte ADAM10-Aktivierung in Leberkrebszellen zu einer gesteigerten Fraktalkin-Freisetzung und folglich zu einer reduzierten Monozyten-Adhäsion führt. Dahingehend könnte man vermuten, dass es durch diesen Vorgang möglicherweise zu einer verminderten Immunzellen-Erkennung und Eliminierung von Leberkrebszellen

kommt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre zunächst ein Monitoring von freigesetztem Fraktalkin in Seren vor und nach Insulin-Behandlung von Diabetes mellitus- Patienten mit Leberkarzinom hilfreich. Optimalerweise kann man durch die Menge an freigesetztem Fraktalkin oder anderen spezifischen ADAM10- oder -17-Substraten in den Seren der Patienten eine Initiierung der Shedding-Aktivität durch Insulin nachweisen. Interessanterweise zeigen bereits existierende klinische Daten, dass erhöhte Fraktalkin-Level mit B-Zell-Lymphomen und mit Typ-2-Diabetes mellitus assoziiert sind.^{46,268}

Die Untersuchung der Insulin-vermittelten Shedding-Aktivität der ADAM-Proteasen bei verringerter Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie) war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Hypoxie ist in diesem Zusammenhang von Interesse, da hypoxische Bedingungen in Organen und Geweben von Diabetes mellitus-Patienten sowie in Tumorgewebe beschrieben wurden.^{83,84} Der größte Teil der vorläufigen Ergebnisse zeigte, dass unter Hypoxie der metabolische PI3K/AKT-Signalweg durch Insulin im Vergleich zur Normoxie reduziert ist und die Shedding-Aktivität der ADAMs nicht induziert werden kann. Diese Ergebnisse widersprechen einem Großteil der Literatur, die eine Induktion der ADAM-Expression und Shedding-Aktivität in Krebsgeweben beschreiben.^{86,279} Daher muss zunächst die Frage geklärt werden, ob hypoxische Bedingungen generell die Stimulationseigenschaft von ADAM-Proteasen beeinflussen oder ob dieser Effekt Insulin-spezifisch durch den herunterregulierten PI3K/AKT-Signalweg zu erklären ist. Hier könnten Versuche mit anderen, gängigen ADAM-Stimulatoren wie Ionomycin oder PMA unter Hypoxie durchgeführt werden. Es wäre darüber hinaus interessant, die Auswirkungen verschiedener auch physiologischer Sauerstoffkonzentrationen auf die Shedding-Aktivität zu untersuchen. So könnte z.B. in Folgeversuchen die Regulation der ADAM-vermittelten Substrat-Freisetzung unter einer Sauerstoffverfügbarkeit von 4-8 % O₂ analysiert werden, dies entspricht einem physiologischen Mikromilieu wie es z.B. in der Leber vorherrscht.⁷⁷

Zusammenfassend betrachtet, tragen die Daten dieser Doktorarbeit zum tieferen Verständnis der Regulation der ADAM-Proteasen im Kontext von Diabetes mellitus und Krebserkrankungen bei. Der identifizierte Aktivierungsmechanismus des Shedding-Vorgangs von ADAM10 und -17 durch Insulin, liefert Einblick in die Bedeutung der Zellmembran als entscheidendes regulatorisches Element und stellt den Ausgangspunkt für zukünftige Studien dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die *a disintegrin and metalloproteinases* (ADAMs) spielen eine zentrale Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit, Krebserkrankungen oder Diabetes mellitus. Die bekanntesten Vertreter dieser Enzymfamilie - ADAM10 und ADAM17 - setzen spezifische Substrate auf der Zellmembran frei, die bei der Entstehung und Entwicklung dieser Krankheiten von Bedeutung sind. Zudem wurde eine Reihe von externen Faktoren identifiziert, die mit den oben genannten Krankheitsbildern assoziiert sind. Diese Arbeit ging der Frage nach, ob ausgesuchte Faktoren einen Einfluss auf die ADAM-Aktivität haben und dadurch eine Rolle bei der Regulation der Krankheitsentwicklung spielen könnten.

Der Einfluss verschiedener externer Faktoren wie Glutamat, Aluminium und Glucose auf die Aktivität von ADAM10 und -17 wurde analysiert. Die Untersuchungen der ADAM-Substrate mittels ELISA und Shedding-Experimenten ergaben, dass keiner der Faktoren einen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 oder -17 unter den getesteten Bedingungen hatte. Obwohl hohe Glucosekonzentrationen die Gesamtproteinexpression beider ADAMs verstärkten, konnte kein Einfluss auf die Shedding-Aktivität festgestellt werden.

Für den Faktor Insulin, der bei Diabetes mellitus extern stark reguliert werden muss, konnte jedoch festgestellt werden, dass er die ADAM-Aktivität beeinflusst.

Dabei konnte hier erstmals beschrieben werden, dass Insulin die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) an die äußere Zellmembran induziert, welches wiederum die Shedding-Aktivität von ADAM10 und ADAM17 reguliert. Mit Hilfe einer AnnexinV-Färbung konnte die PS-Externalisierung in verschiedenen Zelltypen wie in hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen werden. Mit Laktadherin, einem physiologischen Protein, das PS spezifisch bindet, konnte gezeigt werden, dass PS mit ADAM10 auf der Zellmembran interagiert. Diese Interaktion ist für die Insulin-vermittelte Shedding-Aktivierung von ADAM10 unerlässlich.

Der zugrundeliegende intrazelluläre Mechanismus wurde mit Hilfe eines Phosphoinositol-3-Kinase-Inhibitors (PI3K) und eines Insulinresistenz-Modells weiterführend untersucht. Hier konnten wir zeigen, dass der Signalweg, der zur PS-Externalisierung und ADAM-Aktivierung führt, hauptsächlich über PI3K-Aktivierung und AKT-Phosphorylierung vermittelt ist.

Weiterhin wurde die funktionelle Relevanz der Insulin-vermittelten ADAM10-Aktivierung in Leberkrebszellen mit einem Adhäsionstest untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Insulin-vermittelte ADAM10-Aktivierung zur Freisetzung des Adhäsionsmoleküls Fraktalkin und zu einer verminderten Adhäsion von monozytären THP1-Zellen führt. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob dieser Prozess zu einer verminderten Immunantwort gegenüber den Leberkrebszellen - basierend auf der reduzierten Monozyten-Erkennung - führt.

Schließlich wurde der Einfluss einer reduzierten Sauerstoffversorgung (Hypoxie) auf die Insulin-vermittelte ADAM-Aktivierung analysiert. Hypoxie herrscht in Tumor- und diabetischen Geweben vor und wurde mit Hilfe eines Inhibitors (CoCl_2) und einer Hypoxiekammer (1 und 3 % O_2) *in vitro* untersucht. Überraschenderweise konnte kein Einfluss von Insulin auf die ADAM-Aktivierung unter hypoxischen Bedingungen festgestellt werden. Außerdem war - unter den meisten hypoxischen Bedingungen - der PI3K/AKT-Signalweg im Vergleich zu Normoxie (21 % O_2) unter Insulin reduziert. Ausgehend von den vorläufigen Experimenten ist davon auszugehen, dass sowohl der hypoxische Status als auch die Inkubationszeit eine Rolle bei der Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs zu spielen scheinen und weiterführend analysiert werden müssen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Insulin die Phosphatidylserin-Exposition induziert, welches zur Aktivierung von ADAM10 und -17 führt. Dieser Prozess könnte im Zusammenhang mit Insulinresistenz bei Diabetikern, bei denen die Proteasen dysreguliert sein könnten, von Interesse sein. In Krebszellen, in denen sowohl Insulinrezeptoren überexprimiert als auch Insulin-Signalwege hochreguliert sind, ist davon auszugehen, dass die ADAM-Proteasen aktiviert sind. In Leberkrebszellen konnten wir eine funktionelle Relevanz der Insulin-induzierten ADAM10-Aktivierung aufzeigen, die möglicherweise zu einer reduzierten Immunantwort gegenüber Krebszellen führen könnte.

