

Einfluss von Umweltfaktoren auf die
Regulation der Metalloproteasen ADAM10
und ADAM17

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Nancy Speck

Kiel, 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Karina Reiß

Tag der mündlichen Prüfung: 01. 06. 2015

Zum Druck genehmigt: 01. 06. 2015

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

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1 EINLEITUNG	9
1.1 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen	9
1.1.1 Struktur und Funktion von ADAM10 und ADAM17	9
1.1.2 Regulation von ADAM10 und ADAM17	14
1.2 Ernährung als Faktor der Regulation von ADAMs.....	15
1.2.1 Lipide und Lipidmetabolismus	15
1.2.1.1 Atherosklerose	16
1.2.1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose und mögliche Rolle von ADAMs	17
1.2.1.1.2 Einfluss von Fettsäuren aus der Nahrung auf die Pathogenese der Atherosklerose	19
1.2.1.1.3 Mausmodelle für Atherosklerose	21
1.2.2 Sekundäre bioaktive Pflanzenstoffe	22
1.2.2.1 Isothiocyanate.....	23
1.2.2.2 Molekulare Wirkmechanismen von Sulforaphan und anderen Isothiocyanaten.....	24
1.3 Das zelluläre Mikromilieu als Faktor der Regulation von ADAMs – Hypoxie.....	26
1.4 Fragestellung.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	30
2.2 Chemikalien und Reagenzien	31
2.3 ELISA und andere Kits	33
2.4 Software	34
2.5 Antikörper	34
2.6 Mauslinien	34

2.6.1 Zusammensetzung der Diäten	35
2.7 Zellbiologische Methoden.....	35
2.7.1 Zelllinien.....	35
2.7.2 Kultivierung von Zelllinien.....	36
2.7.3 Zellzahlbestimmung	36
2.7.4 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	37
2.7.5 Stimulation von Zellen und Einsatz von Inhibitoren	37
2.7.6 Proteinextraktion aus Zellen und Geweben	39
2.7.7 Isolation von Mikrosomen aus hepatischem Gewebe und Fettsäureanalyse	40
2.8 Proteinbiochemische Methoden	41
2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.8.2 Proteintransfer durch <i>Western Blot</i>	42
2.8.3 Immunologische Detektion transferierter Proteine	42
2.8.4 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	43
2.8.5 Fluorogener Peptidsubstrat- <i>assay</i>	44
2.8.6 (Immun-) Histochemische Färbungen	44
2.8.6.1 Densitometrische Auswertung immunhistologischer Färbungen	46
2.9 Molekularbiologische Methoden	46
2.9.1 mRNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe	46
2.9.2 Reverse Transkription	47
2.9.3 Oligonukleotide.....	48
2.9.4 Polymerase-Ketten-Reaktion und Agarose-Gelelektrophorese	48
2.9.5 <i>Real-Time</i> PCR.....	49
2.10 Statistik.....	50
3 ERGEBNISSE.....	52
3.1 Einfluss von Fettsäuren aus der Nahrung auf die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in einem Atherosklerose-Mausmodell	52
3.1.1 Charakterisierung der Atherosklerose-Entwicklung	52
3.1.2 Expression und Lokalisation der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in der Aorta	56
3.1.3 Lösliche Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorische Marker in der Aorta und im Plasma.....	58
3.1.4 Expression der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in der Leber	64

3.1.5 Lösliche Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorische Marker in der Leber	65
3.1.6 Untersuchung der ADAM-Expression und löslicher ADAM-Substrate in Lunge und Niere	67
3.2 Regulation von ADAMs durch Isothiocyanate	69
3.2.1 Isothiocyanate stimulieren die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in Abhängigkeit von Metalloproteasen.....	69
3.2.2 Untersuchungen zur Sulforaphan-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 und Aktivierung von Metalloproteasen	72
3.2.3 Inhibitionsversuche zur Sulforaphan-vermittelten ERK1/2-Aktivierung und Vergleich von Sulforaphanen unterschiedlicher Hersteller	73
3.2.4 Untersuchungen zur Butyl-Isothiocyanat (BITC)-induzierten ERK1/2-Aktivierung.....	75
3.3 Regulation von ADAM17 durch IFNγ unter Hypoxie	78
3.3.1 IFN γ stimuliert die mRNA-Expression von <i>ADAM17</i> unter Normoxie, nicht jedoch unter Hypoxie.....	79
3.3.2 IFN γ stimuliert das <i>Shedding</i> des TNF-Rezeptors 1 unter Normoxie, nicht jedoch unter hypoxischen Bedingungen	81
4 DISKUSSION.....	83
4.1 Einfluss von Fettsäuren aus der Nahrung auf die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in einem Atherosklerose-Mausmodell	83
4.1.1 LDL-Rezeptor-Knock-out als Mausmodell für Atherosklerose.....	83
4.1.2 Charakterisierung der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen	84
4.1.3 ADAM-vermittelte Proteolyse endothelialer Zelladhäsionsmoleküle	87
4.1.4 ADAM-vermittelte Proteolyse in Leber, Lunge und Niere	89
4.1.5 Expression von ADAM17 im LDLR-Knock-out-Mausmodell.....	91
4.2 Regulation von ADAMs durch Isothiocyanate	93
4.3 Regulation von ADAM17 durch Interferon γ unter Hypoxie.....	97
4.4 Ausblick	102
5 ZUSAMMENFASSUNG	105
6 SUMMARY	107

7 LITERATUR.....	109
8 PUBLIKATIONEN	132
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	133
10 TABELLENVERZEICHNIS	135
11 DANKSAGUNG	136
12 ERKLÄRUNG.....	137
13 LEBENSLAUF	138
14 ANHANG.....	139

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
AA	<i><u>ar</u>achidonic <u>a</u>cid</i>
ADAM	<i><u>a</u> <u>d</u>isintegrin <u>a</u>nd <u>m</u>etalloprotease</i>
AITC	<i><u>A</u>llyl-<u>I</u>sothiocyanat</i>
ALA	<i><u>alpha</u>-<u>l</u>inolenic <u>a</u>cid</i>
AP-1	<i><u>a</u>ctivator <u>p</u>rotein 1</i>
Apo	<i><u>A</u>polipoprotein</i>
APP	<i><u>a</u>myloid <u>p</u>recursor <u>p</u>rotein</i>
APS	<i><u>a</u>mmonium <u>p</u>ersulfate</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (<i><u>A</u>qua <u>d</u>estillata</i>)
ARE	<i><u>a</u>ntioxidant <u>r</u>esponse <u>e</u>lements</i>
ATF-6	<i><u>a</u>ctivating <u>t</u>ranscription <u>f</u>actor 6</i>
ATP	<i><u>A</u>denosin<u>t</u>riphosphat</i>
A β	<i><u>a</u>myloid <u>\beta</u></i>
BITC	<i><u>B</u>utyl-<u>I</u>sothiocyanat</i>
bp	<i><u>B</u>asenpaare</i>
BSA	<i><u>b</u>ovines <u>S</u>erum<u>a</u>lbumin</i>
cDNA	<i><u>c</u>omplementary <u>D</u>NA</i>
Cet	<i><u>C</u>etuximab</i>
ChREBP	<i><u>c</u>arbohy<u>d</u>rate <u>r</u>esponsive <u>e</u>lement <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i>
COX-2	<i><u>C</u>ycloo<u>o</u>xigenase 2</i>
Ct	<i><u>c</u>ycle <u>t</u>hreshold</i>
C-terminal	<i><u>C</u>arboxy-terminal</i>
CVD	<i><u>c</u>ardiovascular <u>d</u>iseases</i>
CX3CL1	<i><u>C</u>X3C-<u>c</u>hemokine <u>l</u>igand 1</i>
CXCL16	<i><u>C</u>XC-<u>c</u>hemokine <u>l</u>igand 16</i>
CYP	<i><u>C</u>ytochrom <u>P</u>450</i>
Da	<i><u>D</u>alton</i>
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	<i><u>D</u>ulbeccos <u>m</u>odified <u>e</u>agle <u>m</u>edium</i>
DNA	<i><u>d</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
dNTP	<i><u>D</u>esoxynukleosid<u>t</u>riphosphat</i>
DSS	<i><u>d</u>extran <u>s</u>odium <u>s</u>ulphate</i>
DTT	<i>1,4-<u>D</u>ithio<u>t</u>hreitol</i>
E-Cadherin	<i><u>e</u>piteliales Cadherin</i>
ECL	<i><u>e</u>nhanced <u>c</u>hemiluminescence</i>
EDTA	<i><u>E</u>thylendiamin<u>t</u>etra<u>a</u>ccetat</i>
EGCG	<i><u>E</u>pigallo<u>c</u>atechingallat</i>
EGF	<i><u>e</u>pidermal <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i>
EPA	Eicosapentaensäure
EPCR	<i><u>e</u>ndothelial <u>p</u>rotein <u>C</u> <u>r</u>eceptor</i>

ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
E-Selektin	<u>e</u> ndotheliales Selektin
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
FH	familiäre <u>H</u> ypercholesterolämie
FKS	fötales <u>K</u> älberserum
FÖ	<u>F</u> ischöl
g	<u>G</u> ravitationsbeschleunigung
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HIF	<u>H</u> ypoxie-induzierbare <u>F</u> aktoren
HMEC-1	<i>human microvascular endothelial cells</i>
HOX	<u>H</u> ypoxie (1 % O ₂)
HPRT	<u>H</u> ypoxanthin- <u>P</u> hosphoribosyl- <u>T</u> ransferase
HRE	<i>hypoxia responsive elements</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>intercellular cell adhesion molecule 1</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> eron
IFU	<i>inclusion forming units</i>
IKK	<i>inhibitor of kappa B kinase</i>
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
iNOS	<u>i</u> nduzierbare <u>N</u> O- <u>S</u> ynthase
Iono	<u>I</u> onomycin
IRE	<i>IFNγ responsive elements</i>
iRhom	<i>inactive rhomboids</i>
ITC	<u>I</u> sothiocyanat
IκB	<i>inhibitor of kappa B</i>
JAK	<u>J</u> anuskinase
JAM-A	<i>junctional adhesion molecule A</i>
Keap1	<i>Kelch like ECH-associated protein 1</i>
KO	<u>K</u> nock-out
LA	<i>linoleic acid</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPL	<u>L</u> ipoprotein- <u>L</u> ipase
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
L-Selektin	<u>L</u> ymphozyten-Selektin
LY	<u>LY</u> 294002
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ktivierte <u>P</u> rotein- <u>K</u> inase

MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MEK	<i>mitogen/extracellular signal-regulated kinase</i>
MM	<i>Marimastat</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloproteasen</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i>
NADPH	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>
N-Cadherin	<i>neuronales Cadherin</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NOX	<i>Normoxie (20 % O₂)</i>
NQO-1	<i>NADPH-Quinon-Oxidoreduktase 1</i>
Nrf-2	<i>Nuclear factor erythroid-related factor-2</i>
N-terminal	<i>Amino-terminal</i>
OD	<i>optische Dichte</i>
Oligo d(T)	<i>Oligomer bestehend aus 18 aufeinanderfolgenden Thyminen</i>
p-	<i>phosphorylierte Form</i>
PAGE	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEITC	<i>Phenethyl-Isothiocyanat</i>
PERK	<i>protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PMA	<i>Phorbol-12-Myristat-13-Acetat</i>
PPADS	<i>pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4',-disulfonic acid</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator activator receptor</i>
P-Selektin	<i>platelet Selektin</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
PVDF	<i>Polyvinylidendifluorid</i>
-R	<i>-Rezeptor</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>round per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell park memorial institute medium</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
s-	<i>soluble</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFA	<i>saturated fatty acids</i>
SFN	<i>Sulforaphan</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i>
Sp1	<i>specifity protein 1</i>
SREBP	<i>sterol responsive element binding protein</i>
SS	<i>Schweineschmalz</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Stauro	<i>Staurosporin</i>
Sur	<i>Suramin</i>

TACE	<i><u>T</u>NF <u>a</u>lpha <u>c</u>onverting <u>e</u>nzyme</i>
TAE	<i><u>T</u>ris-<u>a</u>cetate-<u>E</u>DTA</i>
TBS	<i><u>t</u>ris <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
TEMED	<i><u>t</u>etramethylethylenediamine</i>
TGF	<i><u>t</u>ransforming <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i>
TIMP	<i><u>t</u>issue <u>i</u>nhibitor of <u>m</u>etalloproteases</i>
TNF	<i><u>t</u>umor <u>n</u>ecrosis <u>f</u>actor</i>
U	<i><u>U</u>nit</i>
ün	<i>über <u>N</u>acht</i>
UPR	<i><u>u</u>nfolded <u>p</u>rotein <u>r</u>esponse</i>
VCAM-1	<i><u>v</u>ascular <u>c</u>ell <u>a</u>dhesion <u>m</u>olecule 1</i>
VE-Cadherin	<i><u>v</u>askulär-<u>e</u>ndotheliales Cadherin</i>
VLDL	<i><u>v</u>ery <u>l</u>ow <u>d</u>ensity <u>l</u>ipoprotein</i>
VWF	<i><u>V</u>on-<u>W</u>illebrand-<u>F</u>aktor</i>
WT	<i><u>W</u>ildtyp</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen

Bei den Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen –kurz ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) – handelt es sich um transmembrane Glykoproteine vom Typ I. Sie stehen in enger Homologie zu den Schlangengift Metalloproteasen (*snake venom metalloproteases*, SVMs) (Blobel & White 1992). Zusammen bilden sie die Familie der Adamalysine, eine Untergruppe Zink-abhängiger Metalloproteasen, den Metzinkinen. Zu dieser Superfamilie lassen sich auch die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die Astacine (zuerst beschrieben im Flusskrebs *Astacus astacus*) und die Serralysine (bakterielle Proteasen) einordnen. Charakteristisch für Vertreter der Metzinkine ist ein konservierter Methionin-Rest und ein Zinkbindungsmotiv mit drei Histidin-Resten (HExxHxxGxxH) in der proteolytisch aktiven Domäne (Bode *et al.* 1993; Huxley-Jones *et al.* 2007). Mitglieder der ADAM-Familie wurden bereits in einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen, von *Schizosaccharomyces pombe* über *Drosophila melanogaster* bis zu Vertebraten, nicht jedoch in Bakterien oder Pflanzen (Stone *et al.* 1999; Pan & Rubin 1997; Nakamura *et al.* 2004). Im Menschen wurden bislang 21 ADAM-Gene beschrieben. Hier sei hervorzuheben, dass diese zwar alle die konservierte Metalloprotease-Domäne aufweisen, jedoch nur einige das Zinkbindemotiv. Es kann also davon ausgegangen werden, dass nicht alle ADAMs proteolytisch aktiv sind (Edwards *et al.* 2008). Die mit Abstand am besten charakterisierten Vertreter sind ADAM10 und ADAM17. Sie sind beteiligt an einer Vielzahl physiologischer Vorgänge, beispielweise bei der Fertilisation, Myoblasten-fusion, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Signaltransduktion, aber auch bei der Neurogenese und der Angiogenese. Zudem spielen sie eine Rolle bei pathologischen Prozessen wie z.B. der Alzheimer'schen Erkrankung, der Tumorgenese und Entzündungsreaktionen (Moss & Lambert 2002; Reiss & Saftig 2009).

1.1.1 Struktur und Funktion von ADAM10 und ADAM17

Strukturell wurden bei den ADAMs verschiedene Domänen definiert. Der N-Terminus beginnt mit einer Prodomäne, gefolgt von der Metalloprotease-, Disintegrin-, Cystein-reichen, EGF-ähnlichen, der Transmembran- sowie der zytoplasmatischen Domäne (Seals & Courtneidge 2003). Neuere Publikationen bezeichnen ADAMs mit dieser Domänenstruktur als „typische“ ADAMs. „Atypische“ ADAMs – zu denen auch ADAM10 und 17 gezählt werden - weisen statt der Cystein-reichen und EGF-ähnlichen Domänen eine sogenannte Membran-proximale Domäne auf (Janes *et al.* 2005; Takeda 2009; Lorenzen *et al.* 2012). Die Domänenstruktur atypischer ADAMs ist in Abbildung 1 dargestellt.

Den ADAM-Proteasen lassen sich zwei Hauptfunktionen zuschreiben: Die Vermittlung von Zelladhäsion aufgrund ihrer Eigenschaft mit Integrinen zu interagieren, sowie ihre proteolytische Aktivität, worauf der Fokus dieser Arbeit beruht. Die Vielzahl an Substraten ist enorm, allein für ADAM10 und ADAM17 konnten bereits über 40 bzw. 80 beschrieben werden (Dreymueller *et al.* 2012). Obwohl es keine übereinstimmende Sequenz für die Erkennung oder die Schnittstelle der Substrate gibt, ist dennoch allen Substraten gemein, dass sie mit der Zytoplasmamembran assoziiert sind und die proteolytische Spaltung stets im juxtamembranen Bereich erfolgt (Reiss & Saftig 2009). Der Prozess der proteolytischen Spaltung und die Freisetzung der Ektodomäne von Membranproteinen wird als *Shedding* bezeichnet, daher werden ADAMs auch *Sheddases* genannt (Abbildung 1).

