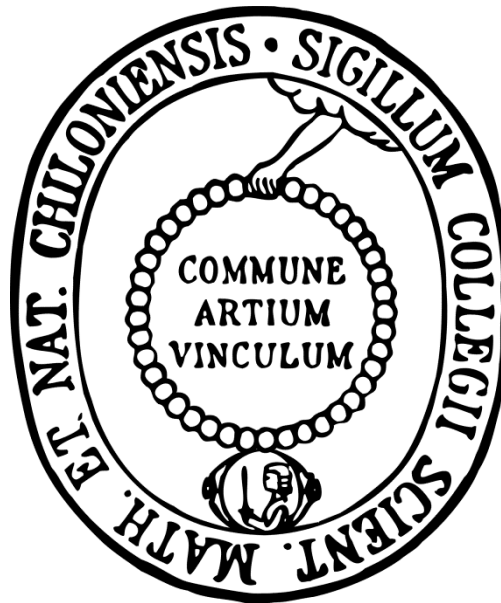


Die Rolle der Metalloprotease ADAM17 während der zellulären Seneszenz

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

Biochemisches Institut

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel



Vorgelegt von:

Timo Effenberger

Angefertigt in der Arbeitsgruppe „Zytokine, Rezeptoren und Metalloproteasen“

Kiel, 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2014

Zum Druck genehmigt: 27.05.2014

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

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Zelluläre Seneszenz	1
1.2 Entstehung von zellulärer Seneszenz	2
1.3 Verantwortliche Signalwege für die Induktion der zellulären Seneszenz.....	5
1.4 SASP	7
1.5 ADAM17.....	10
1.6 Regulation der ADAM17-Aktivität und der Substratselektion.....	15
2. Ziel der Arbeit	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Verwendete Zellen, Geräte und Materialien	21
3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme	21
3.1.2 Plasmide	22
3.1.3 Inhibitoren	22
3.1.4 Antibiotika.....	22
3.1.5 Größenstandards.....	23
3.1.6 Antikörper	23
3.1.7 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits	24
3.1.8 Verbrauchsmaterialien	25
3.1.9 Puffer und Lösungen	25
3.1.10 Verwendete Geräte	26
3.1.11 Chemikalien	27
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	27
3.2.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	27
3.3 Proteinbiochemische Methoden	28
3.3.1 BCA-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	28
3.3.2 Immunopräzipitation	28
3.3.3 ConA-Fällung.....	29
3.3.4 Oberflächenbiotinylierung	29
3.3.5 SDS-PAGE.....	30
3.3.6 WesternBlot und indirekte Immundetektion	31
3.3.7 Strippen von Membranen	32

3.3.8 ELISA.....	32
3.3.9 p38 Aktivitätsassay	33
3.4 Zellbiologische Methoden.....	33
3.4.1 Transfektion von PC-3-Zellen.....	33
3.4.2 Selektion der transfizierten PC-3-Zellen.....	34
3.4.3 Ernte und Lyse adhärenter Zellen	34
3.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	34
3.4.5 Induktion von zellulärer Seneszenz.....	35
3.4.5.1 Induktion von zellulärer Seneszenz mittels Doxorubicin	35
3.4.5.2 Induktion von zellulärer Seneszenz mittels Bestrahlung	36
3.4.6 Ernte von Überständen	36
3.4.7 SA- β -Gal-Färbung.....	36
3.5 Statistische Auswertung	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Induktion von zellulärer Seneszenz.....	38
4.2 Die Sekretion von SASP-Komponenten wird nicht durch Apoptose ausgelöst.....	42
4.3 Ursprung des TNFR1 im Überstand seneszenten Zellen	46
4.4 Rolle von ADAM-Proteasen bei der Generierung löslicher Faktoren des SASPs.....	47
4.5 Inhibition der Freisetzung von SASP-Komponenten durch den inhibitorischen ADAM17-Antikörper D1(A12)	54
4.6 ADAM17 knockdown mit Hilfe von shRNA	56
4.8 Expression von ADAM17	61
4.9 Oberflächenexpression von ADAM17	62
4.10 Erhöhte p38-Aktivität in seneszenten Zellen	63
4.11 Auswirkung der Inhibition von p38 MAPK auf die Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin	64
4.12 ADAM17-Phosphorylierung in seneszenten Zellen	69
5. Diskussion	71
5.1 Induktion zellulärer Seneszenz.....	72
5.2 Analyse seneszenten Zellen	75
5.3 Analyse der für das Shedding von Amphiregulin und TNRF1 verantwortlichen Protease	76
5.4 Die Rolle von p38	79
5.5 Ausblick	82
6. Zusammenfassung.....	84

6.1 Abstract	85
7. Literatur	86
8. Anhang	102
8.1 Abkürzungsverzeichnis	102
8.2 Vektorinformationen pGIPZ	105
8.2.1 Übersicht der im pGIPZ-Vektor enthaltenen Elemente	106
8.2.2 Sequenz des pGIPZ-Vektors	108
9. Danksagung	112
10. Erklärung	113

1. Einleitung

1.1 Zelluläre Seneszenz

Ursprünglich wurde der Begriff Seneszenz lediglich für den natürlichen Alterungsprozess in Pflanzen verwendet. Nach dem heutigen Kenntnisstand gilt es jedoch als gesichert, dass auch in tierischen Organismen die zelluläre Seneszenz, ein prinzipiell permanenter Wachstumsarrest, eine übergeordnete Rolle sowohl in Alterungsprozessen als auch bei der Tumorsuppression spielt. Das Konzept der zellulären Seneszenz wurde erstmals 1965 von Leonard Hayflick beschrieben [1]. Hayflick konnte zeigen, dass humane Fibroblasten in Kultur nicht unendlich proliferieren und widersprach damit der Theorie von Alexis Carrel, der 1908 postulierte, dass Zellen von Vertebraten sich unendlich oft teilen könnten und somit unsterblich seien. Zu jener Zeit waren alle für die Zellkultur verwendeten Zelllinien aneuploid und unbegrenzt teilungsfähig. Erst 1961 gelang es Hayflick diploide Zellen zu kultivieren und nachzuweisen, dass Zellen nach einer definierten Anzahl von Zellteilungen absterben oder sich in einen Zustand begeben, in dem sie zwar noch einen aktiven Stoffwechsel aufweisen, aber nicht mehr proliferieren. Sowohl die Anzahl der möglichen Zellteilungen, das sogenannte Hayflick-Limit, als auch die Entscheidung zwischen Apoptose oder replikativer Seneszenz ist zelltypabhängig [2]. Für seneszenten Zellen ist, im Gegensatz zu quieszenten Zellen, bisher kein physiologischer Stimulus beschrieben, der es ihnen ermöglicht, wieder in den Zellzyklus einzutreten.

Die Ergebnisse von Hayflick führten zur Entwicklung zweier, zu Beginn kontroverser, Theorien über den Nutzen dieses zellulären Mechanismus für den Organismus. Auf der einen Seite wurde eine tumorsuppressive Wirkung vermutet, während andere Wissenschaftler darin die Verbindung zum Alterungsprozess von mehrzelligen Organismen sahen. Die postulierte Beziehung zwischen zellulärer Seneszenz und dem Altern beruhte weitgehend auf der vermuteten degenerativen Wirkung durch die veränderte Morphologie seneszenten Zellen auf Gewebe. Der Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und Seneszenz hingegen war offensichtlicher. Auch ohne Kenntnisse über die molekulare Basis der Krebsentstehung, wie zum Beispiel über Telomerasen und deren Aktivität, galt es als naheliegend, dass Tumorzellen nicht an das Hayflick-Limit gebunden und somit fähig sind, permanent mitotisch

aktiv zu sein. Ein irreversibler Wachstumsarrest würde eine Tumorprogression unterbinden und die Lebenserwartung eines Organismus signifikant verlängern [3].

Senescente Zellen zeichnen sich durch einen prinzipiell irreversiblen Zellzyklusarrest aus und weisen eine veränderte Morphologie auf. Sie sind größer und flacher als normal proliferierende Zellen des gleichen Zelltypus. Zudem lassen sich senescente Zellen mit Hilfe der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) anfärben [4]. Die SA- β -Gal-Färbung ist heute ein häufig genutzter Marker für zelluläre Seneszenz, welcher sich die verstärkte Ausbildung lysosomaler Kompartimente und die Überexpression von lysosomaler β -Galaktosidase in seneszenten Zellen zu Nutze macht [5]. Auch die Expression des Tumorsuppressors p16^{INK4a} dient als anerkannter Biomarker sowohl für Alterungsprozesse [6] als auch für zelluläre Seneszenz [7]. Neben den morphologischen Veränderungen kommt es in seneszenten Zellen auch zu einer Re-Organisation der Chromatinstruktur. So lassen sich sogenannte Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci (SAHF) nachweisen. Diese Heterochromatin-Domänen sind häufig mit DNA-Loci assoziiert, welche pro-proliferative Gene enthalten [8]. Durch die Reprimierung dieser pro-proliferativen Gene wird der Zellzyklusarrest auch epigenetisch reguliert. Zudem bilden sich bei Störungen des Chromatins DNA-SCARS (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence), welche ebenfalls in einigen seneszenten Zellen nachweisbar sind und zu einer Verstärkung des Wachstumsarrestes führen. Im Gegensatz zu transienten Proteinkomplexen, welche im Normalfall für die Reparatur beschädigter DNA ausgebildet werden, finden sich in DNA-SCARS weder die DNA-Reparaturproteine RPA (replication protein A) und RAD51, noch Einzelstrangbrüche. Auch die für die Reparatur nötige DNA-Synthese ist nicht nachweisbar. Zudem kommt es in DNA-SCARS zu einer Akkumulation des DDR(DNA damage response)-Mediators CHEK2 (checkpoint kinase 2) [9].

1.2 Entstehung von zellulärer Seneszenz

Eine der Hauptursachen für zelluläre Seneszenz ist die Verkürzung der Telomere in Zellen, die keine Telomerase exprimieren [10]. Als Telomere bezeichnet man den Komplex aus repetitiver DNA und Proteinen an den Enden von Chromosomen. Telomere sind für die Struktur und die Stabilität von Chromosomen essentiell. Beim Menschen wird die DNA-Sequenz TTAGGG an den Chromosomenenden vielfach wiederholt, wodurch die Telomere eine Länge von circa 10kb erreichen. Bei jeder Zellteilung beziehungsweise bei jeder DNA-

Replikation werden die Telomere um etwa 100 Nukleotide verkürzt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die für die Replikation von DNA zuständige DNA-Polymerase ausschließlich unidirektional arbeitet und für die Synthese eines DNA-Doppelstranges einen RNA-Primer als Startpunkt benötigt. Aus diesem Grund können lineare DNA-Moleküle, wie beispielsweise genomische DNA, mit Hilfe der DNA-Polymerase nicht vollständig repliziert werden. Diese Tatsache wird auch als das End-Replikationsproblem bezeichnet. Wenn ein Telomer die kritische Länge von ungefähr 4kb unterschreitet, ist die betroffene Zelle nicht mehr in der Lage zu proliferieren [11]. Trotz des End-Replikationsproblems muss ein Organismus aber in der Lage sein, beschädigte Gewebe zu erneuern beziehungsweise zu reparieren und sein Erbgut vollständig an die nachfolgende Generation weiterzugeben. Um dies zu gewährleisten, exprimieren Zellen der Keimbahn, Stammzellen und einige somatische Zellen, wie beispielsweise aktivierte T-Zellen, Telomerase. Die Telomerase ist ein Enzym, welches aus einem Protein-Anteil und einem RNA-Anteil besteht. Der Protein-Anteil, TERT (telomerase reverse transcriptase) genannt, füllt die Telomere mit der repetitiven DNA-Sequenz auf. Als Matrize dient der Telomerase dabei ihr eigener RNA-Anteil, die telomerase RNA (TR) [12].

Intakte Telomere werden von der DNA-Reparaturmaschinerie aufgrund von assoziierten Proteinen nicht als DNA-Doppelstrangbruch erkannt. Sie lösen aus diesem Grunde auch keine DDR aus. Die DDR ist ein wichtiger zellulärer Mechanismus der Tumor-Suppression. Sobald ein Schaden an dem Erbgut einer Zelle festgestellt wird, sorgt die DDR für einen sofortigen Zellzyklusarrest und leitet Reparaturmaßnahmen ein. Erst wenn die Reparatur der DNA vollständig und korrekt abgelaufen ist, kann eine Zelle nach aktivierter DDR wieder in den Zellzyklus eintreten [13]. Sind die Schäden an der DNA irreparabel, wie zum Beispiel im Fall von verkürzten Telomeren in Zellen ohne Telomeraseaktivität, so wird aus der transienten eine persistierende DDR. Die daraus resultierende, dauerhafte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führt in letzter Konsequenz zu einem permanenten, irreversiblen Wachstumsarrest, der zellulären Seneszenz [14].

Neben dem speziellen Fall der Telomerverkürzung sind DNA-Schäden im Allgemeinen in der Lage, zelluläre Seneszenz auszulösen [15]. Dabei sind besonders Doppelstrangbrüche in der DNA potente Induktoren von Seneszenz. Aus diesem Grunde ist es nicht verwunderlich, dass ionisierende Strahlung oder Topoisomerase-Inhibitoren in der Lage sind, zelluläre Seneszenz zu induzieren [16]. Viele der in der Krebstherapie eingesetzten Chemotherapeutika schädigen ebenso direkt oder indirekt die DNA und lösen somit eine DDR aus [17]. Auch oxidativer Stress und die damit verbundene Oxidation von DNA-Basen ist in der Lage, Seneszenz auszulösen [18]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass oxidativer Stress die Verkürzung von

Telomeren beschleunigen kann. Der Grund hierfür liegt vermutlich an dem hohen Gehalt der DNA-Base Guanin in den Telomeren, welche besonders empfindlich für Oxidationsreaktionen ist [19]. Dabei ist zu beachten, dass während des Austausches einer geschädigten Base oder bei der Reparatur eines Einzelstrangbruches ein temporärer Doppelstrangbruch von den beteiligten Reparaturenzymen verursacht wird. Falls der Schaden an der DNA zu stark und irreparabel ist, kann dieser temporäre Doppelstrangbruch zu einer verstärkten Induktion der zellulären Seneszenz führen [20].

Im Einklang mit der Rolle als Tumorsuppressor können auch onkogene Formen von Proteinen, welche proliferative Signalwege regulieren, zelluläre Seneszenz durch unausgewogene mitogene Signale auslösen [21]. So führt ein zu starkes mitogenes Signal zu einer erhöhten Replikation der DNA. Dabei kann es aufgrund des starken Druckes des mitogenen Signals zu Fehlern beim Anlegen des Replikationsursprunges kommen, was einen anschließenden Kollaps der Replikationsgabel zur Folge hat. Dies wiederum führt zu Doppelstrangbrüchen und letztendlich zu zellulärer Seneszenz [22].

Neben der direkten Schädigung der DNA können auch Störungen des Chromatins, beziehungsweise der mit der chromosomalen DNA verbundenen Proteine wie Histone, zu Seneszenz führen. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch Histondeacetylase-Inhibitoren, welche eine globale Chromatin-Relaxation herbeiführen, zelluläre Seneszenz induziert werden kann [23]. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass der Tumorsuppressor $p16^{\text{INK4a}}$ normalerweise epigenetisch durch Heterochromatin reprimiert wird. Kommt es nun zu einer Relaxation des Heterochromatins zu Euchromatin, so kann das für $p16^{\text{INK4a}}$ kodierende Gen abgelesen und der Tumorsuppressor exprimiert werden. Dies führt letztendlich zur einer Dephosphorylierung und somit einer Aktivierung von pRB (retinoblastoma-associated protein), welches einen Zellzyklusarrest initiiert [24]. Zum anderen führt die Behandlung von Zellen mit einem Histondeacetylase-Inhibitor zu einer Aktivierung des zentralen DDR-Proteins ATM (ataxia telangiectasia mutated). ATM wiederum kann nun auch ohne physikalische DNA-Schäden die Induktion von Seneszenz einleiten [25]. Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht über die verschiedenen Faktoren, welche zellulärer Seneszenz induzieren können.

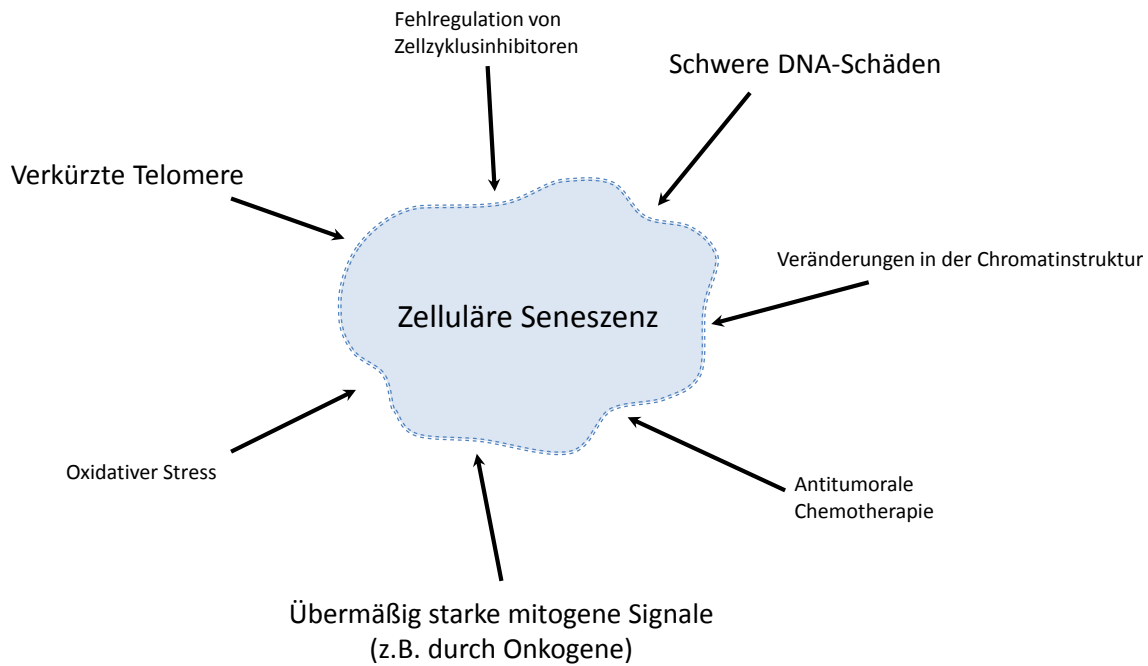


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die verschiedenen Faktoren, welche zur Induktion von Seneszenz in Zellen führen können. Die einzelnen Vorgänge sind in Kapitel 1.3 detailliert beschrieben. Die Hauptursachen, welche zur Induktion zellulärer Seneszenz führen, sind stärker hervorgehoben, als jene, welche bei diesem Prozess nur eine untergeordnete Rolle spielen.

1.3 Verantwortliche Signalwege für die Induktion der zellulären Seneszenz

Auf molekularer Ebene gibt es zwei Signalwege, die für die zelluläre Seneszenz von zentraler Bedeutung sind (Abb. 2). Stimuli, die eine DDR auslösen, induzieren zelluläre Seneszenz hauptsächlich über den p53/p21-Weg. Dabei aktivieren die DDR-Proteine ATM und ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) die Serin/Threonin-Proteinkinasen CHEK1 und CHEK2 (checkpoint kinase 1/2) [26]. Diese Kinasen wiederum können nun den Transkriptionsfaktor p53 phosphorylieren und somit stabilisieren und aktivieren [27]. Eines der wichtigsten Zielgene von p53 ist p21 (auch CDK-Inhibitor 1) [28], ein Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), welcher sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex [29] als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmt [30] und somit einen Zellzyklusarrest initiiert. Neben DNA-Schäden können auch konstitutive Proliferationsstimuli, beispielsweise von mutierten Onkogenen, zu einer Aktivierung von p53 führen [31]. Dies geschieht über das Protein ARF (alternate reading frame), welches in der Lage ist, anhaltende mitogene Signale zu erkennen. ARF inhibiert nun HDM2 (human double minute 2 homolog), eine E3 Ubiquitin-Protein-Ligase, die für die konstitutive Ubiquitinierung und somit für die Degradation von p53 zuständig ist [32].

Neben dem p53/p21-Weg spielt der p16^{INK4a}/pRB-Weg eine entscheidende Rolle bei der Induktion zellulärer Seneszenz [33]. p16^{INK4a} (auch cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A) ist, genau wie p21, ein Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6. Durch die Inhibition von CDK4 und CDK6 wird der Tumorsuppressor pRB in einem Zustand der Hypophosphorylierung gehalten und ist somit aktiv [34]. Aktives pRB bindet und inhibiert Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, welche für die Regulation des Zellzyklus und die DNA-Synthese zuständig sind [35]. Zudem ist der Komplex aus pRB und E2F in der Lage, Histon-Deacetylasen zu aktivieren und somit den Zellzyklus auch epigenetisch zu inhibieren. Dieser Vorgang spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Re-Organisation der Chromatinstruktur seneszenten Zellen und der dabei entstehenden Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Foci [36].

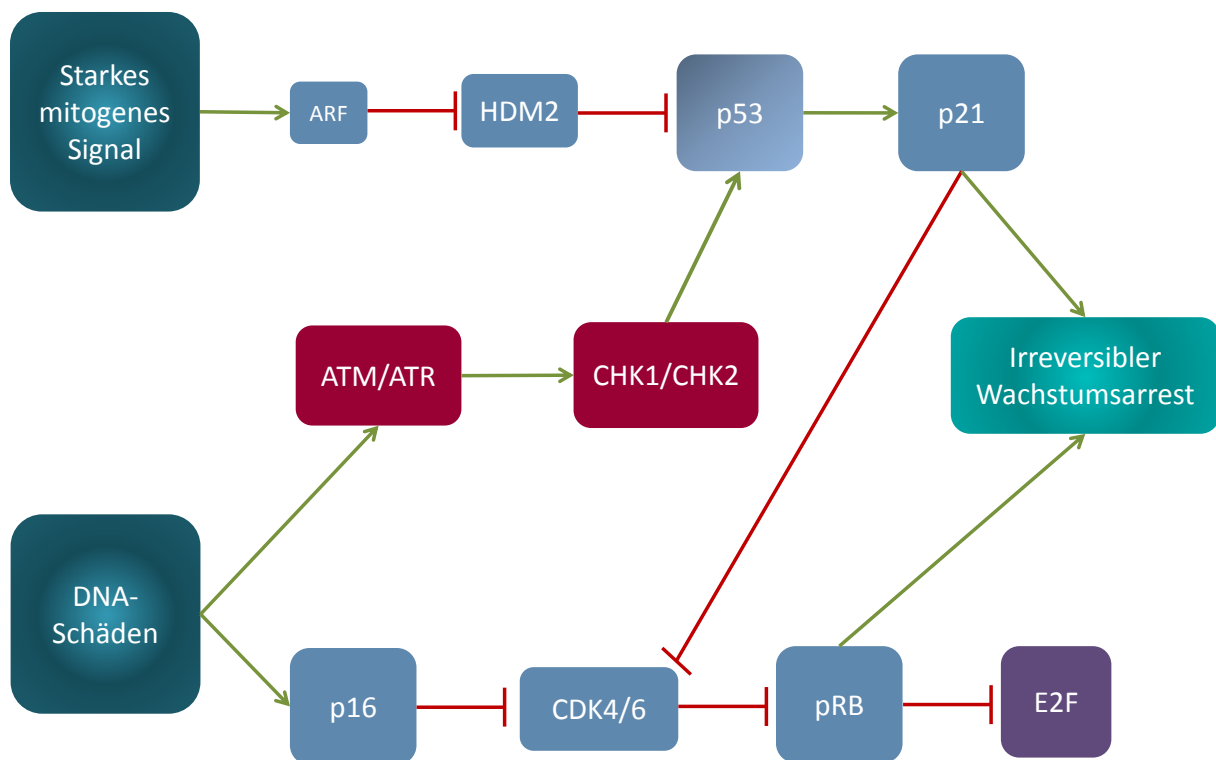


Abbildung 2: Übersicht über die für die Induktion von zellulärer Seneszenz zuständigen Signalwege. Sowohl DNA-Schäden als auch starke mitogene Signale können zelluläre Seneszenz induzieren. Die entscheidenden Signalwege sind der p53/p21-Pfad sowie der p16^{INK4a}/pRB(retinoblastoma-associated protein)-Pfad. DNA-Schäden führen zu einer Aktivierung der DDR(DNA damage response)-Proteine ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), welche anschließend die Serin/Threonin-Proteinkinasen CHEK1 und CHEK2 (checkpoint kinase 1/2) aktivieren. CHEK1/2 sind daraufhin in der Lage, den Transkriptionsfaktor p53 zu phosphorylieren. Ein Zielgen von p53 ist p21, ein Inhibitor der CDKs (Cyclin-dependent kinases), welches pRB in einem aktiven, mit E2F assoziierten Zustand hält. Starke mitogene Signale aktivieren ARF (alternate reading frame), ein Inhibitor von HDM2 (human double minute 2 homolog), welches im aktiven Zustand die Degradation von p53 induziert. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Pfade findet sich in Kapitel 1.2.

1.4 SASP

Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP) ist eines der herausstechenden Merkmale seneszenter Zellen, mit dessen Hilfe sich verschiedene Funktionen der zellulären Seneszenz erklären lassen [3]. Zu diesen Funktionen gehören auf der einen Seite die Aktivierung des Immunsystems, Tumorsuppression und die Reparatur von beschädigten Geweben. Auf der anderen Seite wird der zellulären Seneszenz aber auch eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben und sie ist zudem in den Alterungsprozess von Organismen [37] und in die Entstehung chronischer Entzündungskrankheiten involviert (Abb. 3).

Im Rahmen des SASPs sekretieren seneszente Zellen eine große Anzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Proteasen [38, 39]. So kann der SASP zum Beispiel über die Sekretion von Amphiregulin, einem Mitglied der EGF(epidermal growth factor)-Familie, Zellen durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors zur Proliferation anregen [40]. Zusätzlich ist VEGF (vascular endothelial growth factor), ein wichtiges Protein für die Neubildung von Blutgefäßen, ebenfalls ein Bestandteil des SASP [41]. Zusammen mit IL-6 (interleukin 6) und IL-8 (interleukin 8), welche in der Lage sind, eine Epithelial-mesenchymale Transition zu induzieren [42], können diese Faktoren eindeutig zur Entstehung karzinogener Erkrankungen beitragen. Zudem wird darüber spekuliert, ob die permanente Ausschüttung proinflammatorischer Proteine, wie IL-6 und IL-8 zusammen mit GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor), MCPs (monocyte chemoattractant proteins) und MIPs (macrophage inflammatory proteins), von seneszenten Zellen im Rahmen des SASPs eine chronische Entzündung verursachen kann [43] (Abb. 3).

Neben den oben genannten, pathologischen Eigenschaften des SASPs gibt es auch positive Effekte. So führt die erhöhte Sekretion von Matrix-Metalloproteasen (MMP) [39] zu einer verbesserten Wundheilung [44, 45]. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine akute Leberverletzung zur Induktion von zellulärer Seneszenz in hepatischen Sternzellen (auch Ito-Zellen genannt) führt. Beim anschließenden Wundheilungsprozess kam es zu einer verstärkten Fibrose in p53/p21 und p16/pRB defizienten Mäusen [46]. Ähnliches wurde bei einem Modell einer Hautverletzung beobachtet: Hierbei wurden Mäuse verwendet, die eine Variante von CCN1 (CCN family member 1) exprimieren, die keine Integrine binden kann. Diese Bindung führt normalerweise zu einer Signalkaskade, welche Seneszenz induzieren kann. Nach einer Hautverletzung kam es in den Mäusen, welche die mutierte Form von CCN1 exprimierten, zu einer stärkeren Narbenbildung, als bei den Kontrolltieren [47]. Der SASP ist

weiterhin in der Lage, das Immunsystem zu aktivieren beziehungsweise Immunzellen zu rekrutieren, um seneszente Zellen zu eliminieren [48]. Ein wichtiger Punkt bei der Eliminierung von seneszenten Zellen ist hierbei die Expression von Liganden des Rezeptors NKG2D, welcher auf Natürlichen Killerzellen und CD8 T-Zellen vorhanden ist. Diese Liganden werden vornehmlich bei genomischem Stress oder bei Infektionen exprimiert und sorgen dafür, dass Natürliche Killerzellen die betroffenen Zellen eliminieren. Auf CD8 T-Zellen wirken die NKG2D-Liganden als ko-stimulatorisches Signal zur Aktivierung [49]. Zur Rekrutierung der Immunzellen sekretieren seneszente Zellen Chemokine wie beispielsweise IL-8, MCPs (monocyte chemoattractant proteins) und MIPs (macrophage inflammatory proteins) [39](Abb. 3).

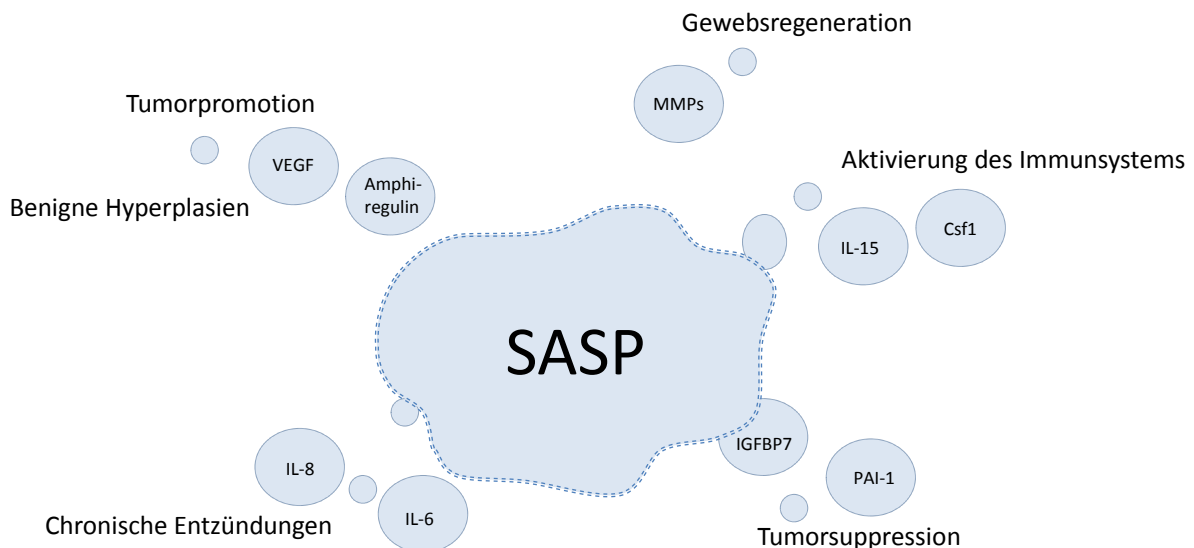


Abbildung 3: Seneszente Zellen sekretieren im Rahmen ihres SASPs eine Vielzahl von löslichen oder auf Exosomen lokalisierten Proteine, darunter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche verschiedene Effekte auf benachbarte Zellen, Gewebe oder den ganzen Organismus haben können. So können beispielsweise die Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und Amphiregulin Tumorstadium fördern, während die permanente Sekretion der Zytokine IL-6 (interleukin 6) und IL-8 (interleukin 8) chronische Entzündungen verursachen kann. Zudem können SASP-Komponenten wie die MMPs (matrix metalloproteinases) Gewebsregeneration vermitteln oder wie im Fall von IL-15 (interleukin 15) und Csf-1 (colony stimulating factor 1) das Immunsystem aktivieren. Andere im Rahmen des SASPs sekretierte Proteine hingegen, wie beispielsweise IGFBP7 (insulin-like growth factor-binding protein 7) und PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), haben eine tumorsuppressorische Wirkung. In Kapitel 1.4 sind die Auswirkungen des SASPs seneszenten Zellen detailliert beschrieben.

Reguliert wird der SASP unabhängig vom Zellzyklusarrest. So führt die Transkription von $p16^{\text{INK4a}}$ zwar zu einem Wachstumsarrest in den exprimierenden Zellen, für die Induktion des SASPs ist eine $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression jedoch nicht von Nöten [50]. Im Gegensatz dazu scheint eine Aktivität von p53, dem zweiten Schlüsselregulator des Proliferationsstopps, den SASP

sogar zu beschränken. So konnte bereits gezeigt werden, dass seneszente Zellen, die kein p53 exprimieren, eine signifikant erhöhte Menge vieler SASP-Komponenten sekretieren [38]. Im Gegensatz dazu ist eine Inhibition der MAP-Kinase p38 [51] oder des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) [52] in der Lage, die Ausbildung eines SASPs in seneszenten Zellen zu unterbinden. Eine erhöhte p38-Aktivität, wie sie im Rahmen der zellulären Seneszenz vorliegt, ist jedoch nicht von transienter Natur und ist auch nicht direkt nach der Induktion, beispielsweise durch radioaktive Bestrahlung, detektierbar. Erst mehrere Tage nach erfolgter Behandlung mit seneszenz-induzierenden Stimuli lässt sich eine verstärkte Phosphorylierung von p38 nachweisen [51]. Diese Ergebnisse ergänzen sich mit der Beobachtung, dass auch die Etablierung des SASPs Zeit benötigt und der SASP erst annähernd zehn Tage nach der Induktion zellulärer Seneszenz seinen vollen Wirkungsgrad erreicht hat. Die MAP-Kinase p38 wird von ATM, ein Protein von essentieller Bedeutung bei der DDR, aktiviert [53]. Dass p38 eine wichtige Rolle bei der Induktion des SASPs spielt, zeigen Experimente, bei denen eine konstitutive Aktivierung von p38 ausreichend war, um einen SASP unabhängig von einem Proliferationsarrest zu induzieren [51]. Die eigentliche Schlüsselrolle bei der Regulation des SASPs nimmt aber letztendlich NF- κ B ein. Als Transkriptionsfaktor, dessen Freisetzung durch phosphoryliertes p38 induziert werden kann, kontrolliert NF- κ B die Transkription und somit die Expression von Zielgenen, welche für die Sekretion der SASP-Komponenten verantwortlich sind [54].

Im Rahmen des SASPs wird auch eine große Anzahl an ursprünglich membrangebundenen Proteinen als lösliche Form sekretiert. So werden beispielsweise die Rezeptoren für IL-6 und TNF- α (tumor necrosis factor alpha), welche für die Initiation von Entzündungen essentiell sind, als lösliche Rezeptoren freigesetzt [39]. Dabei wirken der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) sowie der lösliche TNF- α -Rezeptor (sTNFR1) und sTNFR2 nicht ausschließlich als einfache Antagonisten, sondern erfüllen zusätzlich über spezielle Formen der Signalübertragung wichtige Aufgaben innerhalb entzündlicher Reaktionen (siehe 1.4). Auch ein Mitglied der EGF-Familie von Wachstumsfaktoren, Amphiregulin, ist ein Bestandteil des SASPs [39] und wird als ein membranständiges Vorläuferprotein synthetisiert [55]. Eine fehlerhafte Regulation der Freisetzung von Amphiregulin wird häufig mit Krebserkrankungen, im Besonderen mit Brustkrebs, in Verbindung gebracht [56]. Die Freisetzung membrangebundener Liganden des EGFR (EGF-Rezeptor) wird häufig durch äußere Signale, wie zum Beispiel über die Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

(GPCR), initiiert. Die Stimulation des EGFR durch GPCR-vermittelte Freisetzung seiner membrangebundenen Liganden wird auch als EGFR-Transaktivierung bezeichnet [57] und ist ein klassisches Beispiel für ein sogenanntes *“triple membrane-passing signal“*. Für die Freisetzung der extrazellulären Domänen, der Ektodomäne, eines membranständigen Proteins sind unter anderem ADAM-Proteasen (a disintegrin and metalloprotease) verantwortlich.

1.5 ADAM17

ADAM17, ein Mitglied der Familie der ADAM-Proteasen, ist eine Sheddase, die zuerst als das Schlüsselenzym bei der Prozessierung von TNF- α entdeckt und beschrieben wurde. Aus diesem Grunde wurde ADAM17 ursprünglich auch als TACE (tumor necrosis factor α converting enzyme) bezeichnet [58]. Sheddasen sind eine Klasse von membrangebundenen Enzymen, die in der Lage sind, den extrazellulären Teil von Transmembranproteinen in der Nähe der Zellmembran abzuspalten und so eine lösliche Ektodomäne dieses gespaltenen Proteins freizusetzen. Dieser Prozess wird als Shedding oder auch als Ektodomänen-Shedding bezeichnet. ADAMs sind Type I Transmembranproteine, die eine für ihre Familie typische Struktur besitzen (Abb. 4). Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, gefolgt von einer Pro-Domäne. In der nachfolgenden Katalytischen Domäne wird ein Zink-Ion über die konservierte Konsensussequenz HExxHxxGxxH innerhalb des katalytischen Zentrums der ADAMs koordiniert. Zwölf der 22 vom humanen Genom kodierten ADAMs weisen dieses Motiv auf. Es wird vermutet, dass nur diese zwölf ADAMs proteolytisch aktiv sind, während die anderen ADAMs in andere biologische Prozesse, wie zum Beispiel der Zelladhäsion, involviert sind [59]. Nach der Katalytischen Domäne folgt die namensgebende Disintegrin-Domäne, welche eine hohe Homologie mit den in Viperngiften vorkommenden Disintegrinen aufweist. Die Disintegrine der Schlangengifte inhibieren die Aggregation von Blutplättchen und sind somit verantwortlich für die Hemmung der Blutgerinnung nach einem Biss [60]. Zusätzlich hemmen Disintegrine Integrin-abhängige Zelladhäsion [61]. Im Anschluss an die Disintegrin-Domäne findet man bei den ADAMs eine cysteinreiche Domäne, der eine membranproximale Domäne (MPD) folgt. Nach einer einzelnen Transmembrandomäne befindet sich im Zellinneren eine zytoplasmatische Domäne [59].