7 SUMMARY

The “a disintegrin and metalloproteinases” (ADAMs) play a central role in inflammatory diseases such as Alzheimer's disease, cancer or diabetes mellitus. The best-known representatives of this enzyme family - ADAM10 and ADAM17 - release specific substrates on the cell membrane that are important for the development of these diseases. In addition, several external factors associated with the above-mentioned pathological conditions have been identified. This work investigated whether selected factors could have an influence on ADAM activity and thus might play a role in the regulation of disease development.

The influence of various external factors such as glutamate, aluminum and glucose on the activity of ADAM10 and -17 was analyzed. Studies of ADAM substrates using ELISA and shedding experiments showed that none of the factors influenced the activity of ADAM10 or -17 under the conditions tested. Although high glucose concentrations induced an increase of the total protein expression of both ADAMs, no effect on shedding activity was found.

However, insulin which must be strongly regulated in diabetes mellitus patients was found to influence ADAM shedding activity.

Here, we describe for the first time that insulin induces the externalisation of phosphatidylserine (PS) to the outer cell membrane, which in turn regulates the shedding activity of ADAM10 and ADAM17. Using AnnexinV staining, PS externalization in various cell types such as hepatocellular and colorectal carcinoma cells could be identified. The PS-ADAM interaction is essential for insulin-mediated ADAM activation which could be shown by using lactadherin, a physiological protein that specifically binds PS and blocked the ADAM-PS interaction at the cell membrane.

The underlying mechanism was further investigated using a phosphoinositol-3-kinase inhibitor (PI3K) and an insulin resistance model. Here we could show that the signaling pathway is leading to PS externalization and ADAM activation is mainly mediated by PI3K activation and AKT phosphorylation.

Furthermore, the functional relevance of insulin-mediated ADAM10 activation in liver cancer cells was investigated with an adhesion assay. Here it was shown that insulin-mediated ADAM10 activation leads to the release of the adhesion molecule fractalkine and reduced adhesion of monocytic THP1 cells. Future studies will show

whether this process leads to a reduced immune response towards liver cancer cells based on reduced leucocyte detection.

Finally, the influence of reduced oxygen supply (hypoxia) on insulin-mediated ADAM activation was analyzed. Hypoxia prevails in tumors and diabetic tissues and was investigated *in vitro* using an inhibitor (CoCl₂) and a hypoxia chamber (1 and 3 % O₂). Surprisingly, no influence of insulin on ADAM activation under hypoxic conditions was observed. In addition, under most hypoxic conditions, the PI3K/AKT pathway was reduced compared to normoxia (21 % O₂) under insulin. The preliminary experiments showed that both, the hypoxic status and the incubation time, seem to play a role in the regulation of the PI3K/AKT signaling pathway and need further analysis.

Taken together, the results of this thesis show that insulin regulates phosphatidylserine exposure, which leads to activation of ADAM10 and -17. This process could be of interest in the context of insulin resistance in diabetic patients in whom the proteases could be dysregulated. In cancer cells, in which insulin receptors are overexpressed as well as insulin signaling is upregulated, it can be assumed that the ADAM proteases are activated. In liver cancer cells we have shown a functional relevance of insulin-induced ADAM10 activation, which could possibly lead to a reduced immune response towards cancer cells.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Rani K, Rana R, Datt S. Review on Latest Overview of Proteases. *Int J Curr Life Sci.* 2012;2(1):12-18. <http://www.ijcls.bret.ac.in>.
2. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. 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 Lett.* 1993;331(1-2):134-140.
3. Huxley-Jones J, Clarke T-K, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol.* 2007;7:63. doi:10.1186/1471-2148-7-63.
4. EDWARDS D, HANDSLEY M, PENNINGTON C. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):258-289. doi:10.1016/j.mam.2008.08.001.
5. Moss ML, Lambert MH. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem.* 2002;38:141-153.
6. Reiss K, Saftig P. The a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(2):126-137. doi:10.1016/j.semcdb.2008.11.002.
7. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 2003;17(1):7-30. doi:10.1101/gad.1039703.
8. Moss ML, Bomar M, Liu Q, et al. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35712-35721. doi:10.1074/jbc.M703231200.
9. Giebler N, Zigrino P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel).* 2016;8(4):122. doi:10.3390/toxins8040122.
10. Janes PW, Saha N, Barton WA, et al. Adam Meets Eph: An ADAM Substrate Recognition Module Acts as a Molecular Switch for Ephrin Cleavage In trans. *Cell.* 2005;123(2):291-304. doi:10.1016/j.cell.2005.08.014.
11. Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, et al. 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 Lett.* 2012;586(8):1093-1100. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.012.
12. Sommer A, Kordowski F, Büch J, et al. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun.* 2016;7:11523. doi:10.1038/ncomms11523.
13. Düsterhöft S, Höbel K, Oldefest M, et al. A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J Biol Chem.* 2014;289(23):16336-16348. doi:10.1074/jbc.M114.557322.

14. Düsterhöft S, Michalek M, Kordowski F, et al. Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity. *Biochemistry*. 2015;54(38):5791-5801. doi:10.1021/acs.biochem.5b00497.
15. Drey Mueller D, Pruessmeyer J, Groth E, Ludwig A. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(6-7):472-485. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.003.
16. Reiss K, Saftig P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(2):126-137. doi:10.1016/J.SEMCDB.2008.11.002.
17. Chantry A, Gregson NA, Glynn P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 1989;264(36):21603-21607.
18. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*. 2004;164(5):769-779. doi:10.1083/jcb.200307137.
19. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, et al. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 2003;102:1186-1195. doi:10.1182/blood-2002-12-3775.
20. Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, et al. Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(1):233-240. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.100.
21. Hurst LA, Bunning RAD, Sharrack B, Woodroffe MN. siRNA knockdown of ADAM-10, but not ADAM-17, significantly reduces fractalkine shedding following pro-inflammatory cytokine treatment in a human adult brain endothelial cell line. *Neurosci Lett*. 2012;521(1):52-56. doi:10.1016/j.neulet.2012.05.057.
22. Chen C-D, Yu Tung T, Liang J, et al. Identification of Cleavage Sites Leading to the Shed Form of the Anti-Aging Protein Klotho. 2014;53:33. doi:10.1021/bi500409n.
23. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998;282(5392):1281-1284.
24. Brou C, Logeat F, Gupta N, et al. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000;5(2):207-216.
25. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729-733. doi:10.1038/385729a0.
26. Moss ML, Jin SL, Becherer JD, et al. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol*. 1997;72(2):127-129.

27. Reddy P, Slack JL, Davis R, et al. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem.* 2000;275(19):14608-14614.
28. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45(2):146-169. doi:10.3109/10409231003628015.
29. Reiss K, Cornelsen I, Husmann M, Gimpl G, Bhakdi S. Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity. *J Biol Chem.* 2011;286(30):26931-26942. doi:10.1074/jbc.M111.243485.
30. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(11):4845-4849.
31. Heller RA, Song K, Onasch MA, Fischer WH, Chang D, Ringold GM. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(16):6151-6155.
32. Lee DC, Sunnarborg SW, Hinkle CL, et al. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;995:22-38.
33. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol.* 2004;164(5):769-779. doi:10.1083/jcb.200307137.
34. Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(1):32-43. doi:10.1038/nrm1548.
35. Sibilica M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science.* 1995;269(5221):234-238.
36. Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW, et al. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* 2003;22(11):2704-2716. doi:10.1093/emboj/cdg264.
37. Blaydon DC, Biancheri P, Di W-L, et al. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med.* 2011;365(16):1502-1508. doi:10.1056/NEJMoal100721.
38. Groot AJ, Vooijs MA. The Role of Adams in Notch Signaling. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 727. ; 2012:15-36. doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_2.
39. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 2000;14(11):1343-1352.
40. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, et al. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 2002;11(21):2615-2624.
41. Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, et al. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci.* 2010;30(14):4833-4844. doi:10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010.

42. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*. 2008;102(10):1192-1201. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.169805.
43. Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, et al. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell–cell adhesion and β -catenin nuclear signalling. *EMBO J*. 2005;24(4):742-752. doi:10.1038/sj.emboj.7600548.
44. Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9182-9187. doi:10.1073/pnas.0500918102.
45. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med*. 2001;193(7):863-872.
46. Ferretti E, Pistoia V, Corcione A. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:480941. doi:10.1155/2014/480941.
47. Liu W, Jiang L, Bian C, et al. Role of CX3CL1 in Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(5):371-383. doi:10.1007/s00005-016-0395-9.
48. Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: versatile “special agents” in vascular inflammation. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):694-703.
49. Tsang JYS, Ni Y-B, Chan S-K, et al. CX3CL1 expression is associated with poor outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(3):495-504. doi:10.1007/s10549-013-2653-4.
50. Rossi D, Zlotnik A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):217-242. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217.
51. Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol*. 2012;226(2):148-157. doi:10.1002/path.3029.
52. Li X, Yan Y, Huang W, Yang Y, Wang H, Chang L. The regulation of TACE catalytic function by its prodomain. *Mol Biol Rep*. 2009;36(4):641-651. doi:10.1007/s11033-008-9224-5.
53. Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, et al. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem*. 1999;274(43):30563-30570.
54. Endres K, Anders A, Kojro E, Gilbert S, Fahrenholz F, Postina R. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem*. 2003;270(11):2386-2393. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03606.x.
55. Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J*. 2000;347 Pt 1(Pt 1):131-138.
56. Schwarz J, Broder C, Helmstetter A, et al. Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2013;1833(12):3355-3367. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.005.

57. Le Gall SM, Maretzky T, Issuree PDA, et al. ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 22):3913-3922. doi:10.1242/jcs.069997.
58. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):38-47. doi:10.1038/nrc704.
59. Cavadas M, Oikonomidi I, Gaspar CJ, et al. Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Rep.* 2017;21(3):745-757. doi:10.1016/J.CELREP.2017.09.074.
60. Seipold L, Damme M, Prox J, et al. Tetraspanin 3: A central endocytic membrane component regulating the expression of ADAM10, presenilin and the amyloid precursor protein. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2017;1864(1). doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.003.
61. Prox J, Willenbrock M, Weber S, et al. Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(17):2919-2932. doi:10.1007/s00018-012-0960-2.
62. Huovila A-PJ, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Kärkkäinen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(7):413-422. doi:10.1016/j.tibs.2005.05.006.
63. Maretzky T, Evers A, Le Gall S, et al. The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding. *J Biol Chem.* 2015;290(12):7416-7425. doi:10.1074/jbc.M114.603753.
64. Grubb S, Poulsen KA, Juul CA, et al. TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed Ca(2+) activation. *J Gen Physiol.* 2013;141(5):585-600. doi:10.1085/jgp.201210861.
65. Kunzelmann K, Nilius B, Owsianik G, et al. Molecular functions of anoctamin 6 (TMEM16F): a chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2014;466(3):407-414. doi:10.1007/s00424-013-1305-1.
66. Veit M, Koyro KI, Ahrens B, et al. Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* August 2018. doi:10.1016/J.BBAMCR.2018.08.011.
67. Prinzen C, Müller U, Endres K, Fahrenholz F, Postina R. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 2005;19(11):1522-1524. doi:10.1096/fj.04-3619fje.
68. Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, et al. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev.* 2007;21(9):1113-1124. doi:10.1101/gad.1533407.
69. Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F. Up-regulation of the α -secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* 2009;23(6):1643-1654. doi:10.1096/fj.08-121392.
70. Reiss K, Cornelsen I, Husmann M, Gimpl G, Bhakdi S. Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity. *J Biol Chem.* 2011;286(30):26931-26942. doi:10.1074/jbc.M111.243485.

71. Speck N, Brandsch C, Schmidt N, et al. The Antiatherogenic Effect of Fish Oil in Male Mice Is Associated with a Diminished Release of Endothelial ADAM17 and ADAM10 Substrates. *J Nutr.* 2015;145(6):1218-1226. doi:10.3945/jn.115.211375.
72. Sommer A, D ppe M, Baumecker L, et al. Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF- α -induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding. *Oncotarget.* 2017;8(42):72584. doi:10.18632/oncotarget.19983.
73. Carreau A, Hafny-Rahbi B El, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1239-1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
74. Albenberg L, Esipova T V, Judge CP, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology.* 2014;147(5):1055-63.e8. doi:10.1053/j.gastro.2014.07.020.
75. Zheng L, Kelly CJ, Colgan SP. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;309(6):C350-60. doi:10.1152/ajpcell.00191.2015.
76. Wilson GK, Tennant DA, McKeating JA. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: Current understanding and future directions. *J Hepatol.* 2014;61(6):1397-1406. doi:10.1016/j.jhep.2014.08.025.
77. Jungermann K, Kietzmann T. Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology.* 2000;31(2):255-260. doi:10.1002/hep.510310201.
78. Fong G-H, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):635-641. doi:10.1038/cdd.2008.10.
79. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ.* 2008;15(4):621-627. doi:10.1038/cdd.2008.12.
80. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp.* 2011;(54). doi:10.3791/2899.
81. Vaupel P, Hückel M. Tumor oxygenation and its relevance to tumor physiology and treatment. *Adv Exp Med Biol.* 2003;510:45-49.
82. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):609-617. doi:10.1038/nri2607.
83. Bento CF, Pereira P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia.* 2011;54(8):1946-1956. doi:10.1007/s00125-011-2191-8.
84. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-732. doi:10.1038/nrc1187.
85. Charbonneau M, Harper K, Grondin F, Pelmus M, McDonald PP, Dubois CM. Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor alpha-induced increases in tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells. *J Biol Chem.* 2007;282(46):33714-33724. doi:10.1074/jbc.M704041200.

86. Rzymiski T, Petry A, Kračun D, et al. The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene*. 2012;31(31):3621-3634. doi:10.1038/onc.2011.522.
87. Marshall AJ, Rattray M, Vaughan PFT. Chronic hypoxia in the human neuroblastoma SH-SY5Y causes reduced expression of the putative α -secretases, ADAM10 and TACE, without altering their mRNA levels. *Brain Res*. 2006;1099(1):18-24. doi:10.1016/J.BRAINRES.2006.05.008.
88. Rybnikova E, Gluschenko T, Galeeva A, et al. Differential expression of ADAM15 and ADAM17 metalloproteases in the rat brain after severe hypobaric hypoxia and hypoxic preconditioning. *Neurosci Res*. 2012;72(4):364-373. doi:10.1016/j.neures.2011.12.010.
89. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1:15056. doi:10.1038/nrdp.2015.56.
90. Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, et al. Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology*. 1993;43(3 Pt 1):515-519.
91. Lammich S, Kojro E, Postina R, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3922-3927.
92. Selkoe DJ, Schenk D. ALZHEIMER'S DISEASE : Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43(1):545-584. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140248.
93. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1456-1464. doi:10.1172/JCI20864.
94. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 1990;248(4959):1122-1124.
95. Allinson TMJ, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. ADAMs family members as amyloid precursor protein γ -secretases. *J Neurosci Res*. 2003;74(3):342-352. doi:10.1002/jnr.10737.
96. Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, et al. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 2010;29(17):3020-3032. doi:10.1038/emboj.2010.167.
97. Peron R, Vatanabe I, Manzine P, Camins A, Cominetti M. Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals*. 2018;11(1):12. doi:10.3390/ph11010012.
98. Vincent B. Regulation of the α -secretase ADAM10 at transcriptional, translational and post-translational levels. *Brain Res Bull*. 2016;126:154-169. doi:10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.03.020.
99. Marcello E, Borroni B, Pelucchi S, Gardoni F, Di Luca M. ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(11):1017-1026. doi:10.1080/14728222.2017.1386176.

100. Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med.* 2017;68(1):413-430. doi:10.1146/annurev-med-042915-103753.
101. Killin LOJ, Starr JM, Shiue IJ, Russ TC. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr.* 2016;16(1):175. doi:10.1186/s12877-016-0342-y.
102. Dosunmu R, Wu J, Basha MR, Zawia NH. Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2007;7(7):887-900. doi:10.1586/14737175.7.7.887.
103. Kornbuber J, Wiltfang J. The role of glutamate in dementia. In: Springer, Vienna; 1998:277-287. doi:10.1007/978-3-7091-6467-9_24.
104. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2017;57(4):1041-1048. doi:10.3233/JAD-160763.
105. Jinap S, Hajeb P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite.* 2010;55(1):1-10. doi:10.1016/j.appet.2010.05.002.
106. Mallick HN. Understanding safety of glutamate in food and brain. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2007;51(3):216-234.
107. Hawkins RA, Viña JR. How Glutamate Is Managed by the Blood-Brain Barrier. *Biology (Basel).* 2016;5(4). doi:10.3390/biology5040037.
108. Smith QR. Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier. *J Nutr.* 2000;130(4):1016S-1022S. doi:10.1093/jn/130.4.1016S.
109. Vazana U, Veksler R, Pell GS, et al. Glutamate-Mediated Blood-Brain Barrier Opening: Implications for Neuroprotection and Drug Delivery. *J Neurosci.* 2016;36(29):7727-7739. doi:10.1523/JNEUROSCI.0587-16.2016.
110. Marques F, Sousa JC, Sousa N, Palha JA. Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2013;8:38. doi:10.1186/1750-1326-8-38.
111. Hamilton A, Esseltine JL, DeVries RA, Cregan SP, Ferguson SSG. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2014;7(1):40. doi:10.1186/1756-6606-7-40.
112. Palop JJ, Mucke L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* 2010;13(7):812-818. doi:10.1038/nn.2583.
113. Verret L, Mann EO, Hang GB, et al. Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *Cell.* 2012;149(3):708-721. doi:10.1016/j.cell.2012.02.046.
114. Hoey SE, Williams RJ, Perkinson MS. Synaptic NMDA Receptor Activation Stimulates β -Secretase Amyloid Precursor Protein Processing and Inhibits Amyloid- Production. *J Neurosci.* 2009;29(14):4442-4460. doi:10.1523/JNEUROSCI.6017-08.2009.

115. LEE RKK, JIMENEZ J, COX AJ, WURTMAN RJ. Metabotropic Glutamate Receptors Regulate APP Processing in Hippocampal Neurons and Cortical Astrocytes Derived from Fetal Rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;777(1):338-343. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb34443.x.
116. Marcello E, Gardoni F, Mauceri D, et al. Synapse-Associated Protein-97 Mediates γ -Secretase ADAM10 Trafficking and Promotes Its Activity. *J Neurosci.* 2007;27(7):1682-1691. doi:10.1523/JNEUROSCI.3439-06.2007.
117. Lesne S, Ali C, Gabriel C, et al. NMDA Receptor Activation Inhibits γ -Secretase and Promotes Neuronal Amyloid- β Production. *J Neurosci.* 2005;25(41):9367-9377. doi:10.1523/JNEUROSCI.0849-05.2005.
118. Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A. Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- β Production. *J Neurosci.* 2010;30(47):15927-15942. doi:10.1523/JNEUROSCI.3021-10.2010.
119. Cirrito JR, Kang J-E, Lee J, et al. Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid- β In Vivo. *Neuron.* 2008;58(1):42-51. doi:10.1016/j.neuron.2008.02.003.
120. Tang BL. Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors. *Cell Adh Migr.* 2009;3(1):118-128.
121. Kim SH, Fraser PE, Westaway D, St. George-Hyslop PH, Ehrlich ME, Gandy S. Group II Metabotropic Glutamate Receptor Stimulation Triggers Production and Release of Alzheimer's Amyloid β 42 from Isolated Intact Nerve Terminals. *J Neurosci.* 2010;30(11):3870-3875. doi:10.1523/JNEUROSCI.4717-09.2010.
122. Ferreira PC, Piai K de A, Takayanagui AMM, Segura-Muñoz SI. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2008;16(1):151-157.
123. BfR-Forum Verbraucherschutz. *Aluminium Im Alltag: Ein Gesundheitliches Risiko? - BfR.*; 2014. https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2014/32/aluminium_im_alltag_ein_gesundheitliches_risiko_-192135.html. Accessed July 6, 2018.
124. Flarend R, Bin T, Elmore D, Hem S. A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem Toxicol.* 2001;39(2):163-168. doi:10.1016/S0278-6915(00)00118-6.
125. Guillard O, Fauconneau B, Olichon D, Dedieu G, Deloncle R. Hyperaluminemia in a woman using an aluminum-containing antiperspirant for 4 years. *Am J Med.* 2004;117(12):956-959. doi:10.1016/j.amjmed.2004.07.047.
126. Kawahara M, Konoha K, Nagata T, Sadakane Y. Aluminum and Human Health: Its Intake, Bioavailability and Neurotoxicity. *Biomed Res Trace Elem.* 2007;18(3):211-220. doi:10.11299/brte.18.211.
127. Priest ND. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *J Environ Monit.* 2004;6(5):375-403. doi:10.1039/B314329P.
128. Ricchelli F, Drago D, Filippi B, Tognon G, Zatta P. Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of β -amyloids. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(15):1724-1733. doi:10.1007/s00018-005-5141-0.

129. Buchta M, Kiesswetter E, Schäper M, et al. Neurotoxicity of exposures to aluminium welding fumes in the truck trailer construction industry. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005;19(3):677-685. doi:10.1016/J.ETAP.2004.12.036.
130. Kiesswetter E, Schäper M, Buchta M, et al. Longitudinal study on potential neurotoxic effects of aluminium: I. Assessment of exposure and neurobehavioural performance of Al welders in the train and truck construction industry over 4 years. *Int Arch Occup Environ Health.* 2007;81(1):41-67. doi:10.1007/s00420-007-0191-2.
131. Banks WA, Niehoff ML, Drago D, Zatta P. Aluminum complexing enhances amyloid β protein penetration of blood-brain barrier. *Brain Res.* 2006;1116(1):215-221. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.112.
132. Wang L, Hu J, Zhao Y, Lu X, Zhang Q, Niu Q. Effects of Aluminium on β -Amyloid (1-42) and Secretases (APP-Cleaving Enzymes) in Rat Brain. *Neurochem Res.* 2014;39(7):1338-1345. doi:10.1007/s11064-014-1317-z.
133. Zhang QL, Jia L, Jiao X, et al. APP/PS1 Transgenic Mice Treated with Aluminum: An Update of Alzheimer's Disease Model. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(1):49-58. doi:10.1177/039463201202500107.
134. Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM. Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1140-1144. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1585.
135. Arribas J, Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(1):57-68. doi:10.1007/s10555-006-7889-6.
136. McGowan PM, McKiernan E, Bolster F, et al. ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Ann Oncol.* 2008;19(6):1075-1081. doi:10.1093/annonc/mdm609.
137. Ding X, Yang L-Y, Huang G-W, Wang W, Lu W-Q. ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004;10(18):2735-2739.
138. Katakowski M, Jiang F, Zheng X, Gutierrez JA, Szalad A, Chopp M. Tumorigenicity of cortical astrocyte cell line induced by the protease ADAM17. *Cancer Sci.* 2009;100(9):1597-1604. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01221.x.
139. Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Zhang ZG, Lu Q, Chopp M. ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(11):1045-1054.
140. Borrell-Pagès M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J.* 2003;22(5):1114-1124. doi:10.1093/emboj/cdg111.
141. Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H, Röcken C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131(1):41-48. doi:10.1007/s00432-004-0619-y.
142. Planque C, Kulasingam V, Smith CR, Reckamp K, Goodglick L, Diamandis EP. Identification of Five Candidate Lung Cancer Biomarkers by Proteomics Analysis of Conditioned Media of Four Lung Cancer Cell Lines. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(12):2746-2758. doi:10.1074/mcp.M900134-MCP200.