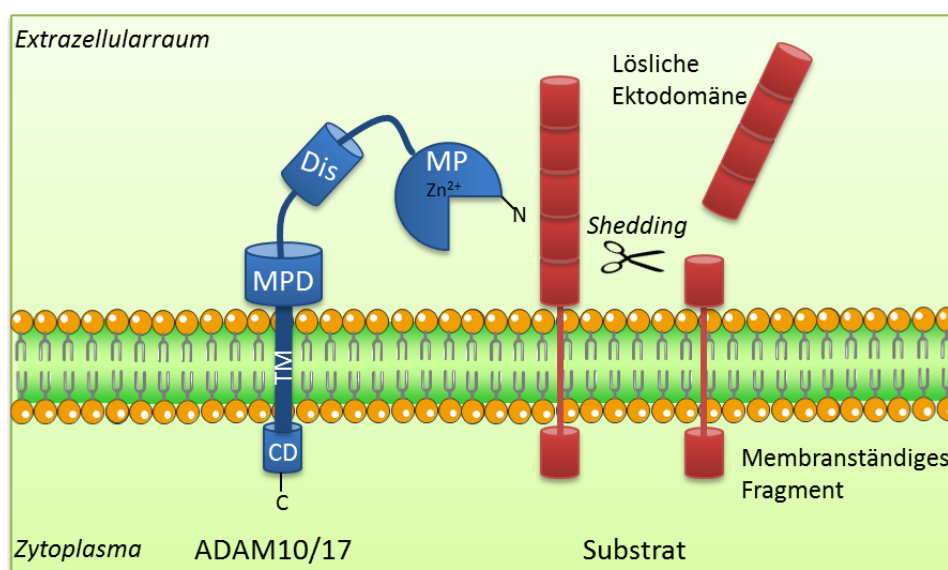


Abbildung 1: Domänenstruktur atypischer ADAMs und *Shedding* eines Transmembranproteins.

Die muren Proteasen ADAM10 und ADAM17 besitzen eine Metalloprotease-Domäne (MP) mit Zinkbindemotiv, eine Disintegrin (Dis)-, eine Membran-proximale (MPD)-, eine Transmembran (TM)- sowie eine zytoplasmatische Domäne (CD) (Janes *et al.* 2005; Takeda 2009; Lorenzen *et al.* 2012). Die proteolytische Spaltung (*Shedding*) eines membrangebundenen Proteins führt zur Freisetzung von dessen Ektodomäne in den extrazellulären Raum, während ein Fragment in der Membran verbleibt (modifiziert nach Blobel 2005).

Als Substrate dienen beispielsweise Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Die durch das *Shedding* freigesetzte Ektodomäne fungiert dabei meist als lösliches, funktionell aktives Protein. Einige dieser Substrate werden sowohl von ADAM10 als auch von ADAM17 oder weiteren ADAMs proteolytisch prozessiert, andere werden spezifisch nur von einer Protease gespalten. Aufgrund der hohen Anzahl und Diversität der Substrate, ist es nicht verwunderlich, dass ADAM10 und ADAM17 bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen entscheidende Rollen zugeschrieben werden (Saftig & Reiss 2011). Einige ausgewählte Substrate sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: ausgewählte Substrate der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17

Substrat	involvierte ADAM-Proteasen	Funktion	Referenz
Adhäsionsmoleküle			
E-Cadherin	ADAM10	Permeabilität	Maretzky, Reiss, <i>et al.</i> 2005
ICAM-1	ADAM17	Adhäsion	Tsakadze <i>et al.</i> 2006
JAM-A	ADAM17, ADAM10	Transmigration	Koenen <i>et al.</i> 2009
L-Selektin	ADAM17	Adhäsion	Peschon <i>et al.</i> 1998
VCAM-1	ADAM17	Adhäsion	Garton <i>et al.</i> 2003
VE-Cadherin	ADAM10	Permeabilität	Schulz <i>et al.</i> 2008
Chemokine/ Zytokine			
CX3CL1 (Fraktalkin)	ADAM10, ADAM17	Adhäsion, Transmigration	Hundhausen <i>et al.</i> 2007; Schulte <i>et al.</i> 2007; Garton <i>et al.</i> 2001
CXCL16	ADAM10	Transmigration	Abel <i>et al.</i> 2004; Scholz <i>et al.</i> 2007
Pro-TNF α	ADAM17	Inflammation	Black <i>et al.</i> 1997; Moss <i>et al.</i> 1997
Wachstumsfaktoren			
Pro-Amphiregulin	ADAM17	Proliferation, Migration, Differenzierung	Gschwind <i>et al.</i> 2003; Sahin <i>et al.</i> 2004
Pro-Betacellulin	ADAM10	Proliferation, Migration, Differenzierung	Sahin <i>et al.</i> 2004
Pro-EGF	ADAM10	Proliferation, Migration, Differenzierung	Sahin <i>et al.</i> 2004
Pro-HB-EGF	ADAM17	Migration, Angiogenese	Sahin <i>et al.</i> 2004
Pro-TGF α	ADAM17	Proliferation, Migration, Differenzierung, Angiogenese	Peschon <i>et al.</i> 1998; Sahin <i>et al.</i> 2004
Rezeptoren			
EPCR	ADAM17	Antikoagulation	Canault <i>et al.</i> 2007
IL-6R	ADAM17 (human), ADAM10 (murin)	Inflammation	Matthews <i>et al.</i> 2003; Garbers <i>et al.</i> 2011
TNFR1/TNFR2	ADAM17	Anti-Inflammation	Peschon <i>et al.</i> 1998; Reddy <i>et al.</i> 2000

ADAM17 wurde zunächst als TACE (*TNF α converting enzyme*) bekannt, aufgrund der Fähigkeit die membrangebundene Proform des Zytokins *tumor necrosis factor* TNF α zu spalten und somit das lösliche TNF α in seiner aktiven Form freizusetzen (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997). TNF α wirkt systemisch als proinflammatorisches Molekül um unter anderem Immunzellen zum Entzündungsherd zu locken. Erhöhte Serum-Konzentrationen von TNF α sind jedoch mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert, wie zum Beispiel Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Endotoxinschock (McInnes & Schett 2011; Papadakis & Targan 2000; Horiuchi *et al.* 2007). ADAM17 spielt zudem eine essentielle Rolle bei der vom *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-vermittelten Signaltransduktion. Eine Aktivierung des EGFRs hat eine Phosphorylierung der *mitogen activated protein* MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase*) zur Folge, was wiederum Zellproliferation, Zellwachstum oder Differenzierung nach sich ziehen kann (Xue & Lucocq

1998; Yarden & Sliwkowski 2001). Die Liganden dieses Rezeptors sind als inaktive Vorläuferproteine in der Membran verankert. Das *Shedding* durch ADAM10 oder ADAM17 führt zu ihrer Freisetzung und in Folge dessen kommt es zur autokrinen oder aber auch parakrinen Aktivierung des EGF-Rezeptors (Sahin *et al.* 2004). Die Bedeutung von ADAM17 als Haupt-*Sheddase* von EGFR-Liganden wird offensichtlich, wenn man die Phänotypen der jeweiligen Knock-out-Mauslinien vergleicht: ADAM17-defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine gestörte Entwicklung verschiedener Organe wie die des Darms, der Lunge oder des Herzens aus (Peschon *et al.* 1998). Zudem zeigen sie auch Defekte in der Entwicklung der Augen oder der verschiedenen Hautschichten, ähnlich des Phänotyps der EGFR-Knock-out-Maus (Sibilia & Wagner 1995; Jackson *et al.* 2003). Diese gravierenden Effekte des ADAM17-Knock-outs führen zum Tod zwischen Embryonaltag E17,5 und der Geburt. Eine erhöhte Expression bzw. Aktivierung des EGFRs und damit einhergehend ein unkontrolliertes Zellwachstum wurde in mehreren Tumorarten beschrieben (Dhomen *et al.* 2012).

Eine weitere wichtige Aufgabe der ADAMs ist die Regulation von Funktionen des Endothels wie z. B. die Permeabilität und die Interaktion mit Immunzellen. Das *Shedding* von Adhäsionsmolekülen führt in diesem Zusammenhang zu einem Aufheben von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen. Lymphozyten (L)-Selektin beispielsweise – ein Zelladhäsionsmolekül auf der Oberfläche von Leukozyten – übernimmt eine wichtige Funktion beim sogenannten *rolling* der Zellen an der Endothelwand. Die proteolytische Spaltung dieses Moleküls beeinflusst also die Leukozytenrekrutierung bei inflammatorischen Prozessen (Hafezi-Moghadam *et al.* 2001). Hier sei auch das *junctional adhesion molecule* JAM-A erwähnt, ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Es vermittelt eine Ca^{2+} -unabhängige homotypische oder heterotypische Zelladhäsion. JAM-A ist unter anderem auf Endothelzellen zu finden und ist am Aufbau von *Tight Junctions* beteiligt (Martín-Padura *et al.* 1998). Zudem ist es in der Migration von Endothelzellen und der transendothelialen Migration von Neutrophilen involviert (Naik & Naik 2006; Woodfin *et al.* 2007). Die Abspaltung von JAM-A von der Zelloberfläche durch ADAM17 führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Leukozyten (Koenen *et al.* 2009). Die löslichen Formen von L-Selektin und JAM-A können zudem als Antagonisten wirken. Sie blockieren andere Liganden für Adhäsionsmoleküle, wie PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand*) und LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*) auf Endothelzellen und Leukozyten, wodurch wiederum die Leukozytenadhäsion und die darauf folgende Transmigration vermindert werden (Smalley & Ley 2005; Koenen *et al.* 2009). Weitere Ig-Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Leukozytenadhäsion. Endotheliales ICAM-1 beispielsweise, interagiert mit den Integrinen LFA-1 und Mac-1 (*macrophage-1 antigen*) auf der Oberfläche von Leukozyten und fördert so eine festere Adhäsion der Leukozyten

und deren folgende Transmigration. VCAM-1 übernimmt eine vergleichbare Funktion und bindet an die leukozytären Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$. Beide werden ebenfalls von ADAM17 prozessiert (Garton *et al.* 2003; Tsakadze *et al.* 2006).

Chemokine spielen für die Zelladhäsion und Leukozytentransmigration ebenfalls eine wichtige Rolle. Die meisten Chemokine werden als lösliche Moleküle freigesetzt und sind extrazellulär am Aufbau eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten für responsive Zellen verantwortlich (Rossi & Zlotnik 2000). Eine Ausnahme bilden die beiden transmembranen Chemokine CXCL16 und CX3CL1 (Fraktalkin). Als transmembrane Proteine auf Endothelzellen interagieren sie mit ihren Rezeptoren auf Leukozyten, wodurch die Zelladhäsion gefördert wird (Ludwig & Weber 2007). Beide werden von ADAM10 und zum Teil auch von ADAM17 prozessiert und fungieren in ihrer löslichen Form als Chemoattraktanten für Leukozyten (Gough *et al.* 2004; Abel *et al.* 2004; Hundhausen *et al.* 2003).

Vertreter der Cadherine, wie E-Cadherin (epithelial), VE-Cadherin (vaskulär-endothelial) oder N-Cadherin (neuronal) sind weitere Beispiele für Adhäsionsmoleküle die von ADAMs prozessiert werden. Sie spielen bei der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, der Erhaltung der Zellpolarität, aber auch bei der Signaltransduktion eine Rolle. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass ADAM10 primär als *Sheddase* für Cadherine fungiert (Maretzky, Reiss, *et al.* 2005; Reiss *et al.* 2005; Schulz *et al.* 2008). Das *Shedding* von VE-Cadherin beispielsweise, erhöht die Permeabilität von endothelialen Zellen und die Migration von T-Zellen (Schulz *et al.* 2008). ADAM10 spielt zudem eine essentielle Rolle im Notch-Signalweg und ist damit wichtig während der frühen Embryogenese. ADAM10-defiziente Mäuse sterben bereits am Embryonaltag E9,5. Sie weisen eine gestörte Entwicklung des Herzens und des Zentralnervensystems auf, außerdem zeigen sich Defekte in der Somatogenese und der Vaskulogenese (Hartmann *et al.* 2002). Der Phänotyp dieser Mäuse ähnelt damit dem von Notch-defizienten Mäusen (Krebs *et al.* 2000).

Sowohl ADAM10 als auch ADAM17 wurden als Proteasen für den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) beschrieben (Müllberg *et al.* 1993; Matthews *et al.* 2003). Dieser Rezeptor wird nur auf hämatopoetischen Zellen und Hepatozyten exprimiert. Die lösliche Form (soluble, sIL-6R) kann jedoch weiterhin das Zytokin IL-6 binden. Dieser Komplex ist dann in der Lage an gp130 zu binden, ein Glykoprotein des IL-6-Signalweges, das auf der Oberfläche nahezu aller Zellen exprimiert wird. Dieser Vorgang wird *transsignalling* genannt und ermöglicht es Zellen, die keinen IL-6-Rezeptor exprimieren, auf IL-6 zu reagieren. Erhöhte Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R sind mit einer Reihe von inflammatorischen Krankheiten sowie Krebs assoziiert (Chalaris *et al.* 2011).

Das *Shedding* von anderen Rezeptoren wie beispielsweise der TNF-Rezeptoren 1 und 2, kann dagegen antagonistische Effekte hervorrufen. So führt die Abspaltung der Ektodomäne dieser Rezeptoren unter anderem zu einer Desensibilisierung der Zellen gegenüber TNF α und damit zu

einer Abschwächung der inflammatorischen Antwort (Heller *et al.* 1990; Van Zee *et al.* 1992; Peschon *et al.* 1998). Dies ist nur ein Beispiel für die Komplexität der proteolytischen Aktivität von ADAM-Proteasen. Die Regulation dieser Enzyme muss daher ein feinregulierter Prozess sein und ist von essentieller Bedeutung, gerade im Hinblick auf inflammatorische Krankheiten wie Atherosklerose, aber auch Krebs oder Alzheimer, für die bereits eine Dysregulation von ADAM10 und/oder ADAM17 beschrieben wurde (Saftig & Reiss 2011).

1.1.2 Regulation von ADAM10 und ADAM17

Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 können auf viele Arten reguliert werden. Die Transkription beispielsweise wird durch Faktoren wie Retinsäure oder Zytokine beeinflusst (Tippmann *et al.* 2009; Faber *et al.* 2014). Die Expression kann ebenfalls durch sauerstoffarme Bedingungen (Hypoxie) modifiziert werden (siehe Abschnitt 1.3). Der Transport der ADAMs wird reguliert durch z.B. Tetraspanine und iRhom2 (Prox *et al.* 2012; Adrain *et al.* 2012). Die proteolytische Aktivität kann durch physiologische Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch durch unphysiologische Faktoren wie dem Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) oder dem Kalzium-Ionophor Ionomycin stimuliert werden (Huovila *et al.* 2005). An der Aktivierung durch PMA ist die Proteinkinase C beteiligt, wohingegen Ionomycin einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bewirkt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität von ADAM17 haben. Sie halten die Protease in einer geschlossenen „inaktiven“ Konformation. Aktivierende Substanzen wie PMA unterbinden diese Funktion, so dass ADAM17 in eine offene aktive Konformation übergeht (Willems *et al.* 2010).

Sowohl ADAMs als auch deren Substrate sind transmembrane Proteine. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung und die Eigenschaften von Membranen einen Einfluss auf die Aktivität der Proteasen haben. Strukturlipide, zu denen die Glycerophospholipide, Sterole (Cholesterol) sowie Sphingolipide zählen, bilden die Grundbausteine biologischer Membranen. Sie weisen eine polare Kopfgruppe sowie ungeladene Kohlenwasserstoffketten (Fettsäuren) auf, sind also amphiphil. Diese Eigenschaft führt in wässrigen Lösungen dazu, dass sie sich aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkungen untereinander und ihrer hydrophilen Wechselwirkungen mit dem Wasser zu Micellen oder Lipiddoppelschichten zusammenlagern. Die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen werden von der Fettsäurezusammensetzung der Strukturlipide und freien Fettsäuren in der Membran beeinflusst. Ungesättigte Fettsäuren wie die Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA, 20:5, n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6, n-3) erhöhen beispielsweise die Fluidität und Permeabilität von Lipiddoppelschichten (Onuki *et al.* 2006). Sphingolipide und Cholesterol hingegen, sind für die Formation von Mikrodomänen innerhalb der Membran - den *lipid rafts* – verantwortlich und bilden so eine Plattform für verschiedene

Signaltransduktionswege (Lemaire-Ewing *et al.* 2012). Sie sind gekennzeichnet durch eine geordnete festere Struktur, aufgrund der vorherrschenden gesättigten und langen Fettsäuren (Lingwood & Simons 2010).

Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass ungesättigte Fettsäuren die *Shedding-Rate* von ADAM10 und ADAM17 erhöhen. Dies war nicht auf eine vermehrte Enzymaktivität zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine Erhöhung der Membranfluidität und der damit einhergehenden Substratverfügbarkeit (Reiss *et al.* 2011). Mehrere Studien zeigten zudem, dass die Freisetzung von ADAM17-Substraten durch Cholesterolentzug erhöht werden kann. ADAM17 ist vorrangig in *lipid rafts* der Membran lokalisiert, so dass das *Shedding* von Substraten in *non-raft* Regionen erhöht wird (Tellier *et al.* 2006). Dies konnte für verschiedene Substrate wie TNF α und dessen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2, sowie für den IL-6R und das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1 gezeigt werden (Tellier *et al.* 2006; Matthews *et al.* 2003; Maretzky, Schulte, *et al.* 2005). Wenngleich ADAM10 nicht in *lipid rafts* zu finden ist, führt Cholesterolentzug auch in diesem Fall zu einem erhöhten *Shedding* von N-Cadherin und APP (*amyloid precursor protein*) (Reiss *et al.* 2005; Kojro *et al.* 2010). Da die Fettsäurezusammensetzung von Zellmembranen erheblich von der Ernährung abhängig ist, stellt sich die Frage, inwiefern das *Shedding* oder die Expression der Proteasen durch die Ernährung modifiziert werden können.

1.2 Ernährung als Faktor der Regulation von ADAMs

1.2.1 Lipide und Lipidmetabolismus

Fettsäuren und Lipide werden sowohl von den Zellen selbst über den endogenen Lipid-Stoffwechselweg in der Leber synthetisiert und zu anderen Geweben transportiert, als auch durch den exogenen Weg aus der Nahrung aufgenommen und zu extrahepatischen Geweben transportiert. Diese Fette werden im Blut nicht frei transportiert, sondern in Form von Komplexen mit hydrophilen Proteinen, den sogenannten Apolipoproteinen. Sie werden anhand ihrer Dichte klassifiziert. Je höher der Proteinanteil, desto höher ist auch die Dichte des Lipoprotein-Komplexes.