Die genauen Aufgaben der einzelnen Domänen sind Gegenstand der aktuellen Forschung, jedoch gelten einige grundsätzliche Theorien als gesichert. Die Pro-Domäne inhibiert die katalytische Aktivität der ADAMs, indem sie das Zink-Ion innerhalb des katalytischen

Zentrums über einen Cystein-Rest bindet [62]. Wird die Pro-Domäne durch eine Proprotein-Konvertase wie Furin abgespalten, kommt es zum sogenannten Cystein-*switch* und das katalytische Zentrum wird exponiert [63]. Dabei ist zu beachten, dass dieser Mechanismus zur Regulation der katalytischen Aktivität der ADAMs über einen Cystein-*switch* nicht für alle proteolytisch aktiven Mitglieder der ADAM-Familie zutrifft. So konnte gezeigt werden, dass für die induzierte proteolytische Spaltung von TNF- α durch ADAM17 keine Prozessierung der Pro-Domäne von ADAM17 durch eine Proprotein-Konvertase notwendig ist [64]. ADAM-Proteine, bei denen die Pro-Domäne vorhanden ist, werden als pro-ADAM oder auch als pro-Form bezeichnet, wohingegen ADAMs, bei denen die Pro-Domäne prozessiert worden ist und das katalytische Zentrum exponiert vorliegt, als reife oder auch mature ADAM-Proteine bezeichnet werden. Das katalytische Zentrum mit dem koordinierten Zink-Ion ist für die proteolytische Aktivität der ADAMs verantwortlich [59]. Die Disintegrin-Domäne ist in der Lage, Integrine zu binden und somit Zelladhäsion zu vermitteln [65]. Es gibt auch Hinweise darauf, dass die Disintegrin-Domäne, genau wie die cysteinreiche Domäne und die membranproximale Domäne, an der Substraterkennung beteiligt ist [66]. Die cysteinreiche Domäne ist mit ihren vielen Cystein-Resten in der Lage, auf Redox-Veränderungen zu reagieren und es konnte bereits experimentell nachgewiesen werden, dass eine Veränderung in der Vernetzung der Disulfidbrücken zur Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung der ADAMs führen kann [67]. Die membranproximale Domäne wiederum scheint neben der Substraterkennung [68] bei der Dimerisierung von ADAM-Proteinen eine entscheidende Rolle zu spielen [69]. Über die Funktion der zytoplasmatischen Domäne existieren sehr widersprüchliche Daten. Auf der einen Seite enthält die zytoplasmatische Domäne der meisten ADAMs ein PxxP-Motiv, welches zur Erkennung und Bindung von Proteinen mit einer SH3(Scr-homology 3)-Domäne dient [70]. Da viele Proteinkomplexe des Zytoskeletts auf SH3-Interaktionen beruhen, kann spekuliert werden, ob die zytoplasmatische Domäne der ADAMs für den Transport und die korrekte Lokalisation auf der Zelloberfläche verantwortlich ist. Des Weiteren finden sich bei einigen ADAMs putative Phosphorylierungsstellen für Tyrosin- oder Serin-/Threonin-Kinasen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige ADAMs bei der Maturation oder bei der Aktivierung phosphoryliert werden und dass eine Inhibition der für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen, wie beispielsweise ERK (extracellular signal related kinase) [71] oder p38 [72], zu einer Hemmung des induzierten Sheddings führt. Auf der anderen Seite konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ADAM17 auch ohne die zytoplasmatische Domäne katalytisch aktiv sein kann [73]. Dieser Umstand ließe sich

dadurch erklären, dass für ADAM17 zwei prinzipiell unterschiedliche Aktivierungsmechanismen zu existieren scheinen. Eine transiente, schnelle Aktivierung der Protease, welche nach einer Induktion des Ektodomänen-Sheddings hervorgerufen wird, scheint weder von der Prozessierung der ADAM17-Pro-Domäne, noch von einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 abhängig zu sein. Für die basale, konstitutive ADAM17-Aktivität hingegen scheint sowohl die Abspaltung der Pro-Domäne von ADAM17, als auch dessen zytoplasmatische Domäne essentiell zu sein [64, 74]. Shedding spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Mobilisierung von ursprünglich membrangebundenen Botenstoffen, als auch bei der Regulation der verfügbaren Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Ektodomänen-Shedding von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie deren Rezeptoren ist ein wichtiger posttranslationaler Regulationsmechanismus sowohl bei der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus. ADAM17-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben meist ab dem Tag 17,5 der Embryonalentwicklung.

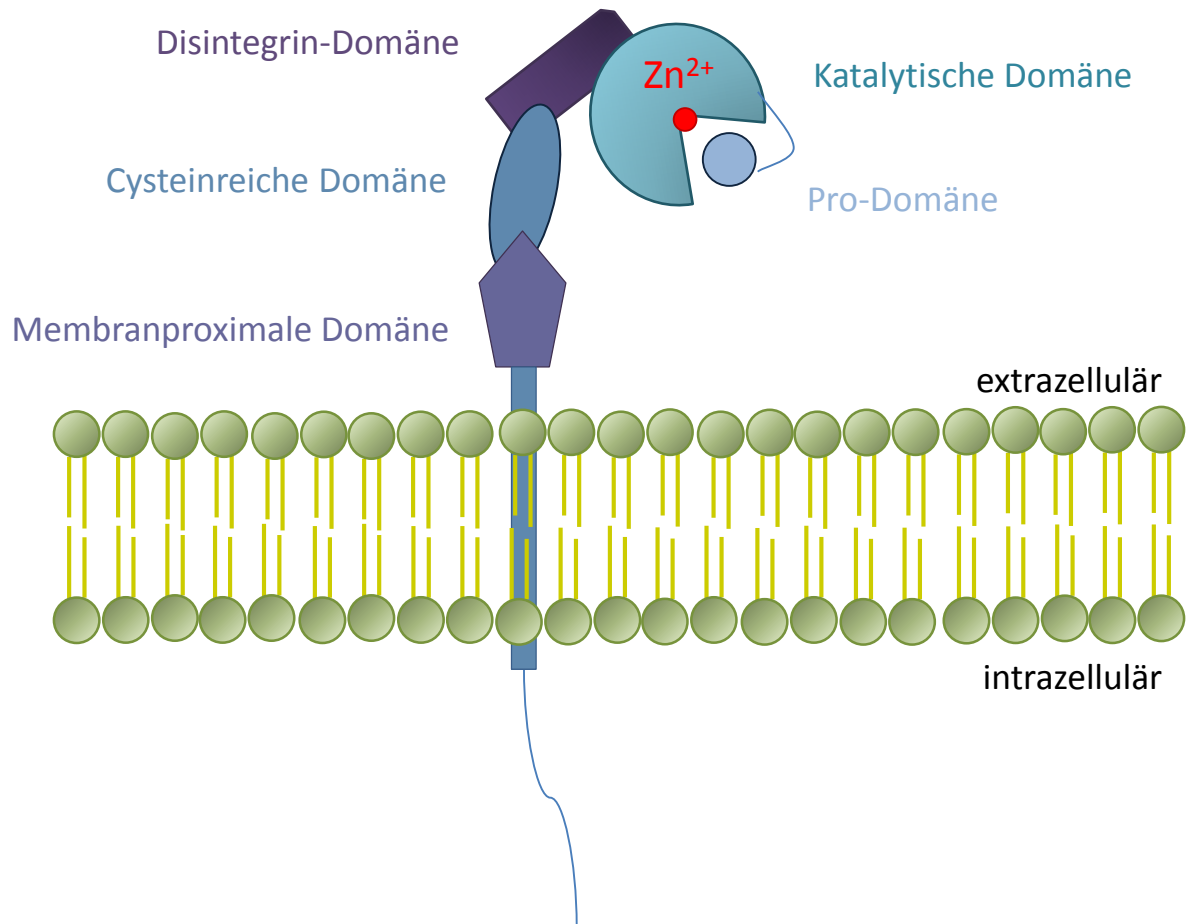


Abbildung 4: Schematische Darstellung der allgemeinen Domänenstruktur von ADAM(a disintegrin and metalloprotease)-Proteasen. Die einzelnen Domänen sowie deren Funktionen sind in Kapitel 1.5 näher beschrieben.

Ein geringer Teil der Mäuse wird auch lebend geboren, diese versterben jedoch innerhalb weniger Tage nach der Geburt. Die Mäuse weisen schwere Fehler bei der Entwicklung der Augen, der Lunge, der Haut sowie des Herzens und der Haare auf. Ebenso ist das vaskuläre System gestört. Somit weisen ADAM17-defiziente Mäuse einen ähnlichen Phänotyp auf wie Mäuse, die kein TGF- α (transforming growth factor alpha), ein Substrat von ADAM17, exprimieren [75]. Auch bei Zell-Zell-Kontakten und Zelladhäsion ist ADAM17 beteiligt. So ist die Protease an der Spaltung von L-Selektin, einem für die Rekrutierung von Lymphozyten zu peripheren Lymphorganen wichtigen Zelladhäsionsmolekül, beteiligt und somit in der Lage, das Immunsystem zu regulieren [76]. Ebenso ist durch ADAM17 vermitteltes Ektodomänen-Shedding sowohl bei der Initiation als auch bei der Resolution von Entzündungsprozessen involviert. Membrangebundenes pro-TNF- α wird von ADAM17 in seine lösliche Form überführt [77], welche dann die umliegenden Zellen parakrin stimulieren kann, was einen wichtigen Prozess in der Initiationsphase von Entzündungen darstellt. Gleichzeitig kann aber auch ein Rezeptor für TNF- α , der TNFR1, von ADAM17 proteolytisch

gespalten und somit die Empfindlichkeit der Zielzelle für TNF- α reguliert werden. Der nun lösliche TNF- α -Rezeptor (sTNFR1) ist zudem antagonistisch und kann im Serum befindliches, lösliches TNF- α binden und somit die Konzentration von aktivem TNF- α im Serum senken [78]. Zusätzlich ist der sTNFR1 in der Lage, auf der Oberfläche von Zellen exprimiertes, membrangebundenes TNF- α (pro-TNF- α) zu binden und eine Signalkaskade in den pro-TNF- α -exprimierenden Zellen auszulösen, welche zum Beispiel zur Induktion von Apoptose in Monozyten führt [79]. Dieser Vorgang ist auch als „*reverse signaling*“ bekannt (Abb. 5). Auch der membranständige Rezeptor für das pro-inflammatorische Zytokin IL-6, der IL-6-Rezeptor (IL-6R), kann durch ADAM17 proteolytisch gespalten werden. Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) ist jedoch kein IL-6-Antagonist. Vielmehr ist ein Komplex aus IL-6 und sIL-6R in der Lage, auch Zellen, die keinen IL-6R exprimieren, über den ubiquitär vorhandenen, signalweiterleitenden Rezeptor gp130 (glykoprotein 130, auch interleukin 6 signal transducer) zu stimulieren. Dabei wird diesem als IL-6-Trans-Signaling bezeichneten Prozess eher eine pro-inflammatorische Wirkung zugesprochen, während bei dem klassischen Signal über den membrangebunden IL-6R im Komplex mit gp130 eine anti-inflammatorische Proportion vermutet wird [80].

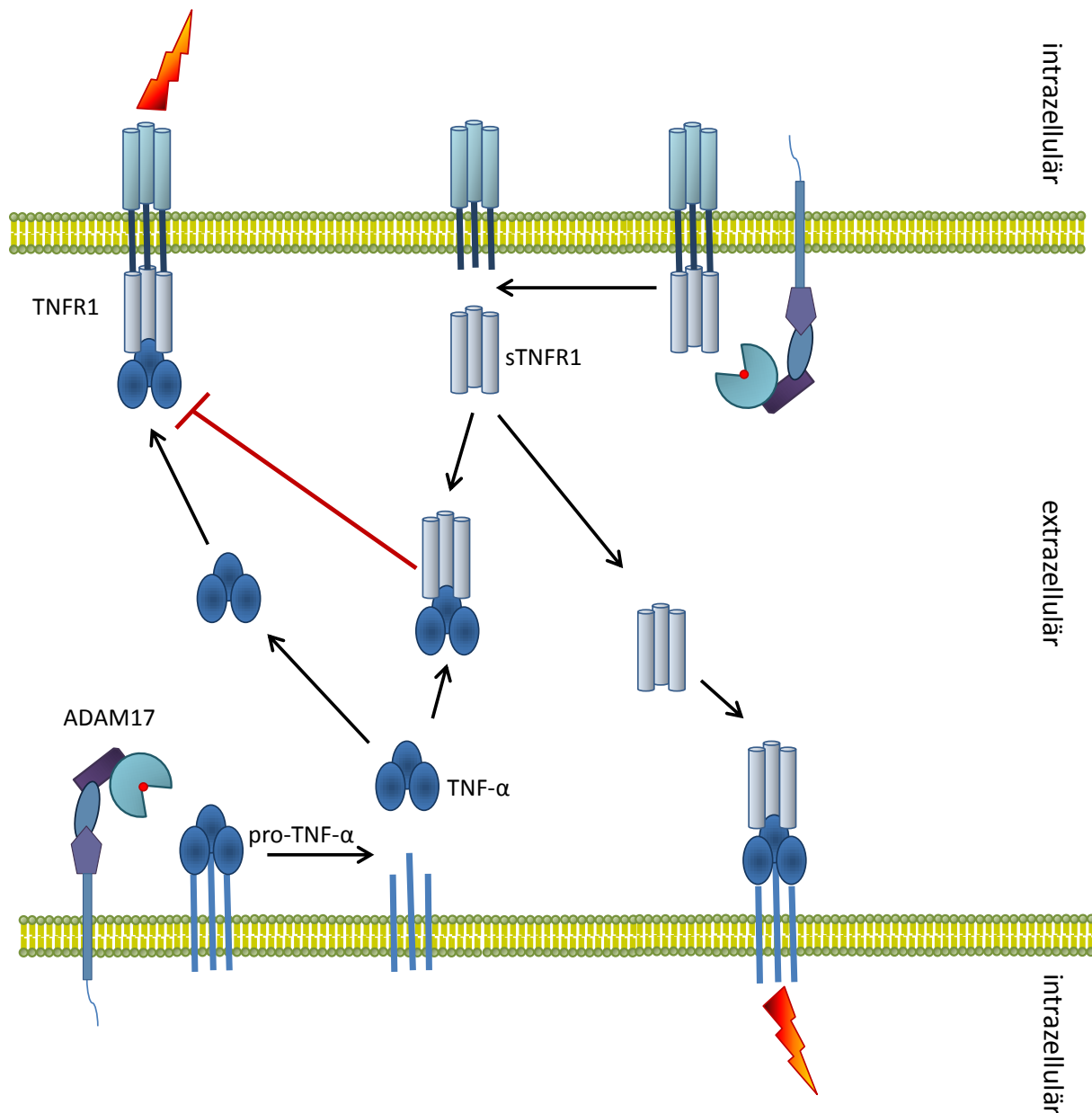


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rolle von ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) während der interzellulären Kommunikation am Beispiel des TNF- α -Signalweges. ADAM17 spaltet sowohl membrangebundenes TNF- α (tumor necrosis factor alpha, unten links), als auch den TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1, oben rechts) proteolytisch. Lösliches TNF- α kann den TNFR1 auf benachbarten Zellen stimulieren (oben links). Diese Stimulation kann durch den antagonistischen sTNFR1 (soluble tumor necrosis factor receptor 1) inhibiert werden (Mitte). Der sTNFR1 kann zudem membrangebundenes TNF- α binden und so eine Signalkaskade in Zellen, welche pro-TNF- α exprimieren, induzieren (unten rechts).

1.6 Regulation der ADAM17-Aktivität und der Substratselektion

Anhand der oben genannten Beispiele wird klar, dass das Ektodomänen-Shedding durch ADAMs strikt reguliert werden muss. Anderenfalls würden bei einer erfolgten Induktion des Sheddings lösliche Faktoren freigesetzt werden, die gegenteilige oder sich gegenseitig

neutralisierende Effekte haben. Diese Regulation kann auf mehreren Ebenen erfolgen und verschiedene, sich nicht gegenseitig ausschließende Mechanismen der Regulation sind denkbar [81]. Zu allererst kann die Expression der Protease an sich sowie deren Aktivität reguliert werden. Dies beinhaltet sowohl prätranskriptionelle Ereignisse, wie epigenetische Einflüsse und die Regulation der Transkription über die Aktivierung oder Inhibition von Transkriptionsfaktoren, als auch posttranslationale Modifikationen der Protease. So durchläuft ADAM17 den sekretorischen Weg von Transmembranproteinen und wird während dieses Prozesses glykosyliert. Auch die Pro-Domäne wird innerhalb des Golgi-Netzwerkes durch Proproteinkonvertasen, wie Furin, entfernt und die Protease somit in seine proteolytisch aktive Form überführt [62]. Ein weiterer Schritt in der Regulation von ADAM17 ist der Transport aus den perinukleären Kompartimenten an die Zelloberfläche [82]. Auf der Zelloberfläche liegt ADAM17 im nicht aktivierten Grundzustand mit TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinases 3) assoziiert vor. Dabei bindet ein Molekül TIMP3 zwei Moleküle von ADAM17 und inhibiert dessen proteolytische Aktivität [83]. Eine Inhibition oder Induktion der Expression von TIMP3 kann somit indirekt die Proteaseaktivität von ADAM17 kontrollieren. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass Integrine [84] und Proteine aus der Familie der Tetraspanine [85], insbesondere CD9, an ADAM17 binden und die Sheddase so negativ in ihrer Aktivität beeinflussen. Ein weiterer, wichtiger Regulator der proteolytischen Aktivität von ADAM17 scheint die Protein Disulfid Isomerase (PDI) zu sein [67]. Einem Modell zufolge kann matures ADAM17 entweder in einer geschlossenen, inaktiven oder in einer offenen, aktiven Konformation an der Zelloberfläche vorliegen [86]. Reduzierte PDI übernimmt dabei die Rolle eines Redox-Schalters der bei einem entsprechenden Redox-Milieu ADAM17 über eine Neuordnung der Disulfidverbrückung von seiner offenen in seine geschlossene Konformation überführt und somit inaktiviert. Dementsprechend sind reaktive Sauerstoffspezies [87] und H_2O_2 [88] in der Lage, ADAM17 zu aktivieren. Ob dies durch direkte Interaktion mit der Protease geschieht oder ob ein für ADAM17 wichtiges regulatorisches Protein oxidiert und damit in seiner Struktur oder Aktivität verändert wird, ist bisher unklar.

Neben der Aktivität von ADAM17 beziehungsweise dessen Expression und Lokalisation können natürlich auch die Substrate der Protease reguliert werden. Die Tatsache, dass bis 2011 bereits 76 verschiedene Substrate für ADAM17 beschrieben wurden [66], legt den Schluss nahe, dass die Regulation der Substratelektion nicht auf Seiten der Protease, sondern auf Seiten des Substrates stattfindet muss. So wird zum Beispiel Notch-1, ein membranständiger Rezeptor und zugleich ein Substrat von ADAM10, einem engen

Verwandten von ADAM17, nur dann proteolytisch gespalten, wenn zuvor ein membranständiger Ligand einer benachbarten Zelle den Rezeptor bindet [89]. Diese Interaktion führt zu einer Änderung der Konformation von Notch-1 und die zuvor für ADAM10 sterisch nicht zugängliche Schnittstelle wird präsentiert. Auch an der Blutgerinnung ist die spezifische Substratselektion von ADAM-Proteasen beteiligt. So wird der Thrombozyten-Rezeptor Glykoprotein VI (GPVI) durch die Bindung an Kollagen aktiviert [90]. Diese Aktivierung löst eine Signalkaskade aus, die zu einer verstärkten Präsentation von Thrombozyten-Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche führt und so die Blutgerinnung nach einer Verletzung einleiten kann. Gleichzeitig wird durch die Interaktion von Kollagen mit GPVI eine Metalloprotease rekrutiert, welche den Thrombozyten-Rezeptor prozessiert und somit die Rezeptordichte auf diesen Zellen reduziert und das Ausmaß der Blutgerinnung reguliert [91, 92]. Auch Proteine der Annexin-Familie sind an der Regulation von Ektodomänen-Shedding beteiligt. Annexine sind Proteine, welche Ca^{2+} -abhängig Phospholipide binden und durch ihre Lokalisation an der Plasmamembran, innerhalb und außerhalb der Zelle, mit membranständigen Proteinen interagieren können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktionen der Annexine A2, A8 und A9 mit den Ektodomänen sowohl von ADAM17 als auch von Amphiregulin einen regulatorischen Einfluss auf das Ektodomänen-Shedding von Amphiregulin haben. Dabei ist zu beachten, dass Annexin A2 inhibitorische Eigenschaften aufweist, während die Annexine A8 und A9 aktivierend wirken. Zudem scheinen bestimmte Annexine spezifisch mit verschiedenen ADAM-Substraten zu interagieren und somit die Substratselektion zu regulieren [93]. Ein weiteres Ca^{2+} -bindendes Protein, welches in die Regulation von ADAM-Proteasen involviert zu sein scheint, ist Calmodulin. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Interaktion von Calmodulin mit den zytoplasmatischen Domänen von L-Selektin [94], APP (amyloid beta (A4) precursor protein) [95], ACE2 (angiotensin I converting enzyme 2) [96] oder Semaphorin4D [97] das Ektodomänen-Shedding dieser Substrate durch ADAM-Proteasen inhibiert wird. Erst kürzlich wurde auch für das ADAM10- und ADAM17-Substrat TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain 3) eine Interaktion mit Calmodulin experimentell nachgewiesen. Auch in diesem Fall erwies sich die Bindung von Calmodulin an TIM-3 als inhibitorisch und ein Calmodulin-Inhibitor konnte die Prozessierung der Ektodomäne von TIM-3 durch ADAM-Proteasen induzieren [98]. Da aber auch beschrieben wurde, dass Calmodulin mit der pro-Form von ADAM10, eine der beiden Haupt-Sheddasen von TIM-3, interagiert und dessen Maturation inhibiert [99], kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob das induzierte Ektodomänen-Shedding von TIM-3 durch den Calmodulin-Inhibitor auf einer verminderten

Interaktion von Calmodulin mit ADAM10 oder von Calmodulin mit TIM-3 beruht. Ein weiterer wichtiger Schritt in der Regulation von Ektodomänen-Shedding scheint die Lokalisation von Protease und Substrat in Mikrodomänen der Zellmembran zu sein [100]. Dafür sprechen beispielsweise die Interaktion von ADAM-Proteasen und deren Substrate mit Tetraspaninen oder die Vernetzung des Zytoskeletts mit ADAM-Substraten. So ist die Interaktion von L-Selektin [101] und APP [102] mit ERM-Proteinen (Ezrin-Radixin-Moesin), eine Familie von Proteinen, die als Bindeglied zwischen der Zellmembran und dem Aktin gelten, essentiell für das induzierte Shedding der Ektodomänen dieser Proteine durch ADAM-Proteasen. Dabei ist hervorzuheben, dass die Interaktion von L-Selektin mit ERM-Proteinen nur für das über den Signalweg der PKC (protein kinase C) und nicht für das über den p38-Pfad vermittelte Shedding essentiell ist [103]. Auch bei der Interaktion von Tetraspaninen mit ADAM-Substraten lassen sich Unterschiede in der Auswirkung erkennen. So führt eine Überexpression von CD9 zu einem verminderten Ektodomänen-Shedding von TGF- α [104], wohingegen die Freisetzung von HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) positiv durch CD9 beeinflusst zu werden scheint [105]. Ein weiterer, indirekter Beweis für die Theorie, dass die Lokalisation von Protease und Substrat von entscheidender Bedeutung ist, stellt die Beobachtung dar, dass die Inhibition der Polymerisation von Aktin die Prozessierung der Ektodomäne von CD44 hemmt [106], während eine verstärkte Polymerisation Shedding von CD16, CD43, CD44 und L-Selektin induziert [107]. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass eine Cholesterin-Depletion und somit die Auflösung von „lipid rafts“ eine Aktivierung von ADAM17 zur Folge hat [108].

Eine große Anzahl unterschiedlicher Stimuli kann Ektodomänen-Shedding induzieren. Dazu gehören oxidativer [87] und osmotischer Stress [109], Apoptose [110], UV-Licht [72], Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [111], die Aktivierung purinergischer Rezeptoren [112] sowie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren [113]. Die verschiedenen Stimuli führen zur Initiation einer oder mehrerer Signalkaskaden. Dazu gehören unter anderem der ERK- [71], der JNK(JUN N-terminal kinase)- [114], der p38- [72] und der Src(sarcoma)-Pfad [115]. Experimentelle Daten bestätigen, dass sowohl ADAMs als auch deren Substrate zum Teil phosphoryliert werden und dass diese Veränderung im Phosphorylierungsstatus einen Einfluss auf das Ektodomänen-Shedding hat [116]. So ist beispielsweise eine Phosphorylierung von L-Selektin am Serin 367 durch die PKC wichtig für dessen Interaktion mit ERM-Proteinen [103]. Ohne eine Phosphorylierung von L-Selektin scheint dessen Lokalisation gestört und das Shedding reduziert zu sein [117]. Die verschiedenen Isoformen der PKC sind auch an der Regulation des Sheddings anderer

18

ADAM-Substrate beteiligt. So wird der IL-6R nach der Aktivierung von PKC δ und PKC η durch ADAM-Sheddasen proteolytisch gespalten [118], während das Ektodomänen-Shedding von HB-EGF von PKC α und PKC δ kontrolliert wird [119]. PKC δ und PKC ζ hingegen kontrollieren die Prozessierung von NRG (Neuregulin) [120, 121] und das Shedding von TNF- α wird über PKC ϵ reguliert [122]. Es scheint also, dass verschiedene Signalwege spezifisch das Ektodomänen-Shedding von einzelnen ADAM-Substraten induzieren. So existieren Daten, die belegen, dass die Stimulation von SCC-9-Zellen (squamous cell carcinoma) mit PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) Shedding von HB-EGF, TGF- α und Amphiregulin hervorruft. LPA (Lysophosphatidsäure), ein Aktivator von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, hingegen induziert in SCC-9-Zellen nur die Prozessierung der Ektodomäne von Amphiregulin [123]. Anhand der oben genannten Beispiele wird deutlich, dass der aktuelle Forschungsstand in Bezug auf die Regulation und die Substratspezifität von ADAM-Proteasen große Lücken aufweist und weitere, experimentelle Arbeit notwendig ist, um den Prozess des Ektodomänen-Sheddings in seiner Gesamtheit zu erfassen.

2. Ziel der Arbeit

Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp seneszenten Zellen beinhaltet unter anderem die Freisetzung der Ektodomänen membrangebundener Proteine. Unter diesen Proteinen befinden sich auch bekannte Substrate der Metalloprotease ADAM17. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von ADAM17 bei der Generierung von löslichem TNFR1 und Amphiregulin, zwei SASP-Komponenten und zugleich ADAM17-Substrate, im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz zu untersuchen. Um solche Untersuchungen zu ermöglichen, soll zunächst eine Methode für die Induktion von zellulärer Seneszenz etabliert werden. Nach einer erfolgreichen Induktion der zellulären Seneszenz sollen anschließend die Überstände seneszenten Zellen hinsichtlich ihres Gehalts an löslichem TNFR1 und löslichem Amphiregulin analysiert werden. Es ist bereits bekannt, dass dasselbe Substrat auf derselben Zelle durch verschiedene Induktoren des Ektodomänen-Sheddings von verschiedenen ADAMs prozessiert werden kann. So kann beispielsweise der IL-6R auf denselben Zellen je nach Stimulus sowohl von ADAM10 als auch von ADAM17 proteolytisch gespalten werden [124]. Aus diesem Grunde soll bei dieser Arbeit bestimmt werden, welche Protease im Rahmen der zellulären Seneszenz den TNFR1 und pro-Amphiregulin prozessiert. Dazu sollen verschiedene Inhibitoren für die Klasse der Metalloproteasen, aber auch spezifische Inhibitoren für verschiedene ADAMs eingesetzt werden. Zusätzlich soll untersucht werden, welcher Signalweg für das erhöhte Shedding im Rahmen des SASPs verantwortlich ist. Da bereits bekannt ist, dass DNA-schädigende Stimuli wie Anisomycin oder UV-Strahlung p38 aktivieren und p38 in der Lage ist, ADAM17 zu phosphorylieren, wird der Fokus bei diesem Teilprojekt auf eben diese Kinase gerichtet. Zu diesem Zweck soll der Einfluss von p38 auf das Ektodomänen-Shedding von ADAM-Proteasen während der zellulären Seneszenz mit Hilfe eines p38-Inhibitors untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Zellen, Geräte und Materialien

3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Für Vektoramplifikationen wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue (Stratagen), der aus dem Sicherheitsstamm K12 hervorgegangen ist, verwendet.

Für Expressions- und Proliferationsversuche wurden folgende Zelllinien (Tabelle 1) verwendet:

Tabelle 1: Aufstellung der für diese Arbeit verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Ursprungsorganismus	Kultivierungsbedingungen
PC-3	Humane Prostatakarzinomzellen	adhärente Zellen, RPMI 1640
IMR-90	Humane Lungenfibroblasten	adhärente Zellen, DMEM

Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (4,5g/L) Medium (IMR-90) oder in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Medium (PC-3) mit 10% FCS (Fetal Calf Serum), Penicillin G (60µg/ml) und Streptomycin (100µg/ml) kultiviert. Alle Zellen wurden in einem Inkubator mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre, 3% O₂ und 5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

3.1.2 Plasmide

In Tabelle 2 sind alle Plasmide aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2: Aufstellung der während dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Plasmid	Resistenz
pGIZ ADAM17shRNA Clone ID: V3LHS_322732 Antisense-Sequenz: TTGCTGTCAACACGATTCT	Ampicillin / Puromycin
pGIZ Non-silencing Lentiviral shRNA	Ampicillin / Puromycin

3.1.3 Inhibitoren

In Tabelle 3 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren aufgeführt.

Tabelle 3: Aufstellung der während dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren.

Inhibitor	Hersteller
GI 254023X (GI)	Auftragssynthese, [125]
GW 280264X (GW)	Auftragssynthese, [125]
Marimastat	Sigma-Aldrich
D1(A12)	Cambridge Universität, Prof. Dr. G. Murphy, [126]
Z-VAD(OMe)-FMK	Santa Cruz Biotechnology
sb203580	Sigma-Aldrich
U0126	Sigma-Aldrich
Bay 11-7082	Sigma-Aldrich

3.1.4 Antibiotika

Als Selektionsantibiotika kamen Ampicillin (Roth) für Bakterien mit 100µg/ml und Puromycin (Sigma-Aldrich) für Zellkulturzellen mit 1,5µg/ml zum Einsatz.

3.1.5 Größenstandards

Von Fermentas stammt der Prestained Protein Molecular Marker (20 - 120kDa), der bei der SDS-PAGE eingesetzt wurde. Im Laufe dieser Arbeit wurde von Seiten des Herstellers das gefärbte Referenzprotein mit einem Molekulargewicht von 80kDa durch ein Referenzprotein mit einem Molekulargewicht von 85kDa ersetzt. Daher sind die Skalierungen der im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten WesternBlots uneinheitlich.

3.1.6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für WesternBlot oder Immunopräzipitation verwendet:

Tabelle 4: Aufstellung der während dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung für WB	Hersteller
A300D	1:1000	Dr. A. Trad, [127]
A300E	-	Dr. K. Yamamoto, [128]
β-Aktin (#4967)	1:1000	Cell Signaling Technology
PARP-1 (#9542)	1:1000	Cell Signaling Technology
p38 (#9212)	1:1000	Cell Signaling Technology
pp38 (# 9211)	1:1000	Cell Signaling Technology
p38 (biotinyliert, #2387)	1:1000	Cell Signaling Technology
pThr (sc-5267)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
pThrPro (#9391)	1:5000	Cell Signaling Technology
Transferrin-Rezeptor (H68.4)	1:1000	life technologies
TNFR1 (sc-8436)	1:500	Santa Cruz Biotechnology
anti-rabbit IgG POD	1:5000	Thermo Scientific
anti-mouse IgG POD	1:5000	Thermo Scientific

3.1.7 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

- Trypsin/EDTA, PAA
- DMEM High Glucose, PAA
- RPMI 1640, PAA
- FCS, PAA
- Pen/Strep, PAA
- Complete Protease Inhibitor Tabletten, Roche Diagnostics
- PhosSTOP, Roche Diagnostics
- Nucleobond®AX-Kit, Machery-Nagel
- SuperSignal West Femto, Thermo Scientific
- BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific
- Cell Surface Protein Isolation Kit, Thermo Scientific
- p38 MAP Kinase Assay Kit, Cell Signaling Technology
- BM Blue POD, Roche Diagnostics
- TurboFect™, Fermentas
- ELISA Duo-Sets: hIL-6, hAmphiregulin, hsTNFR1, R&D Systems
- Protein G Agarose, Millipore
- Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific
- Senescence Detection Kit, BioVision

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Sarstedt:

- 1,5ml, 2ml, 15ml und 50ml Reaktionsgefäße
- Zellkulturschale Ø10cm
- T75 Zellkulturflaschen
- Einwegpipettenspitzen
- CryoPure
- 96-Well-Platten

Greiner:

- 6-Well-Platten

Nunc:

- 96-Well-Platten, Maxisorb

andere:

- PVDF-Membran Westran Clear Signal, 0,45µm Porengröße, GE Healthcare
- Chromatography-Papier, 3mm, GE Healthcare

3.1.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Aqua dest. angesetzt.

5x Laemmli-Puffer: 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerol, 2% SDS,

2% β-Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau

10x TBS: 500mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,5M NaCl

TBS-T: 0,05% Tween 20 in 1x TBS

PBS: 1,4M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄

SDS-PAGE-Laufpuffer: 2M Glycin, 250mM Tris, 1% SDS

10x Transferpuffer: 25mM Tris, 200mM Glycin, 20% Methanol

Lysispuffer: 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 1mM NaVO₃, 1mM NaF, 10 mM 1,10-Phenanthrolin, eine Complete Protease Inhibitor Tabletten pro 50ml Lysispuffer, eine PhosSTOP-Tablette pro 10ml Lysispuffer

LB-Medium: 1% NaCl, 1% Pepton/Trypton, 0,5% Hefeextrakt

IP-Waschpuffer: 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0,2% NP40

3.1.10 Verwendete Geräte

- Eppendorf Zentrifuge 5416 R, Eppendorf
- Heraeus Megafuge 1.0, Heraeus Instruments GmbH
- Thermomixer Compact, Eppendorf
- NanoDrop Spektrophotometer ND-1000, PeqLab Biotechnologie GmbH
- 96-Well-Photometer SCT Rainbow, Tecan
- Zeiss Televal31, Zeiss
- Hera Cell CO₂-Incubator, Kendro Laboratory Products GmbH
- *Gelaide*® BSB 6, Flow Laboratories
- FluorChem®Q, Alpha Innotec
- SDS-PAGE- Western Blot- und Agarosegel-Kammern, BioRad
- Power-Pac 200/300, BioRad
- BioRad GelDoc 2000, BioRad

- SpeedVac®-Plus sc110A und UVS 400A, Savant

- Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience

3.1.11 Chemikalien

Ammoniumperoxosulfat, Merck; Ampicillin, Roth; Borat, Roth; Bovines Serum Albumin, ICN Biomedicals Inc; Bromphenolblau, Sigma-Aldrich; Concanavalin A, Sigma-Aldrich; Dinatriumhydrogenphosphat, Merck; Dimethylsulfoxid, Roth; Doxorubicin, Roth; Essigsäure, Roth; Ethanol, Roth; Ethidiumbromid, Roth; Glycerol, Roth; Glycin, Roth; Hefeextrakt, Roth, Isopropanol, Roth; Kaliumchlorid, Merck; Kaliumdihydrogenphosphat, Merck; β -Mercaptoethanol, Merck; Methanol, Roth; Milchpulver, Roth; Natriumchlorid, Roth; Natriumfluorid, Merck; Natriumhydroxyd, Fluka; NP-40, Sigma-Aldrich; Natriumvanadat, Roth; Penton/Trypton, Roth; Polyacrylamid, Roth; Puromycin, PAA; Salzsäure 37%, Riedel-de Haen; Sodiumdodecylsulfate, Roth; N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin, Roth; Triton X-100, Roth; Tween 20, Roth; Xylene-Xyanol, Serva Feinbiochemica

3.2 Molekularbiologische Methoden

Bei allen gentechnischen Experimenten wurden die Richtlinien des Gentechnikgesetzes (GenTG) und der Gentechnik sicherheits-Verordnung (GenTSV) vom 01.07.1990 beachtet.