143. Lee SB, Schramme A, Doberstein K, et al. ADAM10 Is Upregulated in Melanoma Metastasis Compared with Primary Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011;130(3):763-773. doi:10.1038/JID.2009.335.
144. Crawford HC, Dempsey PJ, Brown G, Adam L, Moss ML. ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Curr Pharm Des*. 2009;15(20):2288-2299.
145. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Röcken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2005;26(1):17-24.
146. Ko S-Y, Lin S-C, Wong Y-K, Liu C-J, Chang K-W, Liu T-Y. Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2007;245(1-2):33-43. doi:10.1016/j.canlet.2005.10.019.
147. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(5):338-351. doi:10.1038/nrc3035.
148. Roca C, Adams RH. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev*. 2007;21(20):2511-2524. doi:10.1101/gad.1589207.
149. Giancotti FG. Mechanisms Governing Metastatic Dormancy and Reactivation. *Cell*. 2013;155(4):750-764. doi:10.1016/j.cell.2013.10.029.
150. Miele L, Espinoza I, Pochampally F, Watabe K, Xing F. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotargets Ther*. 2013;6:1249. doi:10.2147/OTT.S36162.
151. Atapattu L, Saha N, Chheang C, et al. An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth. *J Exp Med*. 2016. doi:10.1084/jem.20151095.
152. Singh B, Schneider M, Knyazev P, Ullrich A. UV-induced EGFR signal transactivation is dependent on proligand shedding by activated metalloproteases in skin cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2009;124(3):531-539. doi:10.1002/ijc.23974.
153. Chang HJ, Yoo BC, Lim S-B, Jeong S-Y, Kim WH, Park J-G. Metabotropic Glutamate Receptor 4 Expression in Colorectal Carcinoma and Its Prognostic Significance. *Clin Cancer Res*. 2005;11(9):3288-3295. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1912.
154. Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, et al. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet*. 2003;34(1):108-112. doi:10.1038/ng1148.
155. de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*. 2011;59(8):1181-1189. doi:10.1002/glia.21113.
156. Koochekpour S. Glutamate, a metabolic biomarker of aggressiveness and a potential therapeutic target for prostate cancer. *Asian J Androl*. 2013;15(2):212-213. doi:10.1038/aja.2012.145.
157. Herner A, Sauliunaite D, Michalski CW, et al. Glutamate increases pancreatic cancer cell invasion and migration via AMPA receptor activation and Kras-MAPK signaling. *Int J Cancer*. 2011;129(10):2349-2359. doi:10.1002/ijc.25898.

158. Rzeski W, Turski L, Ikonomidou C. Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6372-6377. doi:10.1073/pnas.091113598.
159. Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer. *J Neural Transm*. 2014;121(8):933-944. doi:10.1007/s00702-014-1182-6.
160. Darbre PD. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem*. 2005;99(9):1912-1919. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.06.001.
161. Mandriota SJ, Tenan M, Ferrari P, Sappino A-P. Aluminium chloride promotes tumorigenesis and metastasis in normal murine mammary gland epithelial cells. *Int J Cancer*. 2016;139(12):2781-2790. doi:10.1002/ijc.30393.
162. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90. doi:10.3322/caac.20107.
163. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529-538. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013.
164. Hassan M, Hwang L, Hatten CJ, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: Synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2002;36(5):1206-1213. doi:10.1053/jhep.2002.36780.
165. Lai S-W, Chen P-C, Liao K-F, Muo C-H, Lin C-C, Sung F-C. Risk of Hepatocellular Carcinoma in Diabetic Patients and Risk Reduction Associated With Anti-Diabetic Therapy: A Population-Based Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(1):46-52. doi:10.1038/ajg.2011.384.
166. Tsai W-C, Hsu PW-C, Lai T-C, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(5):1571-1582. doi:10.1002/hep.22806.
167. YUAN S, LEI S, WU S. ADAM10 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma and contributes to the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells. *Oncol Rep*. 2013;30(4):1715-1722. doi:10.3892/or.2013.2650.
168. Li X, Song D, Leng SX. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging*. 2015;10:549-560. doi:10.2147/CIA.S74042.
169. Naito R, Miyauchi K. Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Int Heart J*. 2017;58(4):475-480. doi:10.1536/ihj.17-191.
170. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1674-1685. doi:10.2337/dc10-0666.
171. Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2007;30(1):162-172. doi:10.2337/dc07-9917.
172. Ryu TY, Park J, Scherer PE. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J*. 2014;38(5):330-336. doi:10.4093/dmj.2014.38.5.330.
173. Orgel E, Mittelman SD. The links between insulin resistance, diabetes, and cancer. *Curr Diab Rep*. 2013;13(2):213-222. doi:10.1007/s11892-012-0356-6.

174. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocr Rev.* 2009;30(6):586-623. doi:10.1210/er.2008-0047.
175. Malaguarnera R, Belfiore A. The insulin receptor: a new target for cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:93. doi:10.3389/fendo.2011.00093.
176. Bao C, Pedersen NL, Yang R, et al. Diabetes in midlife and risk of cancer in late life: A nationwide Swedish twin study. *Int J Cancer.* March 2018. doi:10.1002/ijc.31365.
177. Serino M, Menghini R, Fiorentino L, et al. Mice Heterozygous for Tumor Necrosis Factor- Converting Enzyme Are Protected From Obesity-Induced Insulin Resistance and Diabetes. *Diabetes.* 2007;56(10):2541-2546. doi:10.2337/db07-0360.
178. Togashi N, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K. Effect of TNF- α -converting enzyme inhibitor on insulin resistance in fructose-fed rats. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2002;39(2 Pt 2):578-580.
179. Li R, Uttarwar L, Gao B, et al. High Glucose Up-regulates ADAM17 through HIF-1 α in Mesangial Cells. *J Biol Chem.* 2015;290(35):21603-21614. doi:10.1074/jbc.M115.651604.
180. Reddy ABM, Ramana K V., Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose Reductase Regulates High Glucose-Induced Ectodomain Shedding of Tumor Necrosis Factor (TNF)- α via Protein Kinase C- δ and TNF- α Converting Enzyme in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology.* 2009;150(1):63-74. doi:10.1210/en.2008-0677.
181. Li R, Uttarwar L, Gao B, et al. High Glucose Up-regulates ADAM17 through HIF-1 α in Mesangial Cells. *J Biol Chem.* 2015;290(35):21603-21614. doi:10.1074/jbc.M115.651604.
182. Nagai N, Ito Y, Tanino T. Effect of High Glucose Levels on Amyloid β Production in Retinas of Spontaneous Diabetes Mellitus Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(4):601-610. doi:10.1248/bpb.b14-00819.
183. Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, Tanihara H. Vitreous fluid levels of β -amyloid(1-42) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol.* 2005;49(2):106-108. doi:10.1007/s10384-004-0156-x.
184. Anand-Apte B, Ebrahim Q, Cutler A, et al. Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice. Reitsma PH, ed. *PLoS One.* 2010;5(10):e13444. doi:10.1371/journal.pone.0013444.
185. Chen C-D, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(50):19796-19801. doi:10.1073/pnas.0709805104.
186. Unger RH. Klotho-induced insulin resistance: a blessing in disguise? *Nat Med.* 2006;12(1):56-57. doi:10.1038/nm0106-56.