Nahrungslipide werden im Darm als Triglyzeride mit dem Apolipoprotein ApoB-48 sowie weiteren Lipiden wie Cholesterol zu Lipoproteinaggregaten, den so genannten Chylomikronen, verpackt und werden von dort zu den Geweben – allen voran zum Fettgewebe, den Muskeln sowie zur Leber – transportiert. Noch im Blut treten die Chylomikronen in Interaktion mit einer anderen Klasse von Lipoproteinen, den *high density lipoprotein* (HDL)-Partikeln. Hierbei kommt es zu einer Übertragung der Apoproteine E und C-II vom HDL auf die Chylomikronen. Dies ist Voraussetzung für den Abbau von Chylomikronen, da ApoC-II als Co-Faktor für die Lipoprotein-Lipase (LPL) in den Endothelzellen

fungiert (Jong *et al.* 1999). Die Fettsäuren können so vom Zielgewebe aufgenommen und als Energiequelle verbrannt werden. Die Reste der abgebauten Chylomikronen bezeichnet man als Chylomikronen-*remnants*. Sie werden zur Leber transportiert, wo sie endozytotisch über den ApoE-Rezeptor aufgenommen und dann abgebaut werden. Die Synthese von Fetten und Fettsäuren hingegen, findet vor allem in der Leber, aber auch im Fettgewebe statt. Um die *de novo* synthetisierten Triglyzeride extrahepatischen Geweben als Energiequelle bzw. –speicher zur Verfügung zu stellen, werden diese zu *very low density lipoprotein* (VLDL)-Partikeln verpackt. Im Blut findet wie schon bei den Chylomikronen eine Interaktion mit HDL-Partikeln statt (Lewis & Rader 2005). Die Übertragung von ApoC-II führt auch hier zu einer Aktivierung der Lipoprotein-Lipase und konsequenterweise zur Hydrolyse der Triglyzeride der VLDL-Partikel, so dass die freien Fettsäuren und Glycerol vom Gewebe - vor allem Fett- und Muskelgewebe - aufgenommen werden können. Die Reste der VLDL-Partikel werden als *intermediate density lipoproteins* (IDL) bezeichnet und zirkulieren zurück zur Leber, wo sie von den Hepatozyten mittels des ApoE-Rezeptors aufgenommen werden oder durch die Aktivität der hepatischen Triglyzerid-Lipase in *low density lipoproteins* (LDL) umgewandelt werden. LDL-Partikel zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Cholesterol aus. Sie zirkulieren von der Leber zu anderen Geweben, wo das transportierte Cholesterol vor allem als Bestandteil der Zellmembranen Verwendung findet, aber auch als Vorstufe für die Steroidsynthese. Die Aufnahme erfolgt über den LDL-Rezeptor (LDLR), wobei ApoB-100 als Ligand für diesen fungiert. Die bereits erwähnten HDL-Partikel sind für den so genannten reversen Cholesteroltransport verantwortlich, sie nehmen also nicht benötigtes Cholesterol aus den Zellen auf und transportieren es zur Leber zurück. Das überschüssige Cholesterol wird in der Leber schließlich zu Gallensäure umgewandelt.

Das Verhältnis von HDL zu LDL ist in der Medizin von enormer Bedeutung, da ein hoher LDL- bzw. eine niedriger HDL-Spiegel im Plasma einer der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen ist (Kottke 1988; Vega & Grundy 1996).

1.2.1.1 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs, *cardiovascular diseases*) sind die häufigste Todesursache weltweit (WHO 2011). Ursächlich hierfür ist in den meisten Fällen eine Verengung und Verhärtung arterieller Blutgefäße, Atherosklerose genannt. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen Nikotinkonsum, eine fettreiche Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität; Lebensstile, die mit Störungen des Lipidstoffwechsels assoziiert sind. Dies beinhaltet erhöhte Konzentrationen von LDL und Triacylglyceriden im Blut, verbunden mit einem erniedrigten HDL-Spiegel. In der Konsequenz führt dies zu Lipidablagerungen in den Gefäßen, dem initialen Schritt der Atherogenese. Genetische Prädispositionen können ebenfalls den Lipidmetabolismus beeinflussen. Die familiäre Hyper-

lipoproteinämie Typ II beispielsweise, ist die häufigste Form der Hyperlipidämien. Sie wird durch Mutationen im *ldlr*-Gen hervorgerufen (Goldstein & Brown 1974). Dies hat erhöhte LDL-Werte im Plasma zur Folge, was wiederum die Einlagerung der LDL-Partikel in das Endothel begünstigt.

1.2.1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose und mögliche Rolle von ADAMs

Arterien bestehen aus drei morphologisch unterscheidbaren Schichten: Die *Tunica adventitia* bildet die äußere Schicht, daran anschließend folgen die *Tunica media* und die *Tunica intima*, die dünne innere Schicht der Arterienwand. Auf der luminalen Seite und in direktem Kontakt mit dem Blut befindet sich das einschichtige Endothel. Das Endothel fungiert somit als Barriere zwischen dem Blut und dem Gewebe. Es reguliert verschiedene biologische Prozesse wie z.B. den Blutdruck durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) oder die Blutgerinnung. Weiterhin ist es in Entzündungsprozessen entscheidend involviert, da es in der Lage ist, Leukozyten anzulocken, welche an die Endothelzellen adhären und schließlich durch die Endothelschicht ins Gewebe und somit zum Ort der Entzündung migrieren.

Der initiale Schritt in der Atherogenese ist der Eintritt und die subendotheliale Retention von ApoB-assoziierten Lipoproteinen, vor allem von LDL (Williams & Tabas 1995). Die Retention scheint dabei hauptsächlich von der Interaktion von ApoB und Proteoglycanen in der subendothelialen Matrix abzuhängen (Borén *et al.* 1998). Daraufhin werden Endothelzellen aktiviert, welche nun vermehrt Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, E- und P-Selektin, VCAM-1), chemotaktische Proteine (wie *monocyte chemoattractant protein* MCP-1) und Wachstumsfaktoren (*macrophage colony-stimulating factor* M-CSF) exprimieren (Richardson *et al.* 1994; Poston *et al.* 1992; Johnson-Tidey *et al.* 1994; Libby 2002). Im Folgenden kommt es zur Adhäsion und Invasion von Monozyten und Lymphozyten. Das *rolling* der Leukozyten an der Endothelwand wird u.a. durch die endothelialen Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin sowie ICAM-1 vermittelt, welche mit Liganden auf den Leukozyten interagieren. An der Adhäsion sind weitere Moleküle wie das Integrin VLA-4 (*very late antigen-4*) auf den Leukozyten und VCAM-1 auf den Endothelzellen beteiligt, die Migration in die Gefäßwand regulieren u.a. die Proteine JAM-A und die Cadherine (Springer 1994). Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen. Diese nehmen LDL-Partikel über verschiedene *Scavenger*-Rezeptoren auf, man spricht schließlich von der Bildung sogenannter Schaumzellen (Brown & Goldstein 1990). Sterben diese ab, setzen sie eine Menge Lipide (vornehmlich Cholesterin und Cholesterolester) und weiteren Zelldebris frei. Histologisch lassen sich solche Läsionen als Fettstreifen, oder *fatty streaks* ausmachen. Parallel hierzu kommt es zur Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) aus der *Tunica media* in die *T. intima*. Diese beiden Vorgänge – die Bildung und das Absterben von Schaumzellen sowie das Einwandern der SMCs – führen schließlich zur Entstehung von bindegewebsartigen Kappen (*fibrous cap*). Diese Kappe besteht aus Molekülen

(v.a. Kollagen und Elastin) der extrazellulären Matrix, die von den glatten Muskelzellen produziert werden. Unter ihr akkumulieren Schaumzellen, lebende sowie die Reste bereits abgestorbener Zellen. Die massive Anhäufung von Zelldebris, extrazellulären Lipiden und zunehmende Kalzifizierung bilden den sogenannten nekrotischen Kern der Plaques. Als ultimative Komplikation der Atherosklerose kommt es schließlich zur Plaque-Ruptur und darauffolgend zu Infarkten oder Thrombosen. Verantwortlich hierfür sind unter anderem Proteasen, wie Kollagenasen, Gelatinasen und Cathepsine, die die Matrix der fibrösen Kappe degradieren, was zu einer Instabilität des Plaques führt. Zytokine wie IFN γ inhibieren zudem die Synthese von Matrixmolekülen. Kalzifizierungen und Neovaskularisation tragen ebenfalls zur Instabilität der Plaques und somit zur folgenden Ruptur bei. Die Vielzahl an ADAM-Substraten, die in der Pathogenese der Atherosklerose involviert sind, deutet auf eine wichtige Rolle von ADAM10 und ADAM17 in der Atherogenese hin. Hierzu zählen Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, JAM-A und VE-Cadherin, aber auch inflammatorische Proteine wie pro-TNF α , TNFR1 und IL-6R (siehe auch Abschnitt 1.1.1). Das *Shedding* dieser Moleküle beeinflusst somit die endotheliale Permeabilität, Leukozytenadhäsion und -transmigration. ADAM17 konnte in rupturierten Plaques von Patienten eines akuten myokardialen Infarktes nachgewiesen werden. Das Level von ADAM17 korrelierte dabei mit dem von TNF α (Sato *et al.* 2008). Läsionale Bereiche in Aorten ApoE-defizienter Mäuse, welche als Modell zur Untersuchung von Atherosklerose dienen, zeigten ebenfalls eine hohe ADAM17-Expression (Canault *et al.* 2006). Zudem konnte die aktive Form von ADAM17 in Mikropartikeln humaner atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden. Wurden diese Partikel mit endothelialen Zellen inkubiert, konnte ein erhöhtes *Shedding* von TNF α , TNFR1 und EPCR (endothelialer Protein C Rezeptor) festgestellt werden (Canault *et al.* 2007). ADAM10 konnte ebenfalls in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Hier korrelierte die Expression mit fortgeschrittenen Läsionen und Bereichen erhöhter Neovaskularisation (Donners *et al.* 2010). Die Beteiligung von ADAM10 und ADAM17 an der Atherogenese ist in Abbildung 2 grafisch dargestellt.

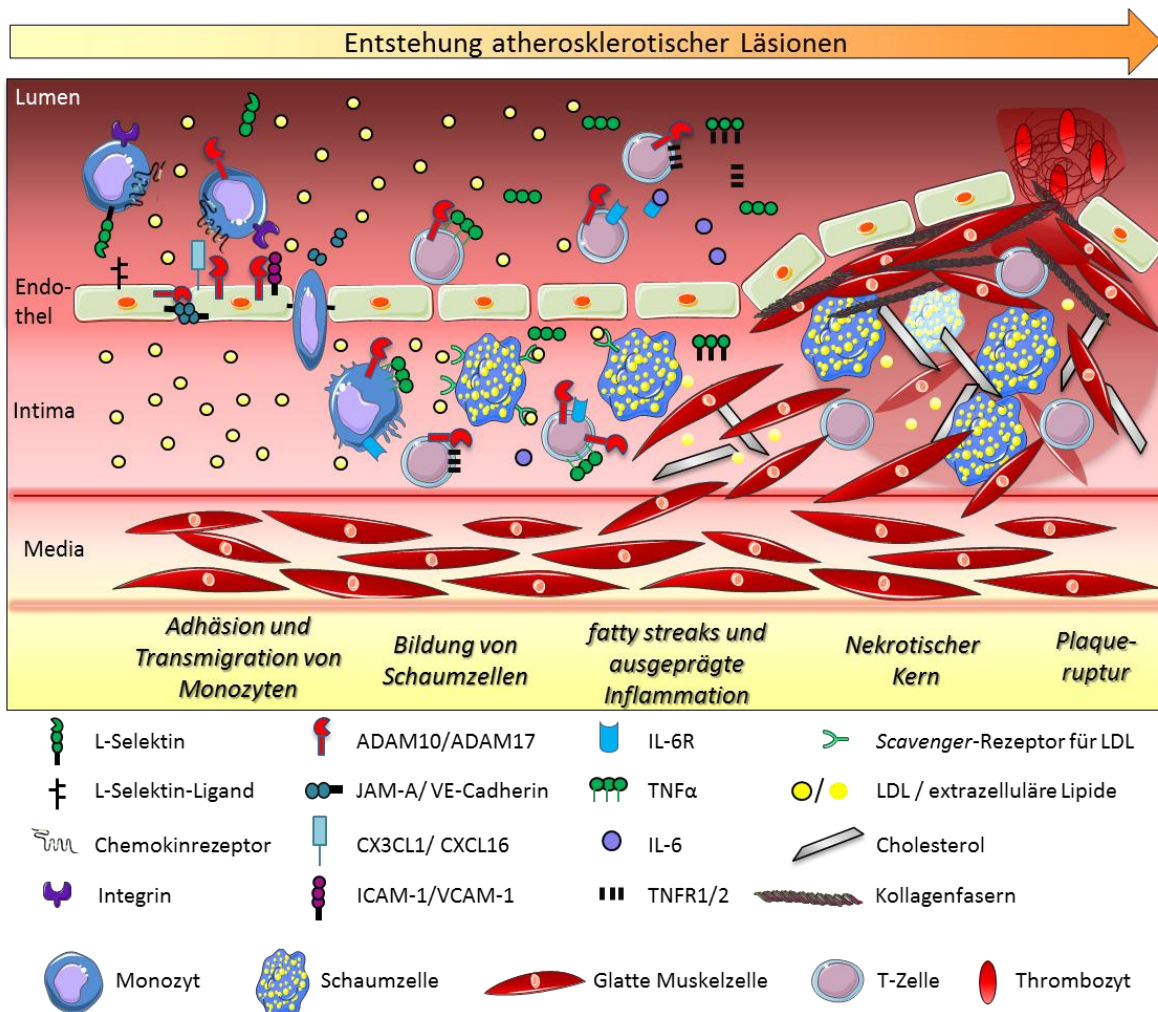


Abbildung 2: Entstehung atherosklerotischer Läsionen unter Beteiligung von ADAM10 und ADAM17.

Die Atherogenese beginnt mit der subendothelialen Retention von LDL-Partikeln und der darauf folgenden Adhäsion und Transmigration von Monozyten in die *T. intima*. Dort differenzieren sie zu Makrophagen und werden schließlich durch die exzessive Aufnahme von LDL zu Schaumzellen. Sterben diese ab, kommt es zur Ansammlung extrazellulärer Lipide (*fatty streaks*). Fortgeschrittene Läsionen sind gekennzeichnet durch eine hohe inflammatorische Komponente aufgrund der Infiltration weiterer Leukozyten und der Freisetzung von Zytokinen. Glatte Muskelzellen wandern aus der *T. media* in die *T. intima*. Es kommt zur vermehrten Produktion extrazellulärer Matrixmoleküle wie Kollagen, welche eine fibröse Kappe über dem nekrotischen Kern bilden. Wird diese instabil kommt es schließlich zur Plaque-Ruptur. ADAM10 und ADAM17 spielen eine wichtige Rolle bei der Atherogenese. Das *Shedding* von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie VE-Cadherin und JAM-A beeinflusst die Permeabilität des Endothels, zusätzlich wird die Adhäsion der Leukozyten moduliert durch die Proteolyse von beispielsweise L-Selektin, I-CAM-1, VCAM-1 und CXCL16. Beide Proteasen sind zudem an der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie TNFα, IL-6R und TNFR1/2 beteiligt. Für ausführlichere Erläuterungen siehe auch Text im Abschnitt 1.2.1.1.

1.2.1.1.2 Einfluss von Fettsäuren aus der Nahrung auf die Pathogenese der Atherosklerose

Eine der ersten und zugleich größten Studien zur Ernährung und kardiovaskulären Erkrankungen ist die sogenannte *Seven Countries Study*. Beginnend 1958 befasste sie sich mit der Assoziation von kardiovaskulären Erkrankungen, dem Lebensstil und der Ernährung von 16 Kohorten in sieben verschiedenen Ländern über einen Zeitraum von 25 Jahren. Es zeigte sich, dass die Zufuhr gesättigter

Fette (*saturated fatty acids*, SFA) positiv mit der Mortalitätsrate durch CVDs assoziiert ist (Keys *et al.* 1986). Diese Beobachtung ging einher mit einer inversen Korrelation der Mortalitätsrate mit der Zufuhr einfach ungesättigter Fettsäuren (*monounsaturated fatty acids*, MUFA). Das führte zu einer Vielzahl weiterer Studien, einige davon bestätigen die Rolle von gesättigten Fettsäuren als Risikofaktor für CVDs (Clarke *et al.* 1997; Masquio *et al.* 2014), andere konnten keinen Zusammenhang zwischen der Aufnahme gesättigter Fette und kardiovaskulären Auffälligkeiten feststellen (Siri-Tarino *et al.* 2010). Hier scheint es wichtig zu sein, wodurch SFAs ersetzt werden. Der Austausch von SFA durch Kohlenhydrate oder MUFA kann das Risiko für CVDs nur bedingt senken. Eine höhere Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), verbunden mit einer geringeren Aufnahme gesättigter Fettsäuren ist dagegen protektiv für CVDs (Mensink & Katan 1992; Howard *et al.* 1995).