3.2.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine Midi-Präparation dient der Ernte größerer Mengen Plasmid-DNA, die für nachfolgende Transfektionen, Subklonierungen oder Sequenzierungen verwendet werden kann. Für eine Midi-Präparation wurden 100ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit Bakterien inokuliert. Für Midi-Präparationen wurde das Nucleobond®AX-Kit von Machery-Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 BCA-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen kam das BCA Protein Assay Kit von Pierce zum Einsatz. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Reaktion von 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) mit einwertigen Kupferionen zu einem violetten Farbkomplex. Die einwertigen Kupferionen werden aus einer Reaktion aus zweiwertigen Kupferionen und den in der Probe enthaltenen Proteinen bereitgestellt [129]. Die Menge an einwertigem Kupfer ist also direkt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Proteinen. Der violette Komplex aus BCA und einwertigen Kupferionen kann quantitativ über die Absorption bei 562nm photometrisch bestimmt werden.

3.3.2 Immunopräzipitation

Die Methode der Immunopräzipitation wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Konzentrierung und Reinigung von Proteinen aus Lysaten verwendet. Dazu wurden 50µl Protein G Agarose Beads (50% slurry) zweimal mit PBS gewaschen. Hierfür wurden die Beads mit 1000g bei 4°C für 3min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Beads mit 10µg des entsprechenden Antikörpers und 500µl PBS bei 4°C für mindestens vier Stunden inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurden die Beads einmal mit PBS gewaschen, bevor das Lysat hinzugegeben wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Proben, ungeachtet der eingesetzten Menge Lysat, auf 1ml mit PBS aufgefüllt wurden. Anschließend wurden die Beads über Nacht bei 4°C mit dem Lysat inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads zweimal mit IP-Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen, mit Hilfe einer Hamilton-Pipette von allen Flüssigkeitsresten befreit und mit 50µl 2x Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden daraufhin für fünf Minuten bei 95°C gekocht und anschließend 15sec mit 18000g zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3 ConA-Fällung

Concanavalin A ist ein Protein aus der Schwertbohne, welches in die Familie der Lektine einzuordnen ist. Lektine sind eine Gruppe von Proteinen, die spezifisch Kohlenhydrate erkennen und binden können. Die Fällung mit Concanavalin A diente daher der Konzentrierung und Reinigung von glykosylierten Proteinen aus Zellüberständen. Dazu wurden Überstände von Zellkulturen mit 50µl ConA-Suspension bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die ConA-Beads bei 4°C mit 1000g für fünf Minuten zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde, mit Hilfe einer Hamilton-Pipette, sämtliche Restflüssigkeit entfernt, die Beads in 50µl 5x Laemmli-Puffer aufgenommen und für 30min bei 95°C gekocht. Danach wurden die Beads für 15sec bei 18000g zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4 Oberflächenbiotinylierung

Die Oberflächenbiotinylierung dient der Isolierung von Proteinen, welche auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Dazu werden Zellen mit einer Biotin-haltigen Lösung, welche nicht membrangängig ist, behandelt. Das Biotin ist über eine Disulfidverbrückung kovalent an eine Sulfo-NHS-Gruppe gekoppelt und kann so mit den primären und sekundären Amidgruppen der Oberflächenproteine von behandelten Zellen reagieren. Über ein NeutrAvidin Agarose-Gel können nach anschließender Lyse der Zellen die biotinylierten Proteine isoliert werden, ohne dass zytosolische Proteine in die Probe gelangen. Für diese Arbeit wurde das Cell Surface Protein Isolation Kit nach den Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden anschließend mittels WesternBlot analysiert. Anschließend wurde der verwendete Antikörper mittels Stripping-Puffer von der Membran entfernt und die Membran daraufhin mit einem Antikörper gegen den membranständigen Transferrin-Rezeptor inkubiert. In Anschluss daran wurde die Membran erneut mit Stripping-Puffer behandelt und mit einem Antikörper gegen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), einen intrazellulärem Protein, inkubiert. Dies sollte sicherstellen, dass die Zellmembran während des Biotinylierungsprozesses intakt war.

3.3.5 SDS-PAGE

Bei der diskontinuierlichen *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis* unter reduzierenden Bedingungen werden Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld voneinander getrennt. Das Prinzip des von Herrn Laemmli [130] entwickelten Verfahrens beruht auf der Denaturierung der Proteine durch das anionische Detergenz SDS (sodium dodecylsulfate) und das reduzierende β -Mercaptoethanol und der Überdeckung der Eigenladung der Proteine durch das negativ geladene SDS. Da die Proteine das SDS in einem festen Massenverhältnis (etwa ein SDS-Molekül auf zwei Aminosäurereste) anlagern und denaturiert vorliegen, trennen sie sich nur nach ihrer Masse auf, unabhängig von ihrer ursprünglichen Konformation oder Eigenladung. Ein typisches SDS-PAGE-Gel besteht aus einem grobporigen Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 und einem feinporigen Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8. Die Gele bestehen aus einem Polymer aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid, die Polymerisation erfolgt radikalisch mit dem Radikalstarter APS (Ammoniumpersulfat) und dem Polymerisierungskatalysator TEMED (Tetramethylethylen-diamin).

Vor einer SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit 1/5 ihres Volumens mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und 5min bei 95°C inkubiert. Für den Nachweis von kleineren Proteinen ($\leq 50\text{kDa}$) wurden 8%ige und für größere Proteine ($\geq 50\text{kDa}$) 10%ige Trenngele gegossen. Das Sammelgel war stets 5%ig. Für das elektrische Feld wurde eine Spannung von 200V angelegt. Die Spannung wurde aufrechterhalten, bis das Bromphenolblau des Laemmli-Puffers aus dem Gel ausgetreten war. Anschließend wurden die nach ihrer Größe getrennten Proteine mit Hilfe eines WesternBlots auf eine PVDF-Membran transferiert.

Trenngel 8% / 10% :	H ₂ O:	4,6ml / 4ml
	30% Acrylamidmix:	2,7ml / 3,3ml
	1,5M Tris (pH 8,8):	2,5ml
	10% SDS:	100 μ l
	10% APS:	100 μ l
	TEMED:	6 μ l / 4 μ l

Sammelgel 4%:	H ₂ O:	2,1ml
	30% Acrylamidmix:	500µl
	0,5M Tris (pH 6,8):	380µl
	10% SDS:	30µl
	10% APS:	30µl
	TEMED:	3µl

3.3.6 WesternBlot und indirekte Immundetektion

Für die Immundetektion der mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennten Proteine wurden diese auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)–Membran transferiert. Dies geschah mit Hilfe des WesternBlot-Verfahren. Dazu wurden vier in Transferpuffer äquilibrierte Chromatography-Papierstücke geschichtet und mit einer PVDF-Membran versehen. Die PVDF-Membran wurde vorher für 30sek in Methanol aktiviert, kurz mit H₂O gespült und anschließend 2min in Transferpuffer äquilibriert. Auf die aktivierte PVDF-Membran wurde das Trenngel der vorangegangenen SDS-PAGE luftblasenfrei gelegt und mit weiteren vier Lagen in Transferpuffer getränkten Chromatography-Papierstücken bedeckt. Anschließend wurde für 180min eine Stromstärke von 400mA angelegt.

Durch die angelegte Spannung wandern die Proteine vertikal durch das Trenngel und binden über starke, hydrophobe Wechselwirkungen an die PVDF-Membran. Für den Nachweis der Proteine wurde eine indirekte Immundetektion gewählt. Bei der indirekten Immundetektion bedient man sich zweier Antikörper. Der erste, oder auch primäre, Antikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein, während der zweite, oder auch sekundäre, Antikörper spezifisch den Fc-Teil des primären Antikörpers erkennt. Der sekundäre Antikörper ist häufig an ein Enzym, meist POD (Peroxidase), gekoppelt. Die POD katalysiert die Reaktion von Luminol und H₂O₂, bei der ein Teil der Reaktionsenergie in Form von Chemolumineszenz frei wird. Diese Chemolumineszenz kann dann mit Hilfe eines Luminescent Image Analyzers detektiert werden.

Für eine erfolgreiche indirekte Immundetektion muss die PVDF-Membran nach dem Transfer blockiert werden, da der primäre Antikörper sonst unspezifisch an allen freien Stellen der Membran binden würde. Dazu wurde die Membran für 1h bei RT oder ü.N. bei 4°C in TBS-T mit 5% Milchpulver oder 5% BSA inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5min in

TBS-T gewaschen. Der primäre Antikörper wurde entsprechend Tabelle 4 in TBS-T mit 5% Milchpulver beziehungsweise 5% BSA verdünnt und mit der Membran für 1h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran erneut 3 x 5min in TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in TBS-T mit 5% Milchpulver oder 5% BSA verdünnt wurde, für 1h bei RT inkubiert. Nach drei finalen Waschschritten mit TBS-T zu je 5min wurde für die Detektion gebundener Antikörper SuperSignal West Femto nach Angaben des Herstellers verwendet und die entstehende Chemolumineszenz am Luminescent Image Analyzer detektiert. Sollte die Membran zu einem späteren Zeitpunkt mit Stripping Puffer behandelt werden, so wurde sie in TBS-T bei 4°C gelagert.

3.3.7 Strippen von Membranen

Falls auf einer PVDF-Membran mehr als ein Protein nachgewiesen werden sollte, so wurde die Membran nach der indirekten Immundetektion „gestrippt“. Das bedeutet, dass alle Antikörper von der Membran beziehungsweise von den darauf befindlichen Proteinen gelöst werden. Dazu wurde der Restore Western Blot Stripping Buffer nach Herstellerangaben verwendet. Nach dem Strippen wurde die Membran erneut geblockt und anschließend mit einem primären Antikörper inkubiert.

3.3.8 ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-DuoSet-Kits von R&D verwendet. Die Konzentrationen von Antikörpern und Standardlösungen entsprachen den Herstellerangaben. Zunächst wurde eine MaxiSorb 96-Well-Platte mit 50µl einer Lösung des *capture antibody*s beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit 200µl PBS mit 1% BSA für mindestens 60min geblockt. Nach dem Blocken wurde die Platte einmal mit 200µl PBS-T gewaschen und anschließend 50µl Zellkulturüberstand beziehungsweise Standard-Lösung pro Well aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde die Platte dreimal mit 200µl PBS-T gewaschen und daraufhin mit 50µl einer Lösung des *detection antibody*s beschickt. Nach weiteren 2h Inkubation bei RT wurde die Platte erneut dreimal mit 200µl PBS-T

gewaschen. Anschließend wurden je 50µl einer Lösung streptavidingekoppelter Peroxidase pro Well hinzugegeben und für 30min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte dreimal mit 200µl PBS-T gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurden 75µl BM Blue POD pro Well hinzugegeben und solange im Dunkeln inkubiert, bis sich eine Blaufärbung einstellte und die Reaktion mit 75µl 1,8M H₂SO₄ abgestoppt wurde. Die Intensität der Absorption des Farbstoffes wurde anschließend bei 450nm gemessen.

3.3.9 p38 Aktivitätsassay

Um zu bestimmen, ob p38 in seneszenten Zellen stärker phosphoryliert und somit eine erhöhte Aktivität aufweist, wurde ein p38 Aktivitätsassay durchgeführt. Dafür wurde das p38 MAP Kinase Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Transfektion von PC-3-Zellen

Für eine Transfektion von adhärent wachsenden PC-3-Zellen wurden die Zellen am Vortag mit PBS gewaschen und für 15min mit 2ml Trypsin/EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Zellkulturschale gespült und für 5min bei 1500g pelletiert. Das Pellet wurde in RPMI 1640-Medium resuspendiert und auf einer 6-Well-Platte so ausgesät, dass die Zellen am nächsten Tag zu 60-70% konfluent waren. Für die eigentliche Transfektion wurde 1µg des entsprechenden Vektors in 200µl serumfreiem Medium gelöst und mit 2µl TurboFect™ versetzt. Das TurboFect™ ist ein kationisches Polymer, welches mit DNA einen stabilen, positiv geladenen Komplex bildet, der die DNA vor Degradation bewahrt. Dieser Ansatz wurde 20min bei RT inkubiert und anschließend langsam auf die PC-3-Zellen getropft. Nach 48h Stunden erfolgte eine Kontrolle der Transfektionseffizienz mit Hilfe einer GFP-Kontrolle am Fluoreszenzmikroskop.

3.4.2 Selektion der transfizierten PC-3-Zellen

Für eine Selektion stabil transfizierter PC-3-Zellen wurden den Zellen 48h nach erfolgter Transfektion 2,5µg/ml des Antibiotikums Puromycin gegeben. Puromycin inhibiert zum einen die Proteinbiosynthese, indem es eine frühzeitige Termination einleitet, zum anderen hemmt es den Proteinimport in Mitochondrien und unterbindet so letzten Endes den Energiestoffwechsel der Zelle. Sobald sich deutlich sichtbare Zellkolonien in der Zellkulturschale bildeten, wurden die Zellen trypsiniert und in eine 96-Well-Platte umgesetzt. Dabei wurde eine Verdünnung gewählt, bei der rein rechnerisch 0,3 Zellen pro Well ausgesät wurden. Sobald sich in einem Well ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen zuerst in eine 6-Well-Platte und anschließend, nach einer erneuten Wachstumsphase, in eine 10cm-Schale überführt. Um eine Insertion der transfizierten cDNA in das Genom der Zielzelle zu gewährleisten, wurde der Selektionsdruck mindestens acht Wochen aufrechterhalten.

3.4.3 Ernte und Lyse adhärenter Zellen

Für die Ernte adhärenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml PBS auf die Zellen gegeben und diese dann mit einem Zellschaber von der Platte abgeschabt. Die abgeschabten Zellen in PBS wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen für 15sec bei 18000g pelletiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 250µl (10cm-Schale) beziehungsweise 75µl (6-Well-Platte) Lysispuffer resuspendiert. Für die Lyse wurden die Zellen für 30min bei 4°C mit dem Lysispuffer inkubiert. Zur Trennung von Proteinen und den restlichen Zelltrümmern wurde das Lysat für 10min bei 18000g und 4°C zentrifugiert. Der die Proteine enthaltene Überstand wurde anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden diese für 5min bei 1500g pelletiert und in 1ml Standardmedium mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Das eigentlich zytotoxische DMSO verhindert die Ausbildung großer Eiskristalle und somit die Zerstörung

der Zellen während des Gefriervorgangs. Die Zellen wurden in ein Cryo-Röhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierbox für mindestens 24h bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Cryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Vor dem Auftauen wurden 30ml Standardmedium warm gestellt und die gefrorenen Zellen mit diesem warmen Medium überspült. Überstehendes Medium und aufgetaute Zellen im Cryo-Röhrchen wurden zurück in das warme Medium überführt, bis kein Eis mehr im Cryo-Röhrchen war. Diese Vorgehensweise diente dazu, das für die Zellen toxische DMSO so schnell wie möglich auf eine nicht-toxische Konzentration zu verdünnen. Anschließend wurden die Zellen für 5min bei 1500g pelletiert, das überstehende, DMSO-haltige Medium abgesaugt und die Zellen in 10ml Standardmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in eine 10cm-Schale gegeben und im Brutschrank gehalten.

3.4.5 Induktion von zellulärer Seneszenz

Zur Induktion von zellulärer Seneszenz in normal proliferierenden Zellen kamen drei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Zum einen wurden die Zellen mit Doxorubicin, welches in DNA interkaliert und so Strangbrüche in der DNA hervorrufen kann, behandelt. Des Weiteren wurde eine Cäsium-Strahlenquelle verwendet, um DNA-Schäden herbeizuführen. Zudem haben IMR-90-Zellen nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit und werden nach einer bestimmten Anzahl von Passagen in Kultur replikativ seneszent.

3.4.5.1 Induktion von zellulärer Seneszenz mittels Doxorubicin

Um Seneszenz mit Hilfe von Doxorubicin zu induzieren, wurden 2×10^6 Zellen (10cm Zellkulturschalen) beziehungsweise 5×10^5 Zellen (6-Well-Platten) für fünf Tage mit 100nM Doxorubicin in Standard-Medium behandelt. Während dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und weitere fünf Tage inkubiert, um die Entstehung eines robusten SASPs zu ermöglichen.

3.4.5.2 Induktion von zellulärer Seneszenz mittels Bestrahlung

Für die Bestrahlung von Zellen wurde Cäsium (^{137}Cs) als Quelle für Beta- und Gammastrahlung verwendet. Das dazugehörige Gerät befindet sich im Immunologischen Institut des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Die Zellen wurden einer Strahlendosis von 10Gy ausgesetzt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für mindestens zehn Tage in einem Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Medium alle drei Tage gewechselt.

3.4.6 Ernte von Überständen

Um die Zellen, in denen Seneszenz induziert wurde, hinsichtlich ihres SASPs zu untersuchen, wurden die Überstände der Zellen gesammelt. Dazu wurden die Zellen in Medium mit 0,5% FCS für 24h inkubiert. Unbehandelte Kontrollzellen wurden einen Tag zuvor ausgesät. Nach 24h wurde der Überstand abgenommen, für 5min bei 1500g zentrifugiert um tote Zellen beziehungsweise Zelltrümmer zu entfernen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert. Die eventuelle Zugabe von Inhibitoren erfolgte zum Zeitpunkt des Mediumwechsels.

Da die Menge an löslichen Proteinen im Überstand im späteren Versuchsablauf auf die Zahl der sezernierenden Zellen normiert werden sollte, musste nach der Ernte der Überstände die Zellzahl bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen mit jeweils 1ml Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend mit Hilfe eines Zellzählgerätes die Zellzahl bestimmt.

3.4.7 SA- β -Gal-Färbung

Die SA- β -Gal-Färbung diente dem optischen Nachweis seneszenter Zellen. Diese Methode beruht auf der erhöhten Expression der lysosomalen β -Galaktosidase und das vermehrte Vorhandensein lysosomaler Kompartimente in seneszenten Zellen. Für diesen Nachweis wurde das Senescence Detection Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die PC-3-Zellen wurden nach der Färbung über Nacht bei 37°C mit atmosphärischem CO_2 -Gehalt inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde eine ungepaarte studentsche t-Verteilung mit Hilfe eines auf einer Internetseite frei benutzbaren Rechners berechnet.

<http://studentsttest.com/>

Dabei wurde ein Wert kleiner oder gleich 0,05 als signifikant angesehen und mit einem Stern (*) versehen. Ein Wert kleiner oder gleich 0,01 wurde mit zwei Sternen (**) und ein Wert kleiner oder gleich 0,001 mit drei Sternen (***) bezeichnet. Nicht signifikante Werte wurden mit "n.s." gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Induktion von zellulärer Seneszenz

Um die Rolle von ADAM-Proteasen bei der Generierung löslicher Faktoren des SASPs zu untersuchen, musste zunächst eine Methode etabliert werden, um Seneszenz in proliferierenden Zellen zu induzieren. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde versucht, Seneszenz mit Hilfe von Doxorubicin, ein Topoisomerase-Inhibitor, welcher in DNA interkaliert, zu induzieren. Des Weiteren wurden PC-3- und IMR-90-Zellen einer ionisierenden, radioaktiven Strahlung mit einer Dosis von 10Gy ausgesetzt, welche direkt die DNA schädigen sollte [131].

Um zu ermitteln, ob eine erfolgreiche Induktion von Seneszenz stattgefunden hat, wurden die Zellen unter dem Mikroskop hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Dabei zeigte sich, dass seneszente Zellen größer, aber auch flacher als proliferierende Zellen des gleichen Typs erscheinen. Zudem bilden einige Zellen eine nicht näher bestimmte Art von Pseudopodien aus und sind stärker granuliert, als ihre proliferierenden Gegenstücke (Abb. 6). Des Weiteren wurden die Zellen einer β -Gal-Färbung in einem sauren Milieu (pH=6) unterzogen, bei der die von seneszenten Zellen exprimierte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal) X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzt [132]. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, konnte im Mikroskop bei radioaktiv bestrahlten Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen eine erhöhte Anzahl an gefärbten Zellen beobachtet werden. Die in Abbildung 6 gezeigten Aufnahmen wurden freundlicherweise von Jan von der Heyde zur Verfügung gestellt [133]. Als dritter Biomarker für zelluläre Seneszenz diente die Sekretion von Interleukin 6 (IL-6), dem zentralen Zytokin des SASPs [134]. Dafür wurden die Überstände von seneszenten und proliferierenden IMR-90- (Abb. 7) und PC-3-Zellen (Abb.8) gesammelt und mittels ELISA untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bestrahlte als auch mit Doxorubicin behandelte Zellen erhebliche Mengen an IL-6 sekretieren, während in proliferierenden Zellen keine IL-6-Produktion nachweisbar war.

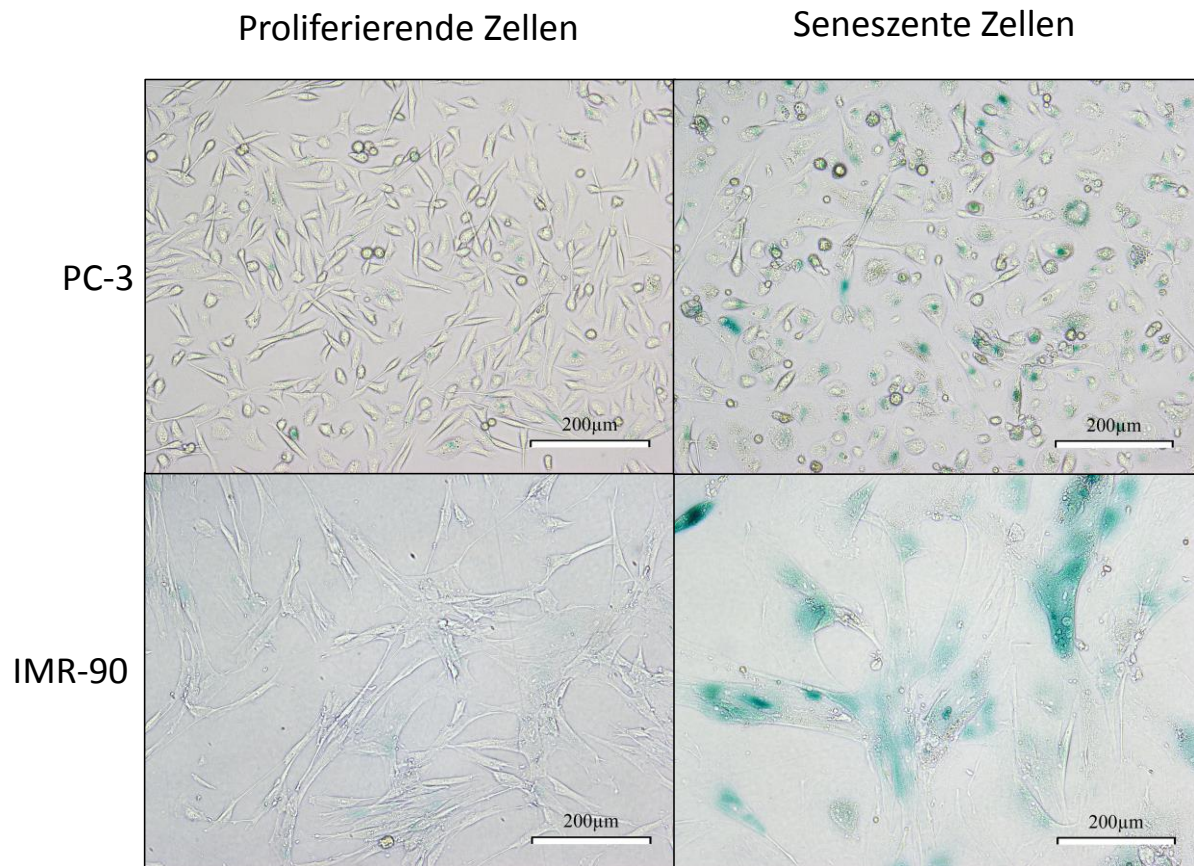


Abbildung 6: Vergleich der Morphologie und der SA- β -Gal-Färbung von proliferierenden und seneszenten PC-3- und IMR-90-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden mit Hilfe des Senescence Detection Kits für 24h bei 37°C mit atmosphärischem CO₂-Gehalt gefärbt.

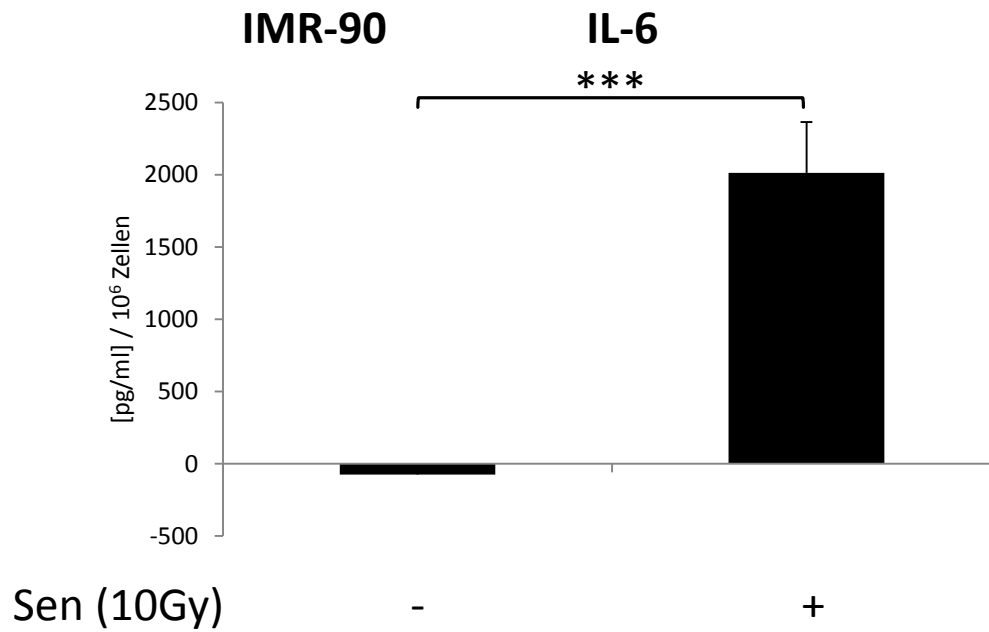


Abbildung 7: Die Induktion zellulärer Seneszenz führt zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 in IMR-90-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. *** $p \leq 0,001$.

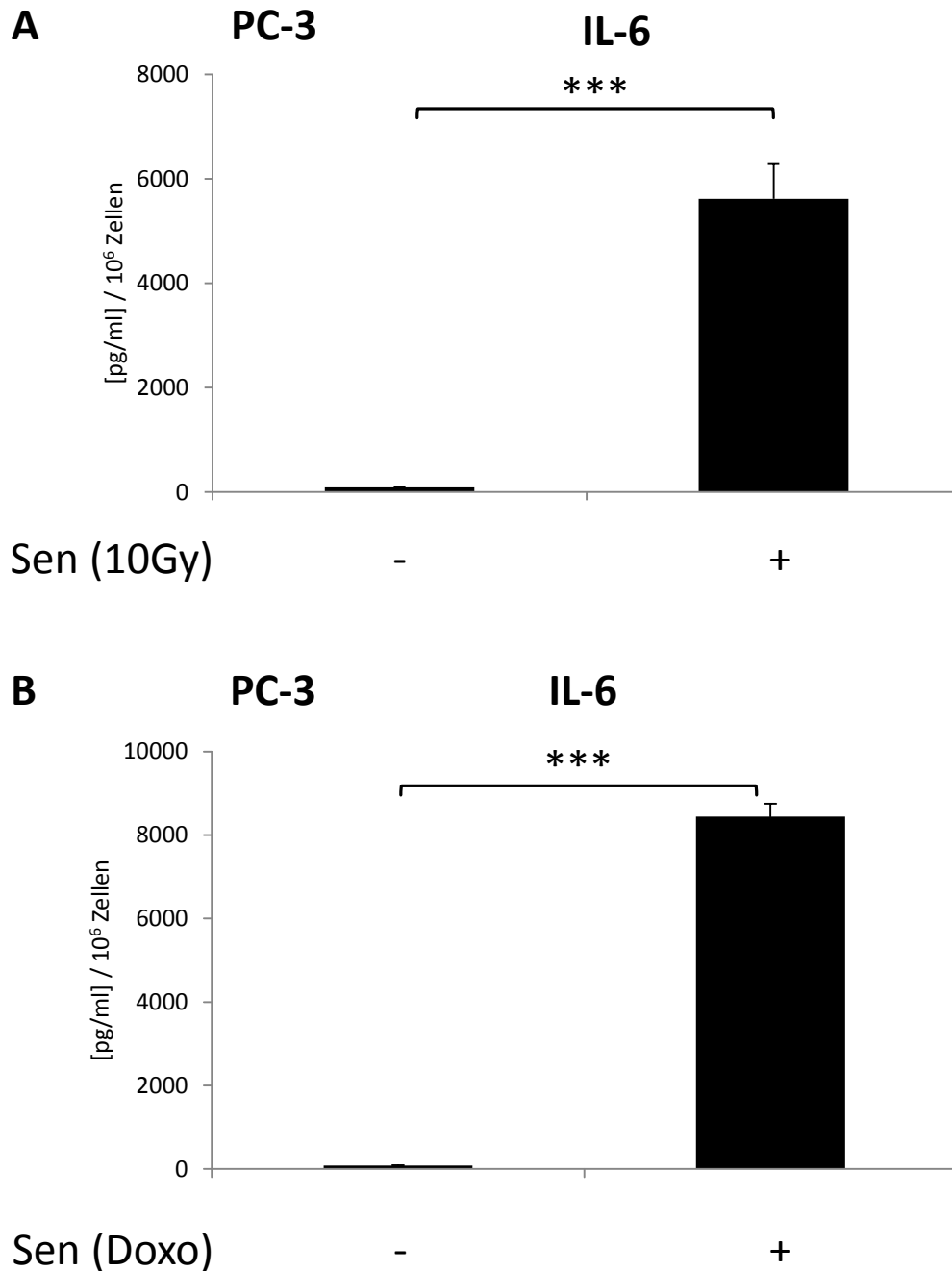


Abbildung 8: Die Induktion zellulärer Seneszenz führt zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 in PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. *** $p \leq 0,001$.

4.2 Die Sekretion von SASP-Komponenten wird nicht durch Apoptose ausgelöst

Da die DNA-schädigende Behandlung der Zellen mit Doxorubicin oder radioaktiver Strahlung in höheren Dosen als den hier eingesetzten Apoptose induzieren kann und ADAM-Proteasen durch Apoptose aktiviert werden können, wurde untersucht, ob der programmierte Zelltod bei der Generierung löslicher SASP-Komponenten in den nachfolgenden Experimenten eine Rolle spielt. Dazu wurde zelluläre Seneszenz in PC-3- und IMR-90-Zellen entweder durch Behandlung mit Doxorubicin oder mit radioaktiver Strahlung induziert. Nach zehn Tagen wurde dem Medium Z-VAD(OMe)-FMK (Z-VAD) [135], ein Pan-Caspase-Inhibitor, welcher die Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose inhibiert, in einer in der Literatur üblichen Konzentration zugesetzt. Nach 24h wurden die Überstände gesammelt und mit Hilfe eines ELISAs analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition von Caspasen keinen Einfluss die Menge von sTNFR1 (Abb. 9 und Abb. 11) und Amphiregulin (Abb. 10) im Überstand seneszenten Zellen hatte. Zudem wurden die Lysate von seneszenten und proliferierenden PC-3-Zellen mittels WesternBlot auf gespaltenes PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1) hin untersucht. PARP-1 ist ein Enzym, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist und wird im Falle von Caspase-abhängiger Apoptose durch Caspase 3 gespalten [136]. Es konnte jedoch keine stärkere Bande für geschnittenes PARP-1 bei seneszenten im Vergleich zu proliferierenden PC-3-Zellen detektiert werden (Abb. 12). Dieses Ergebnis bestätigt die Daten aus den Experimenten mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-Vad.

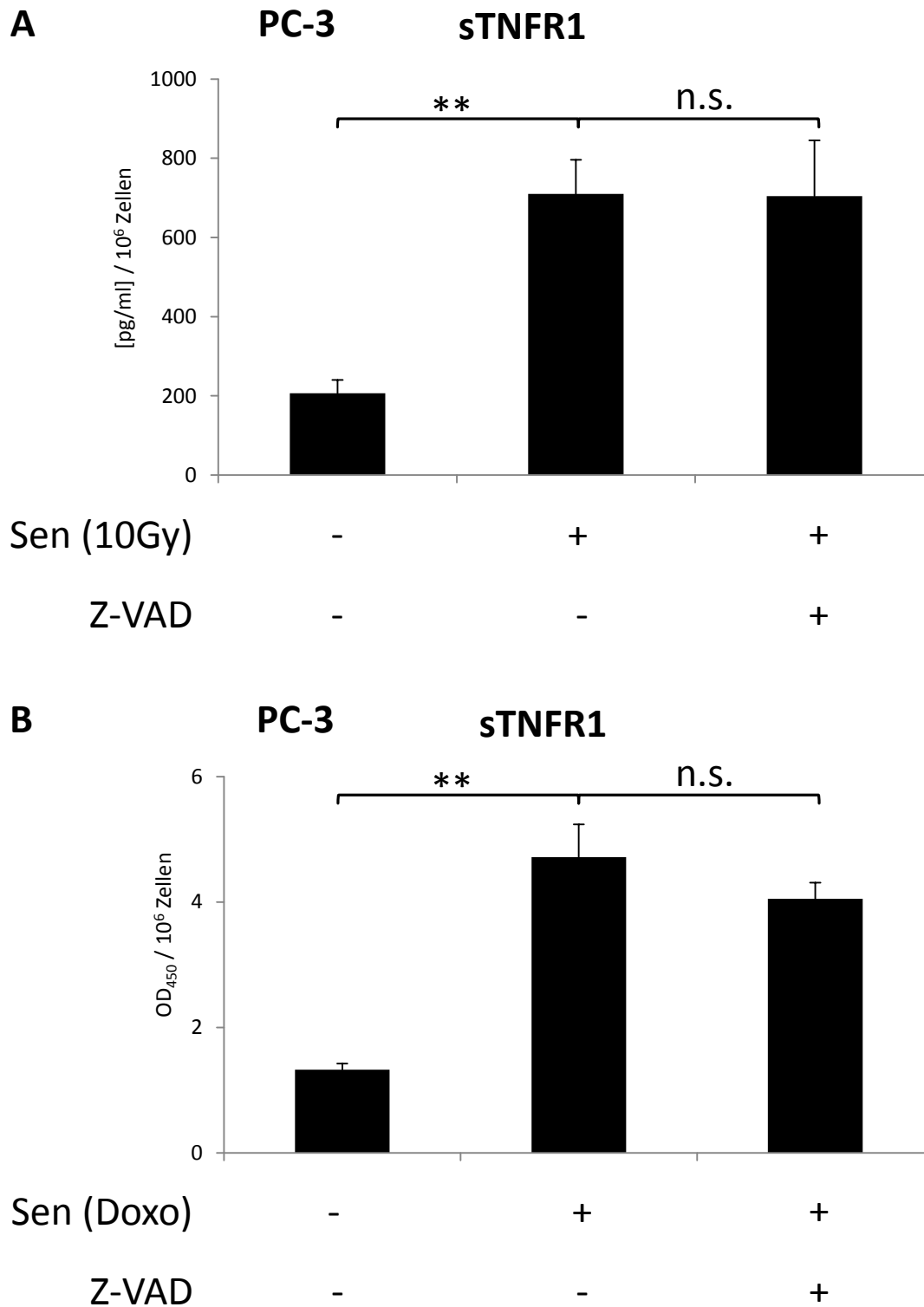


Abbildung 9: Die Freisetzung von sTNFR1 wird nach der Induktion von zellulärer Seneszenz in PC-3-Zellen nicht durch Apoptose ausgelöst. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über **(A)** ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder **(B)** die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 20µM Z-VAD inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$.