187. Kahn CR. The Molecular Mechanism of Insulin Action. *Annu Rev Med.* 1985;36(1):429-451. doi:10.1146/annurev.me.36.020185.002241.
188. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1):a009191-a009191. doi:10.1101/cshperspect.a009191.
189. Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clin Sci (Lond).* 2009;118(5):315-332. doi:10.1042/CS20090399.
190. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-771.
191. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 1982;42(9):3858-3863.
192. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J cancer.* 1980;26(2):171-176.
193. Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect.* 2005;113(9):1250-1256. doi:10.1289/EHP.7567.
194. Murea M, Ma L, Freedman BI. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev Diabet Stud.* 2012;9(1):6-22. doi:10.1900/RDS.2012.9.6.
195. Parsa N. Environmental factors inducing human cancers. *Iran J Public Health.* 2012;41(11):1-9.
196. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci.* 2013;38(1):6-23. doi:10.1503/jpn.110190.
197. Swendeman S, Mendelson K, Weskamp G, et al. VEGF-A Stimulates ADAM17-Dependent Shedding of VEGFR2 and Crosstalk Between VEGFR2 and ERK Signaling. *Circ Res.* 2008;103(9):916-918. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184416.
198. Hsu H-W, Bondy SC, Kitazawa M. Environmental and Dietary Exposure to Copper and Its Cellular Mechanisms Linking to Alzheimer's Disease. *Toxicol Sci.* February 2018. doi:10.1093/toxsci/kfy025.
199. Polizzi S, Pira E, Ferrara M, et al. Neurotoxic Effects of Aluminium Among Foundry Workers and Alzheimer's Disease. *Neurotoxicology.* 2002;23(6):761-774. doi:10.1016/S0161-813X(02)00097-9.
200. Salib E, Hillier V. A case-control study of Alzheimer's disease and aluminium occupation. *Br J Psychiatry.* 1996;168(2):244-249.
201. Nagasawa K, Ito S, Kakuda T, et al. Transport mechanism for aluminum citrate at the blood-brain barrier: kinetic evidence implies involvement of system Xc⁻ in immortalized rat brain endothelial cells. *Toxicol Lett.* 2005;155(2):289-296. doi:10.1016/j.toxlet.2004.10.004.

202. Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, et al. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol.* 2014;44 Suppl 4(Suppl 4):1-80. doi:10.3109/10408444.2014.934439.
203. Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, et al. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. *J Toxicol Environ Heal Part B.* 2007;10(sup1):1-269. doi:10.1080/10937400701597766.
204. BfR. Aluminium in Lebensmitteln und verbrauchernahen Produkten. *Bundesinstitut für Risikobewertung.* 2017. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zu-aluminium-in-lebensmitteln-und-verbrauchernahen-produkten.pdf>. Accessed June 14, 2018.
205. Peters M, Kauth M, Schwarze J, et al. Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax.* 2006;61:134-139. doi:10.1136/thx.2005.049403.
206. Emerging Risk Factors Collaboration TERF, Sarwar N, Gao P, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet (London, England).* 2010;375(9733):2215-2222. doi:10.1016/S0140-6736(10)60484-9.
207. Melenhorst WB, Visser L, Timmer A, van den Heuvel MC, Stegeman CA, van Goor H. ADAM17 upregulation in human renal disease: a role in modulating TGF- α availability? *Am J Physiol Physiol.* 2009;297(3):F781-F790. doi:10.1152/ajprenal.90610.2008.
208. Brummer T, Pignoni M, Rossello A, et al. The metalloprotease ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) undergoes rapid, postlysis autocatalytic degradation. *FASEB J.* February 2018:fj.201700823RR. doi:10.1096/fj.201700823RR.
209. Fukami K, Asano E, Ueda M, Sekiguchi F, Yoshida S, Kawabata A. High glucose induces N-linked glycosylation-mediated functional upregulation and overexpression of Cav3.2 T-type calcium channels in neuroendocrine-like differentiated human prostate cancer cells. *J Pharmacol Sci.* 2017;133(1):57-60. doi:10.1016/J.JPHS.2016.12.004.
210. Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(12):3071-3109. doi:10.1089/ars.2009.2484.
211. Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med.* 2017;23(7):804-814. doi:10.1038/nm.4350.
212. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;19(1):31-44. doi:10.1038/nrm.2017.89.
213. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs.* 2002;16(2):17-23.
214. Habib SL, Rojna M. Diabetes and risk of cancer. *ISRN Oncol.* 2013;2013:583786. doi:10.1155/2013/583786.

215. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert M, et al. Metalloproteinase Inhibitors for the Disintegrin-Like Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that Differentially Block Constitutive and Phorbol Ester-Inducible Shedding of Cell Surface Molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005;8(2):161-171. doi:10.2174/1386207053258488.
216. Kamińska A, Enguita FJ, Stępień EŁ. Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent. *Vascul Pharmacol*. 2018;101:21-28. doi:10.1016/J.VPH.2017.11.006.
217. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular Uncoupling of Fractalkine-mediated Cell Adhesion and Signal Transduction RAPID FLOW ARREST OF CX 3 CR1-EXPRESSING CELLS IS INDEPENDENT OF G-PROTEIN ACTIVATION*. *J Biol Chem*. 1999;274(15):10053-10058.
218. Kerfoot SM, Lord SE, Bell RB, Gill V, Robbins SM, Kubes P. Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Eur J Immunol*. 2003;33(3):729-739. doi:10.1002/eji.200323502.
219. Umehara H, Goda S, Imai T, et al. Fractalkine, a CX₃C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1. *Immunol Cell Biol*. 2001;79(3):298-302. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01004.x.
220. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(1):34-40. doi:10.1161/01.ATV.0000095360.62479.1F.
221. DiGiacomo JW, Gilkes DM. Tumor Hypoxia As an Enhancer of Inflammation-Mediated Metastasis: Emerging Therapeutic Strategies. *Target Oncol*. 2018;13(2):157-173. doi:10.1007/s11523-018-0555-4.
222. Kenny PA. TACE: a new target in epidermal growth factor receptor dependent tumors. *Differentiation*. 2007;75(9):800-808. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00198.x.
223. Wang X, Feng C, Li M. ADAM17 mediates hypoxia-induced drug resistance in hepatocellular carcinoma cells through activation of EGFR/PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Biochem*. 2013;380(1-2):57-66. doi:10.1007/s11010-013-1657-z.
224. Blay J, White TD, Hoskin DW, et al. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*. 2011;57(13):2602-2605. doi:10.1158/0008-5472.can-11-2104.
225. Kwon Y-M, Xia Z, Glyn-Jones S, Beard D, Gill HS, Murray DW. Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages *in vitro*. *Biomed Mater*. 2009;4(2):025018. doi:10.1088/1748-6041/4/2/025018.
226. Patel E, Lynch C, Ruff V, Reynolds M. Co-exposure to nickel and cobalt chloride enhances cytotoxicity and oxidative stress in human lung epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(3):367-375. doi:10.1016/J.TAAP.2011.11.019.
227. Wu D, Yotnda P. Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *J Vis Exp*. 2011;(54). doi:10.3791/2899.

228. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):258-289. doi:10.1016/J.MAM.2008.08.001.
229. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):405-496. doi:10.1124/pr.109.002451.
230. Sturgill JL, Mathews J, Scherle P, Conrad DH. Glutamate signaling through the kainate receptor enhances human immunoglobulin production. *J Neuroimmunol.* 2011;233(1-2):80-89. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.11.014.
231. Ishmael JE, Franklin PH, Murray TF, Leid M. High level expression of the NMDAR1 glutamate receptor subunit in electroporated COS cells. *J Neurochem.* 1996;67(4):1500-1510.
232. Cabañero D, Irie T, Celorrio M, et al. Identification of an epidermal keratinocyte AMPA glutamate receptor involved in dermatopathies associated with sensory abnormalities. *Pain reports.* 2016;1(3). doi:10.1097/PR9.0000000000000573.
233. Rousseaux CG. *A Review of Glutamate Receptors I: Current Understanding of Their Biology.* Vol 21.; 2008.
234. Sitcheran R, Comb WC, Cogswell PC, Baldwin AS. Essential role for epidermal growth factor receptor in glutamate receptor signaling to NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 2008;28(16):5061-5070. doi:10.1128/MCB.00578-08.
235. Darbre PD. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2005;99(9):1912-1919. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.06.001.
236. Ogasawara Y, Sakamoto T, Ishii K, Takahashi H, Tanabe S. Effects of the Administration Routes and Chemical Forms of Aluminum on Aluminum Accumulation in Rat Brain. *Biol Trace Elem Res.* 2002;86(3):269-278. doi:10.1385/BTER:86:3:269.
237. Exley C, Siesjö P, Eriksson H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.* 2010;31(3):103-109. doi:10.1016/j.it.2009.12.009.
238. Mold M, Shardlow E, Exley C. Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations. *Sci Rep.* 2016;6:31578. doi:10.1038/srep31578.
239. Hogenesch H. Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol.* 2012;3:406. doi:10.3389/fimmu.2012.00406.
240. American Diabetes Association AD. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care.* 2013;36 Suppl 1(Suppl 1):S11-66. doi:10.2337/dc13-S011.
241. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(2):19-39.
242. Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle.* 2014;13(16):2494-2500. doi:10.4161/15384101.2014.947750.
243. Mitrou P, Raptis SA, Dimitriadis G. Insulin action in morbid obesity: a focus on muscle and adipose tissue. *Hormones (Athens).* 12(2):201-213.
244. Bedinger DH, Adams SH. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;415:143-156. doi:10.1016/J.MCE.2015.08.013.

245. Teng J-A, Wu S-G, Chen J-X, et al. The Activation of ERK1/2 and JNK MAPK Signaling by Insulin/IGF-1 Is Responsible for the Development of Colon Cancer with Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149822. doi:10.1371/journal.pone.0149822.
246. Sonksen P, Sonksen J. Insulin: understanding its action in health and disease. *Br J Anaesth*. 2000;85(1):69-79. doi:10.1093/BJA/85.1.69.
247. Park SE, Park C-Y, Sweeney G. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: Past, present and future. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(4):180-190. doi:10.3109/10408363.2015.1023429.
248. Chen C-D, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(50):19796-19801. doi:10.1073/pnas.0709805104.
249. Solano DC, Sironi M, Bonfini C, Solerte SB, Govoni S, Racchi M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB J*. 2000;14(7):1015-1022.
250. Nystrom FH, Chen H, Cong LN, Li Y, Quon MJ. Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13(12):2013-2024. doi:10.1210/mend.13.12.0392.
251. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol*. 2015;25(11):639-650. doi:10.1016/j.tcb.2015.08.003.
252. Ehlen HW, Chinenkova M, Moser M, et al. Inactivation of anoctamin-6/Tmem16f, a regulator of phosphatidylserine scrambling in osteoblasts, leads to decreased mineral deposition in skeletal tissues. *J Bone Miner Res*. 2013;28(2):246-259. doi:10.1002/jbmr.1751.
253. Curia CA, Ernesto JI, Stein P, et al. Fertilization Induces a Transient Exposure of Phosphatidylserine in Mouse Eggs. Obukhov AG, ed. *PLoS One*. 2013;8(8):e71995. doi:10.1371/journal.pone.0071995.
254. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, et al. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol*. 2005;7(8):808-816. doi:10.1038/ncb1279.
255. Otzen DE, Blans K, Wang H, Gilbert GE, Rasmussen JT. Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition ☆. *BBA - Biomembr*. 2012;1818:1019-1027. doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.032.
256. Yang S, Liu G. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;13(3):1041-1047. doi:10.3892/ol.2017.5557.
257. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. 2014;383(9922):1068-1083. doi:10.1016/S0140-6736(13)62154-6.
258. Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, et al. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 2010;29(17):3020-3032. doi:10.1038/emboj.2010.167.

259. Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol*. 2011;71(3):365-376. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03830.x.
260. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1-20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
261. Carlsson AC, Östgren CJ, Nystrom FH, et al. Association of soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 with nephropathy, cardiovascular events, and total mortality in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:40. doi:10.1186/s12933-016-0359-8.
262. Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, et al. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 1991;40(6):1007-1012.
263. Mullooly M, McGowan PM, Crown J, Duffy MJ. The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2016;17(8):870-880. doi:10.1080/15384047.2016.1177684.
264. Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci*. 2007;98(5):621-628. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00434.x.
265. Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials*. 2013;34(34):8690-8707. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.100.
266. Yoneda O, Imai T, Nishimura M, et al. Membrane-bound form of fractalkine induces IFN- γ production by NK cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(1):53-58. doi:10.1002/immu.200390007.
267. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, et al. The chemokine CX3CL1 regulates NK cell activity in vivo. *Cell Immunol*. 2003;225(2):122-130.
268. Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, et al. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(5):1512-1518. doi:10.2337/db10-0956.
269. Fabbri M, Bianchi E, Fumagalli L, Pardi R. Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules. *Inflamm Res*. 1999;48(5):239-246. doi:10.1007/s000110050454.
270. Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):932-941. doi:10.1038/nrc2459.
271. Taniguchi CM, Finger EC, Krieg AJ, et al. Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes. *Nat Med*. 2013. doi:10.1038/nm.3294.
272. Marshall AJ, Rattray M, Vaughan PFT. Chronic hypoxia in the human neuroblastoma SH-SY5Y causes reduced expression of the putative alpha-secretases, ADAM10 and TACE, without altering their mRNA levels. *Brain Res*. 2006;1099(1):18-24. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.008.
273. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22642-22647.

274. Sharma B, Kanwar SS. Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Semin Cancer Biol.* September 2017. doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.012.
275. Ray A, Alalem M, Ray BK. Insulin signaling network in cancer. *Indian J Biochem Biophys.* 2014;51(6):493-498.
276. Massacesi C, Di Tomaso E, Urban P, et al. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *Onco Targets Ther.* 2016;9:203-210. doi:10.2147/OTT.S89967.
277. Thapa N, Kim S, So I-S, et al. Discovery of a phosphatidylserine-recognizing peptide and its utility in molecular imaging of tumour apoptosis. *J Cell Mol Med.* 2008;12(5a):1649-1660. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00305.x.
278. Bae SM, Park SJ, Choi M, et al. PSP1, a Phosphatidylserine-Recognizing Peptide, Is Useful for Visualizing Radiation-Induced Apoptosis in Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo. *Transl Oncol.* 2018;11(4):1044-1052. doi:10.1016/j.tranon.2018.06.008.
279. Barsoum IB, Hamilton TK, Li X, et al. Hypoxia Induces Escape from Innate Immunity in Cancer Cells via Increased Expression of ADAM10: Role of Nitric Oxide. *Cancer Res.* 2011;71(24):7433-7441. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2104.

PUBLIKATIONEN

Die Daten dieser Disseration werden momentan zur Einreichung in einem peer-reviewed Journal vorbereitet:

Lena Baumecker, Björn Ahrens, Maria Sperrhacke, Matthias Laudes, Sucharit Bahkdi, Karina Reiss:

Insulin activates shedding activity of ADAM10 and ADAM17 via phosphatidylserine externalization.