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren weisen zwei oder mehr Doppelbindungen auf. Die wichtigsten Gruppen stellen die Omega-3 (n-3)- und Omega-6 (n-6)-Fettsäuren dar. Sie unterscheiden sich in der Lokalisation der letzten Doppelbindung ausgehend von der Carboxy-Gruppe. Der menschliche Organismus kann die Fettsäuren Linolsäure (LA, 18:2, n-6) und Linolensäure (ALA, 18:3, n-3) nicht selbst synthetisieren, man spricht von essentiellen Fettsäuren, welche über die Nahrung aufgenommen werden müssen. Diese beiden Moleküle bilden die Vorstufe für weitere Vertreter der Omega-6- bzw. Omega-3-Fettsäuren. Die Synthese langkettiger n-3 PUFAs und n-6 PUFAs erfolgt teilweise über den gleichen metabolischen Weg, LA und ALA konkurrieren daher um die gleichen Enzyme. So wurde bereits beschrieben, dass LA die Konversion von ALA zu längerkettigen n-3 PUFAs durch den Wettbewerb um die n-6-Desaturase reduziert (Emken *et al.* 1999). ALA kann unter anderem in Eicosapentaensäure (EPA, 20:5, n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6, n-3) umgewandelt werden, sie sind auch die vorherrschenden Fettsäuren im Fischöl. Eine Vielzahl von Studien konnte die kardioprotektiven Eigenschaften dieser Omega-3-Fettsäuren bereits nachweisen (Hansen & Harris 2007; Harris *et al.* 2008; Mozaffarian 2005). Dies ist zum einen auf eine Modulation des Lipidmetabolismus zurückzuführen, zum anderen auf die anti-inflammatorischen Effekte der Omega-3-Fettsäuren. So werden Transkriptionsfaktoren, die für den Fettstoffwechsel wichtig sind, wie PPAR α (*peroxisome proliferator activator receptor*), SREBP1 (*sterol responsive element binding protein*) und ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*) reguliert. Durch die Aktivierung von PPAR α wird die β -Oxidation von Fettsäuren stimuliert (Jump 2008). Gleichzeitig wird die *de novo* Lipogenese durch die Inhibition von SREBP1-c und ChREBP gehemmt (Xu *et al.* 2001; Dentin *et al.* 2005). Omega-3-Fettsäuren führen außerdem zu einer verringerten Sekretion von VLDL-Partikeln in der Leber durch die Degradation des Apolipoproteins B100 aufgrund einer erhöhten intrazellulären Lipid-Peroxidation (Pan *et al.* 2004). EPA und DHA stimulieren zudem die Aktivität der

Lipoprotein-Lipase, was eine schnellere Aufnahme von Chylomikron-Partikeln zur Folge hat und somit zu einer verminderten Triglyzerid-Konzentration im Serum führt (Park & Harris 2003).

Der Einbau ungesättigter Fettsäuren in Phospholipide von Zellmembranen hat einen erheblichen Einfluss auf die zellulären inflammatorischen Prozesse, da die Fettsäuren Substrate für die Synthese von inflammatorischen Mediatoren wie Eicosanoide und Endocannabinoide sind. Omega-6-Fettsäuren vor allem Arachidonsäure (AA, 20:4, n-6), sind Vorstufen für Eicosanoide die im allgemeinen als pro-inflammatorisch angesehen werden, wohingegen solche die aus n-3-Fettsäuren synthetisiert werden als anti-inflammatorisch gelten. Die AA-Abkömmlinge Prostaglandin E₂ und Leukotrien B₄ (LTB₄) beispielsweise, erhöhen die vaskuläre Permeabilität und Vasodilatation, LTB₄ wirkt chemotaktisch auf Lymphozyten und erhöht die Synthese von TNF α , IL-1 und IL-6 (Calder 2002). Tierstudien zeigten, dass eine EPA- und DHA-reiche Diät die Produktion von Omega-6-Eicosanoiden reduziert (Chapkin *et al.* 1991; Yaqoob & Calder 1995). PUFAs modulieren Zellmembranen auch hinsichtlich der Formation von *lipid rafts*, wodurch intrazelluläre Signalwege beeinflusst werden. So konnte die Menge an Sphingomyelin-reichen *lipid rafts* in T-Zellen von Mäusen durch eine Fischöl-angereicherte Nahrung reduziert werden. Dies führte zu einer verminderten Assoziation der PKC θ mit diesen *rafts* und einer damit verbundenen Inhibition von AP-1 (*activator protein 1*), NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und einer verringerten IL-2-Sekretion (Fan *et al.* 2004). Es bleibt festzuhalten, dass verschiedene Wirkmechanismen zu den kardioprotektiven Eigenschaften von Omega-3-Fettsäuren beitragen. Ob hierzu auch eine Modulation der Aktivität oder Expression der ADAM-Proteasen zählt, wurde bislang noch nicht geklärt.

1.2.1.1.3 Mausmodelle für Atherosklerose

Bei der Wahl eines geeigneten Mausmodells für Atherosklerose müssen einige physiologische Besonderheiten bzw. Unterschiede beachtet werden. Dies betrifft vor allem Abweichungen im Plasma-Lipoproteinmetabolismus. So wird Cholesterin in der Maus vor allem in HDL-Partikeln transportiert, wohingegen es im Menschen in LDL-Partikeln verpackt zirkuliert. Aus diesem Grund entwickeln Wildtyp-Mäuse keine spontane Atherosklerose. Um diese Krankheit im Mausmodell studieren zu können, werden daher primär genetisch modifizierte Mausstämme verwendet. Zwei der am häufigsten eingesetzten Modelle sind Knock-out-Stämme (KO) bei denen das Apolipoprotein E deletiert ist, sowie LDL-Rezeptor-defiziente Mausstämme.

ApoE-Knock-out-Mäuse zeichnen sich durch einen stark erhöhten (> 5-fach) Plasma-Cholesterin-Level aus (S. H. Zhang *et al.* 1992; Plump *et al.* 1992). Bei ihnen entwickeln sich spontan atherosklerotische Plaques, sogar unter einer Standard Chow Diät, die nur einen geringen Fettanteil und kein Cholesterin beinhaltet (Nakashima *et al.* 1994). Die Läsionen sind vergleichbar mit denen

beim Menschen, aus anfänglichen Fettstreifen entwickeln sich im Laufe der Zeit komplexe Plaques. Eine Fett- und Cholesterol-reiche Diät kann diesen Phänotyp noch um ein Vielfaches verstärken. LDL-Rezeptor-Knock-out-Stämme eignen sich besonders zur Charakterisierung der humanen familiären Hypercholesterolämie. Sie zeichnen sich durch einen moderat erhöhten (2-fach) Cholesterol-Plasmaspiegel und erhöhte Werte von LDL und VLDL im Blut aus. Das Lipoprotein-Profil ähnelt hier stärker dem humanen System als dies in ApoE-KO-Mäusen der Fall ist (Ishibashi *et al.* 1993). Es bedarf jedoch einer geeigneten atherogenen Diät um Atherosklerose auszulösen (Ishibashi *et al.* 1994). Zahlreiche Studien nutzten seither diese Modelle um z. B. die Rolle der Ernährung bzw. die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten auf die Pathogenese der Erkrankung zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass ApoE-defiziente Mäuse im Gegensatz zu LDLR-KO nicht bzw. kaum auf eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung reagieren (Asset *et al.* 2001; Zampolli *et al.* 2006). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit LDL-Rezeptor-Knock-outs als Mausmodell für die Atherosklerose verwendet, um zu untersuchen, ob die kardioprotektiven Eigenschaften von Omega-3-Fettsäuren aus der Nahrung auch eine Modulation der Expression oder Aktivität von ADAM10 und ADAM17 umfasst.

1.2.2 Sekundäre bioaktive Pflanzenstoffe

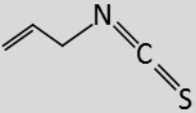
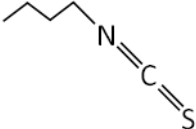
Sekundäre Pflanzenstoffe umfassen eine große Gruppe verschiedener chemischer Verbindungen die von Pflanzen im sogenannten Sekundärmetabolismus produziert werden. Sie grenzen sich damit von anabolen und katabolen Stoffwechselwegen sowie vom Energiestoffwechsel ab, sind also für das Wachstum und das Überleben des Organismus nicht zwingend notwendig. Die ihnen zugeschriebenen Wirkungen sind im Allgemeinen gesundheitsfördernd. So weisen sie unter anderem antikanzerogene, antioxidative, antimikrobielle, entzündungshemmende und Cholesterol-senkende Eigenschaften auf. Beispielhaft sei hier die große Gruppe der Polyphenole erwähnt. Eine Untergruppe, die Catechine, welche u.a. in grünem Tee vorkommen, sind Gegenstand vieler experimenteller Studien aufgrund ihrer potenziellen antioxidativen Eigenschaften. Studien der letzten Jahre legen zudem nahe, dass insbesondere Epigallocatechingallat (EGCG), neuroprotektiv im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung wirkt. Rezai-Zadeh *et al.* zeigten 2005 in einem Alzheimer-Mausmodell, dass EGCG die non-amyloidogene Prozessierung des amyloid precursor protein (APP) fördert und damit die Anreicherung des A β -Peptids verhindert. Verantwortlich für diese proteolytische Spaltung sind die α -Sekretasen ADAM9, -10 und -17. Folgestudien zeigten, dass EGCG die α -Sekretase-Aktivität von ADAM10 erhöht und das dies mit einer erhöhten Maturierung der Protease korreliert (Obregon *et al.* 2006). Die Maturierung von ADAM10 war in diesem Fall abhängig von Estrogen-Rezeptor α /Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalwegen (Fernandez *et al.* 2010). Genistein, ein Isoflavon aus der Sojapflanze, ist unter anderem bekannt für seine spezifische

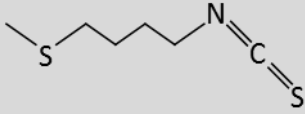
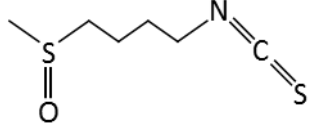
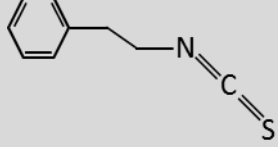
Inhibition von Tyrosinkinasen (Akiyama *et al.* 1987). Da die Aktivität von Tyrosinkinasen, wie beispielsweise des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) in mehreren Krebsarten erhöht ist, wird Genistein oft hinsichtlich seiner antikanzerogenen Eigenschaften untersucht. Piegholdt und Kollegen vom Institut für Humanernährung (CAU Kiel) testeten mehrere bioaktive Pflanzenstoffe in der Colon-Karzinoma-Zelllinie CaCo-2 hinsichtlich ihrer potentiellen Eigenschaft die intestinale Barriere zu schützen. Neben Genistein konnte hier für zwei weitere strukturell ähnliche Isoflavone, Biochanin A und Prunetin, eine erhöhte Integrität der Zellbarriere festgestellt werden. Eigene Analysen innerhalb dieses Kooperationsprojektes legten nahe, dass dies mit einer verminderten ADAM17-Aktivität korreliert (Piegholdt *et al.* 2014). Diese Beispiele zeigen bereits, dass die Aktivität der ADAMs durch Polyphenole beeinflusst werden kann. Ob dies auch für andere Gruppen sekundärer Pflanzenstoffe gilt, ist hingegen noch kaum untersucht.

1.2.2.1 Isothiocyanate

Isothiocyanate (ITCs) sind schwefelhaltige Verbindungen, die durch die Hydrolyse von Glucosinolaten der Kreuzblütlergewächse (Brassicaceae) entstehen (Fahey *et al.* 2001). Verantwortlich für diesen Prozess ist das Enzym Myrosinase. Enzym und Glucosinolate liegen in intakten Pflanzen räumlich getrennt voneinander vor. In der Rapspflanze *Brassica napus* wurden hierfür spezielle Myrosinzellen ausgemacht, in deren Zytoplasma das Enzym vorliegt (Thangstad *et al.* 1990). Erst durch mechanische Zerstörung der Pflanze, kommt die Myrosinase in Kontakt mit den in Vakuolen gespeicherten Glucosinolaten (Bones & Rossiter 1996). Die Hydrolyse-Produkte der Glucosinolate sind die eigentlichen hauptverantwortlichen Substanzen für die vielfach beschriebenen anti-kanzerogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften von Kreuzblütlergewächsen (Riedl *et al.* 2009; Terry *et al.* 2001; Dinkova-Kostova & Kostov 2012). Tabelle 2 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Isothiocyanate zusammen. Welche zellulären Mechanismen für die Eigenschaften der Isothiocyanate verantwortlich sind, soll dann im Folgenden am Beispiel von Sulforaphan beschrieben werden.

Tabelle 2: in dieser Arbeit eingesetzte Isothiocyanate, deren Vorstufen und Struktur

Isothiocyant	Glucosinolat-Vorstufe	Vorkommen	Struktur
Allyl-Isothiocyant (AITC)	Sinigrin	Senf, Meerrettich, Wasabi, diverse Kohllarten	
Butyl-Isothiocyant (BITC)	Gluconapin	Kapern, Weißer Senf, Meerrettich	

Isothiocyanat	Glucosinolat-Vorstufe	Vorkommen	Struktur
Erucin	Glucoerucin	Rucola, Brokkoli	
Sulforaphan (SFN)	Glucorophanin	Brokkoli, Brokkolisprossen	
Phenethyl-Isothiocyanat (PEITC)	Gluconasturtiin	Brunnenkresse, Meerrettich, Brokkoli	

1.2.2.2 Molekulare Wirkmechanismen von Sulforaphan und anderen Isothiocyanaten

Sulforaphan (SFN), ein Abbauprodukt des Glucosinolats Glucorophanin, ist das mit Abstand am besten charakterisierte Isothiocyanat. Der Fokus vieler Forschungsarbeiten liegt hierbei auf den chemoprotektiven Eigenschaften von Sulforaphan. Dies wird insbesondere der Fähigkeit zugeschrieben, den Phase I/II-Metabolismus zu beeinflussen. Phase I- und Phase II-Enzyme sind für die Verstoffwechselung von Xenobiotika und synthetischen Substanzen verantwortlich. Der Abbau von karzinogenen Substanzen durch Phase I-Enzyme kann jedoch zu hochreaktiven Intermediaten führen, die an Nukleinsäuren und Proteine binden können. Sulforaphan ist in der Lage Phase I-Enzyme zu inhibieren, allen voran Cytochrom p450-Monooxygenasen (CYPs), und kann somit DNA-Schädigungen entgegenwirken (Barcelo *et al.* 1996; Mahéo *et al.* 1997). Eine inhibitorische Wirkung auf CYPs konnte ebenfalls für AITC (Lim *et al.* 2014), Erucin (Yoxall *et al.* 2005) und PEITC (Yang *et al.* 1994; Nakajima *et al.* 2001) beschrieben werden. Isothiocyanate sind zudem prominente Aktivatoren antioxidativer Gene des Phase-II Metabolismus (Y. Zhang *et al.* 1992). Dies ist auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor erythroid-related factor-2 (Nrf2) zurückzuführen, welcher an bestimmte Promotor-Regionen binden kann, den antioxidant response elements (ARE). Dies führt zur Induktion von Genen wichtiger antioxidativer Phase II-Enzyme wie beispielsweise die NADPH-Quinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1), die Hämoxxygenase-1 (HO-1), Superoxid-Dismutase (SOD) und die Glutathion-S-Transferase (GST) (Surh & Na 2008; Surh *et al.* 2005). Eine Nrf2-aktivierende Funktion konnte neben Sulforaphan ebenfalls für AITC, BITC, Erucin und PEITC nachgewiesen werden (Ernst *et al.* 2011; Jakubíková *et al.* 2005).

Die chemoprotektiven Eigenschaften von Sulforaphan werden komplementiert durch die Inhibition von proinflammatorischen Signalwegen. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Inhibition des

proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB durch Sulforaphan. So konnten sowohl SFN als auch PEITC eine Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Stimulation von NFκB in murinen Makrophagen herunter regulieren und damit die Expression von Zielmolekülen wie der Cyclooxygenase 2 (COX-2), der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Prostaglandin inhibieren (Heiss *et al.* 2001; Jeong *et al.* 2004; Woo & Kwon 2007). Der Mechanismus der NFκB-Inhibition ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. So kann beispielsweise vermutet werden, dass der endogene Inhibitor von NFκB - IκBα - durch eine verminderte Phosphorylierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK) stabilisiert wird (Prawan *et al.* 2009; Xu *et al.* 2005). Dies legt eine Beteiligung vorgeschalteter MAPK-Signalwege nahe. In der Tat konnte beispielsweise erst kürzlich eine Studie zeigen, dass die MAP-Kinasen ERK1/2 eine Rolle bei der Inhibition des NFκB-Signalwegs durch Sulforaphan spielen, indem die Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes durch ERK1/2 vermindert wird (Kim *et al.* 2014). Einen Zusammenhang zwischen Isothiocyanaten und MAP-Kinasen konnten auch Jakubíková und Kollegen 2006 zeigen. In dieser Studie zeigte sich, dass sowohl Sulforaphan als auch Erucin die MAP-Kinasen ERK1/2 und Akt in CaCo-2-Zellen aktivieren und dass die Induktion von Phase II-Enzymen von diesen Signalwegen abhängig war (Jakubíková *et al.* 2006). Eine aktivierende Funktion für ERK1/2 konnte auch für andere Isothiocyanate wie AITC, BITC und PEITC gezeigt werden (Ernst *et al.* 2011)

Die antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften von Sulforaphan konnten Wagner *et al.* 2013 auch in vivo im DSS (dextran sodium sulphate)-Colitis-Mausmodell zeigen. Eine siebentägige Vorbehandlung der Tiere mit Sulforaphan verringerte die Schwere der DSS-induzierten Colitis. In diesem Zusammenhang konnte eine verminderte Expression mehrerer proinflammatorischer Proteine wie TNFα, IL-6 und Interferon γ sowie eine erhöhte Expression antioxidativer Proteine wie NQO-1 oder PON-2 (Paraoxonase 2) festgestellt werden (Wagner *et al.* 2013). Interessanterweise konnte in dem DSS-Colitis-Modell der Metalloprotease ADAM17 eine protektive Funktion zugeschrieben werden. ADAM17^{ex/ex}-Mäuse, bei denen die Expression der Protease drastisch reduziert ist, sind besonders empfindlich für eine DSS-induzierte Colitis, sie weisen stärkere Entzündungen auf als Wildtyp-Mäuse. Die schlechte Regeneration des Epithels nach DSS-Behandlung ist auf ein vermindertes EGFR-signalling zurückzuführen, da ADAM17 die Haupt-Sheddase dieses Signalwegs ist (Chalaris *et al.* 2010). Bislang gibt es kaum Daten zu einem möglichen Einfluss von Isothiocyanaten auf die ADAM-Metalloproteasen. Lediglich eine kürzlich erschienene Studie berichtete, dass Sulforaphan eine PMA-induzierte Expression von ADAM17 in humanen endothelialen HUVEC-Zellen unterbinden kann und dass dies mit einer Reduktion des stimulierten Sheddings des EPCRs (endothelial protein C receptor) einher geht (Ku *et al.* 2014). Ob dieser inhibitorische Effekt auch für andere Zelltypen gilt oder ITCs in einem anderen Kontext vielleicht auch eine stimulierende Wirkung auf ADAMs haben können, ist weiterhin unklar.