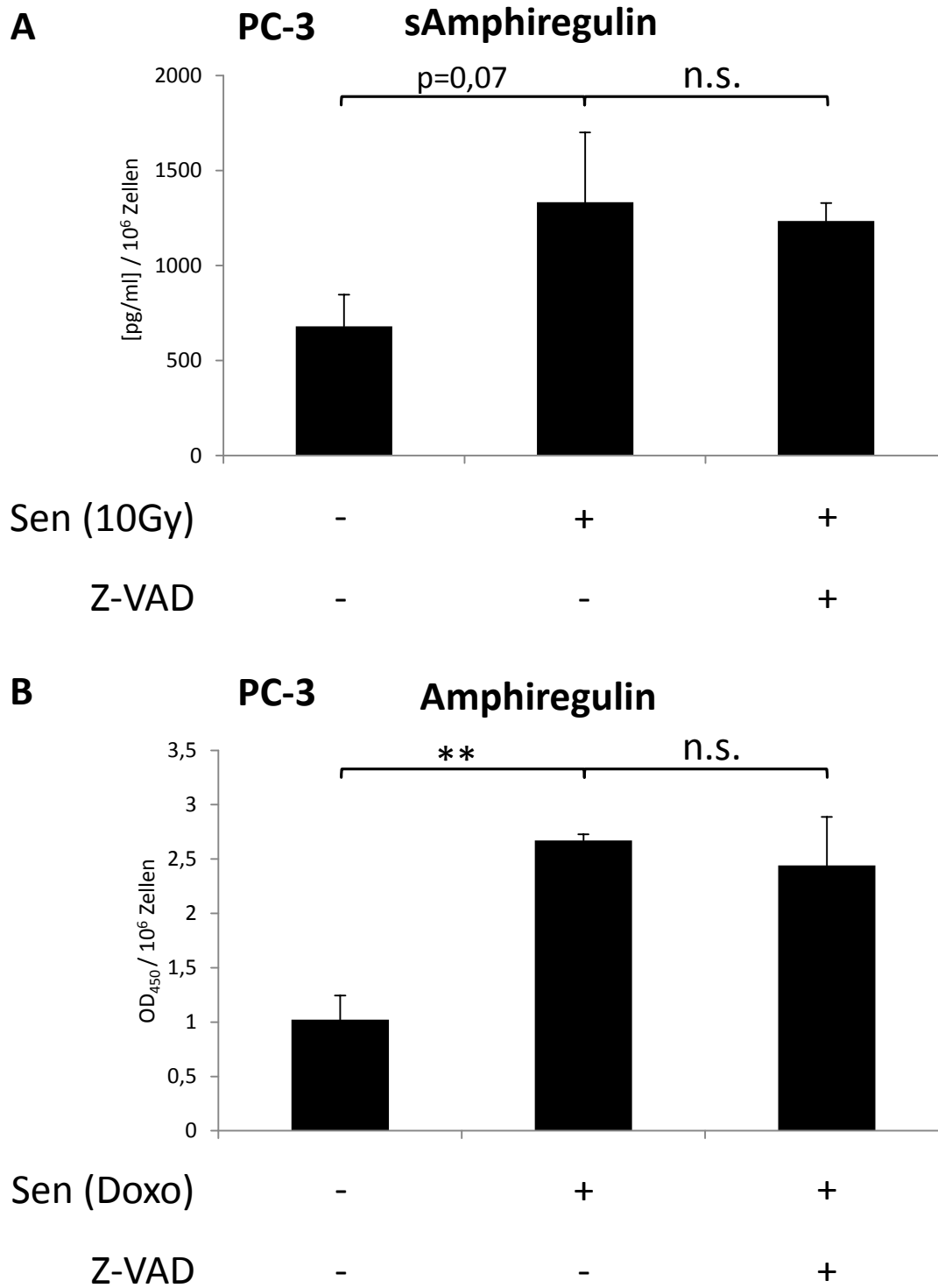


Abbildung 10: Die Freisetzung von Amphiregulin wird nach der Induktion von zellulärer Seneszenz in PC-3-Zellen nicht durch Apoptose ausgelöst. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über **(A)** ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder **(B)** die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 20µM Z-VAD inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$.

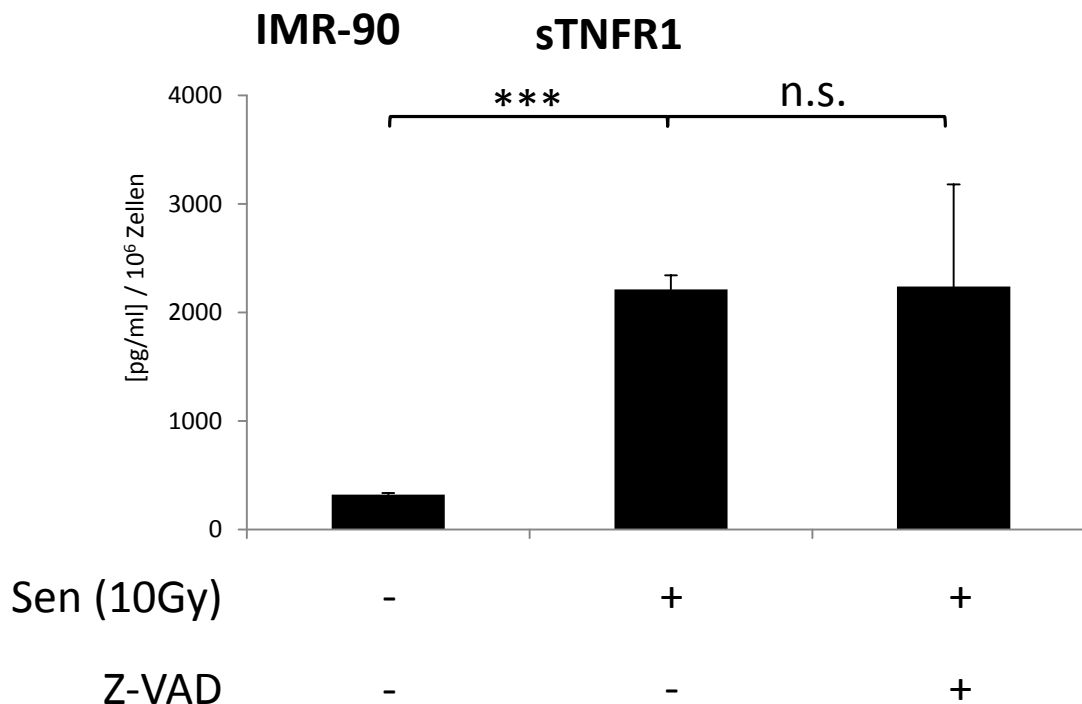


Abbildung 11: Die Freisetzung von sTNFR1 wird nach der Induktion von zellulärer Seneszenz in IMR-90-Zellen nicht durch Apoptose ausgelöst. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 20µM Z-VAD inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; *** $p \leq 0,001$.

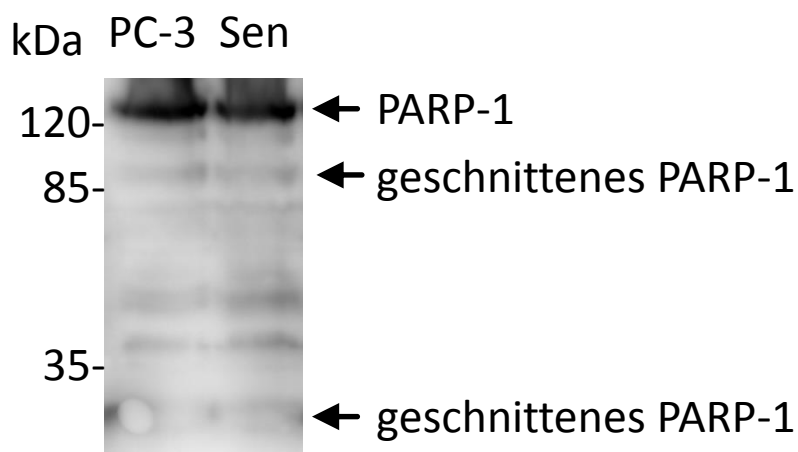


Abbildung 12: Proteolyse von PARP-1 in seneszenten und proliferierenden PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Als primärer Antikörper wurde der PARP-1-Antikörper verwendet.

4.3 Ursprung des TNFR1 im Überstand seneszenten Zellen

Es ist bekannt, dass der TNFR1 in zwei verschiedenen Varianten im Serum beziehungsweise im Überstand von Zellkulturzellen vorliegen kann. Zum einen wurde eine lösliche Form beschrieben, welche durch limitierte Proteolyse der TNFR1-Ektodomäne von der Zellmembran freigesetzt wird [78]. Zum anderen wurde bereits von einer membranständigen Form berichtet, bei der sich der TNFR1 auf Exosomen befindet [137]. Zudem ist bekannt, dass seneszente Zellen vermehrt Exosomen sezernieren [138]. Da im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von ADAM-Proteasen bei der Generierung von löslichen SASP-Faktoren untersucht werden sollte, musste zunächst ermittelt werden, ob die zu untersuchenden Proteine tatsächlich von Proteasen geschnitten oder als Bestandteil von Exosomen sezerniert werden. Dafür wurden die Überstände von seneszenten und normal proliferierenden Zellen miteinander verglichen. Als Kontrollen diente der Überstand von mit PMA behandelten, proliferierenden PC-3-Zellen, in welchen der TNFR1 durch die Stimulation von PMA von ADAM17 prozessiert wird. Zur Konzentrierung der Proteine in den Proben wurde zunächst eine ConA-Fällung durchgeführt und die Proben anschließend im WesternBlot analysiert (Abb. 13). Dabei zeigte sich, dass der TNFR1, wie er im Überstand von proliferierenden Zellen zu finden ist, aufgrund seiner Größe nur der komplette, membrangebundene und somit mit Exosomen assoziierte TNFR1 sein kann. Das Auftreten von Doppelbanden ist vermutlich auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster des TNFR1 zurückzuführen. Im Überstand von seneszenten oder mit PMA behandelten Zellen hingegen findet sich nur die trunkierte, lösliche Form des TNFR1, welche zudem in beiden Proben die gleiche Größe aufweist und somit auf das gleiche Spaltprodukt schließen lässt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der TNFR1 im Zusammenhang mit dem SASP in seiner prozessierten, löslichen Form vorliegt.

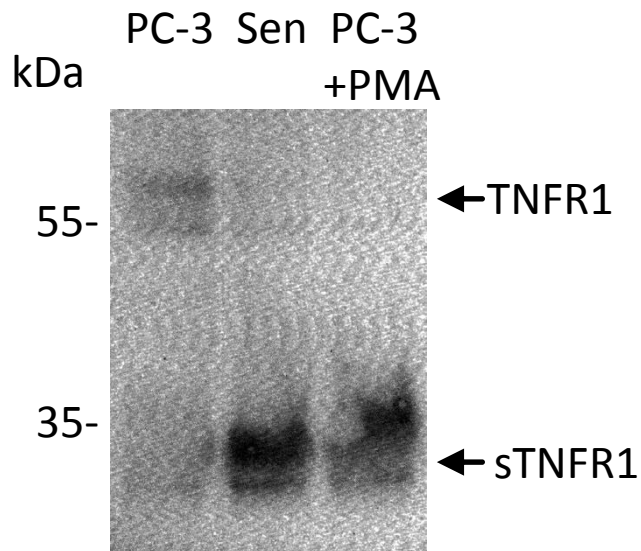


Abbildung 13: Analyse des TNFR1 im Überstand proliferierender und seneszenten (Sen) PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz in PC-3-Zellen erfolgte über die Gabe von 100nM Doxorubicin mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zum Vergleich wurden proliferierenden PC-3-Zellen mit 100nM PMA für 1h in Medium mit 0,5% FCS stimuliert. Die Proben wurden danach einer ConA-Fällung unterzogen und die Proteine anschließend mittels WesternBlot analysiert. Als primärer Antikörper wurde der sc-8436 verwendet.

4.4 Rolle von ADAM-Proteasen bei der Generierung löslicher Faktoren des SASPs

Da viele Komponenten des SASPs Substrate von Proteasen der ADAM-Familie sind, sollte anschließend untersucht werden, ob die löslichen SASP-Faktoren TNFR1 und Amphiregulin auch im Fall der zellulären Seneszenz durch ADAM-Proteasen prozessiert werden. Dazu wurde Seneszenz mittels Bestrahlung oder einer Behandlung mit Doxorubicin in PC-3- und IMR-90-Zellen induziert. Nach zehn Tagen wurde dem Medium entweder ein Breitband-Metalloprotease-Inhibitor (Marimastat) [139] oder Inhibitoren für ADAM10 (GI) beziehungsweise für ADAM10 und ADAM17 (GW) zugesetzt [125]. Nach 24h wurden die Überstände gesammelt und mittels eines ELISAs auf den Gehalt von Amphiregulin und sTNFR1 hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl Marimastat (Abb. 14, 15 und 16) als auch GW (Abb. 17, 18 und 19) in der Lage waren, die Freisetzung der membranständigen Proteine Amphiregulin und TNFR1 von seneszenten Zellen signifikant zu reduzieren. Der ADAM10-Inhibitor GI hingegen hatte keinen Einfluss auf die Sekretion der betrachteten Proteine (Abb. 17, 18 und 19).

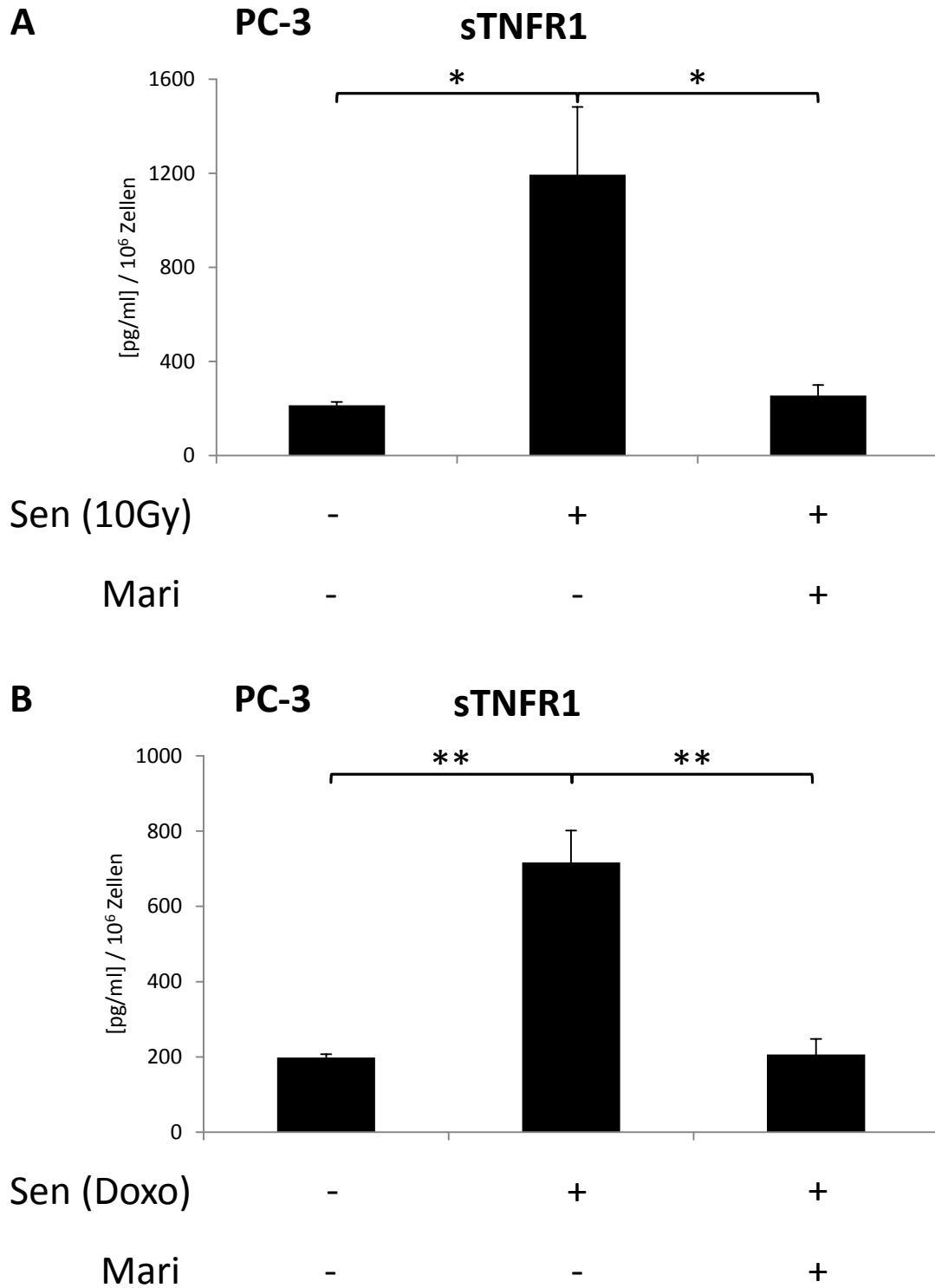


Abbildung 14: Die Freisetzung von sTNFR1 in PC-3-Zellen wird durch den Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 10µM Marimastat (Mari) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

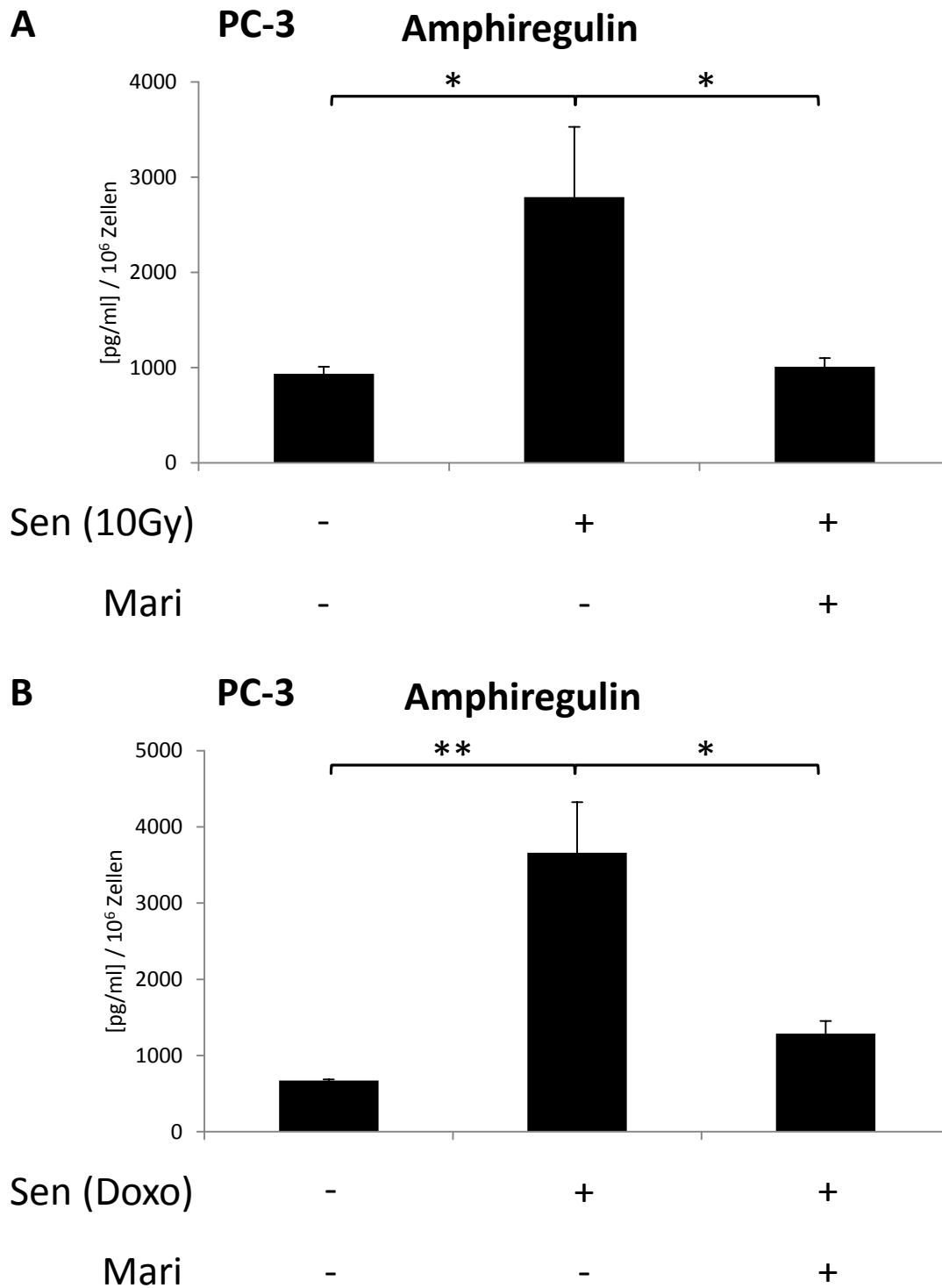


Abbildung 15: Die Freisetzung von Amphiregulin in PC-3-Zellen wird durch den Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 10µM Marimastat (Mari) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

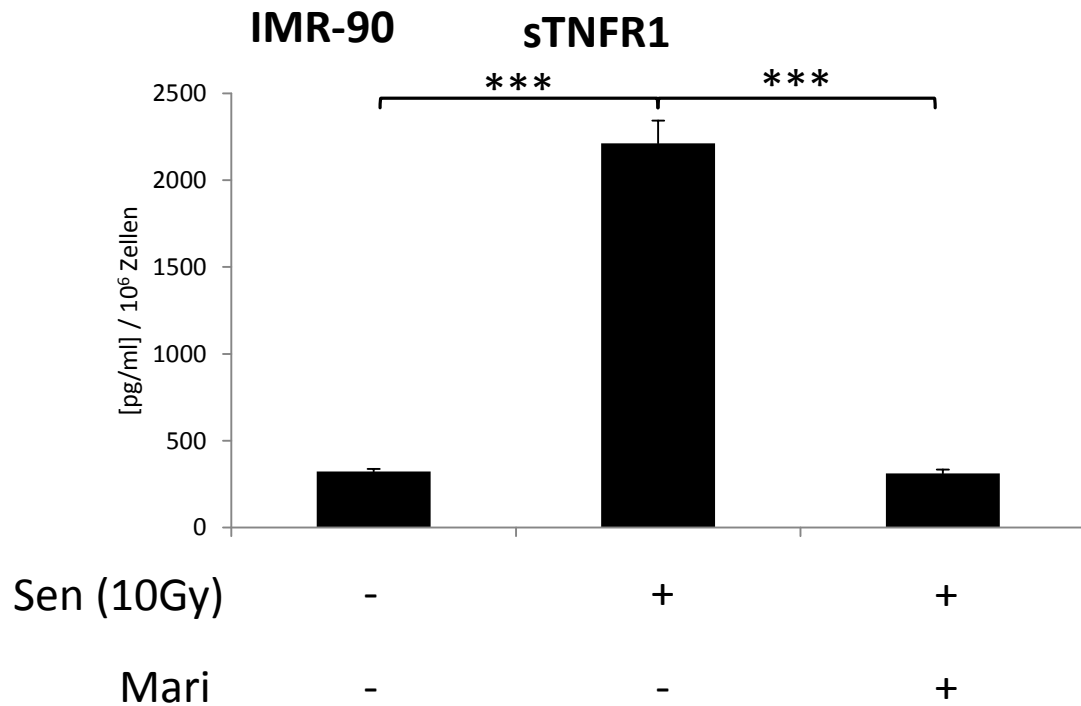


Abbildung 16: Die Freisetzung von sTNFR1 in IMR-90-Zellen wird durch den Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 10µM Marimastat (Mari) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. *** $p \leq 0,001$.

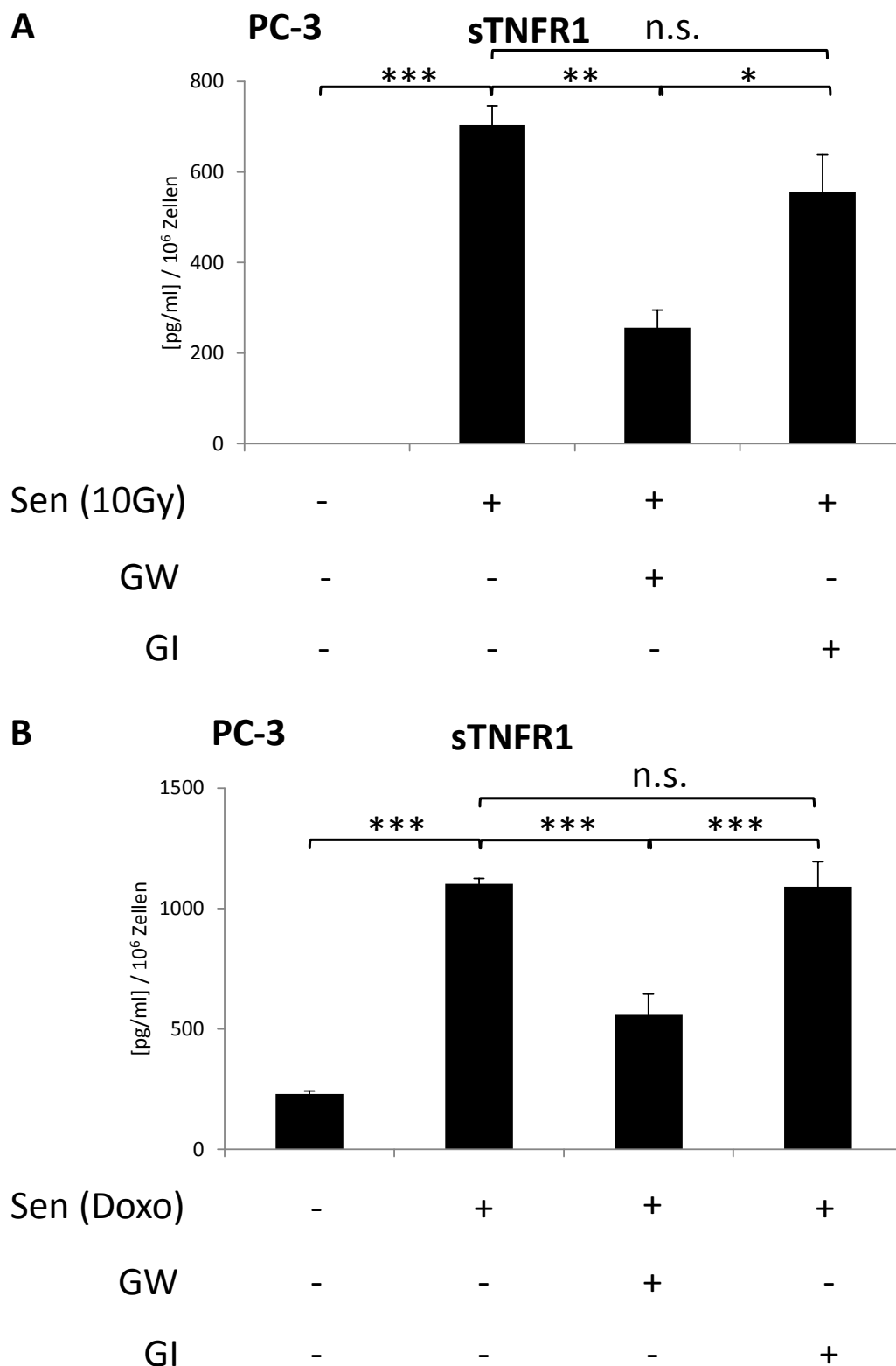


Abbildung 17: Die Freisetzung von sTNRF1 in PC-3-Zellen wird nicht durch den ADAM10-Inhibitor GI, jedoch durch den ADAM10/17-Inhibitor GW gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 3µM GI 254023X (GI) beziehungsweise 3µM GW 280264X (GW) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

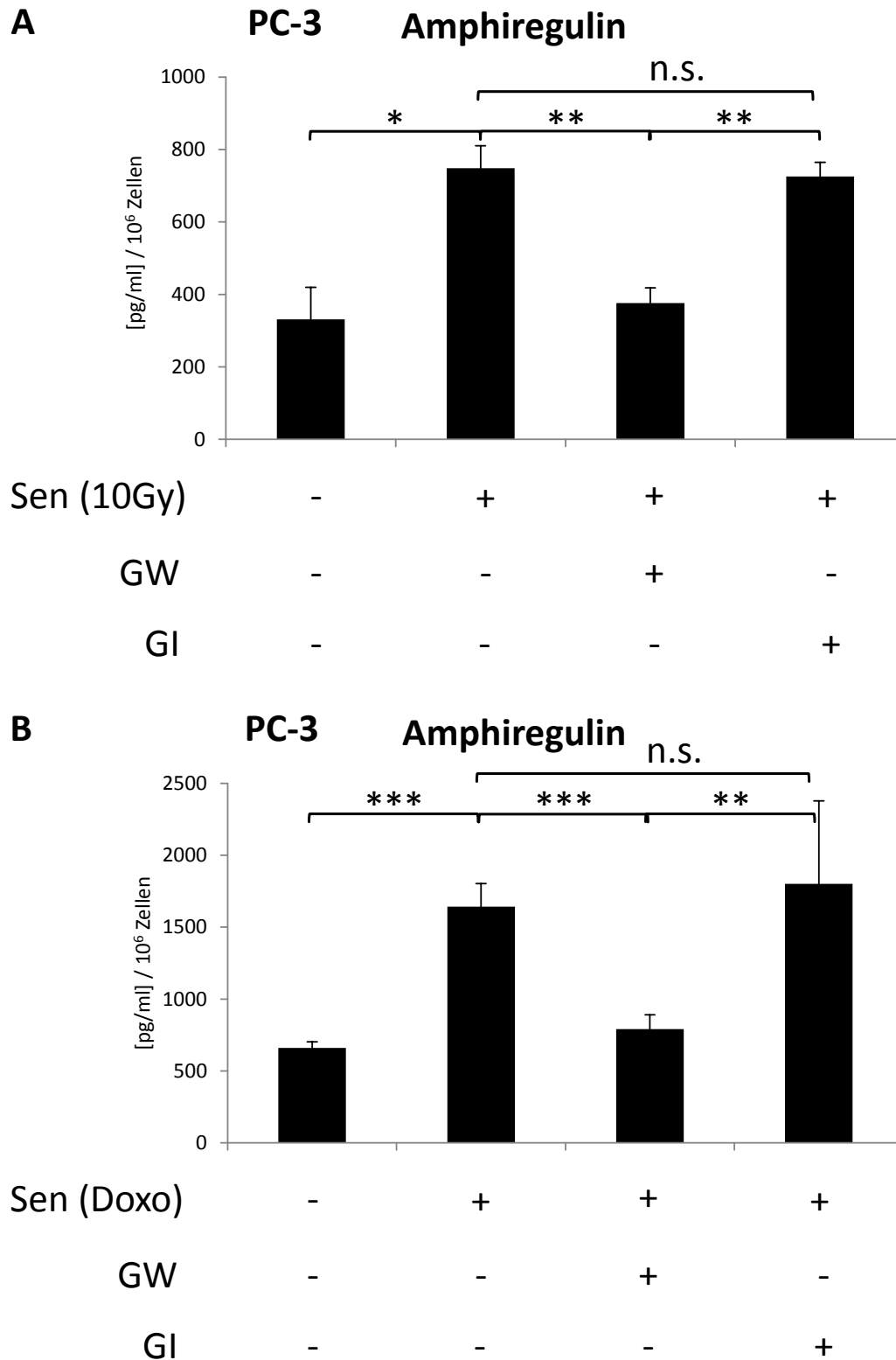


Abbildung 18: Die Freisetzung von Amphiregulin in PC-3-Zellen wird nicht durch den ADAM10-Inhibitor GI, jedoch durch den ADAM10/17-Inhibitor GW gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 3µM GI 254023X (GI) beziehungsweise 3µM GW 280264X (GW) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

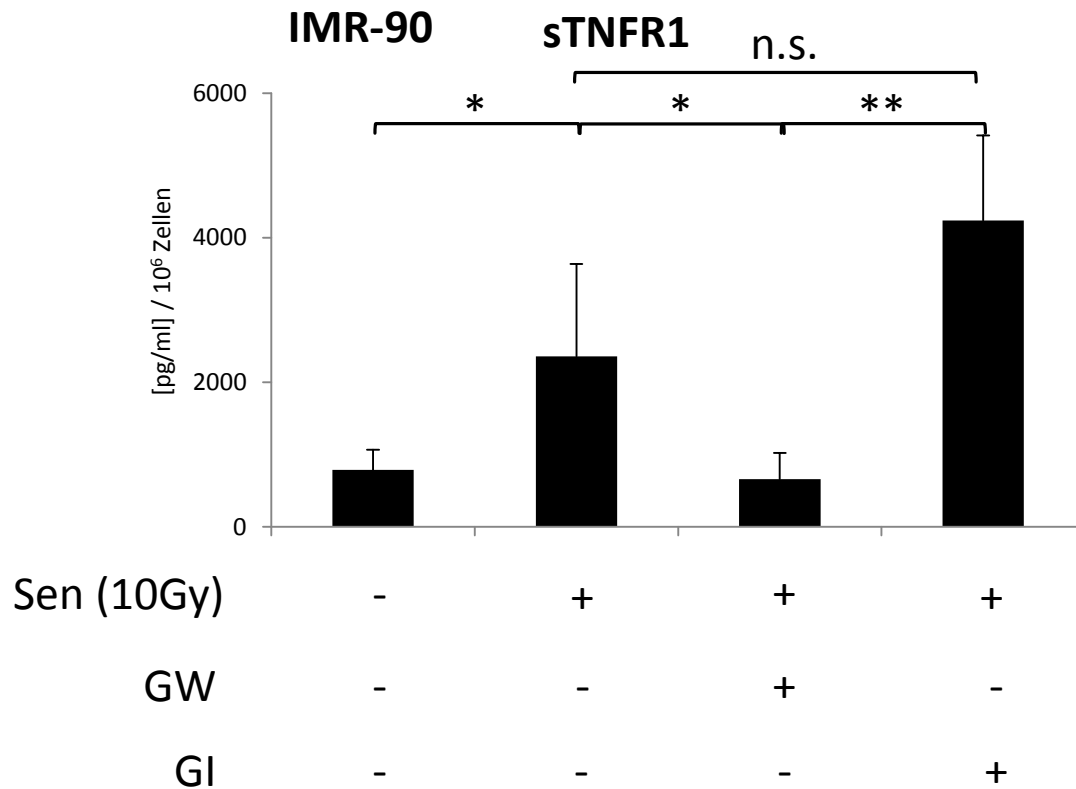


Abbildung 19: Die Freisetzung von sTNFR1 in IMR-90-Zellen wird nicht durch den ADAM10-Inhibitor GI, jedoch durch den ADAM10/17-Inhibitor GW gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 3µM GI 254023X (GI) beziehungsweise 3µM GW 280264X (GW) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4.5 Inhibition der Freisetzung von SASP-Komponenten durch den inhibitorischen ADAM17-Antikörper D1(A12)

Da die Inhibitoren GI und GW auch andere Metalloproteasen inhibieren können [125], wurde zusätzlich der inhibitorische ADAM17-Antikörper D1(A12) [126] verwendet. Dieser chimäre Antikörper verfügt über zwei verschiedene Antigenbindungsstellen und kann über eine Kreuzvernetzung der Disintegrin-Domäne von ADAM17 mit der Katalytischen Domäne von ADAM17 dessen katalytische Aktivität inhibieren. Um die Auswirkung dieses Antikörpers auf die Generierung von löslichen SASP-Komponenten zu untersuchen, wurden PC-3- (Abb. 20) und IMR-90-Zellen (Abb. 21) bestrahlt. Zehn Tage nach der Induktion von zellulärer Seneszenz wurde den Zellen der inhibitorische Antikörper hinzugegeben und nach weiteren 24h die Überstände gesammelt. Diese Überstände wurden daraufhin mittels eines ELISAs untersucht und die Mengen an löslichem TNFR1 und Amphiregulin ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass der inhibitorische Antikörper D1(A12) in der Lage ist, die Freisetzung von löslichen SASP-Komponenten von der Zellmembran seneszenten Zellen zu inhibieren. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass ADAM17 an der Generierung von Amphiregulin und sTNFR1 während der zellulären Seneszenz beteiligt ist.