Zusätzlich zur in dieser Arbeit habe ich Daten generierten, die zu einer weiteren Publikation geführt haben:

Sommer, Düppe, **Baumecker**, Kordowski, Büch, Chico, Fritsch, Schütze, Adam, Sperrhacke, Bhakdi, Reiss:

Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF- α -induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding. *Oncotarget*. 2017 Aug 7;8(42):72584-72596. doi: 10.18632/oncotarget.19983

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1 - SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMÄNENSTRUKTUR VON ADAM10 UND -17	2
ABBILDUNG 2 – REGULATION VON ADAM10 UND -17 UND EKTODOMÄNEN-SHEDDING..	7
ABBILDUNG 3 – REGULATION VON HIF-1 DURCH SAUERSTOFFVERFÜGBARKEIT	10
ABBILDUNG 4 – PHYSIOLOGISCHER UND PATHOPHYSIOLOGISCHER INSULIN-SIGNALWEG	17
ABBILDUNG 5 – SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DURCHFÜHRUNG DES ADHÄSIONSTESTS	37
ABBILDUNG 6 - SHEDDING-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON L-GLUTAMINSÄURE AUF DIE REGULATION DER AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17..	46
ABBILDUNG 7 - EXPERIMENTE ZUR ENDOGENEN SUBSTRATFREISETZUNG DURCH ADAM17 SOWIE ZUR AKTIVIERUNG DES EGF-REZEPTORS DURCH L-GLUTAMINSÄURE.....	48
ABBILDUNG 8 - SHEDDING-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON ALUMINIUMCHLORID (ALCl ₃) AUF DIE AKTIVITÄT VON ADAM10- UND-17.....	49
ABBILDUNG 9 - SHEDDING-EXPERIMENTE UND MTT-TESTS ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON IMJECTALUM™ AUF DIE AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17 SOWIE AUF DIE ZELLVIABILITÄT.	50
ABBILDUNG 10 - DETEKTION DER PROTEINEXPRESSION UND SHEDDING-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON GLUCOSE AUF DIE REGULATION DER AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17.	52
ABBILDUNG 11 - INSULIN INDUZIERT KONZENTRATIONSABHÄNGIG DIE FREISETZUNG VON ADAM17-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN.....	55
ABBILDUNG 12 - INSULIN INDUZIERT KONZENTRATIONSABHÄNGIG DIE FREISETZUNG VON ADAM10-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN.....	56
ABBILDUNG 13 - ADAM-INHIBITOREN HEMMEN DIE INSULIN-INDUZIERTE FREISETZUNG VON SUBSTRATEN	57
ABBILDUNG 14 – INSULIN AKTIVIERT DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM 10 UND -17 ÜBER DEN PI3K/AKT- SIGNALWEG.....	59
ABBILDUNG 15 - INSULINRESISTENZ VERHINDERT DIE STIMULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17 DURCH INSULIN.....	61
ABBILDUNG 16 – INSULIN INDUZIERT KONZENTRATIONSABHÄNGIG DIE EXTERNALISIERUNG VON PHOSPHATIDYLSERIN	63

ABBILDUNG 17 – PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG DURCH INSULIN IST ÜBER DEN PI3K/AKT-SIGNALWEG REGULIERT	65
ABBILDUNG 18 – PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG DURCH INSULIN IST FÜR DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM10 NOTWENDIG	67
ABBILDUNG 19 – INSULIN-STIMULIERTE FRAKTALKIN-FREISETZUNG DURCH ADAM10 FÜHRT ZU REDUZIERTER THP1-ZELLADHÄSION	69
ABBILDUNG 20 – HYPOXIE DURCH CoCl ₂ FÜHRT ZU REDUZIERTER INSULINSIGNALWEITERLEITUNG UND EINGESCHRÄNKTER STIMULIERBARKEIT DER SHEDDASEN DURCH INSULIN.....	72
ABBILDUNG 21 – UNTERSCHIEDLICHE INKUBATIONSZEITEN IN DER HYPOXIE-KAMMER FÜHREN ZU VERSCHIEDENEN ERGEBNISSEN IN BEZUG AUF DEN AKT-SIGNALWEG UNTER INSULIN	75
ABBILDUNG 22 – SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INSULIN-VERMITTELTEN ADAM-AKTIVIERUNG UND DEREN FUNKTIONELLE RELEVANZ	87

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 – ADAM SUBSTRATE	3
TABELLE 2 - VERBRAUCHSMATERIAL	19
TABELLE 3 - CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	20
TABELLE 4 - GERÄTE	23
TABELLE 5 - ELISA	24
TABELLE 6 - PRIMÄRE ANTIKÖRPER	25
TABELLE 7 - SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	25
TABELLE 8 - PLASMIDE.....	26
TABELLE 9 - SOFTWARE.....	26

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Karina Reiß bedanken für die Möglichkeit unter Ihrer Betreuung meine Promotion durchführen zu dürfen. Eine bessere Betreuerin hätte ich mir in fachlich wie auch menschlicher Hinsicht nicht wünschen können.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Thomas Roeder und Prof. Dr. Holger Heine bedanken für die Übernahme der Prüfung dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt dem RTG1743 vor allem Prof. Dr. Matthias Laudes, Prof. Dr. Andre Franke und Eike Zell. In diesem Zusammenhang möchte ich mich vor allem für die Möglichkeiten bedanken, auch über den Tellerrand schauen zu dürfen.

Was wäre eine Doktorarbeit ohne Kollegen und Feudens-/Leidensgenossen. Euch allen ein großes Danke und schön war der Weg mit: Der furchtlose RTGler Felix Kordowski, The American Anselm Sommer, Vegetarier-Mitstreiterin Katharina Kyro, the incredible Hagen Rövekamp, Moodybär Florian Bleibaum, Master of Challenges Martin Veit, Yogaqueen Maren Ludewig, ELISA-Heldin Lena Schröder und nicht zu Letzt Power- und zwei!-fach Mama Maria Sperrhacke. Maria, vielen Dank auch für dein produktives Korrekturlesen!

An dieser Stelle gilt ein besonderer Dank Björn Ahrens. Nicht nur für dein Korrekturlesen, sondern auch für deine offene und lustige Art, die ich sicher vermissen werde.

Außerdem danke ich auch Florian dafür, dass er das Büro zunehmend gut-gelaunt mit mir geteilt hat und für die abwechslungsreichen Gespräche, die hier mit Sicherheit nicht enden werden.

Ein großer Dank auch an meine Familie MaPa und Gerrit, durch deren Unterstützung mein Studium möglich war, mir eine große Portion Selbstsicherheit mit auf den Weg gegeben haben und mir jederzeit bedingungslos Rückhalt geben. Besonders möchte ich Michal Halupka für seine pragmatische und entspannte Art danken, die mir während der letzten Jahre so oft geholfen hat.

Außerdem möchte mich auch bei meinen Kooperationspartnern bedanken, bei denen ich viel lernen durfte: Prof. Dr. Andreas Ludwig und Dr. Paula Escudero der RWTH Aachen.

Schließlich danke ich meinem kleinen Begleiter, der mir vor allem auf den letzten Metern der Doktorarbeit nie von der Seite gewichen ist und mich fortwährend daran erinnert hat, dass die Sonne draußen scheint.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Lena Baumecker, dass ich die vorliegende Arbeit -abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer und Betreuerinnen- selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Desweiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Ort, Datum

Unterschrift -Lena Baumecker-

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

Name	Lena Baumecker
geboren am	11.03.1989
in	Gehrden
seit 10/2015	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Promotionsstudentin Zelluläre Pathophysiologie - Prof. Karina Reiß, Klinik für Dermatologie, UKSH Kiel Titel: Einfluss von äußeren Faktoren und Insulin auf die Shedding-Aktivität der Proteasen ADAM10 und ADAM17.
04/2013-06/2015	Master of Science - Medical Life Sciences an der CAU Kiel Masterarbeit: <i>Functional analysis of long non-coding RNAs deregulates in malignant lymphoma.</i>
10/2009-12/2012	Bachelor of Science – Molekulare Biomedizin an der Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn Bachelorarbeit: <i>The role of the cytosolic domain of endocytotic receptors in cross-presentation.</i>
09/2011-09/2012	Auslandstudium an der <i>Strathclyde University</i> Glasgow, Schottland
1995-2008	Schulbildung mit Abschluss: Abitur – Otto-Hahn Gymnasium Springe