1.3 Das zelluläre Mikromilieu als Faktor der Regulation von ADAMs – Hypoxie

Neben der Ernährung können auch andere Faktoren, wie die Sauerstoffverfügbarkeit die Aktivität der ADAMs maßgeblich beeinflussen. Sauerstoff ist essentiell für das Überleben höherer Organismen. Es dient als terminaler Elektronenakzeptor bei der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien wobei ATP entsteht. Eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit oder ein geringer Sauerstoffpartialdruck unterhalb einer kritischen Grenze wird allgemein als Hypoxie bezeichnet, der Sauerstoffbedarf variiert jedoch von Gewebe zu Gewebe zwischen 1-11 % (Carreau *et al.* 2011). Eine erniedrigte Sauerstoffverfügbarkeit tritt *in vivo* vor allem in Tumoren, bei Entzündungen oder in ischämischen Geweben auf (Vaupel & Höckel 2003; Nizet & Johnson 2009). Verursacht wird dies durch ein gestörtes Gefäßnetzwerk, eine verringerte Blutversorgung oder eine unzureichende Neovaskularisation (Semenza 2003). Niedrige Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe spielen auch bei bakteriellen Infektionen eine Rolle. *Chlamydia pneumoniae* beispielsweise, welches bevorzugt Lungengewebe besiedelt und mit dem Krankheitsbild der COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) assoziiert ist, zeigt unter sauerstoffarmen Bedingungen eine erhöhte Infektionsrate und ein gesteigertes Wachstum (Juul *et al.* 2007). Neben akuten Infektionen treten bei Chlamydien auch persistente Infektionen auf, welche vor allem für chronische Erkrankungen verantwortlich sind. In diesem Zustand sind die Bakterien metabolisch inaktiv und persistieren in der Wirtszelle. Das Zytokin Interferon γ (IFN γ) ist eine bekannter Induktor für chlamydiale Persistenz und in einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unter hypoxischen Bedingungen nicht auftritt. Dies konnte auf eine verringerte Aktivität von IFN γ zurückgeführt werden (Roth *et al.* 2010).

Die Anpassung der Zellen an eine verringerte Sauerstoffkonzentration umfasst im Allgemeinen eine Umstellung der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung auf die Glykolyse, Angiogenese aber auch eine Modulation inflammatorischer Prozesse (Harris 2002). Den 1992 zuerst beschriebenen Hypoxie-induzierten Faktoren (HIFs), insbesondere HIF-1, kommt dabei eine Schlüsselrolle zu (Semenza & Wang 1992). Diese Transkriptionsfaktoren sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit. Beide werden konstitutiv exprimiert, während die β -Untereinheit jedoch stabil im Zellkern vorliegt, wird die α -Untereinheit unter Normoxie kontinuierlich abgebaut. Im Zytoplasma wird die α -Untereinheit von sauerstoffabhängigen Prolyl-Hydroxylasen hydroxyliert. Hierüber kommt es zur Interaktion mit dem von Hippel-Lindau-Protein und darauffolgend zur Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation. Sauerstoffmangel verhindert die Prolyl-Hydroxylierung, HIF-1 α transloziert in den Zellkern und dimerisiert dort mit der β -Untereinheit. Das aktive Protein bindet nun im Folgenden an hypoxia responsive elements (HRE) in Promotorregionen

HIF-regulierter Gene. Bislang wurden mehr als 100 Gene beschrieben, die von HIFs induziert werden (Weidemann & Johnson 2008).

Mehrere Studien legen nahe, dass ADAM17 ebenfalls von HIF-1 reguliert wird. So zeigten Charbonneau *et al.* 2007, dass die mRNA-Expression von *ADAM17* in synovialen Zellen hochreguliert ist, wenn die Zellen unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) kultiviert werden. Dies korreliert mit einer erhöhten TNF α -*Shedding*-Aktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HIF-1 direkt an HR-Elemente in der Promotorregion von *ADAM17* bindet. Andere Studien zeigten ebenfalls, dass die Expression von *ADAM17* durch eine verringerte Sauerstoffzufuhr induziert werden kann. Eine erhöhte Expression von *ADAM17* in Tumorzelllinien wie U87 (Glioma-Zelllinie) und HepG2 (hepatozelluläres Karzinom) unter Hypoxie hat dabei auch funktionelle Konsequenzen: Die Aktivität von ADAM17 führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin in HepG2-Zellen und einer erhöhten Invasivität der U87-Tumorzelllinie (Wang *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2007). Interessanterweise deutet eine Folgestudie darauf hin, dass nicht HIF-1 allein für die erhöhte Expression von *ADAM17* unter Hypoxie in U87-Zellen verantwortlich ist, sondern der Transkriptionsfaktor *specificity protein 1* (Sp1) ebenfalls an den Promotorbereich von *ADAM17* binden kann und die Expression in einem hypoxischen Milieu induziert (Szalad *et al.* 2009). Rzymiski und Kollegen zeigten in einer Studie von 2012, eine graduelle Induktion der Expression von *ADAM17* abhängig von der Schwere der Hypoxie. So führte eine moderate Hypoxie (1 % O₂) zu einer leicht erhöhten *ADAM17*-Expression in HeLa-Zellen und dies kann auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 zurückgeführt werden. Eine schwere Hypoxie (> 0,1 % O₂) führte dagegen zu einer sehr viel stärkeren Induktion der Expression von *ADAM17*. Hauptverantwortlich hierfür waren die Transkriptionsfaktoren PERK (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) und ATF-6 (*activating transcription factor 6*), die als *unfolded protein response* (UPR) in Folge von ER-Stress aktiviert werden (Rzymiski *et al.* 2012). Hypoxie führt jedoch nicht immer zu einer erhöhten ADAM-Expression. In der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SHSY-5Y führte eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit (2,5 % O₂) nach 48 h zu einer verminderten Proteinexpression von ADAM10 und ADAM17, wohingegen die Expression der Beta-Sekretase BACE1 unverändert blieb. Dies korreliert mit einer geringeren α -Sekretaseaktivität für das in der Alzheimer'schen Erkrankung involvierte APP. Auf die mRNA-Expression beider Metalloproteasen und BACE hatte die Hypoxie jedoch keinen Einfluss (Marshall *et al.* 2006). Rybnikova *et al.* stellten in ihrer Studie 2012 ebenfalls fest, dass die mRNA-Expression von *Adam17* im Hippocampus und im Neokortex von Ratten durch Hypoxie herunterreguliert wird. In anderen Hirnarealen konnte hingegen keine Veränderung festgestellt werden.

Diese Studien zeigen, dass das zelluläre Mikromilieu, in diesem Fall die Sauerstoffverfügbarkeit, einen Einfluss auf die Expression und auch die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 haben kann. Auf welche Weise die Proteasen reguliert werden, hängt jedoch von mehreren Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Zell- oder Gewebetyp und dem Grad der Hypoxie. Neben den HIFs können dabei auch andere Faktoren eine Rolle spielen.

1.4 Fragestellung

Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 sind für die Freisetzung verschiedener Transmembranproteine verantwortlich, die wichtige Funktionen in physiologischen und pathologischen Prozessen spielen. Zu diesen Substraten zählen Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Zytokine und auch deren Rezeptoren. Betrachtet man die Vielzahl an Erkrankungen die mit einer Dysregulation der ADAM-Aktivität in Verbindung gebracht werden – wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Infektionen, Entzündungen und verschiedene Tumorarten – wird offensichtlich warum die Regulation dieser Proteasen solch ein wichtiges Forschungsfeld darstellt.

Umweltfaktoren können wesentlich zur Entstehung inflammatorischer Erkrankungen beitragen bzw. diese beeinflussen. Die Ernährung steht dabei in einem besonderen Fokus. Fettstoffwechselstörungen beispielsweise, gelten als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Atherosklerose. Omega-3-Fettsäuren wurden in diesem Zusammenhang bereits häufig hingehend ihrer kardioprotektiven Eigenschaften beschrieben. Für ADAM10 und ADAM17 kann ebenfalls über eine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten spekuliert werden, da ihre Aktivität proinflammatorische Reaktionen beeinflusst, die für die Atherogenese bedeutsam sind. Außerdem sind sie wichtig für die Integrität der endothelialen Barriere. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, inwiefern die antiatherogenen Eigenschaften von Omega-3-Fettsäuren auch eine Beeinflussung der ADAMs umfasst. Zu diesem Zweck wurde eine Fütterungsstudie mit Wildtyp- und LDL-Rezeptor-Knock-out-Mäusen durchgeführt.

Sekundäre Pflanzenstoffe werden hauptsächlich aufgrund ihrer antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften zur Prävention von Krankheiten empfohlen. Inwiefern diese dabei auch einen Einfluss auf ADAMs haben, ist bisher nur unzureichend untersucht. Für das Isothiocyanat Sulforaphan wurde bereits gezeigt, dass es sowohl die Expression als auch die Aktivität von ADAM17 in Endothelzellen inhibieren kann. Ob dies auch für andere Zelltypen, wie das dermale Epithel gilt oder ob Sulforaphan in einem anderen Kontext auch einen stimulierenden Effekt haben kann, war die Fragestellung des zweiten Teils dieser Arbeit.

In einem letzten Teilabschnitt sollte schließlich der Frage nachgegangen werden, ob das zelluläre Mikromilieu einen Einfluss auf die Metalloproteasen hat. Eine erniedrigte Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie) tritt in vivo vor allem in Tumoren oder bei Entzündungen auf. Eine erhöhte Expression konnte in Tumoren sowohl für ADAM10 als auch ADAM17 bereits beschrieben werden. Zudem gibt es mehrere Hinweise, dass ADAM17 durch Hypoxie-induzierbare Faktoren reguliert werden kann. Ob dies einen stimulierenden oder einen inhibitorischen Effekt nach sich zieht, scheint allerdings Zell- bzw. Gewebe-abhängig zu sein. In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf ADAM10 und ADAM17 eine epitheliale Larynxkarzinoma-Zelllinie (HEp2) verwendet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

12-Loch-Zellkulturplatten , <i>BD Falcon™</i>	BD Biosciences, New Jersey
6-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
-80°C-Schrank <i>Forma 900 Series</i>	Thermo Scientific, Massachusetts
Absaug-Pumpe , <i>BVC professional</i>	Vacuubrand, Wertheim
Analysenwaage <i>S-603</i>	Denver Instruments (jetzt Sartorius, Göttingen)
Analysenwaage <i>XS205</i>	Mettler Toledo, Gießen
Brutschrank <i>HERA cell 150</i>	Thermo Scientific, Massachusetts
Einfrier-Behälter <i>Nalgene® Mr. Frosty</i>	Thermo Scientific, Massachusetts
Einkanalpipetten	Brand, Wertheim
Frischhaltebox , luftdicht	EMSA, Emsdetten
Gel-Blotting-Papiere <i>Whatman 1,5 mm</i>	Roth, Karlsruhe
Heizblock <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Kippschüttler <i>Unitwist RT</i>	Uniequip, Planegg
Lichtmikroskop , invers	Hund, Wetzlar
Magnetrührer <i>CB162</i>	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire
Mikro-Schraubrohre , 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten <i>PCR MicroAmp® optical 96 well reaction plate</i> , Real-Time PCR	Life Technologies, Carlsbad
Mikrotiterplatten , 96-Loch, flacher Boden	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten , 96-Loch, flacher Boden, ELISA	Greiner Bio One, Kremsmünster
Mikrotiterplatten-Folie <i>Optical Adhesive film</i> , Real-Time PCR	Life Technologies, Carlsbad
Mikrotiterplatten-Photometer <i>EL800</i>	BioTek Vermont
Multi-Imagingsystem <i>Fusion FX7</i>	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger <i>superfrost® plus</i>	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	Roth, Erlangen
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Gelsystem Mini Twin S	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web M	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S	Peqlab, Erlangen
pH-Meter <i>pH211</i>	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Real-Time PCR System <i>StepOnePlus</i>	Life Technologies, Carlsbad
Rollentisch <i>Stuart SRT6</i>	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire

Roti®-PVDF-Membran , 0,45 µm	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sonifizierer	Bandelin electronic, Berlin
Spannungsgeber EV231	Peqlab, Erlangen
Spannungsgeber PAC 300	Bio-Rad, München
Spectrophotometer , Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Spritzenfilter , 0,45 und 0,2 µm Porendurchmesser	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilwerkbank	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Thermozykler peqstar96 universal	Peqlab, Erlangen
Überkopfschüttler MACS Mix	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Ultrasentrifuge TL-100 , Festwinkelrotor TLA-100	Beckman Coulter; Krefeld
Ultrasentrifugen-Röhrchen polycarbonate centrifuge tubes	Beckman Coulter; Krefeld
Vortexer Vortex Genie	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasseraufbereitungssystem TKA GenPure	TKA, Niederelbert
Wasserbad GFL1004	GFL, Burgwedel
Zellkulturschalen , ø 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber , 16 cm und 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Centrifuge 5417R , Festwinkelrotor F45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5424 , Festwinkelrotor FA45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5804R , Festwinkelrotor F34-6-38	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810R , Ausschwingrotor A-4-62	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R , Festwinkelrotor F14-6x250LE	Thermo Scientific, Massachusetts
Zentrifugenröhrchen , 50 ml und 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.2 Chemikalien und Reagenzien

1,10-Phenanthrolin	Roth, Karlsruhe
ACA	Calbiochem, Schwalbach
Agarose	Roth, Karlsruhe
Allyl-Isothiocyanat (AITC)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
BAPTA AM	Tocris Bioscience, Bristol
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
Butyl-Isothiocyanat (BITC)	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl₂)	Roth, Karlsruhe
Cetuximab C225	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumphosphat (Na₂HPO₄)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)

DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose (4.5 g/l)</i>	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
DNA-Ladepuffer <i>6x Loading Dye</i>	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
DNA-Marker <i>GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder</i>	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
ECL Select	GE Healthcare, New Jersey
EDTA (Di-Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Erucin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 96 % (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GÖ 6976	Sigma, Deisenhofen
Interferon γ (IFN γ)	PeproTech, New Jersey
Ionomycin (IO)	Calbiochem, Schwalbach
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
KGM2 <i>Keratinocyte growth medium 2, ready-to-use</i>	Promocell, Heidelberg
Kollagen aus Rattenschwanz	Roche, Grenzach-Whylen
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>E. coli</i>	Sigma, Deisenhofen
LSM 1077	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
LY 294002 (LY)	Calbiochem, Schwalbach
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Marimastat (MM)	Tocris Bioscience, Bristol
Maxima RT Reverse Transkriptase	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe
Meyer's Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol® 4-88	Calbiochem, Schwalbach
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Oligo d(T)	Sigma, Deisenhofen
oxATP	Sigma, Deisenhofen
peqGOLD TriFast	Peqlab, Erlangen
Penicillin/Streptomycin , 100x	PAA, Schwalbach
p-Formaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phenethyl-Isothiocyanat (PEITC)	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen

Phosphatase-Inhibitor-Mix <i>PhosStop</i>	Roche, Grenzach-Whylen
PP2	Calbiochem, Schwalbach
PPADS	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Mix <i>Complete</i>	Roche, Grenzach-Whylen
Proteinmarker, PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Random Hexamer Primer	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
RNase Inhibitor <i>RiboLock</i>	Fermentas (jetzt Thermo Scientific, Massachusetts)
Roti-Immunoblock, 10x	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 <i>Roswell Park Memorial Institute</i>	PAA, (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (HCl)	Roth, Karlsruhe
Saponin	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H₂SO₄)	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin aus <i>Streptomyces sp.</i>	Calbiochem, Schwalbach
Sulforaphan	Sigma, Deisenhofen
Sulforaphan "HE"	Gabe von Prof. Dr. Anika Wagner, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, CAU Kiel
Suramin (Sur)	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA, 10x	PAA (jetzt GE Healthcare, New Jersey)
Tween-20	Roth, Karlsruhe
U-73122	Sigma, Deisenhofen

2.3 ELISA und andere Kits

ELISA human	
sTNF RI/TNFRSF1A DuoSet	R&D Systems (jetzt Bio-Techne, Minnesota)
ELISA murin	
Cadherin-5 (CDH5) ELISA kit	Cusabio, Wuhan
CXCL16 DuoSet	
E-Cadherin DuoSet	
ICAM-1/CD54 DuoSet	
IL-6 DuoSet	
IL-6 R alpha DuoSet	
JAM-A DuoSet	R&D Systems (jetzt Bio-Techne, Minnesota)
L-Selektin/CD62L DuoSet	
CCL2/JE/MCP-1 DuoSet	
TNF RI/TNFRSF1A DuoSet	
VCAM-1/CD106 DuoSet	

Weitere Kits

SV total RNA Isolation System
Vectastatin Elite ABC Kit

Promega, Wisconsin
Vector Laboratories, Kalifornien

2.4 Software

Adobe Photoshop 6.0 AxioVision 4.8.2	Adobe Systems, USA Zeiss, DE
Bio 1D	Vilber Lourmat, DE
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, USA
Fusion 15.17	Vilber Lourmat, DE
GraphPadPrism 5	GraphPad Software Inc., USA
Mendeley Desktop Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2010	Mendeley Ltd., UK Microsoft Corp., UK
StepOne Software 2.2.2	Applied Biosystems, USA

Abbildung 1, Abbildung 2 und Abbildung 26 wurden mit Hilfe der Powerpoint-Vorlagen von Servier Medical Art angefertigt (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

2.5 Antikörper

Tabelle 3: verwendete Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Immunisierte Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IHC
ADAM10 19026	Millipore	Kaninchen		1:50
ADAM17	C. Blobel (HSS, NY)	Kaninchen	1:1000	
ADAM17 19027	Millipore	Kaninchen	1:3000	1:50
ERK 4696	Cell Signaling	Maus	1:3000	
ICAM-1 AF796	R&D	Ziege		1:100
JAM-A H-80	Santa Cruz	Kaninchen		1:20
phospho-ERK 9101	Cell Signaling	Kaninchen	1:3000	
von-Willebrand-Faktor (vWF) A0082	Dako	Kaninchen		1:100
VCAM-1 AF643	R&D	Ziege		1:200

2.6 Mauslinien

Die Fütterungsstudie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Gabriele Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Haltung, Fütterung, Tötung und Organentnahme der Tiere erfolgte in Halle und wurde von den dortigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ausgeführt.