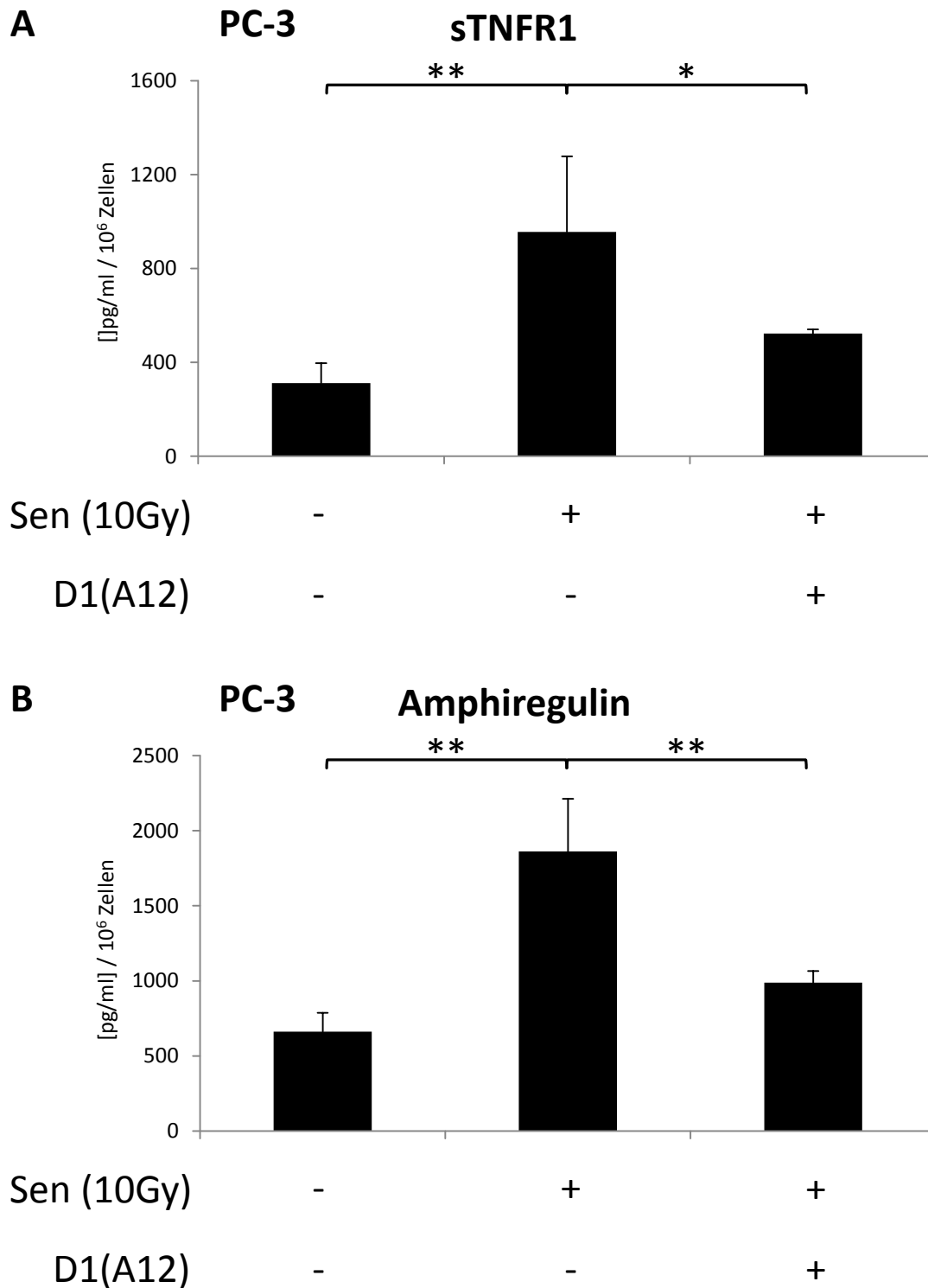


Abbildung 20: Die Freisetzung von (A) sTNFR1 und (B) Amphiregulin in PC-3-Zellen wird durch den inhibitorischen Antikörper D1(H12) gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 100nM D1(A12) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

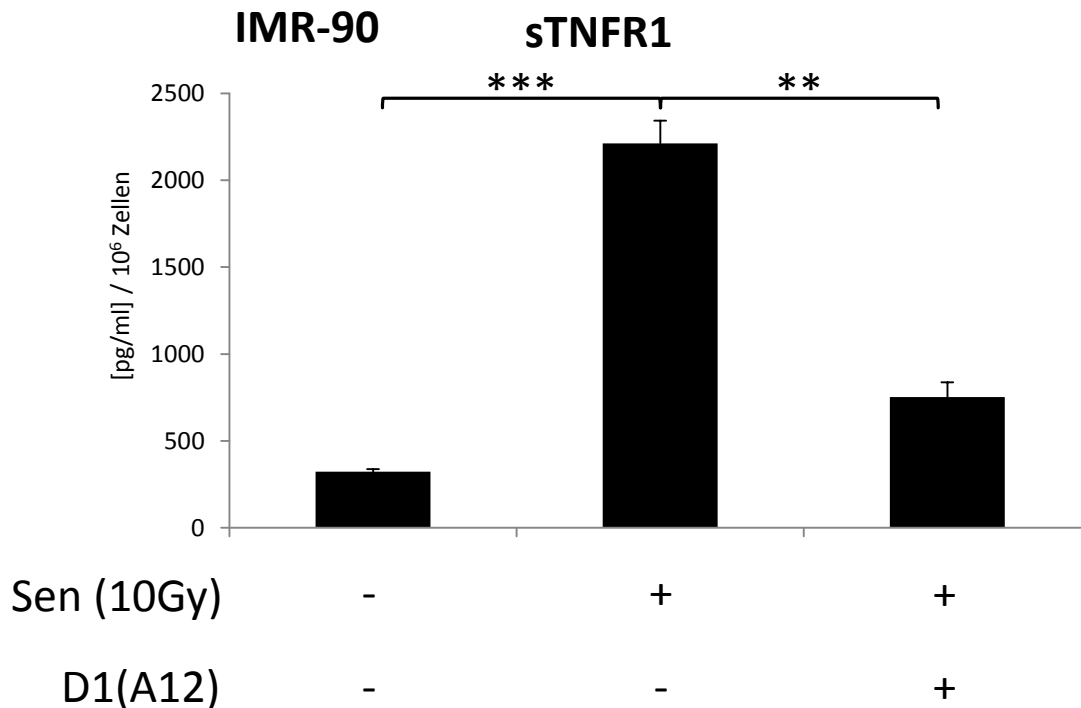


Abbildung 21: Die Freisetzung von sTNFR1 in IMR-90-Zellen wird durch den inhibitorischen Antikörper D1(H12) gehemmt. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 100nM D1(A12) inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.6 ADAM17 knockdown mit Hilfe von shRNA

Da die in 4.4. verwendeten Inhibitoren neben den ADAM-Proteasen auch einige Matrixmetalloproteasen inhibieren [125], wurde die Expression von ADAM17 in PC-3-Zellen mit Hilfe einer shRNA unterdrückt. Dazu wurde eine PC-3-Zelllinie generiert, die stabil eine gegen die mRNA von ADAM17 gerichtete shRNA exprimiert. Zu diesem Zweck wurden PC-3-Zellen ausgesät und anschließend mit einem Vektor, der für eine gegen die mRNA von ADAM17 gerichtete shRNA kodiert, transfiziert. Dem Medium wurde 48h nach der Transfektion 2,5µg/ml Puromycin zugesetzt und der Selektionsdruck für mindestens acht Wochen aufrechterhalten. Nur Zellklone, welche den Vektor und die damit verbundene Puromycinresistenz stabil in ihr Genom integriert haben, können unter solchen Bedingungen überleben und proliferieren. Nach erfolgter Antibiotika-Selektion wurden die Zellen hinsichtlich ihrer ADAM17-Expression mit Hilfe eines WesternBlots untersucht. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, war die Expression sowohl der pro-Form, als der maturen Form von ADAM17 bei dem Zellklon 32/1 besonders stark reduziert. Aus diesem Grund

wurde der Zellklon 32/1 für weitere Experimente verwendet und die restlichen Klone verworfen. Um sogenannte „*off target*“-Effekte auszuschließen, wurde zusätzlich eine Zelllinie erstellt, die stabil mit einem Vektor transfiziert wurde, der für eine „*non-silencing*“ shRNA kodiert. Da der dafür verwendete Vektor zusätzlich für GFP kodiert, wurde der Klon mit der stärksten GFP-Expression, scr6, gewählt und bei weiteren Experimenten als Kontrolle verwendet. Im WesternBlot zeigte sich, dass der Zellklon scr6 eine mit untransfizierten PC-3-Zellen vergleichbare Expression von ADAM17 aufwies (Abb. 23). Bei der Bande zwischen der pro-Form und der maturen Form von ADAM17 handelt es sich vermutlich um eine bisher nicht näher beschriebene Variante von ADAM17 mit einem anderen Glykosylierungsmuster.

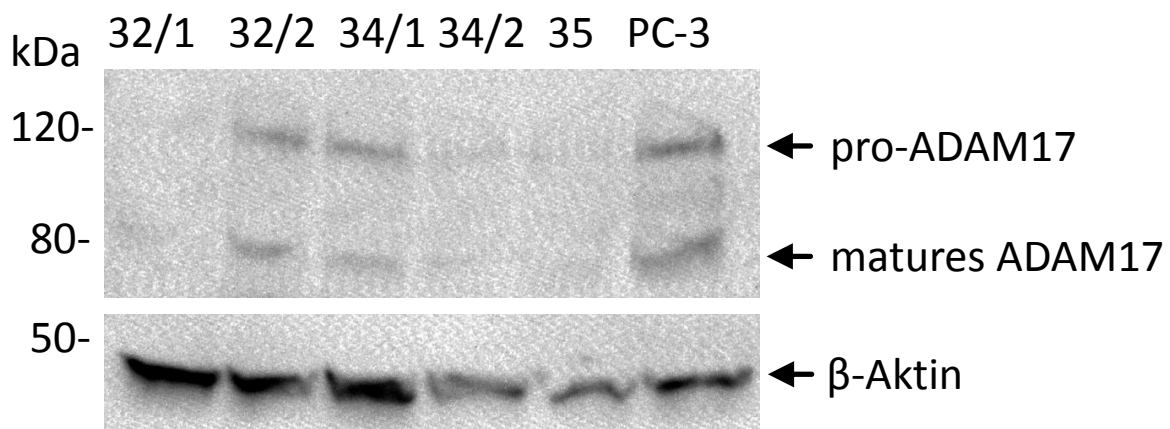


Abbildung 22: Analyse der ADAM17-Expression verschiedener, mit einer gegen die mRNA von ADAM17 gerichteten shRNA transfizierter, Klone. Es wurden PC-3-Zellen generiert, welche stabil verschiedene shRNAs gegen die mRNA von ADAM17 exprimieren. Nach erfolgter Antibiotika-Selektion mit 2,5µg/ml Puromycin wurden von den Zell-Klonen Lysate erstellt und die Expression von ADAM17 mittels WesternBlot analysiert. Hierzu wurde als primärer Antikörper der A300D verwendet. Als Kontrolle dienten untransfizierte PC-3-Zellen. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen β-Aktin.

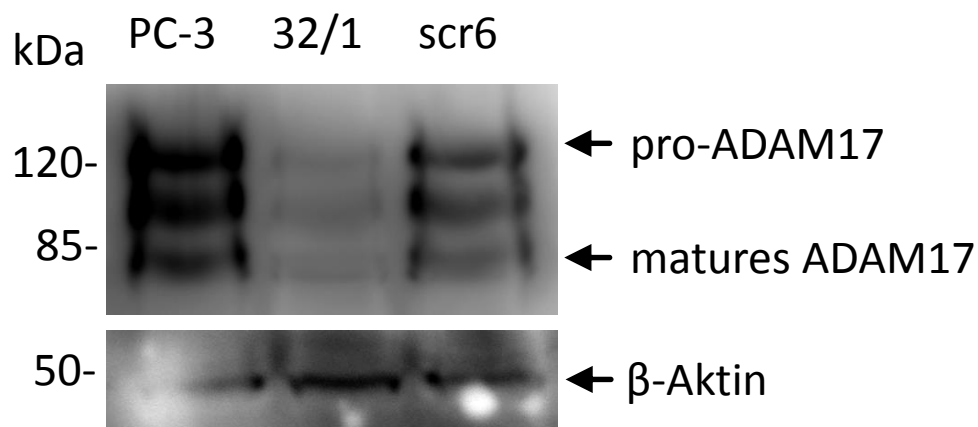


Abbildung 23: Analyse der ADAM17-Expression der Zellklone 32/1 und scr6. Es wurden PC-3-Zellen generiert, welche stabil eine shRNA gegen ADAM17 (32/1) beziehungsweise eine Kontroll-shRNA (scr6) exprimieren. Nach erfolgter Antibiotika-Selektion mit 2,5µg/ml Puromycin wurden von den Zell-Klonen Lysate erstellt und die Expression von ADAM17 mittels WesternBlot analysiert. Hierzu wurde als primärer Antikörper der A300D verwendet. Als Kontrolle dienten untransfizierte PC-3-Zellen. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen β-Aktin.

4.7. Auswirkung des ADAM17 knockdown auf den SASP

Die stabil eine ADAM17-shRNA beziehungsweise eine Kontroll-shRNA exprimierenden PC-3-Zellen wurden anschließend auf ihre Fähigkeit hin untersucht, in zelluläre Seneszenz zu gehen. Dazu wurden die Zellen einer radioaktiven Strahlung mit einer Dosis von 10Gy ausgesetzt. Nach einer zehntägigen Inkubationsphase wurden die Überstände gesammelt und die darin enthaltene Menge an IL-6 mit Hilfe eines ELISAs ermittelt. Es zeigt sich, dass die stabile Expression einer shRNA, welche gegen die mRNA von ADAM17 gerichtet ist, keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen, einen seneszenten Phänotypen zu entwickeln, hatte (Abb. 24). Des Weiteren wurden die gesammelten Überstände auch auf den Gehalt von löslichem TNFR1 (Abb. 25) und Amphiregulin (Abb. 26) hin untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Freisetzung der untersuchten Faktoren bei Zellklon 32/1 stark inhibiert war, wohingegen im Überstand des Zellklones scr6 eine mit den untransfizierten PC-3-Zellen vergleichbare Konzentrationen gemessen wurden.

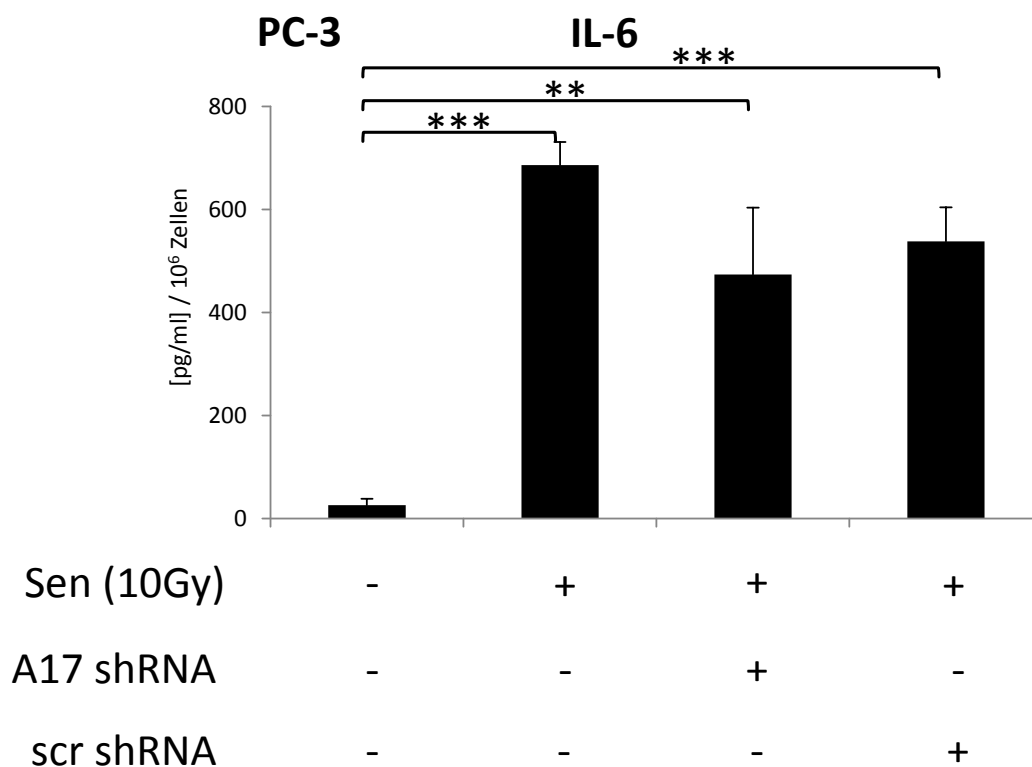


Abbildung 24: Auswirkung der stabilen Transfektion mit shRNAs auf die Sekretion von IL-6 in seneszenten PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz in PC-3-Zellen, welche stabil eine shRNA gegen die mRNA von ADAM17 (A17 shRNA) oder eine Kontroll-shRNA (scr shRNA) exprimieren, erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

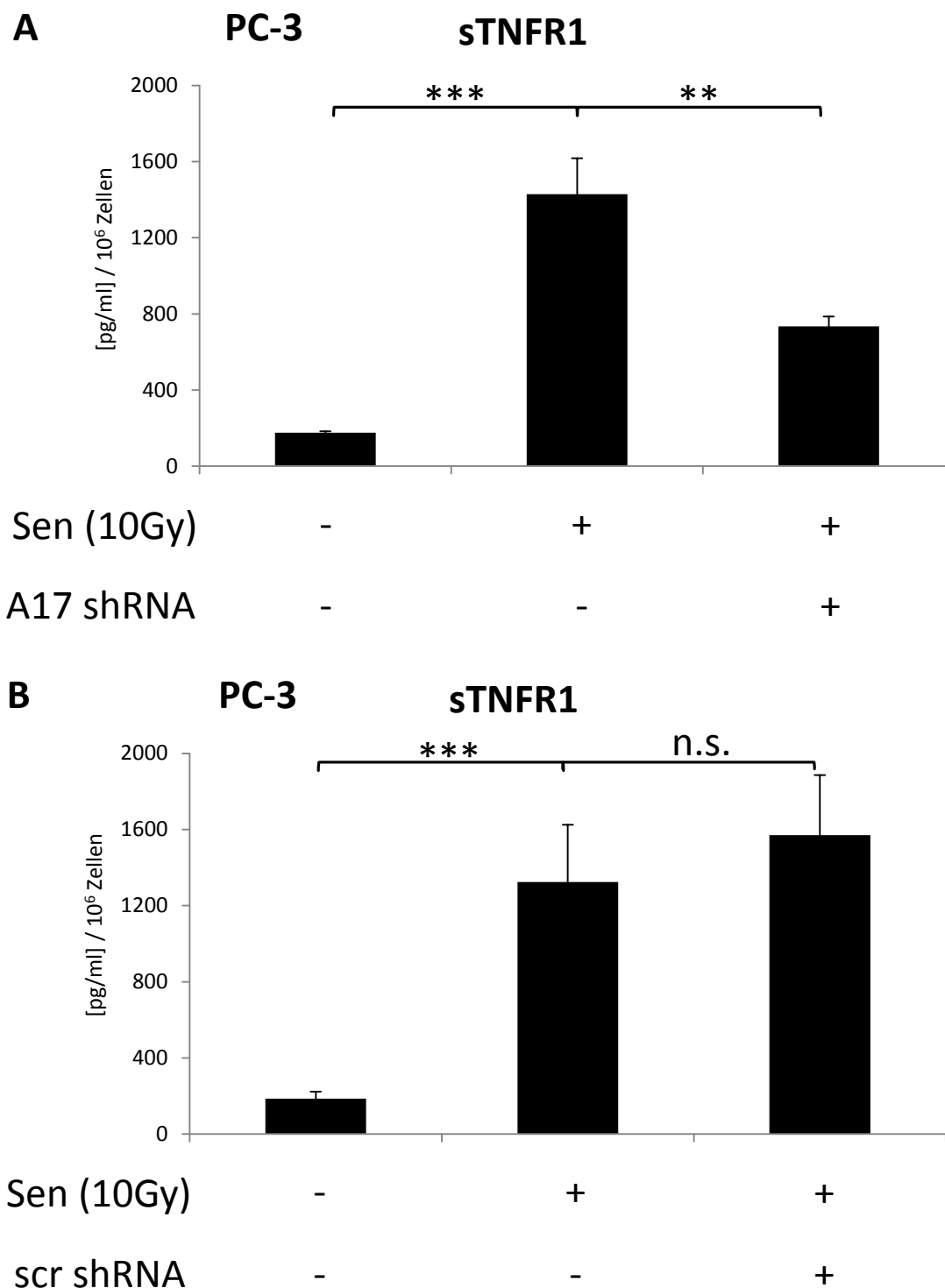


Abbildung 25: Auswirkung der stabilen Transfektion mit shRNAs auf die Freisetzung von sTNFR1 in seneszenten PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz in PC-3-Zellen, welche stabil (A) eine shRNA gegen die mRNA von ADAM17 (A17 shRNA) oder (B) eine Kontroll-shRNA (scr shRNA) exprimieren, erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

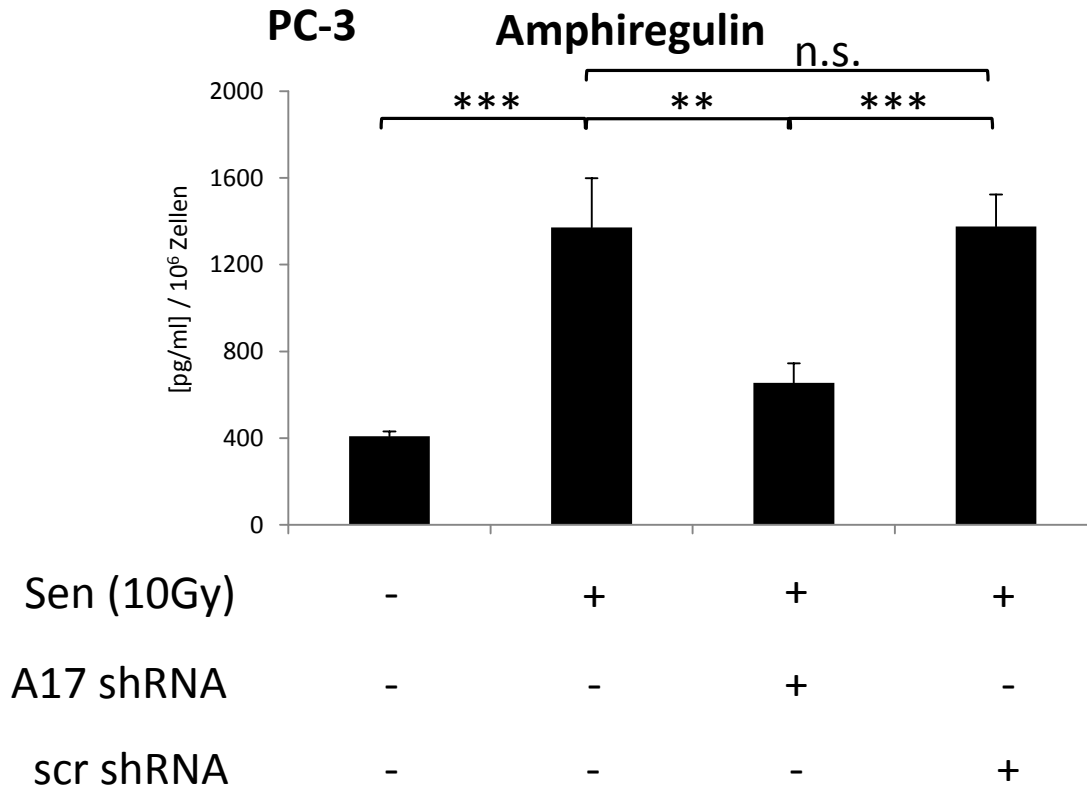


Abbildung 26: Auswirkung der stabilen Transfektion mit shRNAs auf die Freisetzung von Amphiregulin in seneszenten PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz in PC-3-Zellen, welche stabil eine shRNA gegen die mRNA von ADAM17 (A17 shRNA) oder eine Kontroll-shRNA (scr shRNA) exprimieren, erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. n.s.=nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.8 Expression von ADAM17

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, warum im Rahmen zellulärer Seneszenz vermehrt ADAM17-Substrate proteolytisch von der Zellmembran abgespalten werden. Da bereits bekannt war, dass bei vielen Krebserkrankungen ADAM17 überexprimiert wird [140, 141] und darüber spekuliert wird, ob diese erhöhte Expression mit einer gesteigerten Proteaseaktivität korreliert, sollte die Expressionsstärke von ADAM17 in seneszenten und proliferierenden Zellen analysiert werden. Dazu wurden zunächst Zelllysate von seneszenten und normal proliferierenden PC-3-Zellen erstellt und mit Hilfe eines WesternBlots in Bezug auf die Expression von ADAM17 miteinander verglichen. In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass ADAM17 in seneszenten PC-3-Zellen nicht stärker exprimiert wird, als in proliferierenden Kontrollzellen. Auch die Verteilung zwischen der pro-Form und der murenen Form von ADAM17 ist in beiden Proben gleich.

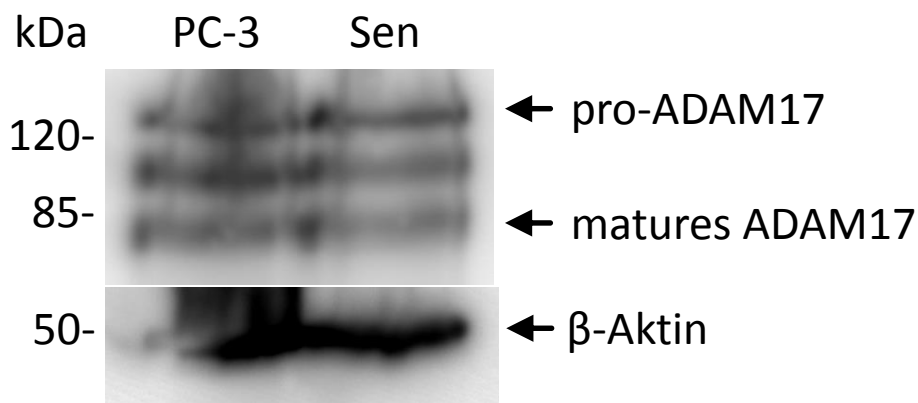


Abbildung 27: Vergleich der Expression von ADAM17 in proliferierenden und seneszenten PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Von den Zellen wurden anschließend Lysate erstellt und die Lysate mittels WesternBlot analysiert. Als primärer Antikörper wurde der A300D verwendet. Als Kontrolle dienten proliferierende PC-3-Zellen. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen β -Aktin.

4.9 Oberflächenexpression von ADAM17

Da ADAM17 in seneszenten Zellen nicht in höherem Maße exprimiert wird und auch das Verhältnis von pro-Form zu maturer Form vergleichbar mit dem von proliferierenden Zellen ist, sollte als nächstes untersucht werden, ob ADAM17 verstärkt an die Zelloberfläche transportiert wird und sich somit die erhöhte Menge an löslichen ADAM17-Substraten im Überstand von seneszenten Zellen erklären lässt. Dazu wurde eine Oberflächenbiotinylierung sowohl bei seneszenten als auch bei proliferierenden PC-3-Zellen durchgeführt und die Proben anschließend im WesternBlot untersucht. Zur Kontrolle der Membranintegrität während des Biotinylierungsprozesses wurde die PVDF-Membran zusätzlich auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hin untersucht. Da GAPDH ein intrazelluläres Protein ist, sollte es nach einer Oberflächenbiotinylierung nicht zu detektieren sein. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels mit den Proben diente der membranständige Transferrin-Rezeptor. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, wiesen seneszente PC-3-Zellen keinen erhöhten Level an ADAM17 auf der Zelloberfläche auf. Da bei diesem Experiment lediglich Proteine der Zelloberfläche analysiert wurden, ist im WesternBlot nur die prozessierte, mature Form von ADAM17 detektierbar. Die GAPDH-Kontrolle zeigt, dass die Membran während der Oberflächenbiotinylierung intakt gewesen ist und keine Proteine, die sich im sekretorischen Weg befanden, die Proben verunreinigt haben.

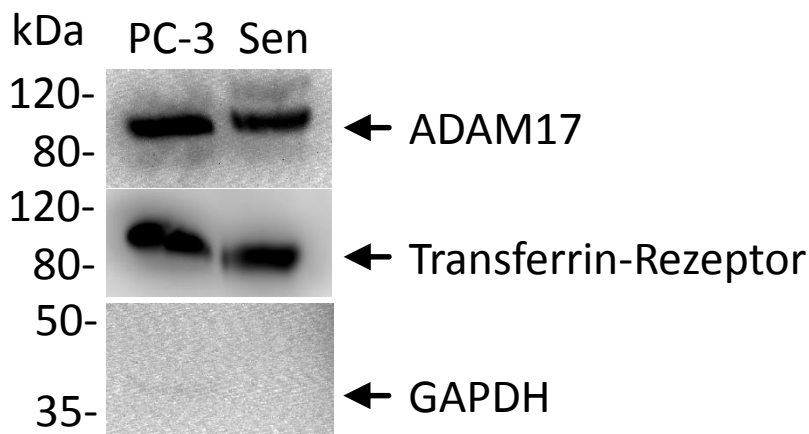


Abbildung 28: Oberflächenbiotinylierung von proliferierenden und seneszenten PC-3-Zellen zum Vergleich der Oberflächenexpression von ADAM17. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Anschließend wurde mit den Zellen eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt und die Proben mittels WesternBlot analysiert. Als primärer Antikörper wurde der A300D verwendet. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor. Zur Überprüfung der Membranintegrität während des Biotinylierungsprozesses wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet.

4.10 Erhöhte p38-Aktivität in seneszenten Zellen

Es ist bereits bekannt, dass DNA-Schädigung eine Aktivierung der MAPK p38 hervorrufen kann [142]. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass aktives p38 in der Lage ist, ADAM17 am Threoninrest 735 zu phosphorylieren [72]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob p38 in seneszenten Zellen stärker phosphoryliert ist, als in normal proliferierenden Zellen. Dazu wurde ein p38-Aktivitäts-Assay durchgeführt, bei dem zunächst phosphoryliertes p38 (pp38) aus Zelllysate gefällt wurde. Anschließend wurden die Beads mit dem gebundenen pp38 zusammen mit ATP (Adenosintriphosphat) und ATF2 (activating transcription factor 2), einem bekannten Substrat von p38 [143], inkubiert. Die Proben wurden anschließend im WesternBlot mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes ATF2 analysiert. Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, wurde mehr ATF2 durch aus seneszenten Zellen präzipitiertes pp38 phosphoryliert, als durch pp38 aus normal proliferierenden Zellen, was darauf schließen lässt, dass in diesem experimentellen Aufbau zelluläre Seneszenz mit einer erhöhten p38-Aktivität einhergeht.

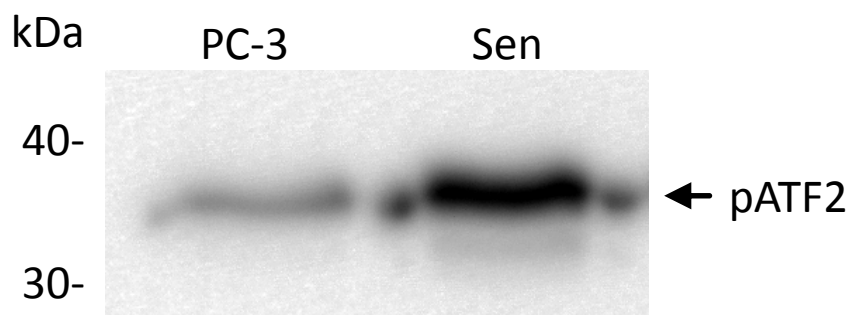


Abbildung 29: Phosphorylierung von ATF2 durch pp38 aus proliferierenden und seneszenten PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Daraufhin wurde ein p38 Aktivitätsassay durchgeführt, bei dem ATF2, ein Substrat von p38, durch zuvor mittels eines Antikörpers gefälltes pp38, phosphoryliert wird. Die Proben wurden anschließend mittels WesternBlot analysiert. Als primärer Antikörper wurde ein Antikörper gegen pATF2 verwendet. Dieser Antikörper ist Bestandteil des p38 MAP Kinase Assay Kit.

4.11 Auswirkung der Inhibition von p38 MAPK auf die Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin

Nachdem festgestellt wurde, dass in seneszenten Zellen die MAPK p38 stärker phosphoryliert ist, als in normal proliferierenden Zellen, sollte untersucht werden, ob eine Behandlung von seneszenten Zellen mit einem p38-Inhibitor, sb203580, zu einer Reduktion von sTNFR1 und Amphiregulin im Überstand führt. Dazu wurde dem Medium seneszenten PC-3- (Abb. 30 und 31) und IMR-90-Zellen (Abb. 32) für 24h sb203580 hinzugefügt und der Überstand anschließend mittel ELISA auf die Menge an sTNFR1 und Amphiregulin hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass der p38-Inhibitor sb203580 in der Lage war, die limitierte Proteolyse von TNFR1 und Amphiregulin durch ADAM17 im Vergleich zu unbehandelten, seneszenten Zellen signifikant zu reduzieren. Da sb203580 in der hier eingesetzten Konzentration von 10 μ M auch andere Kinasen inhibieren kann [144], wurde zusätzlich die dosisabhängige Wirkung dieses Inhibitors auf den SASP analysiert. Wie sich in Abbildung 33 ablesen lässt, führt bereits die Gabe von 1 μ M sb203580 zu einer deutlichen Reduktion der Konzentration von sTNFR1 und Amphiregulin im Überstand behandelter Zellen. Ab einer Konzentration von 2,5 μ M ist kein Unterschied mehr zu höheren Konzentrationen dieses Inhibitors feststellbar.