Es wurden vier Wochen alte männliche Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J) von Charles River Laboratories bezogen. Als Mausmodell der Atherosklerose wurde ein LDL-Rezeptor-Knock-out-Stamm, LDLR^{-/-}, (B6.129S7-Ldlrtm1Her/J) verwendet. Die von Jackson Laboratories bezogenen Mäuse waren ebenfalls vier Wochen alte Männchen.

2.6.1 Zusammensetzung der Diäten

Vor Beginn der Studie wurden die Mäuse für fünf Tage mit einer ungereinigten Standard-Nager-Diät gefüttert. Diese enthielt 500 g Kohlenhydrate, 200 g Roh-Protein, 40 g Roh-Fett, 50 g Roh-Faser und 135 g Wasser pro kg (#1324, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage). Wildtyp- und Knock-out-Mäuse wurden dann zufällig auf je zwei Diät-Gruppen aufgeteilt. Die Basis der *Western* Diät bestand aus 288,5 g Maisstärke, 200 g Casein, 200 g Sucrose, 60 g Vitamin- und Mineralstoffmix, 50 g Cellulose, 3 g DL-Methionin und 1,5 g Cholesterol pro kg. Diese Diät wurde für eine Gruppe angereichert mit 200 g/kg Schweineschmalz, für die zweite Gruppe mit 100 g/kg Schweineschmalz und 100 g/kg Fischöl. Eine Analyse der Fettsäurezusammensetzung (siehe auch Tabelle 10 im Anhang) ergab für das Schweineschmalz 49,7 % gesättigte Fettsäuren, 38,7 % einfach ungesättigte Fettsäuren, 10,8 % Omega-6-Fettsäuren und 0,8 % Omega-3-Fettsäuren. Fischöl setzte sich zu 29,7 % aus gesättigten Fettsäuren, 38 % einfach ungesättigten Fettsäuren, 9,1 % Omega-6-Fettsäuren und zu 23,2 % aus Omega-3-Fettsäuren zusammen. Alle Diäten wurden ad libitum über einen Zeitraum von 12 Wochen zugeführt. Trinkwasser stand ebenso ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen in Räumen mit kontrollierter Temperatur (23 ± 1 °C) und Luftfeuchtigkeit (50-60 %) gehalten. Der Tag/Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden. Alle experimentellen Maßnahmen folgten den Regeln für die Haltung von Labortieren und wurden genehmigt durch das Bundesland Sachsen-Anhalt.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Zelllinien

HaCaT (*H*uman *a*dult *l*ow *C*alcium *h*igh *T*emperature *K*eratinocytes)

Bei HaCaT-Zellen handelt es sich um in vitro spontan immortalisierte, nicht-kanzerogene Keratinozyten, die aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms der oberen Rückenhaut eines 62-jährigen Patienten entnommen wurden. Etabliert und charakterisiert wurde die HaCaT-Zelllinie Ende der Achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (Boukamp *et al.* 1988).

HEp-2

Ursprünglich beschrieben als eine aus einem humanen laryngealen Karzinom stammende Zelllinie (Fjelde 1955), ist inzwischen bekannt, dass HEp-2-Zellen mit HeLa-Zellen kontaminiert sind (Nelson-Rees *et al.* 1981). Sie werden dennoch u.a. bevorzugt für die Anzucht von bestimmten Chlamydien-Stämmen verwendet (Roblin *et al.* 1992).

2.7.2 Kultivierung von Zelllinien

Kulturmedium	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in DMEM oder RPMI
PBS pH 7,2	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Trypsin-EDTA	0,05 % (verdünnt in PBS)

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich adhärente Zelllinien verwendet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultur der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die verwendeten Medien wurden steril bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen (ø 10 cm) mit einem Volumen von 10 ml Kulturmedium. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA mehrere Minuten inkubiert, bis sie sich von der Zellschale ablösten. Um das proteolytisch aktive Trypsin abzustoppen, wurden die Zellen in 5 ml serumhaltiges Medium aufgenommen und bei 200 x g für 5 Minuten sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und subkultiviert. HaCaT-Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusätzen kultiviert, HEp-2 Zellen in RPMI-Medium mit Zusätzen. Für Stimulationsversuche wurde zunächst die Konzentration der Zellsuspension mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.7.3) und die gewünschte Zellzahl in 6- oder 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät.

2.7.3 Zellzahlbestimmung

Für die lichtmikroskopische Zellzahlbestimmung wurde die verdünnte Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung (0,2 %) vermischt und auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Färbung mit Trypanblau erlaubt es, lebende von toten Zellen zu unterscheiden, da tote Zellen aufgrund ihrer

zerstörten Membran blau angefärbt werden. Lebende Zellen bleiben farblos. Die Großquadrate der Zählkammer wurden ausgezählt und daraus die Konzentration der Zellsuspension nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{Mittelwert gezählter Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.7.4 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Einfriermedium	DMEM mit 20 % FKS (v/v) und 10 % DMSO (v/v)
Kulturmedium	10 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in DMEM
Trypsin-EDTA (1x)	0,05 % (verdünnt in PBS)

Eukaryotische Zellen wurden für eine langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert, mit 1 ml Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 200 x g pelletiert, das Sediment in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Zur schonenden Abkühlung wurden die Zellen für mindestens einen Tag in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Abkühlgeschwindigkeit 1 °C/ Minute) bei -80 °C gelagert und schließlich in einen Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen von eukaryotischen Zellen wurden diese vom Stickstofftank sofort im 37 °C Wasserbad erwärmt und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Um die DMSO-Rückstände des Einfriermediums zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkulturschale kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt.

2.7.5 Stimulation von Zellen und Einsatz von Inhibitoren

Tabelle 4: eingesetzte Stimulanzen und Inhibitoren

Bezeichnung	Verwendung	Eingesetzte Konzentration
Stimulanzen		
Allyl-Isothiocyanat	MAP-Kinase ERK1/2-Aktivator	10 µM
Butyl-Isothiocyanat	MAP-Kinase ERK1/2-Aktivator	10 µM
Erucin	MAP-Kinase ERK1/2-Aktivator	10 µM
Interferon γ	Pro-inflammatorisches Zytokin	25 U/ml
Ionomycin	Ca ²⁺ -Ionophor	1 µM

Bezeichnung	Verwendung	Eingesetzte Konzentration
Stimulanzen		
Phenethyl-Isothiocyanat	MAP-Kinase ERK1/2-Aktivator	5 µM
Sulforaphan	MAP-Kinase ERK1/2-Aktivator	10 µM
Inhibitoren		
ACA <i>N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilic Acid</i>	Phospholipase A2- und TRP (<i>transient receptor potential</i>)-Kanal-Blocker	10 µM
BAPTA/AM <i>1,2-bis (o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester</i>	intrazellulärer Ca ²⁺ -Chelator	30 µM
Cetuximab	EGFR-blockierender Antikörper	10 µg/ml
EGTA <i>Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid</i>	Breitband-Chelator für Metallionen	3 mM
GÖ 6976 <i>12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole</i>	Proteinkinase C-Inhibitor	1 µM
LY 294002 <i>2-(4-Morpholinyl)-8-(4-aminophenyl)-4H-1-benzopyrone-4-one</i>	Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitor	10 µM
Marimastat <i>(2S,3R)-N⁴-((1S)-2,2-Dimethyl-1-((methylamino)carbonyl)propyl)-N¹,2-hydroxy-3-(2-methylpropyl)butanediamide</i>	Breitband-Metalloprotease-Inhibitor	10 µM
PP2 <i>4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine</i>	Src-Kinase-Inhibitor	10 µM
PPADS <i>Pyridoxalphosphate-6-Azophenyl-2',4',-Disulfonic Acid</i>	P2X-Rezeptor-Inhibitor	200 µM
Staurosporin	Proteinkinase C-, Proteinkinase A-, und MLCK (<i>myosin light-chain kinase</i>)-Inhibitor	1 µM
Suramin	P2-Rezeptor-Inhibitor	50 µM
U-73122 <i>1-[6-((17β-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione</i>	Phospholipase C- und Phospholipase A2-Inhibitor	10 µM

Für Stimulationsversuche wurden Zellen in der gewünschten Konzentration in 6- bzw. 12-Lochplatten ausgesät. Die Stimulation erfolgte stets am darauffolgenden Tag. Zur Vorbereitung wurden die HaCaT-Zellen 1 x mit Basalmedium (ohne Zusätze) gewaschen und für etwa 2 Stunden in Basalmedium inkubiert. Die anschließende Stimulation erfolgte ebenfalls in zusatzfreiem Medium. Bei gleichzeitigem Einsatz von Inhibitoren wurden diese 15 min vor Beginn der Stimulation hinzugegeben.

Versuche mit HEp-2-Zellen wurden aufgrund der langen Stimulationszeit (24-48 h) in Kulturmedium mit 5 % FKS durchgeführt, um die Zellen nicht durch Nährstoffentzug zu stressen. Die Zugabe des Inhibitors Marimastat erfolgte hier ebenfalls 15 min vorher und wurde nach 24 Stunden aufgefrischt, so dass die Ziel-Moleküle zu Beginn der Stimulation bereits inhibiert waren und die Inhibition über den gesamten Stimulationszeitraum aufrechterhalten wurde.

Für die einzelnen Stimulanzien und Inhibitoren wurden entsprechende Lösungsmittelkontrollen eingesetzt.

Die Stimulation wurde beendet, indem die Überstände abgenommen und ein geeigneter Lysispuffer zu den Zellen gegeben wurde. Bis zur Aufarbeitung wurden die Platten bei -80 °C eingefroren. Die Überstände wurden durch Zentrifugation (4 °C, 12000 x g, 5 min) von Zelldebris befreit und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.6 Proteinextraktion aus Zellen und Geweben

Lysispuffer <i>Western Blot</i> pH 7,4	5 mM Tris 1 mM EGTA 250 mM Saccharose 1 % (v/v) Triton-X-100 10 mM 1,10-Phenanthrolin 1 × <i>Complete</i> Protease-Inhibitor-Mix 1 × <i>PhosStop</i> Phosphatase-Inhibitor-Mix	<i>Vor jedem Versuch frisch hinzugefügt</i>
PBS pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄	
Tris-HCl-Puffer pH 6,8	20 mM Tris 10 mM 1,10-Phenanthrolin 1 × <i>Complete</i> Protease-Inhibitor-Mix 1 × <i>PhosStop</i> Phosphatase-Inhibitor-Mix	<i>Vor jedem Versuch frisch hinzugefügt</i>

Zur Lyse der Zellen aus Zellkulturversuchen wurde *Western Blot*-Lysispuffer zu den Zellen gegeben, anschließend wurden die Platten zunächst 3 x bei -80 °C eingefroren und aufgetaut. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden bei 4 °C und 12000 x g für 5 min abzentrifugiert.

Der Proteingehalt der so erhaltenen Zelllysate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford 1976) bestimmt. Hierfür wurde eine gebrauchsfertige Coomassie-Lösung (Thermo Scientific) verwendet. Die Standardkurve wurde mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen BSA-Verdünnungsreihe (Thermo Scientific) generiert. Die Messung der Extinktion erfolgte in

Mikrotiterplatten im Plattenphotometer EL800 von BioTek bei 595 nm. Bei allen Messungen wurde Lysispuffer als Leerwert eingesetzt und die Messwerte der Proben hiervon entsprechend bereinigt.

Zur Proteinextraktion aus murinen Organen wurden diese mittels hochbeschleunigter Kügelchen in der *SpeedMill Plus* (Analytik Jena) zunächst homogenisiert. Hierfür wurde das Gewebe in Schraubdeckelgefäßen mit 3-4 Keramik-Kügelchen (2,8 mm, Precellys) in Tris-HCl-Puffer (ca. 100 µl/10 mg Gewebe) 3-5-mal für 90 sec aufgeschlossen. Die Proben wurden anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Das Homogenat wurde folgend bei 100000 x g für 1 Stunde bei 4 °C in der Ultrazentrifuge *TL100* (Beckmann Coulter) separiert, wobei sich die löslichen Zellbestandteile im Überstand befanden und die unlösliche Membranfraktion sedimentiert wurde. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde wie oben beschrieben bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Um Proteine aus der Membranfraktion effizient heraus zu lösen, wurde das Pellet zunächst im *Western Blot*-Lysispuffer resuspendiert und anschließend sonifiziert. Dies erfolgte mit Hilfe eines Ultraschallstabes für 2 min (je 30 sec Puls, bei 70 % Leistung, 30 sec Pause). Unlösliche Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g für 5 min entfernt, das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.7 Isolation von Mikrosomen aus hepatischem Gewebe und Fettsäureanalyse

Die Isolation von Mikrosomen aus Mäuse-Leber und die anschließende Fettsäureanalyse wurden im Rahmen des Kooperationsprojektes von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Gabriele Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Frische Gewebestücke wurden in einer eiskalten Lösung aus 0,15 M NaCl und 0,25 M Saccharose homogenisiert und anschließend bei 2000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Homogenat wurde dann erneut bei 100000 x g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Mikrosomen-Fraktion zu separieren. Lipide der Mikrosomen wurden isoliert, indem die Fraktion über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus n-Hexan und Isopropanol (3:2 v/v) inkubiert wurde (nach einer Methode von Hara & Radin 1978). Im nächsten Schritt wurden die isolierten Lipide mittels Trimethyl-Sulfoniumhydroxid in Fettsäure-Methylester transmethyliert (Butte 1983). Diese wurden nun im Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, Deutschland) mit einer HP-FFAP Kapillarsäule und einem Flammen-Ionisationsdetektor analysiert (GC-2010, Shimadzu, Deutschland).

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Puffer pH 8,8	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel-Puffer pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Trenngel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Rotiphorese Gel 30 (Roth)	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
APS	10 % (w/v) APS in H ₂ O
SDS-Probenpuffer finale Konzentration	2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerin 125 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteingemische elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In dieser Arbeit erfolgte dies nach der Methode von Laemmli 1970.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei Gele (Sammel- und Trenngel) verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Acrylamid-Konzentration und ihres pH-Wertes unterscheiden. Abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine wurden in dieser Arbeit Trenngele unterschiedlicher Acrylamid-Konzentrationen verwendet. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele nach Laemmli

	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 4,5 %
Rotiphorese Gel 30	2,33 ml	3,33 ml	0,835 ml
Sammelgel-Puffer	-	-	1,25 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	-
H₂O	5,0 ml	4,0 ml	2,9 ml
TEMED	30 µl	30 µl	15 µl
APS	60 µl	60 µl	30 µl

Die aufzutrennenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer vermischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde zusätzlich ein Größenmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific)

aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei zunächst 15 mA pro Gel im Sammelgel und 25 mA pro Gel im Trenngel.

2.8.2 Proteintransfer durch *Western Blot*

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

Bei einem *Western Blot* werden die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische auf eine feste Matrix übertragen und immobilisiert. Die Matrix bestand hier aus einer 0,45 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran und als Verfahren wurde die Methode des *Tank blottings* verwendet. Zu diesem Zweck wurden Membran und Filterpapiere (Whatman) auf die gewünschte Größe geschnitten. Die Membran wurde mit Methanol aktiviert und anschließend im Transferpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Für die Blot-Kassetten wurde schließlich das Gel und die PVDF-Membran zwischen je zwei Filterpapiere und eine Filtermatte gelegt. Die Kassette konnte so in die *Tank Blot*-Apparatur eingesetzt werden, wobei darauf geachtet wurde, dass das Gel auf der Kathodenseite war und die Membran auf der Seite der Anode. Der Transfer erfolgte entweder bei 80 mA über Nacht oder bei 200 mA für 2 h.

2.8.3 Immunologische Detektion transferierter Proteine

Blockier-Lösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T-Puffer
TBS-Puffer pH 7,4	20 mM Tris 140 mM NaCl 10 mM EDTA
TBS-T-Puffer	0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS-Puffer
Stripping-Puffer pH 6,7	62,5 mM Tris 2 % (w/v) SDS 0,7 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

Unmittelbar nach Abschluss des Blottens wurde die PVDF-Membran in einer 5%igen Milchpulver-Lösung 1 h bei Raumtemperatur (RT) oder 4 °C über Nacht geblockt. Hierbei binden die Proteine des Milchpulvers an die noch freien Stellen der Membran, wodurch eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran verhindert werden soll. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur (siehe 2.5). Lediglich Antikörper der Firma Cell Signaling wurden gemäß Empfehlung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Primär-Antikörper wurden in der Blockierlösung verdünnt. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 min in TBS-T um

ungebundene Antikörper zu entfernen. Die speziesspezifischen Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden in TBS-T verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend wiederum für 3 x 10 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Peroxidase-Substrates *ECL Select* (GE Healthcare) und der *Fusion FX* Chemilumineszenzkamera (PepLab). Zur Quantifizierung der Proteinbanden im *Western Blot* wurde die Software Bio1D verwendet.

Sollte eine Membran mehrmals mit verschiedenen Antikörpern markiert werden, mussten Primär- und Sekundärantikörper zunächst von der Membran abgelöst werden. Dieser Vorgang wird als *Stripping* bezeichnet. Hierfür wurde die Membran für 15-45 min bei 65 °C in *Stripping*-Puffer inkubiert. Die Zeit richtete sich dabei nach Intensität der zu entfernenden Banden. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen und musste erneut für 1 h bei RT in Blockier-Lösung inkubiert werden, bevor die Membran mit einem neuen Primärantikörper markiert werden konnte.

2.8.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PBS pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Wasch-Puffer	0,05 % Tween 20 in PBS
Reagenz-Lösung steril filtriert	1 % BSA in PBS
Stopp-Lösung	2 N H ₂ O ₂

Eine weitere Methodik, um spezifisch Proteine in einer Probe nachweisen zu können, ist der *Sandwich-ELISA*. Diese Form des Proteinnachweises erfolgt in Mikrotiterplatten über Bindung des nachzuweisenden Proteins an einen immobilisierten Antikörper und die nachfolgende Bindung eines zweiten, Antigen-spezifischen Biotin-gekoppelten Antikörpers. Nach anschließender Inkubation mit Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP) erfolgt die Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins durch Zugabe und Umsetzung eines chromogenen Peroxidase-Substrates (Tetramethylbenzidin, TMB) und photometrische Messung der Farbentwicklung.

In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich DuoSet ELISA Kits der Firma R&D verwendet. Eine Ausnahme bildete der murine VE-Cadherin-ELISA der Firma Cusabio. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller. Die Absorption bei 450 nm wurde gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm im *SunriseTM microplate reader* von Tecan gemessen.

2.8.5 Fluorogener Peptidsubstrat-assay

Dieser *assay* basiert auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Prinzip. Die Emissionsenergie des Donors FAM (Carboxyfluorescein) wird auf den Akzeptor, ein Dabcyl-Gruppe (4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoyl) übertragen. Schneidet eine aktive Protease das Substrat, trennt sie somit den Akzeptor vom Donor, die Energie wird auf ein Photon übertragen und es entsteht eine Fluoreszenz, die nach Anregung detektiert werden kann. Die Erkennungssequenz für die ADAM-Proteasen basiert auf der Spaltstelle von TNF α (-Leu-Ala-Gln-Ala-Homophe-Arg-Ser-Lys).

Um die Aktivität der ADAM-Proteasen zu bestimmen wurde eine 96-Lochplatte mit 15000 HaCaT-Zellen in 150 μ l DMEM Kulturmedium pro *well* kultiviert. Nach Gabe von Stimulanzen und Inhibitoren wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ M des ADAM *fluorogenic substrates* (Enzo Lifesciences) gestartet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Überstände in eine schwarze 96-well-Platte transferiert und mit dem 96-well *Microplate-Reader* FLx800TM mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und eine Emission bei 530 nm detektiert.

2.8.6 (Immun-) Histochemische Färbungen

Gefrierschnitte von Maus-Aorten wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Gabriele Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) angefertigt. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse vier Stunden nach Nahrungsentzug leicht anästhesiert getötet. Für die Präparation der Aortenwurzel wurde das Gefäß mit 0,9 % NaCl perfundiert. Die *Aorta ascendens* konnte nun am linken Ventrikel beginnend mit der Aortenklappe und ca. 1 mm der Aortenwurzel unter dem Mikroskop herauspräpariert werden. Zur Gewebestabilisierung wurde das Präparat in Einbettmedium transferiert (tissue freezing medium[®], Jung; Leica Instruments, Nussloch), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Gefrierschnitte (7 μ m) wurden an einem Kryostat (Leica CM 1850 UV, Leica Microsystems GmbH, Nussloch) angefertigt, der Transport nach Kiel erfolgte auf Trockeneis, wo sie bei -20 °C gelagert wurden.

Zur Charakterisierung atherosklerotischer Plaques in der Aorta wurden Gefrierschnitte mit verschiedenen Substanzen gefärbt, um sie hinsichtlich Lipid-, Kollagen- und Kalziumablagerungen zu untersuchen. Diese Arbeit wurde ebenfalls von Mitarbeitern der AG Stangl ausgeführt.

Die Gefrierschnitte wurden vor den eigentlichen Färbungen mit 10 % Formol in Ethanol bzw. 10 % Formol in destilliertem Wasser für Ölrot-O fixiert und 3x mit destilliertem Wasser gespült.

Zur Sichtbarmachung neutraler Lipide (Cholesterinester und Triacylglyceride) wurden die Schnitte mit Ölrot-O (Sigma-Aldrich; Stammlösung: 0,5 % in Isopropanol; Gebrauchslösung: 60%ig in Aqua dest.) für 15 min gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung mehrmals mit Aqua dest.

abgewaschen und die Schnitte im letzten Waschschrift für 3 – 5 min in Aqua dest. inkubiert. Nach Lufttrocknung erfolgte das Eindecken mit Gelatine (Glycerin-Gelatine: Dr. Hollborn & Söhne GmbH & Co.KG).

Kollagenstrukturen wurden mit einer Trichrom-Lösung angefärbt. Die Lösung bestand aus 0,5 % Phosphorwolframsäure (Sigma-Aldrich), 1 % Orange G (VWR International GmbH), 0,5 % Anilinblau (Carl Roth GmbH & Co. KG) und 1,5 % Säurefuchsin (VWR International GmbH). Die Schnitte wurden darin einige Sekunden inkubiert und anschließend wiederum in Aqua dest. gründlich gespült. Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren, wurden sie mit Eukitt (Fluka) eingedeckt.

Zum Nachweis kalzifizierter Bereiche in den Plaques wurde eine Silberfärbung („Von Kossa-Färbung“) der Schnitte durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 1 h im Dunkeln in einer 5%igen wässrigen Silbernitrat-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Silber mit einer Na₂CO₃-Formaldehyd-Lösung (5 g Na₂CO₃ in 75 ml H₂O und 25 ml Formaldehyd (37 %)) für zwei min reduziert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min indirekt unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Fixierung wurde danach eine 5%ige wässrige Natriumthiosulfat-Lösung für 5 min aufgetragen. Es folgte ein weiterer Waschschrift für 10 min unter fließendem Leitungswasser, gefolgt von einem Spülschrift in Aqua dest. Schließlich wurden die Schnitte mit Säurefuchsin-Ponceau („Goldner 1“) 1 min gegengefärbt. Nach dem Lufttrocknen der Schnitte wurden sie mit Eukitt eingedeckt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden im Rahmen der Kooperation von Mitarbeitern der AG von Prof. Ralph Lucius (Anatomisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 10 min in Aceton fixiert. Nach kurzer Antrocknung wurden sie in eine 3 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung (in Methanol) transferiert, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Anschließend wurden die Schnitte 3 x mit PBS gespült und für 30 Minuten in einer 1%igen BSA-Lösung (in PBS) inkubiert. Dies diente der Abblockung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Die anschließende Inkubation mit dem jeweiligen Primäantikörper (verdünnt in 1 % BSA in PBS, siehe 2.5) erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Am darauffolgenden Tag erfolgte, nach einem erneuten Waschschrift mit PBS, die 45-minütige Inkubation des biotinylierten Sekundäantikörpers der entsprechenden Spezies (verdünnt in 1 % BSA in PBS). Die Schnitte wurden nun abermals 3 x mit PBS gespült und für 45 Minuten mit dem ABC-Reagenz (Vectastatin Elite ABC Kit, Vector) inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte 3 x mit PBS gespült und mit dem DAB- (3, 3'-diaminobenzidine) HRP-Substrat (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector) für 10 min angefärbt. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Zellkerne mit Hämalaun (30 % Meyer's Hämalaun) für 30 sec angefärbt, die Schnitte mit destilliertem Wasser kurz gespült und anschließend

für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach zweimaligem Abspülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte letztlich mit Aquatex (Merck) eingebettet. Die Schnitte wurden getrocknet und am folgenden Tag mikroskopiert oder bei RT gelagert.

2.8.6.1 Densitometrische Auswertung immunhistologischer Färbungen

Um die Intensität der immunhistologischen Färbungen der Mausearten quantifizieren zu können, wurden die Aufnahmen densitometrisch nach der Methode von Nguyen 2013 analysiert. Hierfür wurde die *freeware* ImageJ 1.47m verwendet. Weißen, ungefärbten Bereichen wird dabei ein maximaler Wert der Intensität von 250 zugeordnet. Je intensiver und damit dunkler die Färbung ausfällt, desto niedriger fallen die Intensitätswerte aus. Die Intensität einer Färbung korreliert somit invers mit dem numerischen Wert. Für die Analysen wurde nur das Aortengewebe, also ohne Lumen, als *region of interest* (ROI) markiert. Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten Werte als „reziproke Intensität“ dargestellt, indem die Werte der ROI von der maximalen Intensität subtrahiert wurden. Die Intensität der Färbungen wurde außerdem von den Intensitäten der Kontrollfärbungen (nur sekundärer Antikörper) bereinigt.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 mRNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe

Für die Isolierung von mRNA aus Zellen wurde ein Phenol/Guanidinisothiocyanat-Gemisch verwendet. Nach Beendigung der Stimulation und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen zunächst mit 500 µl der peqGOLD TriStar Reagenz pro Loch einer 12-Lochplatte lysiert und die Suspension in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Anschließend wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt, kurz gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 min trennte sich das Homogenat in drei Phasen auf, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthielt, DNA und Protein befanden sich in der Inter- bzw. organischen Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 250 µl Isopropanol hinzugefügt, wiederum kurz gemischt und für mindestens 15 min bei 4 °C inkubiert. Die RNA konnte schließlich durch Zentrifugation von 15 min bei 12000 x g und 4 °C präzipitiert werden. Im Folgenden wurde das Pellet noch 3 x mit 1 ml 70%igem Ethanol und 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 7500 x g gewaschen. Das mRNA-Präzipitat wurde nun getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Um das Pellet effizient lösen zu können, wurde die Probe für 5 min bei 55 °C erwärmt.

Für Zellkulturexperimente die in 6-Lochplatten durchgeführt wurden, wurde die eingesetzte Menge an peqGold TriStar, Chloroform und Isopropanol verdoppelt. Bei allen Schritten wurden ausschließlich Nuklease-freie, sterile Reagenzgefäße und Filterspitzen verwendet.

Die mRNA-Isolierung aus Organen geschah mit Hilfe des SV Total RNA Isolation Kits (Promega). Zu diesem Zweck wurden maximal 30 mg Gewebe in 175 µl des RNA-Lysepuffers in einem Schraubdeckelröhrchen mit drei bis vier Keramik-Kügelchen (2,8 mm, Precellys) in der *Speedmill Plus* (Analytik Jena) aufgeschlossen. Zur Förderung der Lyse wurde das Homogenat für zusätzliche 15 min auf Eis inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß Vorschrift des Herstellers. Auch hierbei wurden ausschließlich Nuklease-freie, sterile Reagenzgefäße und Filterspitzen verwendet.

Zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration wurde das Spektrophotometer *NanoDrop 1000* (Peqlab) genutzt. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da Nukleinsäuren hier ihr Absorptionsmaximum haben. Um gleichzeitig die Reinheit der Proben zu überprüfen, wurde ebenfalls die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Da aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum von 280 nm besitzen, gibt dies Rückschlüsse auf eventuelle Verunreinigungen durch Proteine. Hierbei sollte der Quotient der Messungen bei 260/280 zwischen 1,8 und 2 liegen. Die mRNA wurde möglichst sofort in cDNA umgeschrieben oder bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Reverse Transkription

Nach erfolgreicher Isolierung der mRNA konnte diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Für aus Zellkulturexperimenten gewonnene mRNA wurde das Enzym *Maxima RT* (Thermo Scientific) verwendet. Für einen 20 µl Ansatz wurden zunächst maximal 3 µg RNA mit H₂O (*ad* 13,25 µl) und 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Oligo d(T) Primer (100 µM) sowie 0,5 µl *random hexamer primer* (100 µM) gemischt und für 5 min auf 65 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Nach kurzer Abkühlungsphase auf Eis wurden schließlich 4 µl *reverse transcriptase buffer* (5x), 0,5 µl *RiboLock RNase Inhibitor* (40 U/µl) und 0,25 µl *Maxima RT* (200 U/µl) hinzugegeben und die reverse Transkription im Thermozykler *peqSTAR 96 universal* gemäß der Protokollangaben des Herstellers durchgeführt.

Das *PrimeScript™ RT Master Mix* Kit (Takara) fand seine Anwendung in der cDNA-Synthese von mRNA, die aus Organen isoliert wurde. Hierfür wurden 0,5 µg RNA mit 2 µl des 5x *PrimeScript™ RT Master Mixes* und H₂O (*ad* 10 µl) vermischt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 15 min mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 85 °C für 5 sec im Thermozykler *peqSTAR 96 universal*.

Im letzten Schritt wurde die Konzentration der cDNA auf 10 ng/µl eingestellt. Alle Arbeiten wurden mit Nuklease-freien, sterilen Reaktionsgefäßen und Filterspitzen ausgeführt.

2.9.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software *Clone Manager 9* entworfen. Die Sequenzen wurden so gewählt, dass die Primer-Paare Intron-überspannend sind, so dass eventuell noch vorhandene genomische DNA aufgrund der kurzen Elongationszeit nicht amplifiziert werden kann bzw. eine unterschiedliche Fragmentlänge aufweist. Weiterhin haben die Primer eine Länge von 20 Basenpaaren, einen GC-Gehalt von 50-60 % sowie eine Schmelztemperatur zwischen 55 und 60 °C. Die Länge des Amplifikats sollte zwischen 80-200 Basenpaaren liegen. Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Sigma Aldrich bezogen. Die Sequenzen sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: verwendete Oligonukleotide

Gen	Name	Sequenz
<i>human</i>		
ADAM17	hsADAM17_fwdIII	AGACAGAGAACCACCTGAAG
	hsADAM17_revIII	CCCATGAAGTGTTCCGATAG
ADAM10	hsADAM10_fwdII	AGTGGACCCATCAACTTGTG
	hsADAM10_revII	CCAGCCATTAGCATGATCAG
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1)	hHPRT_for_eigener	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
	hHPRT_rev_eigener	CCCTGTTGACTGGTCATTAC
<i>murin</i>		
Adam17	mmADADM17_fwd	CCTGATGGGCTAGCAGAATG
	mmADAM17_rev	TGTTGCTGCGCTCCTGGAAG
Adam10	mmADAM10_fwd	CGCACAACTCTGGCTGAAAG
	mmADAM10_rev	CCGGAGAAGTCTGTAGTCTG
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)	mGAPDHfor	TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	mGAPDHrev	ATTCTCGGCCTTGACTGTGC
Icam1	mmICAM-1_fwd	CCTGGTCACCGTTGTGATCC
	mmICAM-1_rev	TCAGCCACTGAGTCTCCAAG
Vcam1	mmVCAM-1_fwd	GAGCCTCAACGGTACTTTGG
	mmVCAM-1_rev	GTCCTCACCTTCGCGTTTAG

2.9.4 Polymerase-Ketten-Reaktion und Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer pH 8,0	40 mM Tris 20 mM Acetat 1 mM EDTA
Agarosegel	2 % Agarose 0,5 µl/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Neue Primer-Paare wurden in einer Gradienten-PCR auf Spezifität und optimale *annealing*-Temperatur getestet. Ein Standardansatz von 25 µl beinhaltete 2,5 µl 10 x Puffer, 2,5 µl dNTP-Mix (2 mM), 0,25 µl *forward* Primer (100 µM), 0,25 µl *reverse* Primer (100 µM), 2 µl DNA (10 ng/µl), 0,15 µl *Dream Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl) und wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Zur Kontrolle der Reinheit der eingesetzten Reagenzien (Negativ-Kontrolle) wurde Wasser statt DNA in der Reaktion eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde ein bereits getestetes Primer-Paar eines Haushaltsgens eingesetzt. Die PCR erfolgte im Thermozykler *peqSTAR 96 universal* (Peqlab), alle Arbeiten wurden mit Nuklease-freien, sterilen Reaktionsgefäßen und Filterspitzen ausgeführt. Tabelle 7 zeigt das PCR-Programm:

Tabelle 7: Programm für Gradienten-PCR

Schritt	Temperatur, Zeit
	Deckel 120 °C
initiale Denaturierung	95 °C, 2min
Denaturierung	90 °C, 30 sec
<i>annealing</i>	53,1-64,7 °C, 30 sec
Elongation	72 °C, 20 sec
finale Elongation	72 °C, 10 min
Kühlung	8 °C, ∞

25-30 Zyklen

Um verschieden große DNA-Fragmente aufzutrennen, bedient man sich der DNA-Gelelektrophorese. Dabei werden die Proben auf ein waagerechtes Agarosegel aufgetragen. Die Proben wurden zuvor mit 6 x DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) vermischt. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler 100 bp DNA-ladder* (Thermo Scientific) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 10 V/cm² in TAE-Puffer. Das Ergebnis wurde in einem UV-Transilluminator (*Dual intensity Ultraviolet Transilluminator TM 20* und *BioDocII*-Fotodokumentationsanlage) dokumentiert.