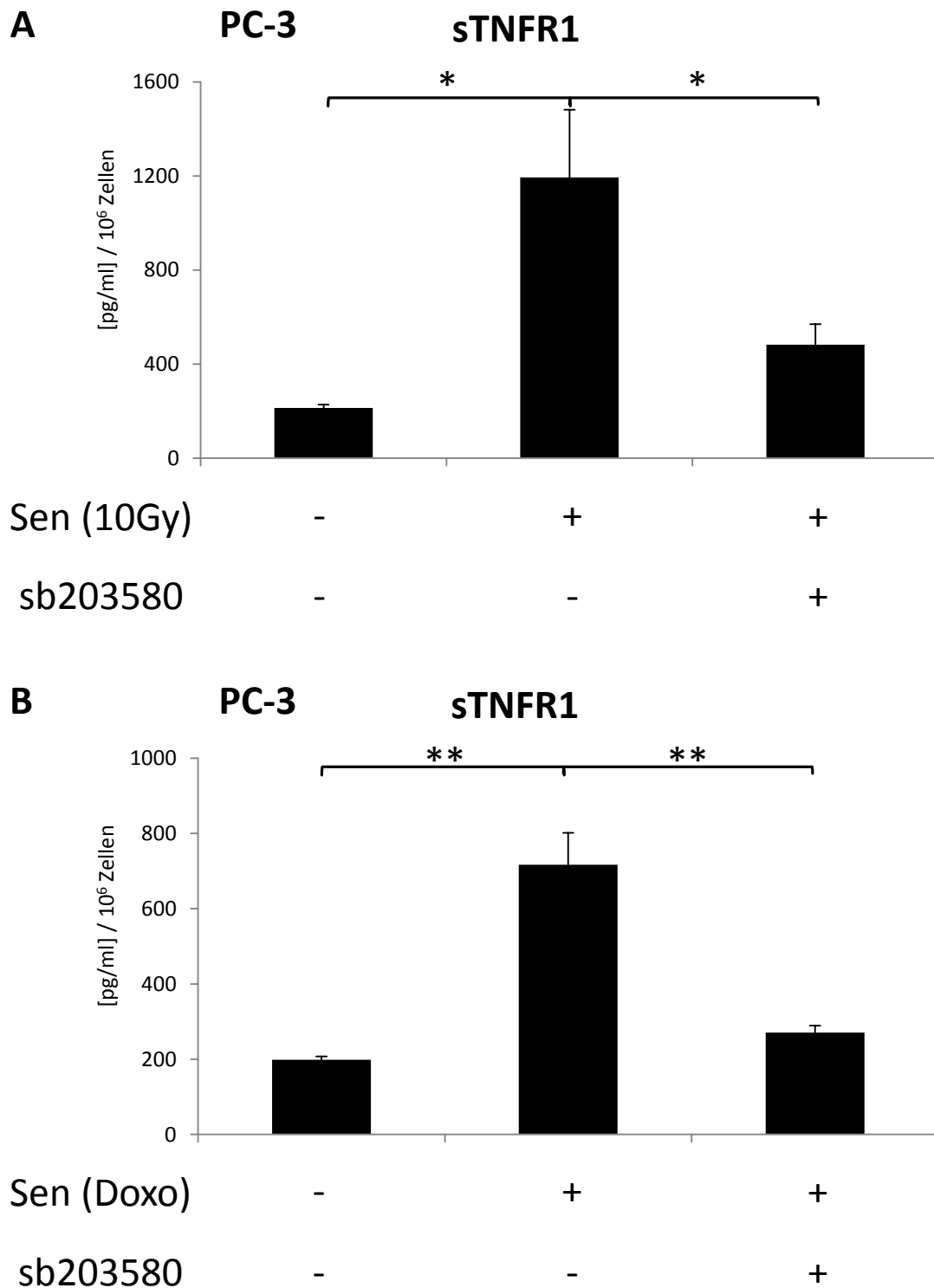


Abbildung 30: Auswirkungen des p38 Inhibitors sb203580 auf die Freisetzung von sTNFR1 in PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 10µM sb203580 inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

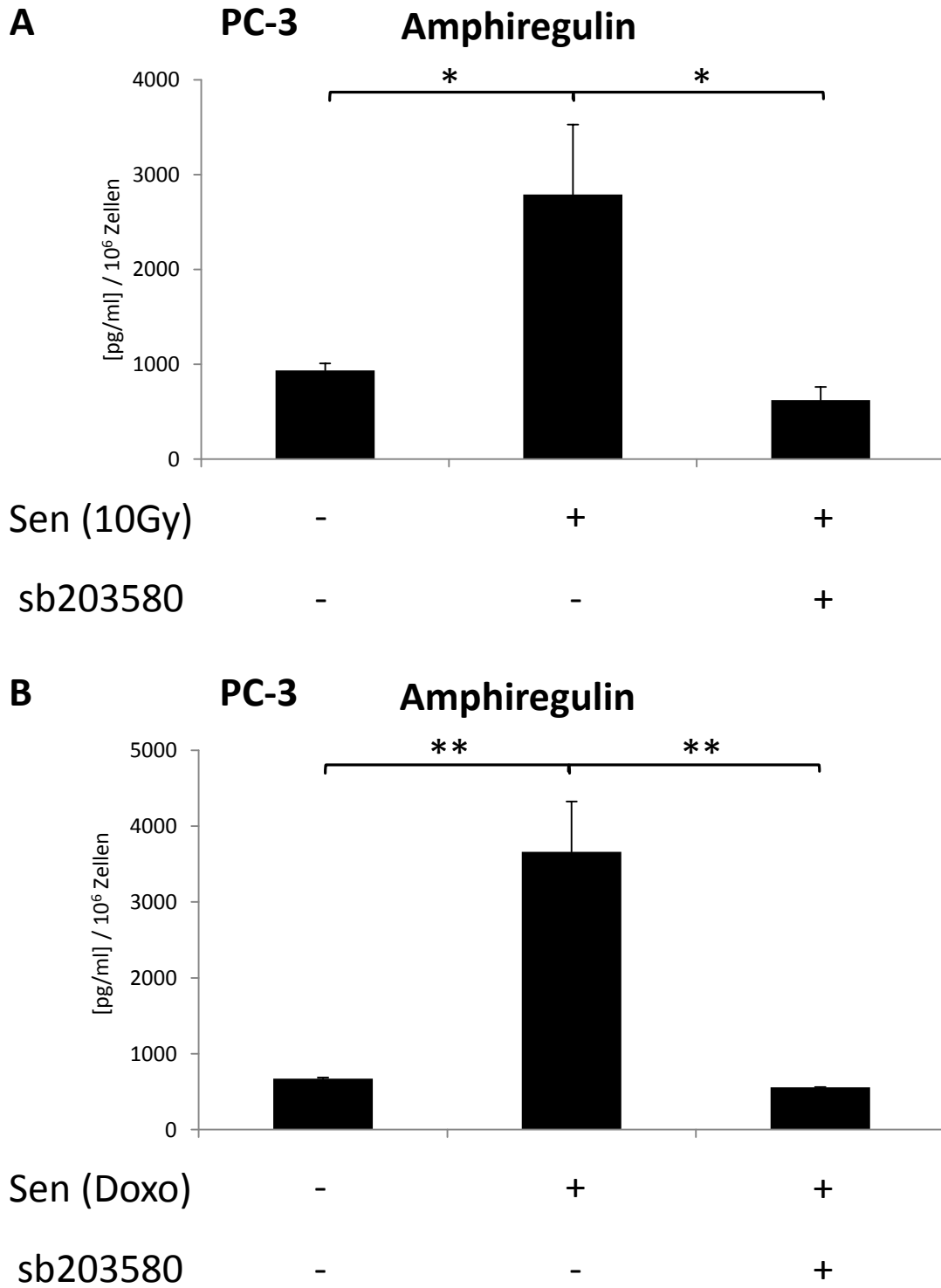


Abbildung 31: Auswirkungen des p38 Inhibitors sb203580 auf die Freisetzung von Amphiregulin in PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über (A) ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) oder (B) die Gabe von 100nM Doxorubicin (Sen (Doxo)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 10µM sb203580 inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

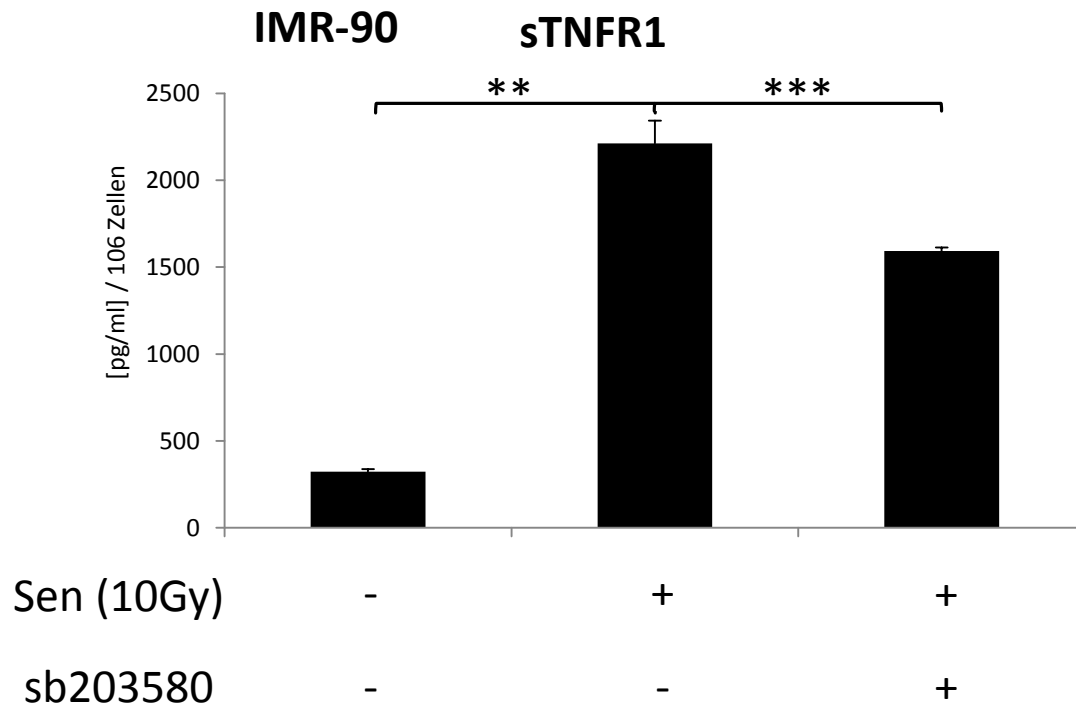


Abbildung 32: Auswirkungen des p38 Inhibitors sb203580 auf die Freisetzung von sTNFR1 in IMR-90-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne 10 μ M sb203580 inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

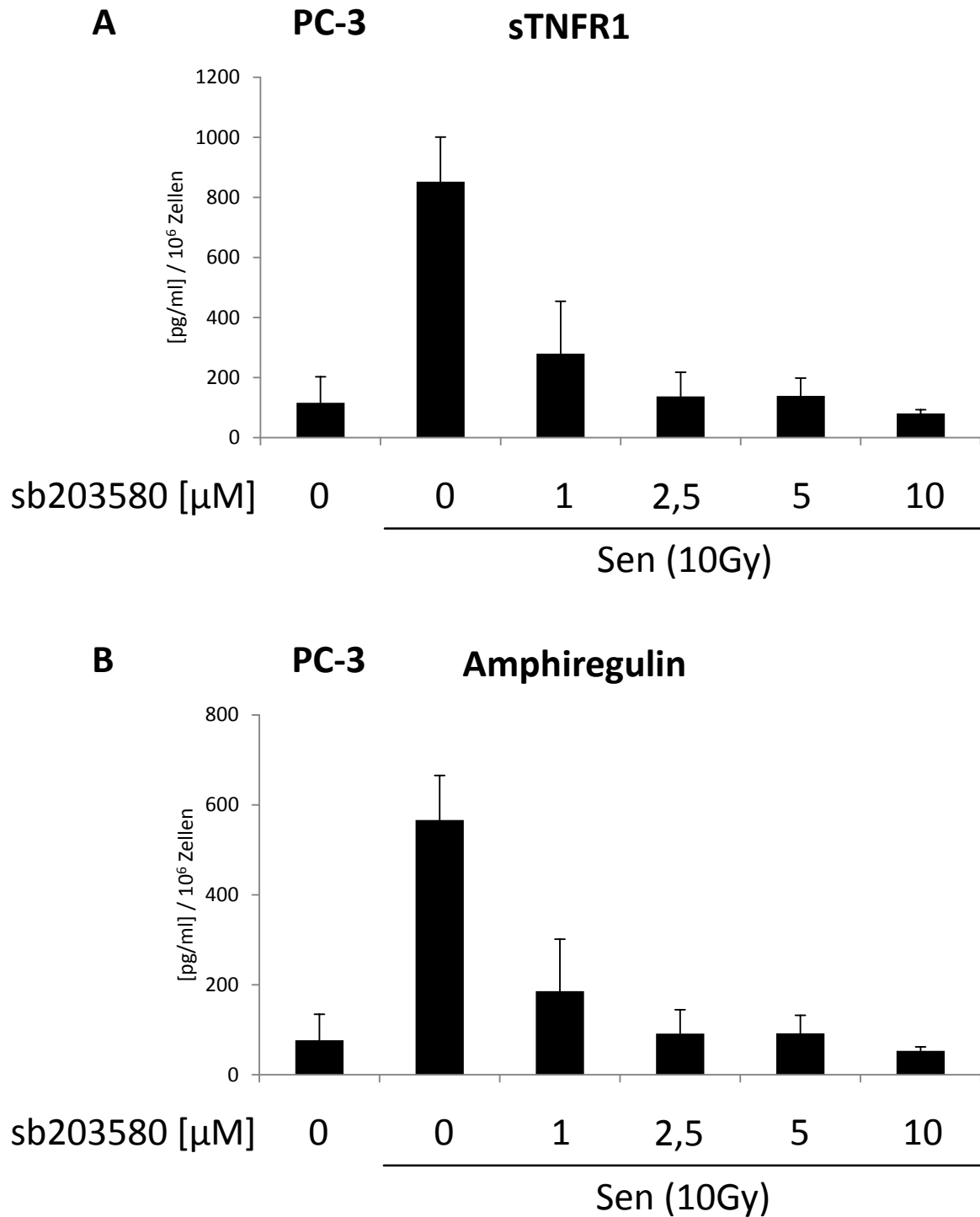


Abbildung 33: Dosisabhängige Wirkung des p38 Inhibitors sb203580 auf die Freisetzung von (A) sTNFR1 und (B) Amphiregulin in PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen (10Gy)) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5% FCS mit oder ohne sb203580 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die Überstände nach 24h geerntet. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt und die ELISA-Daten auf die Zellzahl normiert.

4.12 ADAM17-Phosphorylierung in seneszenten Zellen

Um die Theorie einer erhöhten ADAM17-Phosphorylierung durch p38 zu überprüfen, wurde der Phosphorylierungsstatus von ADAM17 in seneszenten mit normal proliferierenden PC-3-Zellen verglichen. Dazu wurde eine Immunopräzipitation mit einem ADAM17-spezifischen Antikörper, A300E, durchgeführt und die Proben anschließend im WesternBlot untersucht. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch phosphorylierte Threoninreste direkt vor einem Prolinrest erkennt und bindet. Dieses Motiv findet sich in der Aminosäuresequenz von ADAM17 nur an der Position 735. Um eine gleichmäßige Beladung des Gels zu gewährleisten, wurde die PVDF-Membran anschließend mit einem ADAM17-spezifischen Antikörper, A300D, inkubiert und somit die Gesamtmenge an ADAM17 visualisiert. Zusätzlich wurde auch die Phosphorylierung von ADAM17 aus seneszenten Zellen, die für 24h mit dem p38-Inhibitor sb203580 behandelt wurden, untersucht.

Es zeigte sich, dass ADAM17 in seneszenten Zellen stärker am Threoninrest 735 phosphoryliert ist, als in normal proliferierenden Zellen. Diese verstärkte Phosphorylierung von ADAM17 konnte mit dem p38-Inhibitor sb203580 inhibiert werden (Abb. 34). Bemerkenswert ist ebenfalls, dass nur die prozessierte, mature Form von ADAM17, welche auf der Zelloberfläche vorhanden ist, phosphoryliert ist, die pro-Form von ADAM17 hingegen nicht. Diese Ergebnisse untermauern die Theorie, dass bei zellulärer Seneszenz die MAPK p38 ADAM17 phosphoryliert und dass diese Phosphorylierung zu einer erhöhten Menge von sTNFR1 und Amphiregulin im Rahmen des SASPs führt.

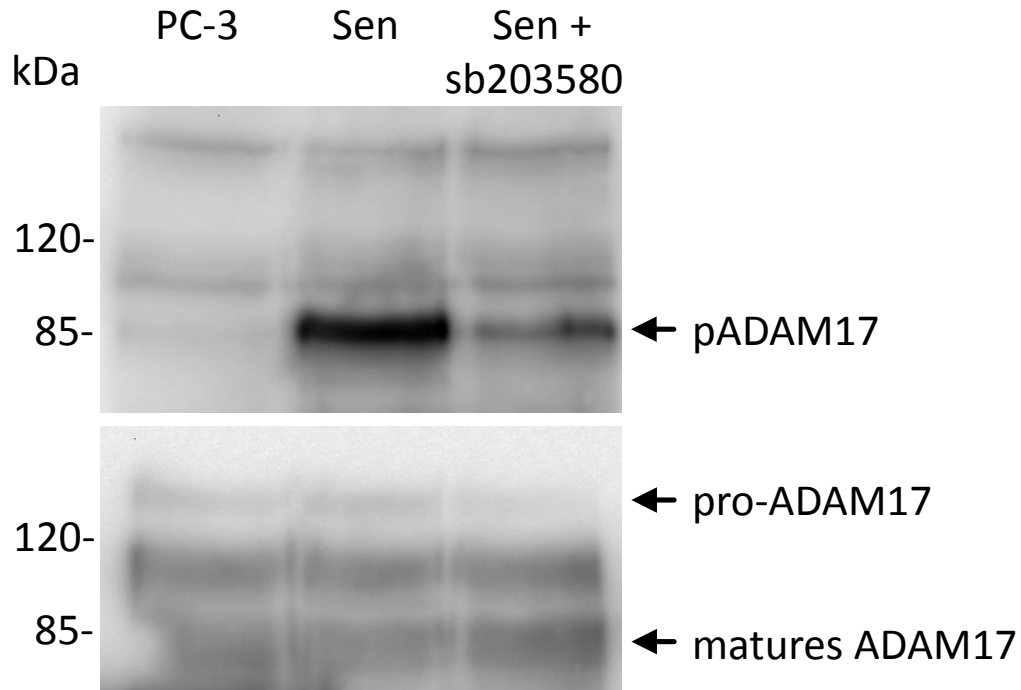


Abbildung 34: Phosphorylierung von ADAM17 in proliferierenden und seneszenten PC-3-Zellen. Die Induktion der zellulären Seneszenz erfolgte über ionisierende, radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy (Sen) mit einer anschließenden Ruhephase von mindestens 10 Tagen. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit oder ohne 10 μ M sb203580 inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die Proben mittels WesternBlot analysiert. Als primärer Antikörper wurde der pThrPro-Antikörper verwendet. Als Kontrolle dienten proliferierende PC-3-Zellen. Als Ladekontrolle diente der A300D-Antikörper.

5. Diskussion

Der Schwerpunkt im Feld der ADAM17-Forschung liegt fast ausschließlich auf der experimentellen Betrachtung der ADAM17-Aktivität beziehungsweise dessen Lokalisation innerhalb oder auf der Zelle. Dafür wird versucht, verschiedene physiologische oder pathologische Situationen in der Zellkultur nachzustellen und die Aktivität von ADAM17 mit Hilfe der Konzentration eines Substrates im Überstand nach einer erfolgten Stimulation zu ermitteln und mit der Konzentration im Überstand von unstimulierten oder mit einem Inhibitor behandelten Zellen zu vergleichen. Dadurch reduzieren sich die Kernaussagen der vorhandenen Publikationen auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit der Proteaseaktivität von ADAM17 bei einem gegebenen Stimulus in einer bestimmten Zielzelllinie. Es wird zwar häufig die herrschende Unwissenheit über die Substratselektion diskutiert oder bemängelt, aber es finden sich kaum Publikationen zu diesem Thema. Das mag vor allem daran liegen, dass negative Ergebnisse, wie das Ausbleiben des induzierten Ektodomänen-Sheddings eines bestimmten Substrates bei einem bestimmten Stimulus, nicht publiziert werden. Zudem wird häufig entweder das Substrat und beziehungsweise oder ADAM17 in Zellen transfiziert, welche diese Proteine normalerweise nicht exprimieren. So führen Überexpression und ein fehlerhafter zellulärer Kontext zu Ergebnissen, deren Richtigkeit *in vivo* zumindest fragwürdig sind. Ebenso diskussionswürdig sind die zum Teil eingesetzten Stimuli. Ionomycin, ein Ionophor aus *Streptomyces conglobatus* [145], ist in der Lage, Ca^{2+} -Ionen über die Zellmembran ins Zellinnere zu transportieren und so unter anderem Shedding zu induzieren [146]. Die Induktion erfolgt vermutlich über calciumbindende Proteine wie Calmodulin oder Annexine. Da eine Behandlung von Zellen mit Ionomycin beziehungsweise ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel aber neben der Induktion von Ektodomänen-Shedding auch andere beschriebene Konsequenzen, wie die Induktion von Apoptose oder die Produktion von Zytokinen, Interferonen und Chemokinen, hat, kann nur darüber spekuliert werden, welchem Mechanismus das induzierte Shedding nach Ionomycin-Stimulation zu Grunde liegt. Auch die Stimulation des purinergischen Rezeptors P2X7, einem ligandengesteuerten Kationen-Kanal, mit BzATP, welche als Induktor von Ektodomänen-Shedding Verwendung findet, führt zu Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle [112]. Da Ca^{2+} einer der häufigsten und wichtigsten *second messenger* in lebenden Organismen darstellt und in eine unüberschaubare Vielzahl von zellulären Prozessen involviert ist, kann hier nicht von einer

gezielten oder gar spezifischen Aktivierung von ADAM-Proteasen gesprochen werden. Ebenso verhält es sich mit dem ebenfalls sehr häufig zur Induktion von Shedding genutzten Phorbolster PMA. PMA ist ein beschriebener Tumorpromotor und entfaltet seine Wirkung als Diacylglycerol-Mimetikum hauptsächlich über die Aktivierung der Proteinkinase C, aber auch der ERK-Signalweg wird mit Hilfe von PMA stimuliert. Wie in der Einleitung beschrieben, können unterschiedliche Isoformen der PKC spezifisch das Ektodomänen-Shedding von verschiedenen Substraten induzieren. Ob der Phorbolster jedoch alle oder nur einzelne Isoformen der PKC aktiviert, wurde bisher noch nicht untersucht. So kann auch in diesem Fall nicht von einer spezifischen Substratselektion, wie es wahrscheinlich bei einer physiologischen Aktivierung der PKC-Isoformen der Fall wäre, gesprochen werden. Auch Anisomycin, ein Antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces griseolus*, wird häufig als Induktor für Shedding eingesetzt. Anisomycin hemmt die Proteinbiosynthese und in hohen Konzentrationen auch die DNA-Synthese. Zusätzlich werden durch Anisomycin verschiedene Kinasen, wie die MAPK p38, die JNK und die SAPK (stress-activated protein kinase) aktiviert. So führt also auch die Behandlung von Zellen mit Anisomycin zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Welcher Signalweg spezifisch für die Induktion von Ektodomänen-Shedding bei verschiedenen Substraten relevant ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

Aus diesem Grunde wurde versucht, sich im Rahmen dieser Arbeit der Induktion des Ektodomänen-Shedding von der physiologischen Seite zu nähern. Zwar ist auch die Behandlung von Zellen mit einem DNA-Interkalanz wie Doxorubicin oder auch die radioaktive Bestrahlung von Zellen nicht unbedingt physiologisch, aber es muss in Betracht gezogen werden, dass den Zellen eine Ruhephase von mindestens zehn Tage nach der Induktion der Seneszenz zugesprochen wurde. Nach dieser Zeit ist davon auszugehen, dass sich alle durch die Behandlung transient aktivierten Signalwege wieder in ihrem Ursprungszustand befinden und nur jene Signalwege aktiv sein, die direkt oder indirekt mit der Regulation des Zellzyklusarrestes oder dem SASP in Verbindung stehen.

5.1 Induktion zellulärer Seneszenz

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von ADAM17 bei der Generierung der löslichen Form ehemals membrangebundener Proteine im Rahmen des SASPs seneszenten Zellen untersucht werden. Um solche Untersuchungen zu ermöglichen, musste zunächst eine

Methode zur Induktion zellulärer Seneszenz etabliert werden. Dazu wurden zwei Zelllinien, PC-3 und IMR-90, ausgewählt. Die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 ist für Experimente im Zusammenhang mit dem SASP seneszenten Zellen als besonders gut geeignet anzusehen, da sie kein p53 exprimiert. Der Verlust von p53 führt zu einem besonders stark ausgeprägten SASP (siehe Kap. 1.3). Zudem existierten zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits Daten über eine erfolgreiche Induktion zellulärer Seneszenz in PC-3-Zellen und über die von dieser Zelllinie im Rahmen des SASPs sekretierten Proteine [38]. IMR-90-Zellen sind primäre Lungenfibroblasten mit einem definierten, endlichen Proliferationspotential. Nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen begeben sich diese Zellen in einen Zustand der replikativen Seneszenz und aktivieren somit ohne äußere Einflüsse jene Signalwege, welche zu zellulärer Seneszenz und zur Ausbildung des SASPs führen. Dadurch ist es in dieser Zelllinie möglich, zelluläre Seneszenz entweder durch Stimulation oder einfach durch häufiges Passagieren zu induzieren. Zudem wurde bereits das Sekretom dieser Zellen nach erfolgter Seneszenz-Induktion analysiert und publiziert [38]. Für die Induktion der zellulären Seneszenz wurden zwei in der Literatur etablierte Methoden gewählt. Zum einen wurden die PC-3-Zellen mit Doxorubicin, einem DNA-Interkalanz, welches die DNA schädigt und so eine DDR auslöst, welche wiederum zelluläre Seneszenz induzieren kann, behandelt. Dabei wurde eine Konzentration gewählt, welche zwar für eine erfolgreiche Induktion der Seneszenz erforderlich ist, dabei aber keine Apoptose in den behandelten Zellen auslöst. Es war bereits bekannt, dass Doxorubicin in hohen Konzentrationen von 10 μ M einen nekrotischen Zelltod hervorruft, während die Behandlung von Zellen mit 1 μ M Doxorubicin zur Induktion von Apoptose führt. Bei geringeren Konzentrationen von ungefähr 0,1 μ M führt die Gabe von Doxorubicin jedoch zur Ausbildung zellulärer Seneszenz [147]. Dabei ist zu beachten, dass direkt nach der Behandlung von PC-3-Zellen mit Doxorubicin ein nicht unerheblicher Teil der behandelten Zellen apoptotisch wurde. Als zweiter Stimulus zur Induktion zellulärer Seneszenz wurde die Behandlung mit radioaktiver, ionisierender Strahlung gewählt. Das für die Bestrahlung eingesetzte Nuklid war Cäsium-137, welches bei seinem Zerfall über metastabiles Barium-137 zu stabilem Barium-137 sowohl β - als auch γ -Strahlung emittiert [148]. Ionisierende Strahlung kann sowohl direkt Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA auslösen [149], als auch die Radikalbildung fördern [150]. Diese freien Radikale können nun unter anderem mit den Ribosen der DNA reagieren und so die DNA schädigen [151]. Auch eine durch Strahlung induzierte Dimerisierung von DNA-Basen wurde bereits nachgewiesen [152]. Bei der Behandlung von Patienten mittels Strahlentherapie unterscheidet man zwischen einer Reizbestrahlung mit einer Strahlendosis

von 1-20Gy und einer gewebesabtötenden Bestrahlung mit einer Dosis von 20-80Gy. Für die Bestrahlung von Zellkulturzellen, in diesem Fall PC-3- und IMR-90-Zellen, wurde eine Dosis von 10Gy gewählt. Diese Dosis ist laut Literatur ausreichend, um zelluläre Seneszenz auszulösen [38], induziert jedoch keine Apoptose oder einen nekrotischen Zelltod in den behandelten Zellen. Obwohl sich die ionisierende, radioaktive Strahlung in der Theorie gleichmäßig über die Zellkulturschale verteilen sollte und somit alle Zellen die gleichen DNA-Schäden durch eine solche Behandlung erleiden sollten, war in der Praxis zu beobachten, dass in einigen Zellen durch die Bestrahlung Apoptose ausgelöst wurde. Da die nachfolgenden Experimente jedoch lediglich mit Zellen, deren Doxorubicin-Gabe oder radioaktive Bestrahlung mindestens zehn Tage zurück lag, durchgeführt wurden und im Anbetracht der Tatsache, dass Apoptose ein Prozess ist, der sich innerhalb von Stunden und nicht innerhalb von Tagen abspielt, sollte der programmierte Zelltod in diesem Versuchsaufbau in der Theorie keine Rolle spielen. Um diese Theorie experimentell zu bestätigen, wurden seneszente PC-3- und IMR-90-Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD behandelt. Der Einfluss dieses Inhibitors auf den SASP wurde anschließend mittels ELISA untersucht. Da Z-VAD keinen Einfluss auf die Generierung löslicher Faktoren seneszenten Zellen hatte, kann davon ausgegangen werden, dass durch Caspasen induzierte Apoptose, welche bekanntermaßen Ektodomänen-Shedding von beispielsweise dem IL-6R durch ADAM17 auslösen kann [110], nicht für die erhöhte Sekretion von SASP-Komponenten verantwortlich ist. Zusätzlich wurden Lysate von seneszenten und proliferierenden PC-3-Zellen erstellt und diese anschließend auf das Vorhandensein von geschnittenem PARP-1 hin untersucht. PARP-1, ein Enzym, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist, wird im Falle von Caspase-abhängiger Apoptose durch Caspase 3 gespalten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein vermehrtes Auftreten von geschnittenem PARP-1 in seneszenten Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt die Daten, die aus den Versuchen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD gewonnen wurden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sowohl die Analyse von PARP-1 als auch die Verwendung von Z-VAD nur Aussagen über Caspase-abhängige Apoptose zulassen. Inwieweit der Caspase-unabhängige programmierte Zelltod [153] eine Rolle in diesem Versuchsaufbau spielte, wurde nicht untersucht.

5.2 Analyse seneszenten Zellen

Um sicherzustellen, dass sich die Zellkulturzellen nach einer erfolgten Stimulation mit Doxorubicin oder ionisierender, radioaktiver Strahlung in einem Zustand zellulärer Seneszenz befanden, wurden verschiedene Experimente zur Detektion von Seneszenzmarkern durchgeführt. Das wohl am aussagekräftigste Ergebnis war hierbei die erhöhte Sekretion von IL-6. Obwohl die Zusammensetzung der SASP-Komponenten je nach Zelltyp zum Teil unterschiedlich ist, lässt sich in allen bisher untersuchten Zelltypen eine stark erhöhte Expression von IL-6 während der zellulären Seneszenz beobachten. Normal proliferierende PC-3- und IMR-90-Zellen sekretieren nur sehr geringe Mengen dieses Zytokins. Dabei ist zu beachten, dass sich die gemessenen Konzentrationen von IL-6 im Überstand proliferierender Zellen mittels ELISA auf Messungenauigkeiten zurückführen lässt, da die gemessenen Absorptionswerte (unter 0,1) nahe an der unteren Detektionsgrenze lagen und somit nur rein rechnerisch eine Sekretion von IL-6 nachgewiesen werden konnte. Bei bestrahlten oder mit Doxorubicin behandelten PC-3- und IMR-90-Zellen hingegen ist die Sekretion von IL-6 meist um mehr als das Tausendfache erhöht, was laut Literatur als ein deutliches Anzeichen für zelluläre Seneszenz betrachtet werden kann [3]. Neben der Sekretion von IL-6 wurde auch die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase untersucht. Dieses lysosomale Protein ist in seneszenten Zellen mittels einer X-Gal-Färbung bei einem pH-Wert von 6 detektierbar [132]. Obwohl die SA- β -Gal weder für die Initiation noch für die Aufrechterhaltung des Wachstumsarrestes oder des SASPs von essentieller Bedeutung ist, kommt es in seneszenten Zellen zu einer Überexpression und Akkumulation von endogener, lysosomaler β -Galaktosidase, welche dann als Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase angesprochen wird. Es handelt sich hierbei nicht, wie zum Teil irrtümlich angenommen, um zwei verschiedene Proteine. Somit kann auch in proliferierenden Zellen mittels einer X-Gal-Färbung β -Galaktosidase bei pH=6 nachgewiesen werden. In diesem Fall dauert die Färbung allerdings erheblich länger und der Anteil an positiv gefärbten Zellen ist deutlich geringer. Da im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von ADAM17 bei der Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin als Bestandteile des SASPs von seneszenten PC-3- und IMR-90-Zellen untersucht werden sollte, wurden als letztes Kriterium für eine erfolgreiche Induktion zellulärer Seneszenz die Konzentrationen dieser beiden Proteine im Überstand bestrahlter oder mit Doxorubicin behandelter Zellen herangezogen. Dafür wurden die Überstände von proliferierenden mit potentiell seneszenten Zellen im Hinblick auf die Konzentrationen von sTNFR1 und Amphiregulin mittels ELISA miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass

sich die in der Literatur beschriebene erhöhte Sekretion dieser beiden Proteine reproduzieren ließ. Nachdem alle Experimente, die zum Nachweis zellulärer Seneszenz dienten, positive Ergebnisse erbrachten, konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl die Behandlung mit 0,1 μ M Doxorubicin als auch die radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 10Gy für die Induktion von zellulärer Seneszenz in PC-3- und IMR-90-Zellen geeignet war.

5.3 Analyse der für das Shedding von Amphiregulin und TNFR1 verantwortlichen Protease

Amphiregulin und sTNFR1 sind beschriebene Substrate von ADAM17 und es konnte bereits gezeigt werden, dass ADAM17 eine der für das induzierte Ektodomänen-Shedding dieser beiden Proteine verantwortlichen Proteasen ist. Es ist allerdings auch bekannt, dass sich mit einem ADAM17-spezifischen Inhibitor oder durch eine Inhibition der Expression von ADAM17, zum Beispiel mittels shRNAs, nicht das basale Ektodomänen-Shedding von sTNFR1 und Amphiregulin inhibieren lässt. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass ADAM17 zwar nach einem Stimulus, wie etwa der Behandlung von Zellkulturzellen durch PMA, die Ektodomänen seiner Substrate prozessiert, für die konstitutive Freisetzung von membrangebunden ADAM-Substraten ohne Stimulus jedoch eine andere Protease verantwortlich ist. Um zu ermitteln, ob ADAM17 im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz für die erhöhte Sekretion von sTNFR1 und Amphiregulin essentiell ist oder ob eine andere, nicht näher beschriebene Protease diese Aufgabe übernimmt, wurden seneszente Zellen mit verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren behandelt und die Konzentration der beiden ADAM17-Substrate im Überstand behandelter Zellen mit dem Überstand nicht behandelter, seneszenten Zellen mittels ELISA verglichen. Dafür wurde zunächst Marimastat, ein Breitband-Inhibitor für Matrix-Metalloproteasen, der neben den MMPs auch andere Metalloproteasen, wie zum Beispiel ADAM17, in seiner Aktivität hemmt [139], verwendet. Die Behandlung mit Marimastat führte tatsächlich zu einer signifikanten Reduzierung der Konzentration von sTNFR1 und Amphiregulin im Überstand seneszenten Zellen im Vergleich mit unbehandelten seneszenten Zellen. Somit konnte die verantwortliche Protease auf die Klasse der Metalloproteasen eingeschränkt und andere Protease-Familien, wie zum Beispiel Serin- oder Aspartat-Proteasen, ausgeschlossen werden. Im Anschluss daran sollte untersucht werden, ob in das Ektodomänen-Shedding von sTNFR1 und Amphiregulin im Rahmen des SASPs seneszenten Zellen tatsächlich ADAM-Proteasen involviert sind. Hierfür wurden

Inhibitoren verwendet, welche entweder für ADAM10 (GI) oder für ADAM10 und ADAM17 (GW) spezifisch sind. Ein Vergleich zwischen den Konzentrationen von sTNFR1 und Amphiregulin im Überstand behandelter seneszenten Zellen und unbehandelter seneszenten Zellen mit Hilfe eines ELISAs zeigt, dass der ADAM10-spezifische Inhibitor GI keinen wesentlichen Einfluss auf die Freisetzung dieser beiden membrangebunden Proteine hatte. Der ADAM10- und ADAM17-spezifische Inhibitor GW hingegen reduzierte signifikant das Ektodomänen-Shedding von sTNFR1 und Amphiregulin in seneszenten Zellen. Dieses Ergebnis war der erste direkte Hinweis darauf, dass ADAM17 auch im Rahmen des SASPs seneszenten Zellen die hauptverantwortliche Protease bei der Generierung löslicher Ektodomänen von TNFR1 und Amphiregulin ist. Obwohl GI und GW häufig als spezifische Inhibitoren für ADAM10 beziehungsweise ADAM17 bezeichnet werden, offenbart die Literatur, dass diese Inhibitoren auch andere Metalloproteasen in ihrer Aktivität hemmen können. So ist für den Inhibitor GI beschrieben, dass er neben ADAM10 auch die Matrix-Metalloproteasen 9 und 13 inhibieren kann. Dabei sind die IC_{50} -Werte für die beiden MMPs sogar geringer als für ADAM10 (ADAM10: 5,3 μ M; MMP9: 2,5 μ M; MMP13: 1,1 μ M). Der ADAM10- und ADAM17-Inhibitor GW ist ebenfalls in der Lage, MMPs zu inhibieren. Neben den MMPs 9 und 13 wird durch GW auch MMP3 in seiner Aktivität gehemmt. Auch in diesem Fall sind die IC_{50} -Werte für die MMPs zum Teil geringer als für die ADAM-Proteasen (ADAM10: 12 μ M; ADAM17: 8 μ M; MMP3: 17 μ M; MMP9: 10 μ M; MMP13: 4 μ M) [125]. Um auszuschließen, dass eine Matrix-Metalloprotease in das Ektodomänen-Shedding von TNFR1 und Amphiregulin im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz involviert ist, wurde ein ADAM17-spezifischer, inhibitorischer Antikörper, D1(A12), verwendet. Dieser chimäre Antikörper verfügt über zwei verschiedene Antigenbindungsstellen; eine für die Disintegrin-Domäne von ADAM17 und eine für die Katalytische Domäne [126]. Bindet nun ein solcher Antikörper an ADAM17, so werden diese beiden Domänen kreuzvernetzt, wodurch das katalytische Zentrum blockiert wird. Dies führt somit unmittelbar zu einer Inhibition der Proteaseaktivität von ADAM17. Es kann darüber spekuliert werden, ob der Antikörper D1(A12) auch in der Lage ist, zwei ADAM17-Moleküle über solch eine Kreuzvernetzung zu dimerisieren. Das Ergebnis wäre aber grundlegend das Gleiche. Da in diesem Fall ein Molekül ADAM17 während der Substraterkennung beziehungsweise Bindung und das zweite ADAM17-Molekül in seiner enzymatischen Aktivität gehemmt wären, würde es auch in solch einem Szenario zu einer spezifischen Inhibition von ADAM17 kommen. In den nachfolgenden Experimenten stellte sich heraus, dass der inhibitorische Antikörper D1(A12) tatsächlich in der Lage war, die Generierung der

löslichen Ektodomänen von TNFR1 und Amphiregulin als Komponenten des SASPs seneszenter Zellen signifikant zu reduzieren. Die bereits vorliegenden Ergebnisse zu den verschiedenen Inhibitoren sollten abschließend mit einer Inhibition der Expression von ADAM17 mittels einer shRNA verifiziert werden. Dazu wurden PC-3-Zellen generiert, welche stabil eine shRNA, welche gegen die mRNA von ADAM17 gerichtet war, exprimieren. Nach einer erfolgreichen Induktion zellulärer Seneszenz mittels radioaktiver Bestrahlung wurden die Überstände dieser Zellen durch einen ELISA hinsichtlich der Konzentration von sTNFR1 und Amphiregulin analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine Inhibition der ADAM17-Expression mittels RNAi zu einer signifikanten Reduktion der Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin im Vergleich zu seneszenten Zellen, welche ADAM17 exprimieren, führte. Somit konnte die Hypothese, dass ADAM17, welche die hauptverantwortliche Protease beim induzierten Ektodomänen-Shedding von TNFR1 und Amphiregulin darstellt, auch im Rahmen des SASPs seneszenter Zellen bei der Generierung des löslichen Ektodomänen dieser beiden Proteine eine essentielle Rolle spielt, bestätigt werden. Zahlreiche Untersuchungen von Gewebe-Proben aus Tumoren und die Analyse vieler Krebszelllinien, welche in der Zellkultur Verwendung finden, haben ergeben, dass Krebszellen sehr häufig eine erhöhte Expression von ADAM17 aufweisen [140, 141]. Es wird darüber spekuliert, ob diese erhöhte Expression mit einer verstärkten Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise EGFR-Liganden aber auch VEGF, welche förderlich für die Tumorpromotion und zudem häufig in erhöhtem Maße im Serum von Krebspatienten zu finden sind [154], in Zusammenhang steht. Um die Frage zu klären, warum in seneszenten Zellen die ADAM17-Substrate TNFR1 und Amphiregulin einem verstärkten Ektodomänen-Shedding unterliegen, wurde deshalb als nächstes die Expression der Protease untersucht. Dazu wurden Lysate von seneszenten mit denen von proliferierenden Zellen durch WesternBlot mit Hilfe eines spezifisch gegen ADAM17 gerichteten Antikörpers verglichen. Es zeigte sich, dass es keine Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen seneszenten und proliferierenden Zellen gab. Auch das Verhältnis zwischen der pro- und der maturen Form von ADAM17 war identisch. Da diese Experimente allerdings mit komplettem Zelllysate durchgeführt wurden, konnte auf diese Weise nicht geklärt werden, ob sich eventuell mehr ADAM17 auf der Zelloberfläche seneszenter Zellen befindet. Aus diesem Grund wurde anschließend eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt, um so ausschließlich das auf der Zellmembran befindliche ADAM17 analysieren zu können. Doch auch bei diesen Versuchen konnte kein Unterschied zwischen seneszenten und normal proliferierenden Zellen in Bezug auf die Expressionsstärke und dem Verhältnis zwischen der pro- und der maturen Form von

ADAM17 festgestellt werden. Es war jedoch bereits bekannt, dass eine erhöhte ADAM17-Expression nicht zwangsläufig auch zu einer erhöhten Proteaseaktivität beziehungsweise zu einem verstärkten Ektodomänen-Shedding von ADAM17-Substraten führt. So konnte im Rahmen eines transgenen Mausmodells gezeigt werden, dass eine systemische Überexpression von ADAM17 keinen Einfluss sowohl auf der konstitutive als auch auf das durch LPS (Lipopolysaccharid) induzierte Ektodomänen-Shedding von TNF- α hatte [155]. Daher waren diese Ergebnisse nicht in Gänze unerwartet.

5.4 Die Rolle von p38

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der experimentellen Analyse des bei der von ADAM17 vermittelten Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin in seneszenten Zellen involvierten Signalweges. Dazu wurde bereits im Vorfeld ein besonderes Augenmerk auf den p38-Pfad gelegt. Das lag zum einen daran, dass bereits bekannt war, dass die MAPK p38 bei einer DNA-Schädigung, wie sie zum Beispiel durch Anisomycin oder UV-Strahlung verursacht wird, aktiviert wird und im Anschluss daran in der Lage ist, direkt eine Phosphorylierung von ADAM17 zu vermitteln [72]. Dieser Umstand lässt sich dadurch erklären, dass p38 eine sogenannte Stresskinase ist, welche auf zellulären Stress zum Beispiel durch Hitze, Strahlung oder osmotischen Schock reagiert. Zum anderen wurde auch schon eine erhöhte p38-Aktivität in seneszenten Zellen beschrieben [51]. Aus diesen Gründen wurde mittels eines Inhibitors für p38, sb203580, die Rolle dieser Kinase bei der Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin in seneszenten Zellen untersucht. Dazu wurde in PC-3- und IMR-90-Zellen entweder durch radioaktive Bestrahlung oder durch Gabe von Doxorubicin zelluläre Seneszenz induziert. Anschließend wurden die Zellen mit sb203580 behandelt und die Konzentrationen von sTNFR1 und Amphiregulin im Überstand dieser Zellen mit denen von unbehandelten seneszenten Zellen mit Hilfe eines ELISAs verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Behandlung seneszenten Zellen mit dem p38-Inhibitor sb203580 zu einer deutlichen Reduktion von sTNFR1 und Amphiregulin im Überstand dieser Zellen führte. Dies war der erste Hinweis darauf, dass die Vermutung, p38 spiele bei der Generierung von sTNFR1 und Amphiregulin in seneszenten Zellen eine entscheidende Rolle, korrekt war. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der p38-Inhibitor sb203580 in der allgemein üblichen Konzentration von 10 μ M verwendet wurde. Laut Literatur inhibiert sb203580 bei dieser Konzentration nicht nur die alpha-Isoform von p38 (Restaktivität 2%), welche bei

dieser Arbeit in den Fokus gestellt werden sollte, sondern auch die beta-Isoform von p38 (Restaktivität 10%) sowie die Proteinkinase B alpha (PKBa, Restaktivität 62%), die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β , Restaktivität 66%) und die LCK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Restaktivität 32%) [144]. Um sicherzustellen, dass die Reduktion des Ektodomänen-Sheddings durch sb203580 nicht auf einer Inhibition der oben genannten Kinasen beruhte, wurde der Versuch mit verschiedenen Konzentrationen von sb203580 wiederholt. Hierbei zeigte sich, dass 1 μ M sb203580 bereits einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von membrangebundenem TNFR1 und Amphiregulin hatte und dass bei einer Konzentration von 2,5 μ M sb203580 kein Unterschied mehr zu den mit 10 μ M sb203580 behandelten seneszenten Zellen festzustellen war. Diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, dass der beobachtete Effekt von sb203580 auf eine Inhibition der alpha-Isoform von p38 und nicht auf eine Hemmung der anderen, oben genannten Kinasen, zurückzuführen ist. Um die Rolle von p38 bei der zellulären Seneszenz detaillierter zu untersuchen, wurde versucht, den Phosphorylierungsstatus dieser Kinase mit dem von normal proliferierenden Zellen zu vergleichen. Dazu wurden sowohl senescente als auch proliferierende Zellen lysiert und die Lysate anschließend mittels WesternBlot mit Hilfe eines gegen phosphoryliertes p38 (pp38) gerichteten Antikörpers analysiert. Mit dieser Methode ließ sich jedoch keine deutlich stärkere Phosphorylierung von p38 in seneszenten Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen feststellen. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass die zelluläre Seneszenz nur zu einer schwachen, jedoch konstitutiven Aktivierung von p38 führt, wohingegen eine Behandlung von Zellkulturzellen mit zum Beispiel Anisomycin oder UV-Licht eine starke, jedoch transiente p38-Phosphorylierung hervorruft. Um diese Vermutung experimentell zu bestätigen, wurde ein kommerziell erhältlicher Assay zur Bestimmung der p38-Aktivität erworben und durchgeführt. Hierbei wurde zunächst pp38 aus dem Lysat seneszenten und proliferierender Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gefällt und das so isolierte pp38 anschließend mit ATP und einem p38-Substrat, ATF2, inkubiert. Das Substrat ATF2 und ATP wurden dabei in einem molaren Überschuss eingesetzt, so dass jedes Molekül pp38 in der Lage war, mehrere Moleküle ATF2 zu phosphorylieren. Durch diese Methode kann das Signal eines einzelnen phosphorylierten p38-Moleküls amplifiziert werden, was zu einer besseren Detektierbarkeit führt. So war bei einer anschließenden WesternBlot-Analyse des Inkubationsansatzes mit Hilfe eines gegen phosphoryliertes ATF2 gerichteten Antikörpers eine deutlich stärkere pATF2-Bande bei dem Ansatz, welcher pp38 aus seneszenten Zellen enthielt, zu beobachten. Im Anschluss an diese Experimente sollte der Einfluss von p38, beziehungsweise von dessen Inhibitor sb203580, auf die Phosphorylierung von ADAM17

untersucht werden. Dafür wurde zunächst ADAM17 aus dem Lysat von seneszenten sowie von proliferierenden PC-3-Zellen gefällt und anschließend mittels WesternBlot analysiert. Hierzu wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch ein phosphoryliertes Threonin, welchem ein Prolin folgt, erkennt. Dieses Threonin-Prolin-Motiv findet sich nur einmal innerhalb der Aminosäure-Sequenz von ADAM17 und zwar an der Position 735. Es konnte bereits gezeigt werden, dass p38 nach Stressoren wie UV-Strahlung oder Anisomycin in der Lage ist, genau dieses Threonin 735 zu phosphorylieren und dass es nach einer Phosphorylierung an dieser Stelle zu einer Dissoziation von TIMP3, einem endogenen Inhibitor, und ADAM17 kommt [83]. Die Freisetzung von TIMP3 aus seinem Komplex mit zwei Molekülen ADAM17 ist ein beschriebener, aktivierender Prozess für die Protease. Eine Deletion beziehungsweise eine Mutation dieses Theonins 735 führt zu einer reduzierten Proteaseaktivität von ADAM17 [156]. Die WesternBlot-Analyse ergab, dass ADAM17 in seneszenten Zellen tatsächlich stärker am Threoninrest 735 phosphoryliert war, als bei normal proliferierenden Zellen. Dabei gilt es besonders zu beachten, dass im Falle der zellulären Seneszenz nur die mature Form von ADAM17 phosphoryliert ist, die pro-Form hingegen nicht. Diese erhöhte Phosphorylierung konnte durch die Zugabe des p38-Inhibitors sb203580 drastisch reduziert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass p38 tatsächlich ADAM17 im Rahmen zellulärer Seneszenz phosphoryliert und dass diese Phosphorylierung essentiell für die Generierung der löslichen Ektodomänen von TNFR1 und Amphiregulin im Zusammenhang mit dem SASP ist. Die Frage, ob p38 während der zellulären Seneszenz direkt ADAM17 phosphoryliert, oder ob diese Reaktion durch eine andere, von p38 regulierte, Kinase katalysiert wird, bleibt zunächst unbeantwortet. So konnte während dieser Arbeit mittels einer Immunopräzipitation keine Interaktion zwischen p38 und ADAM17 nachgewiesen werden. Da aber eine Interaktion zwischen Kinase und Substrat nur transienter Natur und extrem kurzlebig ist, sind solche Experimente mit ausschließlich endogen exprimierten Bindungspartnern nur schwer durchzuführen. Die Verwendung einer dominant-negativen Mutante von p38, welche zwar noch ADAM17 binden kann, aber nicht mehr in der Lage ist, die Protease zu phosphorylieren, wäre bei diesen Versuch hilfreich gewesen [157]. Dies ließ sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht realisieren. Da jedoch bereits gezeigt werden konnte, dass in einem zellfreien Reagenzglasversuch isoliertes p38 die Phosphorylierung von ADAM17 katalysieren kann [72], ist es vorstellbar, dass dies auch im Fall der zellulären Seneszenz gilt.

5.5 Ausblick

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde lediglich der p38 MAPK-Weg näher betrachtet. Zwar ist die Wahl, den Fokus auf p38 zu legen, nachvollziehbar, eine umfassendere Untersuchung des Aktivitätsstatus anderer Kinasen, wie beispielsweise der PKC, wäre aber wünschenswert gewesen. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente mit dem MEK(MAPK/ERK kinase)-Inhibitor U0126, welcher die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von ERK hemmt, durchgeführt, die Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich. So führte eine Behandlung von seneszenten Zellen mit U0126 zwar zu einer Reduktion der löslichen ADAM17-Substrate im Überstand der behandelten Zellen nach 24 Stunden, zugleich konnte jedoch auch eine signifikante Erhöhung der Zellzahl der behandelten Zellen um circa 10% im Vergleich zu unbehandelten seneszenten Zellen festgestellt werden. Dementsprechend wurde darüber spekuliert, ob eine Inhibition von Erk die Aktivität von ADAM17 generell senkt oder mit der spezifischen Substratselektion interferiert. Ebenso ist nicht bekannt, ob der MEK/Erk-Weg eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes seneszenten Zellen spielt beziehungsweise in die Regulation des SASPs involviert ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Wachstumsarrest und der SASP unabhängig voneinander reguliert werden [39]. Zudem konnten *in vitro* Situationen etabliert werden, bei denen entweder der Zellzyklusarrest [158] oder der SASP [159] inhibiert wurde, ohne mit dem jeweils anderen zellulären Prozess zu interferieren. Aus diesem Grunde wurde der Ansatz der Inhibition des MEK/ERK-Weges mit Hilfe des Inhibitors U0126 nicht weiter verfolgt. Auch die Verwendung eines NF- κ B-Inhibitors, Bay 11-7082, führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen. NF- κ B ist im Rahmen der zellulären Seneszenz ein Zielprotein von p38 und zugleich ein Schlüsselregulator des SASPs. So soll, laut Literatur, eine Inhibition von NF- κ B, beziehungsweise von Proteinen, die in die positive Regulation der Signalkaskade von NF- κ B involviert sind, zu einer Hemmung der Generierung von SASP-Komponenten führen [54]. Im Rahmen dieser Arbeit führte eine Behandlung seneszenten Zellen mit Bay 11-7082 jedoch zum Teil zur spontanen Induktion von Apoptose. Dabei ist es erwähnenswert, dass es nur in vereinzelten, jedoch regelmäßig auftretenden Fällen bei der Behandlung von seneszenten Zellen mit Bay 11-7082 zu apoptotischen Ereignissen kam. So wurde beispielsweise bei einem Versuchsaufbau mit triplikaten Ansätzen nur in ein oder zwei Ansätzen Apoptose beobachtet, während die Zellen in den anderen Ansätzen bei mikroskopischer Betrachtung vital aussahen. Was zunächst als ein Arbeitsfehler interpretiert wurde, stellte sich später als ein reproduzierbares, jedoch nicht

erklärbares Phänomen heraus. Da p38, wie oben beschrieben, sowohl mit ADAM17 als auch mit dem NF- κ B-Pfad, welcher für die Regulation des SASPs zuständig ist, in Verbindung steht, wären Ergebnisse in Bezug auf eine NF- κ B-Inhibition sehr hilfreich gewesen, um an dieser Stelle zwischen der Phosphorylierung beziehungsweise Aktivierung von ADAM17 und der Substratselektion zu unterscheiden. So wäre es durchaus vorstellbar, dass p38 zwar durch eine Phosphorylierung von ADAM17 dessen Assoziation mit TIMP3 aufhebt und somit den inhibitorischen Effekt von TIMP3 auf ADAM17 negiert, für eine Induktion von Ektodomänen-Shedding aber noch weitere, von NF- κ B regulierte Schritte notwendig sind. Diese Schritte könnten die Regulation der Aktivierung beziehungsweise der Inhibierung oder aber auch der Expression von Ca²⁺-bindenden Proteinen, wie Calmodulin oder Annexine, oder auch Tetraspanine, ERM-Proteine oder Integrine beinhalten. Für diese Theorie spricht die Tatsache, dass zum Beispiel ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), ein beschriebenes, membranständiges Substrat von ADAM17, zwar während des SASPs seneszenten Zellen in einem erhöhten Maße sekretiert wird [38], dies jedoch nicht über Ektodomänen-Shedding durch ADAM17, sondern über die Freisetzung von Exosomen geschieht [133]. Weiterführende Experimente hinsichtlich anderer Signalwege, insbesondere des NF- κ B-Pfades, beziehungsweise die der Zielgene von NF- κ B, wären also aus den oben genannten Gründen sehr hilfreich, um das Verständnis des Ektodomänen-Sheddings von ADAM-Proteasen zu erweitern. Auf diese Weise wäre es möglich experimentell zu beweisen, dass die Aktivierung von ADAM17 und die spezifische Substratselektion zwei voneinander abhängige, aber unterschiedlich regulierte Prozesse sind.

6. Zusammenfassung

Verkürzte Telomere nach wiederholter Zellteilung, irreparable Schäden an der DNA oder auch starke proliferative Signale, zum Beispiel durch mutierte Onkogene, können in Zellen einen Zustand der zellulären Seneszenz, ein prinzipiell irreversibler Wachstumsarrest, induzieren. Dieser Vorgang dient vornehmlich der Suppression von malignen und benignen Transformationen und somit der Inhibition von Tumorentwicklung. Aber auch in andere physiologische Prozesse, wie beispielsweise die Wundheilung, ist die zelluläre Seneszenz involviert. Eines der herausstechenden Merkmale seneszenten Zellen ist die Ausbildung eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP). Dabei werden eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren in einem erhöhten Maße sezerniert. Diese Proteine sorgen nach zunehmender Akkumulation seneszenten Zellen im Alter jedoch auch für pathologische Veränderungen in Geweben beziehungsweise im gesamten Organismus. So wird nach dem heutigen Kenntnisstand eine Reihe von chronischen Entzündungskrankheiten sowie maligne Veränderungen und Hyperplasien dem SASP seneszenten Zellen zugeschrieben. Unter diesen sezernierten Proteinen finden sich auch membranständige Proteine, welche über Ektodomänen-Shedding durch ADAM(a disintegrin and metalloprotease)-Proteasen freigesetzt werden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener Inhibitoren sowie durch stabile Transfektion mit einer shRNA gezeigt, dass sowohl Amphiregulin, ein potenter Wachstumsfaktor, welcher häufig mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird, als auch der TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1), der eine wichtige Rolle bei Entzündungen einnimmt, während der zellulären Seneszenz von ADAM17 prozessiert werden. Die Induktion zellulärer Seneszenz erfolgte über die Gabe von Doxorubicin, einen DNA-Interkalanz, oder durch ionisierende, radioaktive Bestrahlung. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit experimentell nachgewiesen werden, dass die MAP-Kinase p38, welche zum Beispiel nach einer DNA-Schädigung aktiviert wird, ADAM17 in seneszenten Zellen phosphoryliert und dass ein p38-Inhibitor sowohl die Phosphorylierung von ADAM17 als auch die Freisetzung von sTNFR1 und Amphiregulin inhibiert. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse könnte eine Strategie entwickelt werden, um gezielt die Freisetzung von sTNFR1 und Amphiregulin durch senescente Zellen zu verhindern, ohne dabei mit dem physiologisch wichtigen Ektodomänen-Shedding oder der zellulären Seneszenz in ihrer Gesamtheit zu interferieren.

6.1 Abstract

Shortened Telomers after repeated cell cycles, irreparable damage of DNA as well as strong proliferative signals, for example through mutated oncogenes, can induce a state of cellular senescence. Senescence is characterized as an irreversible growth arrest, suppresses malignant and benign transformations and thus inhibits the development of tumors. Cellular senescence is also involved in other physiological processes, as wound healing. One important characteristic of senescent cells is the formation of a senescence-associated secretory phenotype (SASP). Within this process numerous cytokines, chemokines and growth factors as well as their receptors are increasingly secreted. However, after increased accumulation of senescent cells these proteins can also cause pathological transformations in different tissues and the whole organism. Therefore, according to the state of knowledge, different chronic inflammatory diseases as well as malignant transformations and hyperplasia are associated with the SASP of senescent cells. Among these secreted proteins there are also membrane bound proteins, which are released through ectodomain shedding of ADAM (a disintegrin and metalloprotease) proteases. In this study it was shown on the basis of different inhibitors and through stable transfection with shRNA that both Amphiregulin, a potent growth factor often associated with different cancers, and TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1), which constitutes an important factor in many inflammatory settings, are processed by ADAM17 upon cellular senescence. Cellular senescence was induced by Doxorubicin, a DNA damaging agent, or through ionizing irradiation. Furthermore experimental evidence was provided, that the MAPK p38, which is activated for example after DNA damage, phosphorylates ADAM17 in senescent cells and that a p38 inhibitor inhibits both the phosphorylation of ADAM17 and the release of sTNFR1 and Amphiregulin. On the basis of these conclusions it might be possible to develop a strategy in order to prevent specifically the release of sTNFR1 and Amphiregulin by senescent cells without interfering with the physiological important ectodomain-shedding or cellular senescence in its entirety.

7. Literatur

1. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
2. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
3. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 685-705.
4. Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj and O. Pereira-Smith, *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
5. Kurz, D.J., S. Decary, Y. Hong and J.D. Erusalimsky, *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** (20): p. 3613-22.
6. Krishnamurthy, J., C. Torrice, M.R. Ramsey, G.I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su and N.E. Sharpless, *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1299-307.
7. Collins, C.J. and J.M. Sedivy, *Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence*. Aging Cell, 2003. **2**(3): p. 145-50.
8. Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon and S.W. Lowe, *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.
9. Rodier, F., D.P. Munoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J.P. Coppe, E. Campeau, C.M. Beausejour, S.H. Kim, A.R. Davalos and J. Campisi, *DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion*. J Cell Sci, 2011. **124**(1): p. 68-81.
10. Martens, U.M., E.A. Chavez, S.S. Poon, C. Schmoor and P.M. Lansdorp, *Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 291-9.
11. Levy, M.Z., R.C. Allsopp, A.B. Futcher, C.W. Greider and C.B. Harley, *Telomere end-replication problem and cell aging*. J Mol Biol, 1992. **225**(4): p. 951-60.

12. Collins, K., *Mammalian telomeres and telomerase*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(3): p. 378-83.
13. Sirbu, B.M. and D. Cortez, *DNA damage response: three levels of DNA repair regulation*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(8): p. a012724.
14. Fumagalli, M., F. Rossiello, M. Clerici, S. Barozzi, D. Cittaro, J.M. Kaplunov, G. Bucci, M. Dobрева, V. Matti, C.M. Beausejour, U. Herbig, M.P. Longhese and F. d'Adda di Fagagna, *Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(4): p. 355-65.
15. Nakamura, A.J., Y.J. Chiang, K.S. Hathcock, I. Horikawa, O.A. Sedelnikova, R.J. Hodes and W.M. Bonner, *Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence*. *Epigenetics Chromatin*, 2008. **1**(1): p. 6.
16. Robles, S.J. and G.R. Adami, *Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts*. *Oncogene*, 1998. **16**(9): p. 1113-23.
17. Chang, B.D., M.E. Swift, M. Shen, J. Fang, E.V. Broude and I.B. Roninson, *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 389-94.
18. Barascu, A., C. Le Chalony, G. Pennarun, D. Genet, N. Imam, B. Lopez and P. Bertrand, *Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation*. *EMBO J*, 2012. **31**(5): p. 1080-94.
19. von Zglinicki, T., *Oxidative stress shortens telomeres*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(7): p. 339-44.
20. Sedelnikova, O.A., C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, A.G. Georgakilas and W.M. Bonner, *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. *Mutat Res*, 2010. **704**(1-3): p. 152-9.
21. Courtois-Cox, S., S.L. Jones and K. Cichowski, *Many roads lead to oncogene-induced senescence*. *Oncogene*, 2008. **27**(20): p. 2801-9.
22. Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci and F. d'Adda di Fagagna, *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication*. *Nature*, 2006. **444**(7119): p. 638-42.
23. Munro, J., N.I. Barr, H. Ireland, V. Morrison and E.K. Parkinson, *Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent*

- mechanism that is independent of a mitotic clock.* Exp Cell Res, 2004. **295**(2): p. 525-38.
24. Kim, W.Y. and N.E. Sharpless, *The regulation of INK4/ARF in cancer and aging.* Cell, 2006. **127**(2): p. 265-75.
 25. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation.* Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
 26. Smith, J., L.M. Tho, N. Xu and D.A. Gillespie, *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer.* Adv Cancer Res, 2010. **108**: p. 73-112.
 27. Shieh, S.Y., J. Ahn, K. Tamai, Y. Taya and C. Prives, *The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites.* Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 289-300.
 28. Saramaki, A., C.M. Banwell, M.J. Campbell and C. Carlberg, *Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(2): p. 543-54.
 29. LaBaer, J., M.D. Garrett, L.F. Stevenson, J.M. Slingerland, C. Sandhu, H.S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow, *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors.* Genes Dev, 1997. **11**(7): p. 847-62.
 30. Brugarolas, J., K. Moberg, S.D. Boyd, Y. Taya, T. Jacks and J.A. Lees, *Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1002-7.
 31. Schramek, D., A. Kotsinas, A. Meixner, T. Wada, U. Elling, J.A. Pospisilik, G.G. Neely, R.H. Zwick, V. Sigl, G. Forni, M. Serrano, V.G. Gorgoulis and J.M. Penninger, *The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression.* Nat Genet, 2011. **43**(3): p. 212-9.
 32. Maglic, D., S. Zhu, E.A. Fry, P. Taneja, F. Kai, R.D. Kendig, T. Sugiyama, L.D. Miller, M.C. Willingham and K. Inoue, *Prognostic value of the hDMP1-ARF-Hdm2-p53 pathway in breast cancer.* Oncogene, 2013. **32**(35): p. 4120-9.
 33. Jarrard, D.F., S. Sarkar, Y. Shi, T.R. Yeager, G. Magrane, H. Kinoshita, N. Nassif, L. Meisner, M.A. Newton, F.M. Waldman and C.A. Reznikoff, *p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells.* Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2957-64.
 34. Semczuk, A. and J.A. Jakowicki, *Alterations of pRb1-cyclin D1-cdk4/6-p16(INK4A) pathway in endometrial carcinogenesis.* Cancer Lett, 2004. **203**(1): p. 1-12.

35. Inoue, Y., M. Kitagawa and Y. Taya, *Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage*. EMBO J, 2007. **26**(8): p. 2083-93.
36. Macaluso, M., M. Montanari and A. Giordano, *Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes*. Oncogene, 2006. **25**(38): p. 5263-7.
37. Baker, D.J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N.K. LeBrasseur, B.G. Childs, B. van de Sluis, J.L. Kirkland and J.M. van Deursen, *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 232-6.
38. Coppe, J.P., C.K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D.P. Munoz, J. Goldstein, P.S. Nelson, P.Y. Desprez and J. Campisi, *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
39. Coppe, J.P., P.Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi, *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
40. Bavik, C., I. Coleman, J.P. Dean, B. Knudsen, S. Plymate and P.S. Nelson, *The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 794-802.
41. Coppe, J.P., K. Kauser, J. Campisi and C.M. Beausejour, *Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29568-74.
42. Laberge, R.M., P. Awad, J. Campisi and P.Y. Desprez, *Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts*. Cancer Microenviron, 2012. **5**(1): p. 39-44.
43. Freund, A., A.V. Orjalo, P.Y. Desprez and J. Campisi, *Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences*. Trends Mol Med, 2010. **16**(5): p. 238-46.
44. Kortlever, R.M. and R. Bernards, *Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection*. Cell Cycle, 2006. **5**(23): p. 2697-703.
45. Carmeliet, P., L. Moons, M. Dewerchin, S. Rosenberg, J.M. Herbert, F. Lupu and D. Collen, *Receptor-independent role of urokinase-type plasminogen activator in*

- pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice.* J Cell Biol, 1998. **140**(1): p. 233-45.
46. Krizhanovsky, V., M. Yon, R.A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender and S.W. Lowe, *Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis.* Cell, 2008. **134**(4): p. 657-67.
47. Jun, J.I. and L.F. Lau, *The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(7): p. 676-85.
48. Sagiv, A. and V. Krizhanovsky, *Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program.* Biogerontology, 2013. **14**(6): p. 617-28.
49. Gasser, S., S. Orsulic, E.J. Brown and D.H. Raulet, *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor.* Nature, 2005. **436**(7054): p. 1186-90.
50. Coppe, J.P., F. Rodier, C.K. Patil, A. Freund, P.Y. Desprez and J. Campisi, *Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype.* J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36396-403.
51. Freund, A., C.K. Patil and J. Campisi, *p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype.* EMBO J, 2011. **30**(8): p. 1536-48.
52. Guo, H., Z. Liu, B. Xu, H. Hu, Z. Wei, Q. Liu, X. Zhang, X. Ding, Y. Wang, M. Zhao, Y. Gong and C. Shao, *Chemokine receptor CXCR2 is transactivated by p53 and induces p38-mediated cellular senescence in response to DNA damage.* Aging Cell, 2013.
53. Zhu, K.Q. and S.J. Zhang, *Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G1-S arrest.* World J Gastroenterol, 2003. **9**(9): p. 2073-7.
54. Salminen, A., A. Kauppinen and K. Kaarniranta, *Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP).* Cell Signal, 2012. **24**(4): p. 835-45.
55. Sunnarborg, S.W., C.L. Hinkle, M. Stevenson, W.E. Russell, C.S. Raska, J.J. Peschon, B.J. Castner, M.J. Gerhart, R.J. Paxton, R.A. Black and D.C. Lee, *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability.* J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12838-45.

56. Busser, B., L. Sancey, E. Brambilla, J.L. Coll and A. Hurbin, *The multiple roles of amphiregulin in human cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1816**(2): p. 119-31.
57. George, A.J., R.D. Hannan and W.G. Thomas, *Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches*. *FEBS J*, 2013. **280**(21): p. 5258-68.
58. Moss, M.L., S.L. Jin, M.E. Milla, D.M. Bickett, W. Burkhart, H.L. Carter, W.J. Chen, W.C. Clay, J.R. Didsbury, D. Hassler, C.R. Hoffman, T.A. Kost, M.H. Lambert, M.A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L.K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.L. Su and J.D. Becherer, *Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha*. *Nature*, 1997. **385**(6618): p. 733-6.
59. Klein, T. and R. Bischoff, *Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(1): p. 17-33.
60. Suntravat, M., Y. Jia, S.E. Lucena, E.E. Sanchez and J.C. Perez, *cDNA cloning of a snake venom metalloproteinase from the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*), and the expression of its disintegrin domain with anti-platelet effects*. *Toxicon*, 2013. **64**: p. 43-54.
61. Calvete, J.J., *The continuing saga of snake venom disintegrins*. *Toxicon*, 2013. **62**: p. 40-9.
62. Gonzales, P.E., A. Solomon, A.B. Miller, M.A. Leesnitzer, I. Sagi and M.E. Milla, *Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(30): p. 31638-45.
63. Leonard, J.D., F. Lin and M.E. Milla, *Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch*. *Biochem J*, 2005. **387**(3): p. 797-805.
64. Schwarz, J., C. Broder, A. Helmstetter, S. Schmidt, I. Yan, M. Muller, D. Schmidt-Arras, C. Becker-Pauly, F. Koch-Nolte, H.W. Mittrucker, B. Rabe, S. Rose-John and A. Chalaris, *Short-term TNFalpha shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3355-67.
65. Edwards, D.R., M.M. Handsley and C.J. Pennington, *The ADAM metalloproteinases*. *Mol Aspects Med*, 2008. **29**(5): p. 258-89.

66. Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John, *ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 380-7.
67. Willems, S.H., C.J. Tape, P.L. Stanley, N.A. Taylor, I.G. Mills, D.E. Neal, J. McCafferty and G. Murphy, *Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17*. Biochem J, 2010. **428**(3): p. 439-50.
68. Lorenzen, I., J. Lokau, S. Düsterhoft, A. Trad, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John and J. Grötzinger, *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): p. 1093-100.
69. Lorenzen, I., A. Trad and J. Grötzinger, *Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(2): p. 330-6.
70. Seals, D.F. and S.A. Courtneidge, *The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 7-30.
71. Soond, S.M., B. Everson, D.W. Riches and G. Murphy, *ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking*. J Cell Sci, 2005. **118**(11): p. 2371-80.
72. Xu, P. and R. Derynck, *Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation*. Mol Cell, 2010. **37**(4): p. 551-66.
73. Reddy, P., J.L. Slack, R. Davis, D.P. Cerretti, C.J. Kozlosky, R.A. Blanton, D. Shows, J.J. Peschon and R.A. Black, *Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14608-14.
74. Le Gall, S.M., T. Maretzky, P.D. Issuree, X.D. Niu, K. Reiss, P. Saftig, R. Khokha, D. Lundell and C.P. Blobel, *ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site*. J Cell Sci, 2010. **123**(22): p. 3913-22.
75. Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March and R.A. Black, *An essential role for ectodomain shedding in mammalian development*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1281-4.
76. Smalley, D.M. and K. Ley, *L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(2): p. 255-66.

77. Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March and D.P. Cerretti, *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
78. Bell, J.H., A.H. Herrera, Y. Li and B. Walcheck, *Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF-alpha and its receptors by neutrophils and macrophages*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(1): p. 173-6.
79. Waetzig, G.H., P. Rosenstiel, A. Arlt, A. Till, K. Brautigam, H. Schafer, S. Rose-John, D. Seegert and S. Schreiber, *Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 91-3.
80. Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John, *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
81. Hartmann, M., A. Herrlich and P. Herrlich, *Who decides when to cleave an ectodomain?* Trends Biochem Sci, 2013. **38**(3): p. 111-20.
82. Adrain, C., M. Zettl, Y. Christova, N. Taylor and M. Freeman, *Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE*. Science, 2012. **335**(6065): p. 225-8.
83. Xu, P., J. Liu, M. Sakaki-Yumoto and R. Derynck, *TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association*. Sci Signal, 2012. **5**(222): p. ra34.
84. Gooz, P., Y. Dang, S. Higashiyama, W.O. Twal, C.J. Haycraft and M. Gooz, *A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by alpha5beta1 integrin in kidney mesangial cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33350.
85. Gutierrez-Lopez, M.D., A. Gilsanz, M. Yanez-Mo, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Dominguez, P.N. Monk, I. Gonzalez-Alvaro, F. Sanchez-Madrid and C. Cabanas, *The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(19): p. 3275-92.
86. Düsterhoft, S., S. Jung, C.W. Hung, A. Tholey, F.D. Sönnichsen, J. Grötzinger and I. Lorenzen, *Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(15): p. 5776-81.

87. Brill, A., A.K. Chauhan, M. Canault, M.T. Walsh, W. Bergmeier and D.D. Wagner, *Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 137-44.
88. Wang, Y., A.H. Herrera, Y. Li, K.K. Belani and B. Walcheck, *Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2449-57.
89. Christian, L.M., *The ADAM family: Insights into Notch proteolysis*. Fly (Austin), 2012. **6**(1): p. 30-4.
90. Jung, S.M., M. Moroi, K. Soejima, T. Nakagaki, Y. Miura, M.C. Berndt, E.E. Gardiner, J.M. Howes, N. Pugh, D. Bihan, S.P. Watson and R.W. Farndale, *Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood*. J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 30000-13.
91. Gardiner, E.E., J.F. Arthur, M.L. Kahn, M.C. Berndt and R.K. Andrews, *Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3611-7.
92. Bender, M., S. Hofmann, D. Stegner, A. Chalaris, M. Bosl, A. Braun, J. Scheller, S. Rose-John and B. Nieswandt, *Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases*. Blood, 2010. **116**(17): p. 3347-55.
93. Nakayama, H., S. Fukuda, H. Inoue, H. Nishida-Fukuda, Y. Shirakata, K. Hashimoto and S. Higashiyama, *Cell surface annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(10): p. 1964-75.
94. Kahn, J., B. Walcheck, G.I. Migaki, M.A. Jutila and T.K. Kishimoto, *Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism*. Cell, 1998. **92**(6): p. 809-18.
95. Canobbio, I., S. Catricala, C. Balduini and M. Torti, *Calmodulin regulates the non-amyloidogenic metabolism of amyloid precursor protein in platelets*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(3): p. 500-6.
96. Lambert, D.W., N.E. Clarke, N.M. Hooper and A.J. Turner, *Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain*. FEBS Lett, 2008. **582**(2): p. 385-90.
97. Mou, P., Z. Zeng, Q. Li, X. Liu, X. Xin, K.M. Wannemacher, C. Ruan, R. Li, L.F. Brass and L. Zhu, *Identification of a calmodulin-binding domain in Sema4D that regulates its exodomain shedding in platelets*. Blood, 2013. **121**(20): p. 4221-30.

98. Möller-Hackbarth, K., C. Dewitz, O. Schweigert, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John and J. Scheller, *A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 Are Major Sheddases of T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3 (Tim-3)*. J Biol Chem, 2013. **288**(48): p. 34529-44.
99. Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara and H. Saya, *Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation*. J Cell Biol, 2004. **165**(6): p. 893-902.
100. Tellier, E., M. Canault, L. Rebsomen, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, G. Nalbone and F. Peiretti, *The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts*. Exp Cell Res, 2006. **312**(20): p. 3969-80.
101. Killock, D.J., M. Parsons, M. Zarrouk, S.M. Ameer-Beg, A.J. Ridley, D.O. Haskard, M. Zvelebil and A. Ivetic, *In Vitro and in Vivo Characterization of Molecular Interactions between Calmodulin, Ezrin/Radixin/Moesin, and L-selectin*. J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8833-45.
102. Darmellah, A., A. Rayah, R. Auger, M.H. Cuif, M. Prigent, M. Arpin, A. Alcover, C. Delarasse and J.M. Kanellopoulos, *Ezrin/radixin/moesin are required for the purinergic P2X7 receptor (P2X7R)-dependent processing of the amyloid precursor protein*. J Biol Chem, 2012. **287**(41): p. 34583-95.
103. Killock, D.J. and A. Ivetic, *The cytoplasmic domains of TNFalpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding*. Biochem J, 2010. **428**(2): p. 293-304.
104. Yanez-Mo, M., F. Sanchez-Madrid and C. Cabanas, *Membrane proteases and tetraspanins*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(2): p. 541-6.
105. Higashiyama, S., R. Iwamoto, K. Goishi, G. Raab, N. Taniguchi, M. Klagsbrun and E. Mekada, *The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor*. J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 929-38.
106. Shi, M., K. Dennis, J.J. Peschon, R. Chandrasekaran and K. Mikecz, *Antibody-induced shedding of CD44 from adherent cells is linked to the assembly of the cytoskeleton*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 123-31.
107. Middelhoven, P.J., J.D. van Buul, M. Kleijer, D. Roos and P.L. Hordijk, *Actin polymerization induces shedding of FcgammaRIIb (CD16) from human neutrophils*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(3): p. 568-74.

108. Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.J. Kallen and S. Rose-John, *Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38829-39.
109. Kuper, C., H. Bartels, M.L. Fraek, F.X. Beck and W. Neuhofer, *Ectodomain shedding of pro-TGF-alpha is required for COX-2 induction and cell survival in renal medullary cells exposed to osmotic stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(6): p. C1971-82.
110. Chalaris, A., B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C.A. Fielding, S.A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller, *Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1748-55.
111. Jones, S.A., S. Horiuchi, D. Novick, N. Yamamoto and G.M. Fuller, *Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3514-22.
112. Sengstake, S., E.M. Boneberg and H. Illges, *CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs*. Int Immunol, 2006. **18**(7): p. 1171-8.
113. Ohtsu, H., P.J. Dempsey and S. Eguchi, *ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(1): p. C1-10.
114. Kenchappa, R.S., C. Tep, Z. Korade, S. Urrea, F.C. Bronfman, S.O. Yoon and B.D. Carter, *p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17*. J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 20358-68.
115. Niu, A., Y. Wen, H. Liu, M. Zhan, B. Jin and Y.P. Li, *Src mediates the mechanical activation of myogenesis by activating TNFalpha-converting enzyme*. J Cell Sci, 2013. **126**(19): p. 4349-57.
116. Liu, X., H. Hwang, L. Cao, D. Wen, N. Liu, R.M. Graham and M. Zhou, *Release of the neuregulin functional polypeptide requires its cytoplasmic tail*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34335-40.
117. Ivetic, A., O. Florey, J. Deka, D.O. Haskard, A. Ager and A.J. Ridley, *Mutagenesis of the ezrin-radixin-moesin binding domain of L-selectin tail affects shedding*,

- microvillar positioning, and leukocyte tethering.* J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33263-72.
118. Thabard, W., M. Collette, R. Bataille and M. Amiot, *Protein kinase C delta and eta isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor alpha in myeloma cells.* Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 193-200.
119. Kveiborg, M., R. Instrell, C. Rowlands, M. Howell and P.J. Parker, *PKCalpha and PKCdelta regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding of heparin binding-EGF through separate pathways.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17168.
120. Dang, M., K. Dubbin, A. D'Aiello, M. Hartmann, H. Lodish and A. Herrlich, *Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate-specific a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus.* J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 17704-13.
121. Esper, R.M. and J.A. Loeb, *Neurotrophins induce neuregulin release through protein kinase Cdelta activation.* J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26251-60.
122. Wheeler, D.L., K.J. Ness, T.D. Oberley and A.K. Verma, *Protein kinase Cepsilon is linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor-alpha ectodomain shedding and the development of metastatic squamous cell carcinoma in protein kinase Cepsilon transgenic mice.* Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6547-55.
123. Gschwind, A., S. Hart, O.M. Fischer and A. Ullrich, *TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells.* EMBO J, 2003. **22**(10): p. 2411-21.
124. Garbers, C., N. Janner, A. Chalaris, M.L. Moss, D.M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John and J. Scheller, *Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding.* J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 14804-11.
125. Ludwig, A., C. Hundhausen, M.H. Lambert, N. Broadway, R.C. Andrews, D.M. Bickett, M.A. Leesnitzer and J.D. Becherer, *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): p. 161-71.
126. Tape, C.J., S.H. Willems, S.L. Dombernowsky, P.L. Stanley, M. Fogarasi, W. Ouwehand, J. McCafferty and G. Murphy, *Cross-domain inhibition of TACE ectodomain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5578-83.

127. Trad, A., N. Hedemann, M. Shomali, V. Pawlak, J. Grötzinger and I. Lorenzen, *Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17*. J Immunol Methods, 2011. **371**(1-2): p. 91-6.
128. Yamamoto, K., A. Trad, A. Baumgart, L. Huske, I. Lorenzen, A. Chalaris, J. Grötzinger, T. Dechow, J. Scheller and S. Rose-John, *A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell-mediated lysis of prostate cancer cells*. Biochem J, 2012. **445**(1): p. 135-44.
129. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
130. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
131. Wang, Y., G. Blandino and D. Givol, *Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin*. Oncogene, 1999. **18**(16): p. 2643-9.
132. Debacq-Chainiaux, F., J.D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint, *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
133. von der Heyde, J., *Exosomale Sekretion und limitierte Proteolyse als Mechanismen zur Generierung löslicher Formen von Transmembranproteinen*. Masterarbeit am Biochemischen Institut der CAU Kiel, 2013.
134. Ogura, N., U. Matsuda, F. Tanaka, Y. Shibata, H. Takiguchi and Y. Abiko, *In vitro senescence enhances IL-6 production in human gingival fibroblasts induced by lipopolysaccharide from Campylobacter rectus*. Mech Ageing Dev, 1996. **87**(1): p. 47-59.
135. Slee, E.A., H. Zhu, S.C. Chow, M. MacFarlane, D.W. Nicholson and G.M. Cohen, *Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32*. Biochem J, 1996. **315**(1): p. 21-4.
136. Wesierska-Gadek, J., M. Gueorguieva, J. Wojciechowski and S. Tudzarova-Trajkovska, *In vivo activated caspase-3 cleaves PARP-1 in rat liver after administration of the hepatocarcinogen N-nitrosomorpholine (NNM) generating the 85 kDa fragment*. J Cell Biochem, 2004. **93**(4): p. 774-87.

137. Hawari, F.I., F.N. Rouhani, X. Cui, Z.X. Yu, C. Buckley, M. Kaler and S.J. Levine, *Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1297-302.
138. Xu, D. and H. Tahara, *The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(3): p. 368-75.
139. Rasmussen, H.S. and P.P. McCann, *Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat*. Pharmacol Ther, 1997. **75**(1): p. 69-75.
140. Sinnathamby, G., J. Zerfass, J. Hafner, P. Block, Z. Nickens, A. Hobeika, A.A. Secord, H.K. Lyerly, M.A. Morse and R. Philip, *ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17) is naturally processed through major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and is a potential immunotherapeutic target in breast, ovarian and prostate cancers*. Clin Exp Immunol, 2011. **163**(3): p. 324-32.
141. Kenny, P.A., *TACE: a new target in epidermal growth factor receptor dependent tumors*. Differentiation, 2007. **75**(9): p. 800-8.
142. Zhang, Y., Y. Gao, L. Zhao, L. Han, Y. Lu, P. Hou, X. Shi, X. Liu, B. Tian, X. Wang, B. Huang and J. Lu, *Mitogen-activated protein kinase p38 and retinoblastoma protein signalling is required for DNA damage-mediated formation of senescence-associated heterochromatic foci in tumour cells*. FEBS J, 2013. **280**(18): p. 4625-39.
143. Waas, W.F., H.H. Lo and K.N. Dalby, *The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5676-84.
144. Davies, S.P., H. Reddy, M. Caivano and P. Cohen, *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(1): p. 95-105.
145. Liu, C. and T.E. Hermann, *Characterization of ionomycin as a calcium ionophore*. J Biol Chem, 1978. **253**(17): p. 5892-4.
146. Moller-Hackbarth, K., C. Dewitz, O. Schweigert, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John and J. Scheller, *ADAM10 AND ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3)*. J Biol Chem, 2013.
147. Rebbaa, A., X. Zheng, P.M. Chou and B.L. Mirkin, *Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence*. Oncogene, 2003. **22**(18): p. 2805-11.

148. P, U.M., *Half-life measurements at the National Institute of Standards and Technology.*, in *Applied Radiation and Isotopes*. 2002. p. 125–130.
149. Abdisalaam, S., A.J. Davis, D.J. Chen and G. Alexandrakis, *Scanning fluorescence correlation spectroscopy techniques to quantify the kinetics of DNA double strand break repair proteins after gamma-irradiation and bleomycin treatment*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(1): p. e5.
150. Becker, D., A. Adhikary, S.T. Tetteh, A.W. Bull and M.D. Sevilla, *Kr-86 ion-beam irradiation of hydrated DNA: free radical and unaltered base yields*. *Radiat Res*, 2012. **178**(6): p. 524-37.
151. E, S. and H.E. O, *Radiation Produced Radicals*, in *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit* B. M and G. E, Editors. 2008, John Wiley & Sons, Inc.
152. Ronto, G., S. Gaspar, A. Fekete, T. Kerekgyarto, A. Berces and P. Grof, *Stability of nucleic acid under the effect of UV radiation*. *Adv Space Res*, 2002. **30**(6): p. 1533-8.
153. Constantinou, C., K.A. Papas and A.I. Constantinou, *Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy?* *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(6): p. 717-28.
154. Yewale, C., D. Baradia, I. Vhora, S. Patil and A. Misra, *Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies*. *Biomaterials*, 2013. **34**(34): p. 8690-707.
155. Yoda, M., T. Kimura, T. Tohmonda, H. Morioka, M. Matsumoto, Y. Okada, Y. Toyama and K. Horiuchi, *Systemic overexpression of TNFalpha-converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54412.
156. Diaz-Rodriguez, E., J.C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste and A. Pandiella, *Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(6): p. 2031-44.
157. Somwar, R., S. Koterski, G. Sweeney, R. Sciotti, S. Djuric, C. Berg, J. Trevillyan, P.E. Scherer, C.M. Rondinone and A. Klip, *A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(52): p. 50386-95.
158. Rodier, F., J.P. Coppe, C.K. Patil, W.A. Hoeijmakers, D.P. Munoz, S.R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A.R. Davalos and J. Campisi, *Persistent DNA damage signalling*

- triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 973-9.
159. Taniguchi, K., H. Kohsaka, N. Inoue, Y. Terada, H. Ito, K. Hirokawa and N. Miyasaka, *Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis*. Nat Med, 1999. **5**(7): p. 760-7.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE2	angiotensin 1 converting enzyme 2
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
APP	amyloid beta (A4) precursor protein
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	alternate reading frame
ATF2	activating transcription factor 2
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CCN1	CCN family member 1
CD	cluster of differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	complementary DNA
CHEK1/2	checkpoint kinase 1/2
ConA	Concanavalin A
Csf-1	colony stimulating factor 1
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-SCARS	DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence
EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-related kinase
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FCS	fetal calf serum

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
gp130	glykoprotein 130
GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptoren
GPVI	Thrombozyten-Rezeptor Glykoprotein VI
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HDM2	human double minute 2 homolog
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IGFBP7	insulin-like growth factor-binding protein 7
IL-6/8/15	interleukin 6/8/15
IL-6R	IL-6 receptor
JNK	JUN N-terminal kinase
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemoattractant proteins
MEK	MAPK/ERK Kinase
MIP	macrophage inflammatory proteins
MMP	matrix-metalloprotease
MPD	membranproximale Domäne
mRNA	messenger RNA
n.s.	nicht signifikant
NF- κ B	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PARP-1	poly(ADP-ribose)-polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate

POD	Peroxidase
pRB	retinoblastoma-associated protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPA	replication protein A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci
SAPK	stress-activated protein kinase
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SCC	squamous cell carcinoma
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis
SH3	Scr-homology 3
shRNA	short hairpin RNA
sIL-6R	löslicher IL-6-Rezeptor
Src	sarcoma
sTNFR1/2	soluble tumor necrosis factor receptor 1/2
TACE	tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGF- α	transforming growth factor alpha
TIM-3	T cell immunoglobulin and mucin domain 3
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinases 3
TNFR1/2	tumor necrosis factor receptor 1/2
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TR	telomerase RNA
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor

8.2 Vektorinformationen pGIPZ

Für eine stabile Transfektion einer gegen die mRNA von ADAM17 gerichteten shRNA in PC-3-Zellen wurde das pGIPZ-Vektorsystem von Thermo Scientific verwendet. Die für die shRNA kodierende Sequenz war bereits in dem verwendeten Vektor enthalten. Die mit diesem Vektor durchgeführten Experimente sind in 4.6 und 4.7 näher beschrieben.

Alle im Anhang unter 8.2 gezeigten Abbildungen, Informationen und Sequenzen stammen von der Internetseite des Herstellers und wurden unverändert übernommen.

<http://www.thermoscientificbio.com/shrna/gipz-lentiviral-shrna/>

<http://www.thermoscientificbio.com/vectorMap/?name=pGIPZ>

Zugriff erfolgte am 20.10.2013

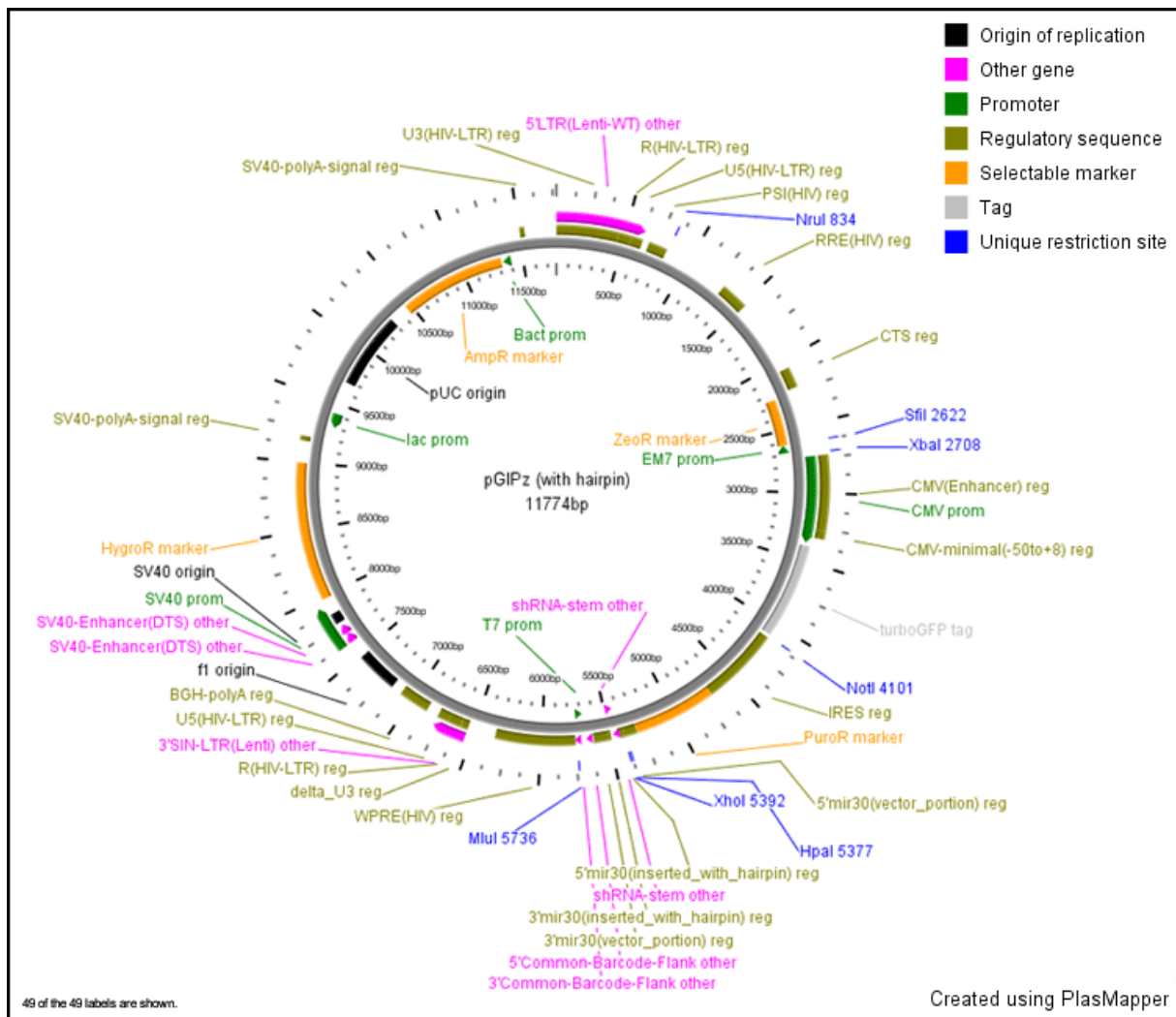
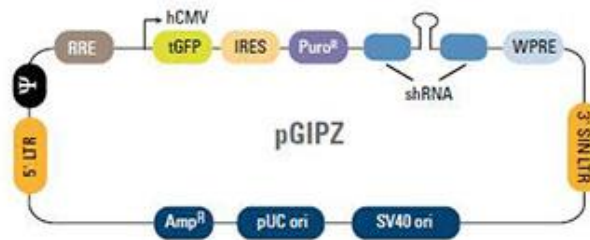


Abbildung 35: Plasmidkarte des pGIPZ-Vektors

Quelle: <http://www.thermoscientificbio.com/vectorMap/?name=pGIPZ>; Zugriff erfolgte am 20.10.2013.



Vector Element	Utility
hCMV	Human cytomegalovirus promoter drives strong transgene expression
tGFP	TurboGFP reporter for visual tracking of transduction and expression
Puro ^R	Puromycin resistance permits antibiotic-selective pressure and propagation of stable integrants
IRES	Internal ribosomal entry site allows expression of TurboGFP and puromycin resistance genes in a single transcript
shRNA	microRNA-adapted shRNA (based on miR-30) for gene knockdown
5' LTR	5' long terminal repeat
3' SIN LTR	3' self-inactivating long terminal repeat for increased lentivirus safety
Ψ	Psi packaging sequence allows viral genome packaging using lentiviral packaging systems
RRE	Rev response element enhances titer by increasing packaging efficiency of full-length viral genomes
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element enhances transgene expression in the target cells

Abbildung 36: Schematische Darstellung der im pGIPZ-Vektor enthaltenen Elemente

Quelle: http://www.thermoscientificbio.com/uploadedImages/Products/shRNA/Lentiviral_shRNA/pGIPZ%20vector%20cartoon.jpg; Zugriff erfolgte am 20.10.2013.

8.2.1 Übersicht der im pGIPZ-Vektor enthaltenen Elemente

FEATURES	Location/Qualifiers
Regulatory_Seq	1..455 /gene="U3 (HIV-LTR) reg"
Other Gene	1..635 /gene="5' LTR (Lenti-WT) other"
Regulatory_Seq	456..550 /gene="R (HIV-LTR) reg"
Regulatory_Seq	551..635 /gene="U5 (HIV-LTR) reg"
Regulatory_Seq	685..822 /gene="PSI (HIV) reg"
misc_binding	831..836 /dbxref="REBASE:NruI"
Regulatory_Seq	1314..1518 /gene="RRE (HIV) reg"
Regulatory_Seq	2064..2214 /gene="CTS reg"
Marker	2245..2619 /gene="ZeoR marker"
misc_binding	2614..2626 /dbxref="REBASE:SfiI"
Promoter	2620..2683 /gene="EM7 prom"

```

misc_binding      2707..2712
                  /dbxref="REBASE:XbaI"
Promoter          2731..3366
                  /gene="CMV prom"
Regulatory_Seq   2731..3262
                  /gene="CMV(Enhancer) reg"
Regulatory_Seq   3263..3320
                  /gene="CMV-minimal(-50to+8) reg"
Tag               3390..4088
                  /gene="turboGFP tag"
misc_binding      4099..4106
                  /dbxref="REBASE:NotI"
Regulatory_Seq   4114..4689
                  /gene="IRES reg"
Marker            4690..5292
                  /gene="PuroR marker"
Regulatory_Seq   5296..5390
                  /gene="5'mir30(vector_portion) reg"
misc_binding      5374..5379
                  /dbxref="REBASE:HpaI"
Regulatory_Seq   5391..5423
                  /gene="5'mir30(inserted_with_hairpin) reg"
misc_binding      5391..5396
                  /dbxref="REBASE:XhoI"
Other Gene        5424..5445
                  /gene="shRNA-stem other"
Other Gene        5465..5486
                  /gene="shRNA-stem other"
Regulatory_Seq   5487..5506
                  /gene="3'mir30(inserted_with_hairpin) reg"
Regulatory_Seq   5507..5614
                  /gene="3'mir30(vector_portion) reg"
Other Gene        5626..5646
                  /gene="5'Common-Barcode-Flank other"
Other Gene        5707..5729
                  /gene="3'Common-Barcode-Flank other"
Promoter          5710..5729
                  /gene="T7 prom"
misc_binding      5735..5736
                  /dbxref="REBASE:MluI"
Regulatory_Seq   5749..6337
                  /gene="WPRE(HIV) reg"
Regulatory_Seq   6544..6596
                  /gene="delta_U3 reg"
Other Gene        6544..6779
                  /gene="3'SIN-LTR(Lenti) other"
Regulatory_Seq   6599..6693
                  /gene="R(HIV-LTR) reg"
Regulatory_Seq   6694..6778
                  /gene="U5(HIV-LTR) reg"
Regulatory_Seq   6868..7091
                  /gene="BGH-polyA reg"
Rep_Origin        7171..7477
                  /gene="f1 origin"
Promoter          7609..7930
                  /gene="SV40 prom"
Other Gene        7609..7680
                  /gene="SV40-Enhancer(DTS) other"
Other Gene        7681..7752
                  /gene="SV40-Enhancer(DTS) other"
Rep_Origin        7776..7853
                  /gene="SV40 origin"

```

```

Marker          7979..8996
                /gene="HygroR marker"
Regulatory_Seq 9160..9194
                /gene="SV40-polyA-signal reg"
Promoter        9304..9419
                /gene="lac prom"
Rep_Origin      9686..10305
                /gene="pUC origin"
Marker          10460..11320
                /gene="AmpR marker"
Promoter        11362..11400
                /gene="Bact prom"
Regulatory_Seq 11504..11538
                /gene="SV40-polyA-signal reg"
    
```

8.2.2 Sequenz des pGIPZ-Vektors

ORIGIN

```

1  tggaagggct aattcactcc caaagaagac aagatatacct tgatctgtgg atctaccaca
61  cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggggtc agatatccac
121 tgacctttgg atgggtgctac aagctagtac cagttgagcc agataaggta gaagaggcca
181 ataaaggaga gaaccaccagc ttgttacacc ctgtgagcct gcatgggatg gatgaccagg
241 agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac gtggccccgag
301 agctgcatcc ggagtacttc aagaactgct gatatcgagc ttgtacaag ggactttccg
361 ctggggactt tccagggagg cgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat
421 cctgcatata agcagctgct ttttgctgtg actgggtctc tctggttaga ccagatctga
481 gcctgggagc tctctggcta actaggggac ccactgctta agcctcaata aagcttgctc
541 tgagtgtctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc
601 agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaaag
661 cgaaagggaa accagaggag ctctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg
721 caagaggcga ggggaggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga
781 aggagagaga tgggtgagag agcgtcagta ttaagcgggg gagaattaga tgcgatggg
841 aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg
901 caagcaggga gctagaacga ttgcagttta atcctggcct gttagaacaa tcagaaggct
961 gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat
1021 cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca
1081 ccaaggaagc ttagacaagc atagaggaag agcaaaacaa aagtaagacc accgcacagc
1141 aagcggccgg ccgctgatct tcagacctgg aggaggagat atgagggaca attggagaag
1201 tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc
1261 aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag agcagtggga ataggagctt tgttccttgg
1321 gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg cgcagcgtca atgacgctga cggtacaggc
1381 cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca gcagaacaat ttgtgaggg ctattgaggc
1441 gcaacagcat ctggtgcaac tcacagtctg gggcatcaag cagctccagg caagaatcct
1501 ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctgggg atttggggtt gctctggaaa
1561 actcatttgc accactgctg tgccctggaa tgctagtgg agtaataaat ctctggaaca
1621 gatttggaat cacacgacct ggatggagtg ggacagagaa attaacaatt acacaagctt
1681 aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt
1741 ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac ataacaatt ggctgtggta
1801 tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttggtaggt ttaagaatag tttttgctgt
1861 actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca ttatcgttc agaccacct
1921 cccaaccccg aggggaccog acaggcccga aggaatagaa gaagaagggt gagagagaga
1981 cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atcggcactg cgtgcgcaa ttctgcagac
2041 aatggcagc attcatccac aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag
2101 gggaaagaat agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa
2161 ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt acagggacag cagagatcca gtttggttag
2221 taccgggccc gctctagtc ggaatcagtc ctgctcctcg gccacgaagt gcacgcagtt
2281 gccggccggg tcgcgcaggg cgaactccc cccccacggc tgctcgccga tctcggtcat
2341 ggccggcccg gaggcgtccc ggaagttcgt ggacacgacc tccgaccact cggcgtacag
2401 ctgctccagg ccgcgcaccc acaccaggc caggtgttg tccggcacca cctggtcctg
    
```

2461 gaccgcgctg atgaacaggg tcacgtcgtc ccggaccaca ccggcgaagt cgtcctccac
 2521 gaagtcccgg gagaaccgga gccggtcggt ccagaactcg accgctccgg cgacgtcgcg
 2581 cgcggtgagc accggaacgg cactgggtcaa cttggccatg gtggccctcc tatagtgagt
 2641 cgtattatac tatgccgata tactatgccg atgattaatt gtcaaacacgt gctgcaggtc
 2701 cgaggttcta gacgtattac cgccatgcat tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc
 2761 attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc
 2821 tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt
 2881 aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca
 2941 cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg
 3001 taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca
 3061 gtacatctac gtattagtca togtattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa
 3121 tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctcccaccca ttgacgtcaa
 3181 tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtg acaactccgc
 3241 cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg
 3301 tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag
 3361 acaccgactc tactagagga tctgccacca tggagagcga cgagagcggc ctgcccgcca
 3421 tggagatcga gtgccgcac accggcacc tgaacggcgt ggagtctgag ctggtgggcg
 3481 gcgagagagg ccccccgag cagggccgca tgaccaaaa gatgaagagc accaaaggcg
 3541 ccctgacctt cagcccctac ctgctgagcc acgtgatggg ctacggcttc taccacttcg
 3601 gcacctacc cagcggctac gagaaccct tctgcacgc catcaacaac ggcggtaca
 3661 ccaacacccg catcgagaag tacgaggacg gcggcgtgct gcacgtgagc ttcagctacc
 3721 gctacgaggc cggccgcgtg atcggcgact tcaaggatgat gggcaccggc tccccgagg
 3781 acagcgtgat cttcacggac aagatcatcc gcagcaacgc caccgtggag cacctgcacc
 3841 ccatgggcca taacgatctg gatggcagct tccccgcac cttcagcctg cgcgacggcg
 3901 gctactacag ctccgtgggtg gacagccaca tgcacttcaa gagcgccatc caccacgca
 3961 tcttgacaga cggggggcccc atgttcgctc tccgcccgtg ggaggaggat cacagcaaca
 4021 cctgactggg catcgtggag taccagcagc cttcaagac cccggatgca gatgccggtg
 4081 aagaataatg tacaagtac ggcgcgcaat tccgcccctc tcccctcccc ccccctaacg
 4141 ttactggccg aagcgccttg gaataaggcc ggtgtgctgt tgtctatatg ttattttcca
 4201 ccatattgcc gtctttttggc aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc ttcttgacga
 4261 gcattcctag gggctcttcc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg aatgtcgtga
 4321 aggaagcagt tctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtagcg accctttgca
 4381 ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag
 4441 atacacctgc aaaggcggca caacccagc gccacgttg gagttggata gttgtgaaa
 4501 gagtcaaatg gctctctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtac
 4561 cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtca
 4621 ggttaaaaaa acgtctaggg cccccgaacc acggggacgt ggttttctt tgaaaaacac
 4681 gataatacca tggccaccga gtacaagccc acgggtgcgc tgcgccaccg cgacgacgtc
 4741 ccccgggccg tacgcaccct cgccgcggcg ttcggcgact accccgccac gcgccacacc
 4801 gtcgaccgg accgcccacat cgagcggggtc accgagctgc aagaactctt cctcacgcgc
 4861 gtcgggctcg acatcggcaa ggtgtgggtc gcggacgacg gcgcccgggt ggcggtctgg
 4921 accacgcgg agagcgtcga agcggggggcg gtgttcgcc agatcggctc gcgcatggcc
 4981 gagttgagcg gttcccggct ggcgcgcag caacagatgg aaggcctcct ggcgcgcac
 5041 cggcccaagg agcccgcgtg gttcctggcc accgtcggcg tctcgcgcca ccaccagggc
 5101 aagggctctg gcagcgcctg cgtgctccc ggagtggagg cggccgagcg cgtcggggtg
 5161 cccgccttcc tggagacctc cgcgccccgc aacctcccct tctacgagcg gctcggcttc
 5221 accgtcaccg ccgacgtcga ggtgcccga ggaccgcgca cctgggtgcat gaccgcgaag
 5281 cccggtgctt gagtttgttt gaatgaggct tcagtacttt acagaatcgt tgccctgaca
 5341 tcttggaaac acttgcctggg attacttctt caggttaacc caacagaagg ctcgagaagg
 5401 tatattgctg ttgacagtga gcgcagcagc agcagcagca gcagcatgtg aagccacaga
 5461 tgtagctgct gctgctgctg ctgctgtgcc tactgcctcg gaattcaagg ggctacttta
 5521 ggagcaatta tcttgtttac taaaactgaa taccttgcta tctctttgat acatttttac
 5581 aaagctgaat taaaatggta taaattaaat cacttttttc aattggaaga ctaatgcggc
 5641 cggccattac tccgtctcgt gtcttggtgc atatgtctgc tggtttgttt gatgtgtttt
 5701 gcgggcccgg cctatagtga gtcgtattac ctaggacgcg tctggaacaa tcaacctctg
 5761 gattacaaaa tttgtgaaag attgactggg attcttaact atggtgctcc ttttacgcta
 5821 tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat ggctttcatt
 5881 ttctcctcct tgtataaaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg gcccgttgtc
 5941 aggcaacgtg gcgtgggtgt cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt
 6001 gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc cctccctat tgccacggcg
 6061 gaactcatcg ccgctgctt tgcccgtgc tggacagggg ctcggtgctt gggcactgac
 6121 aattccgctg tgttgcggg gaagctgacg tcttttccat ggctgctcgc ctgtgttgc

6181 acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcggac
6241 cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgccct
6301 cagacgagtc ggatctccct ttgggcccgc tccccgcctg gaattaattc tgcagtcgag
6361 acctagaaaa acatggagca atcacaagta gcaatacagc agctaccaat gctgattgtg
6421 cctggctaga agcacaagag gaggaggagg tgggttttcc agtcacacct caggtacctt
6481 taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaagaggg
6541 gactggaagg gctaattcac tcccacgaa gacaagatct gctttttgct tgtactgggt
6601 ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg aaccactgc
6661 ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgccctg ctgttgtgtg
6721 actctggtaa ctagagatcc ctgagacct tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagta
6781 gtagttcatg tcatcttatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga
6841 gtgagaggcc ttgacattgt ttaaaccgcg tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgtc
6901 cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg tgcactccc
6961 actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct
7021 attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg
7081 catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct
7141 aggggggtatc cccacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg
7201 cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcggccg ctcccttcgc tttcttcct
7261 tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta
7321 gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggatggt
7381 tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtccacg
7441 ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat
7501 tcttttgatt tataagggat tttgcccatt tccggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt
7561 taacaaaaat ttaacgcgaa ttaattctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt
7621 ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca
7681 ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatc catctcaatt
7741 agtcgcaaac catagtcctc ccctaactc cggccatccc gcccctaact ccgcccagtt
7801 ccgcccattc tccgcccatt ggtgactaa tttttttat ttatgcagag gccgagggccg
7861 cctctgcctc tgagctatcc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt
7921 gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca ttttcggatc tgatcagcac gtgatgaaaa
7981 agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agtttctgat cgaaaagttc gacagcgtct
8041 ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctctgctc tttcagcttc gatgtaggag
8101 ggcgtggata tgtcctgogg gtaaatagct gcgccgatgg tttctacaaa gatcgttatg
8161 tttatcggca ctttgcatcg gccgcgctcc cgattccgga agtgcttgac attggggaat
8221 tcagcgagag cctgacctat tgcactccc gccgtgcaca ggggtgcacg ttgcaagacc
8281 tgcctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggctgc ggaggccatg gatgcgatcg
8341 ctgcccgcga tcttagccag acgagcgggt tccggcccatt cggaccgcaa ggaatcggtc
8401 aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga tccccatgtg tatcactggc
8461 aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgctg ccgctcgcgca ggctctcgat gagctgatgc
8521 tttgggcccga ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca
8581 atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga ctggagcag gcgatggtcg
8641 gggattccca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag gccgtggttg gcttgtatgg
8701 agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc atccggagct tgcaggatcg ccgcggtcc
8761 gggcgtatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca gagcttggtt gacggcaatt
8821 tcgatgtgac agcttgggcg cagggtcgat gcgacgcaat cgtccgatcc ggagccggga
8881 ctgtcgggcg tacacaaatc gccgcgaaa gcgcggccgt ctggaccgat ggctgttag
8941 aagtactcgc cgatagtgga aaccgacgcc ccagcactcg tccgagggca aaggaatagc
9001 acgtgctacg agatttcgat tccaccgccc ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg
9061 ttttccggga cgcggctgg atgatoctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg
9121 cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia
9181 atttcacaaa taaagcattt ttttactgac attctagttg tggtttgtcc aaactcatca
9241 atgtatctta tcatgtctgt ataccgtcga cctctagcta gagcttggcg taatcatggt
9301 catagctggt tctgtgtgga aattgttata cgctcacaat tccacacaa atacgagccg
9361 gaagcataaaa gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgctg
9421 tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg
9481 gccaacgcgc ggggagagge ggtttgcgta ttgggcgctc tccgcttcc tcgctcactg
9541 actcgtcgtc ctcggtcgtt cggtcgggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa
9601 tacggttata cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc
9661 aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc
9721 ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaaccg acaggactat
9781 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgctg ctctcctgtt ccgaccctgc
9841 cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct

9901 cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg tcggttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg
9961 aaccccccggt tcagccccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc
10021 cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga
10081 ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggcc taactacggc tacactagaa
10141 gaacagttatt tgggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta
10201 gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtgg tttttttggt tgcaagcagc
10261 agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg
10321 acgctcagtg gaacgaaaa tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga
10381 tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg
10441 agtaaacttg gtctgacagt tacciaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgtatc
10501 gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg
10561 agggccttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc
10621 cagattttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa
10681 ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc
10741 cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt
10801 cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc
10861 ccatgtttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc gatcgttgtc agaagtaagt
10921 tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc
10981 catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt
11041 gtatgccccg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata
11101 gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga
11161 tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcaccaaac tgatcttcag
11221 catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa
11281 aaaaggggat aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatatt
11341 attgaagcat ttatcagggg tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga
11401 aaaataaaca aataggggtt ccgcgacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtcgacg
11461 gatcggggaga tcaacttggt tattgcagct tataatgggt acaataaag caatagcatc
11521 acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtgggtt gtccaaactc
11581 atcaatgtat cttatcatgt ctggatcaac tggataactc aagctaacca aaatcatccc
11641 aaacttccca ccccatacc tattaccact gcccaattacc tgtggtttca tttactctaa
11701 acctgtgatt cctctgaatt attttcattt taaagaaatt gtatttgtta aatatgtact
11761 acaaacttag tagt

9. Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller danken, der mir die Möglichkeit, eine Promotionsarbeit anzufertigen, gab, auch wenn er mich nicht bis zum Abschluss begleiten konnte.

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Rabe für die anschließende Übernahme meiner Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Rose-John möchte ich für die Betreuung während der gesamten Promotionszeit und für die Übernahme des Erstgutachtens danken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Athena Chalaris und Dr. Dirk Schmidt-Arras für die Geduld, mit der sie mir bei meinen vielen kleinen und großen Fragen und Problemen zur Seite gestanden haben.

An dieser Stelle sei auch meine Büro-Crew bestehend aus Olga Schweigert, Katja Möller-Hackbarth, Christin Dewitz und Eva Wagener erwähnt, welche die triste Schreibtischarbeit mit Leben gefüllt haben.

Ebenso Dank verdient Jan „der Bachelor“ von der Heyde für die tolle Vorarbeit zu diesem Projekt und die stundenlangen Diskussionen.

Nicht unerwähnt in dieser Danksagung sollten auch Annett Lickert und Steffi Schnell bleiben. Vielen Dank für eure Unterstützung mit Material und guten Ratschlägen. Gleiches gilt für Benjamin Schönbeck und Dr. Markus Lettau aus dem Immunologischen Institut des UK-SH, welche für mich die Bestrahlung von Zellen durchgeführt haben.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Familie danken, die mich sowohl moralisch als auch finanziell immer unterstützt hat. Dies gilt ganz besonders für meine Lebensgefährtin Henrike, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel sowie unter Anleitung meiner Betreuer angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen wurden, sind im Text kenntlich gemacht.

Diese Dissertation hat bisher nicht in dieser oder einer ähnlichen Fassung im In- oder Ausland zu einem Promotionsverfahren vorgelegen. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 23.01.2014

Timo Effenberger