2.9.5 Real-Time PCR

Die *Real-Time* PCR ist eine Methode, um die mRNA-Expression eines Gens in einem Gewebe oder aus Zellkulturexperimenten zu untersuchen. Dabei wurde die Expression des Gens mit einem internen Standard, der in jeder Zelle etwa gleich stark exprimiert wird, verglichen.

Zur Verbesserung der Spezifität der PCR wurde eine sogenannte *touchdown*-PCR durchgeführt. Die *annealing*-Temperatur wird hierbei zunächst höher gewählt als die optimale Temperatur und verringert sich pro Zyklus um 1 °C bis die optimale *annealing*-Temperatur erreicht ist. So werden unspezifische Primer-Anlagerungen in den ersten Zyklen vermieden und es entstehen spezifische DNA-Fragmente, die in den folgenden Zyklen weiter amplifiziert werden. In dieser Arbeit wurde der *SYBR premix Ex Taq II*-Mix (Takara) eingesetzt. Dieser enthält den Farbstoff *SYBR Green I*, der -

gebunden an doppelsträngige DNA - Fluoreszenz emittiert. So lässt sich die Menge der amplifizierten DNA quantitativ bestimmen. Die Spezifität der vervielfältigten DNA-Fragmente konnte anschließend nochmals mit Hilfe von Schmelzkurven überprüft werden, da die PCR-Produkte spezifische Schmelztemperaturen besitzen, die als Fluoreszenzmaximum erkennbar sind. Das PCR-Programm ist in Tabelle 8 dargestellt. Die *Real-Time* PCR wurde in einem *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies) durchgeführt. Ein 10 µl Standard-Ansatz enthielt 5,2 µl des *SYBR premix Ex Taq II-Mixes* (5x Master Mix + ROX), 1 µl cDNA (10 ng/µl), 0,5 µl *forward* Primer (2,5 µM), 0,5 µl *reverse* Primer (2,5 µM) und 2,8 µl H₂O. Jede Messung erfolgte in Doppelwerten. Um die Ergebnisse auszuwerten, wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode (*cycle threshold*) angewandt:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Ziel-Gen}) - C_t (\text{Haushaltsgen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{stimulierte Probe}) - \Delta C_t (\text{unbehandelte Kontrolle})$$

$$\text{x-fache Veränderung} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Tabelle 8: Real-Time PCR-Programm

Schritt	Temperatur, Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C, 30 sec	
Denaturierung	95 °C, 5 sec	6 Zyklen
<i>annealing</i>	64 °C (-1 °C/Zyklus), 30 sec	
Elongation	72 °C, 30 sec	
Denaturierung	95 °C, 5 sec	40 Zyklen
<i>annealing</i>	58 °C, 30 sec	
Elongation	72 °C, 30 sec	
Denaturierung	95 °C, 15 sec	Schmelzkurve
Elongation	60 °C, 1 min	
aufschmelzen	60 °C, 15 sec +0,3 °C/15 sec (bis 95 °C)	
finale Denaturierung	95 °C, 15 sec	

Alle Arbeiten wurden mit Nuklease-freien, sterilen Reaktionsgefäßen und Filterspitzen ausgeführt.

2.10 Statistik

Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Standardabweichung wurde aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Alle statistischen Tests wurden mit der Software GraphPad Prism 5 berechnet. Bei der Fütterungsstudie wurde eine *Two-way ANOVA* durchgeführt, um Effekte der Diät, des Genotyps und deren Interaktion zu analysieren. *Post-hoc* Analysen wurden mittels des Tukey's Test (bei Varianz-Homogenität) oder des Games-Howell Tests (bei Varianz-Heterogenität) durchgeführt. Bei allen anderen Experimenten (Isothiocyanate und Hypoxie) wurde die Varianzanalyse mit Hilfe der *One-Way ANOVA* inklusive *Bonferroni's Multiple Comparison* Post-Test durchgeführt. Alternativ wurden Signifikanzen auch mit Hilfe des Student's t-

Test berechnet, wenn nur zwei Testgruppen vorhanden waren. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Fettsäuren aus der Nahrung auf die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in einem Atherosklerose-Mausmodell

Fischöl ist reich an Omega-3-Fettsäuren, allen voran Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA). Die kardioprotektiven Eigenschaften von Fischöl wurden bereits in einer Vielzahl von Studien belegt, der Wirkmechanismus hingegen ist noch nicht vollständig geklärt (Hansen & Harris 2007; Harris *et al.* 2008; Mozaffarian 2005). Für die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 kann ebenfalls über eine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten spekuliert werden (Canault *et al.* 2007; Donners *et al.* 2010).

In diesem Teil der Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob die positiven Eigenschaften von Omega-3-Fettsäuren möglicherweise auch durch einen Einfluss auf ADAM-Proteasen bedingt sein könnten.

Es wurden je 24 Wildtyp-Mäuse (WT) und 24 LDL-Rezeptor-Knock-out-Mäuse (KO) in zwei verschiedene Fütterungsgruppen aufgeteilt. Mutationen im humanen *LDLR*-Gen führen zu erhöhten Cholesterol- und LDL-Konzentrationen im Plasma und begünstigen die Entstehung von Atherosklerose. LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse eignen sich daher besonders zur Charakterisierung dieser humanen familiären Hypercholesterolämie. Eine fettreiche Nahrung (*Western* Diät) führt bei ihnen, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques (Ishibashi *et al.* 1994).

12 WT- und 12 KO-Tiere erhielten über einen Zeitraum von 12 Wochen eine fettreiche *Western* Diät, deren Fettanteil hauptsächlich aus gesättigten Fettsäuren (Schweineschmalz, SS) bestand. Die andere Gruppe erhielt eine *Western* Diät, die mit ungesättigten Fettsäuren (Fischöl, FÖ) angereichert war. Nach Ablauf der 12 Wochen wurden das Plasma und verschiedene Organe - wie Aorta, Leber, Lunge und Niere - für weitere Untersuchungen entnommen. Die Fütterung und Organentnahme der Tiere wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Gabriele Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) von den dortigen Mitarbeitern ausgeführt. Die Charakterisierung der Atherosklerose-Entwicklung erfolgte ebenfalls dort.

3.1.1 Charakterisierung der Atherosklerose-Entwicklung

Über den gesamten Fütterungszeitraum wurde die Gewichtszunahme der Tiere dokumentiert (Abbildung 3 A). Hierbei zeigte sich eine vergleichbare Entwicklung in allen vier Gruppen. Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der verschiedenen Diäten festgestellt werden.

Weiterhin wurden Gefrierschnitte der Aortenwurzel aller Tiere angefertigt und hinsichtlich der atherosklerotischen Läsionen histomorphologisch untersucht (Abbildung 3 B). Hier zeigte sich, dass die Knock-out-Mäuse signifikant stärker Läsionen entwickelten als die Wildtyp-Tiere. Fischöl-reiche Nahrung führte zu signifikant geringerer Plaque-Entwicklung in den LDLR^{-/-}-Tieren als Schweineschmalz-reiche Nahrung.

Um Lipidablagerungen im Gewebe sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Ölrot-O gefärbt (Abbildung 3 C oben). Die Auswertung ergab signifikant erhöhte Lipidanreicherungen in den Aorten der LDLR^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, in denen kaum bis gar keine Lipidablagerungen gefunden werden konnten. Die Fischöl-reiche Diät senkte die Lipidablagerungen in den LDLR^{-/-}-Tieren signifikant um etwa die Hälfte verglichen mit der Schweineschmalz-reichen Diät.

Kollagenreiche Strukturen wurden mit Hilfe einer Trichrom-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 3 C). Hier konnte wiederum ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-Mäusen und den LDLR-defizienten Tieren festgestellt werden. Die Aorten der Knock-out-Tiere wiesen wesentlich mehr kollagenreiche Strukturen auf als die der Wildtyp-Tiere. Ein Unterschied hinsichtlich der Diäten konnte hingegen nicht ausgemacht werden.

Schließlich wurden kalzifizierte Bereiche mit Hilfe der „von Kossa-Färbung“ identifiziert (Abbildung 3 C unten). Hier zeigte sich, dass Kalkablagerungen in allen Gruppen kaum vorhanden waren. Die morphometrische Quantifizierung zeigte jedoch auch hier eine stärkere Kalzifizierung in den LDLR^{-/-}-Mäusen, im Gegensatz zu den Wildtypen.

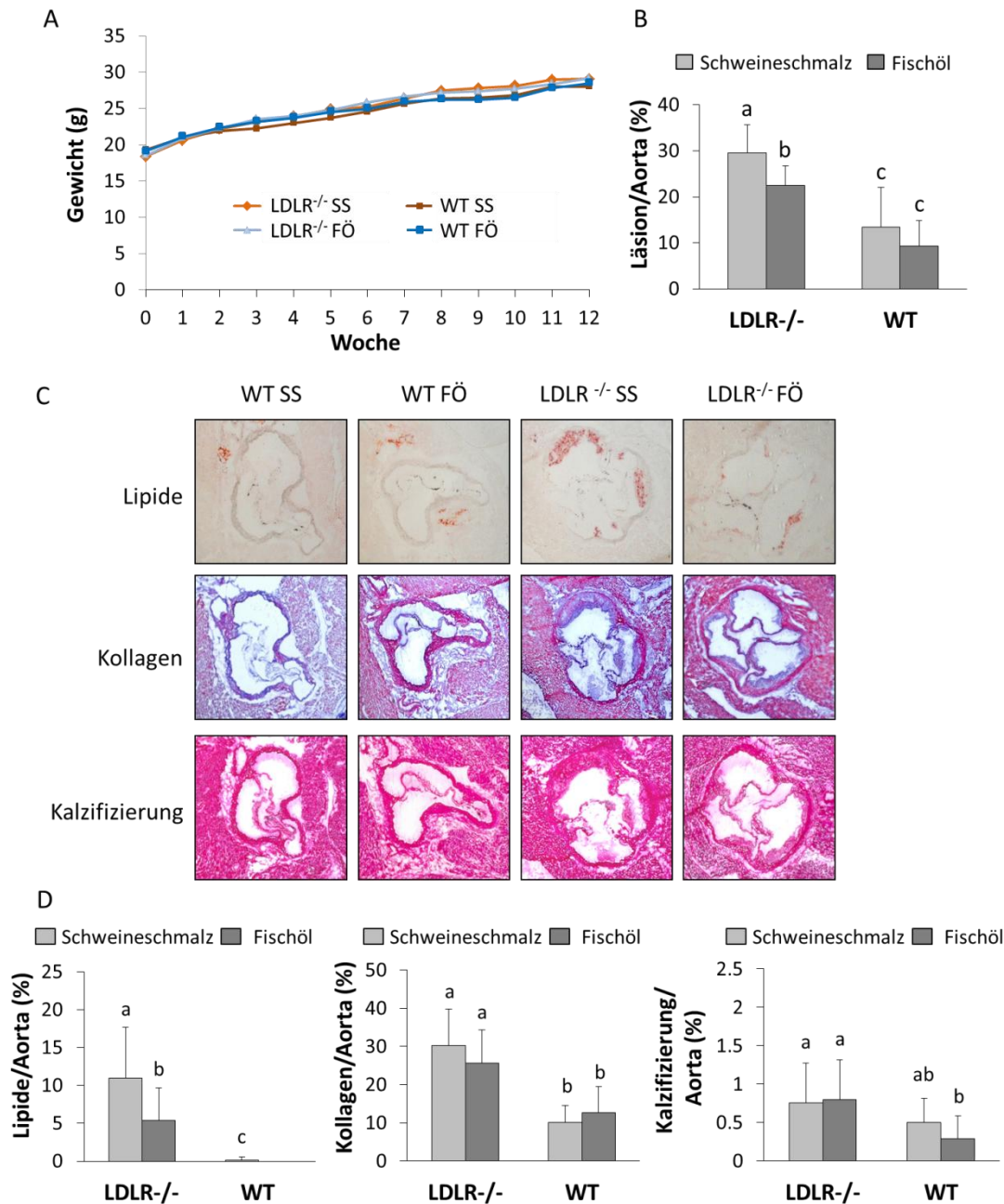


Abbildung 3: Charakterisierung der Gewichtszunahme und atherosklerotischen Plaqueentwicklung in den verschiedenen Fütterungsgruppen.

Entwicklung des Körpergewichts von LDLR^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen, die über einen Zeitraum von 12 Wochen mit einer *Western* Diät gefüttert wurden, angereichert mit Schweineschmalz (SS) oder Fischöl (FÖ) (A). Morphometrische Auswertung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta der Tiere der verschiedenen Fütterungsgruppen, dargestellt ist der Mittelwert + SD. (B). Gefrierschnitte der Aortenwurzel der Tiere der verschiedenen Fütterungsgruppen wurden mit Ölrot-O für Lipidablagerungen (C, oben), mit einer Trichrom-Lösung für Kollagenstrukturen (C, mitte) und mit einer „von Kossa“-Lösung für kalzifizierte Bereiche (C, unten) gefärbt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Übersichtsaufnahmen, die mit einem 5er Objektiv aufgenommen wurden; sowie die Mittelwerte + SD der morphometrischen Auswertung dieser Aufnahmen (D). Statistische Analysen erfolgten mittels *Two-way ANOVA* und *post hoc*-Tests. Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant, n= 12 (WT FÖ n= 11). Diese Analysen wurden durchgeführt und zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

Um zu überprüfen, ob sich der Anteil unterschiedlicher Fettsäuren in der Nahrung auch in der Membranzusammensetzung widerspiegelt, wurden die Lebermikrosomen isoliert und hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung untersucht (Tabelle 9). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wie erwartet eine Fischöl-reiche Ernährung sowohl in den Wildtypen als auch in den Knock-out-Tieren zu einem signifikant höheren Anteil von Omega-3-Fettsäuren (DHA 22:6 n-3 und EPA 20:5 n-3) in den Mikrosomen führte. Die Konzentrationen für Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2, n-6) und Arachidonsäure (20:4, n-6) hingegen, waren nach Fischöl-reicher Ernährung erniedrigt.

Tabelle 9: Fettsäurezusammensetzung in Lipidextrakten aus isolierten Lebermikrosomen

Analysen durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch AG Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

	LDLR ^{-/-}						Wildtyp					
	Schweineschmalz			Fischöl			Schweineschmalz			Fischöl		
	MW	SD		MW	SD		MW	SD		MW	SD	
FS-14:0	0,38	bc	0,08	0,54	a	0,16	0,33	c	0,04	0,43	b	0,11
FS-16:0	32,68	b	1,77	36,65	a	1,90	32,68	b	2,50	36,21	a	2,58
FS-16:1	3,12	ab	0,42	2,77	bc	0,32	3,40	a	0,53	2,65	c	0,55
FS-18:0	15,87	bc	1,72	17,37	a	1,80	15,02	c	0,66	16,63	ab	1,33
FS-18:1	25,97	a	2,04	21,73	b	2,18	25,88	a	2,09	22,26	b	2,84
FS-18:2 n-6	13,12	a	0,94	10,54	b	0,73	13,14	a	0,85	10,33	b	0,53
FS-18:3 n-3	0,14	b	0,04	0,37	a	0,07	0,11	b	0,03	0,35	a	0,12
FS-18:3 n-6	0,36	a	0,08	0,26	b	0,06	0,31	b	0,04	0,25	b	0,06
FS-20:4 n-6	6,33	a	0,91	3,04	b	0,89	6,65	a	2,18	3,45	b	1,06
FS-20:5 n-3	0,24	b	0,05	2,72	a	1,23	0,29	b	0,11	2,56	a	1,06
FS-22:5 n-3	n.d.			0,37	a	0,21	0,07	b	0,12	0,46	a	0,20
FS-22:6 n-3	1,27	b	0,36	2,98	a	2,29	1,46	b	1,15	3,74	a	2,44
FS-24:1	n.d.			0,10		0,15	0,06		0,09	0,13		0,14
Summe n-3	1,66	b	0,37	6,44	a	3,63	1,93	b	1,18	7,11	a	3,59
Summe n-6	19,81	a	1,20	13,84	b	1,03	20,09	a	2,49	14,03	b	1,25
n-3/n-6	0,08	b	0,02	0,46	a	0,23	0,09	b	0,04	0,49	a	0,20

a, b, c Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (Two-way ANOVA und post hoc-Tests)
n.d. nicht detektierbar

MW, Mittelwerte und SD, Standardabweichung; n= 12 (WT FÖ n= 11)

Als Fazit lässt sich sagen, dass in Einklang mit der Literatur, eine fettreiche Ernährung mit Schweineschmalz zu einer Atherosklerose in LDLR^{-/-}-Mäusen führte. Der Austausch von Schweineschmalz durch Fischöl führte zu einer verminderten phänotypischen Ausprägung der Atherosklerose in diesen Tieren. Wildtyp-Mäuse waren deutlich weniger von atherosklerotischen Läsionen betroffen als der Knock-out-Stamm. Die histochemischen Analysen deuteten insgesamt auf eine frühe Form der Atherosklerose-Entwicklung hin.

3.1.2 Expression und Lokalisation der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in der Aorta

Für weitere Analysen wurden Organe und das Plasma der Tiere nach Kiel transferiert. Um zu untersuchen, ob die Fettsäurezusammensetzung in der Nahrung einen Einfluss auf die Expression der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 hatte, wurde mRNA aus Aortengewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels einer *Real-Time* PCR analysiert. Wie in Abbildung 4 zu sehen, hatte die Art der Ernährung sowohl in Wildtypen als auch in LDLR^{-/-}-Mäusen keinen Einfluss auf die Expression beider Proteasen. Die mRNA-Expression von *Adam17* ist jedoch signifikant höher in den Knock-out-Tieren als in den Wildtyp-Mäusen. Für *Adam10* konnte eine leicht verminderte Expression in den Aorten der Schweineschmalz-gefütterten Knock-out-Tiere, verglichen mit denen der SS-Gruppe der Wildtyp-Tiere, gezeigt werden.

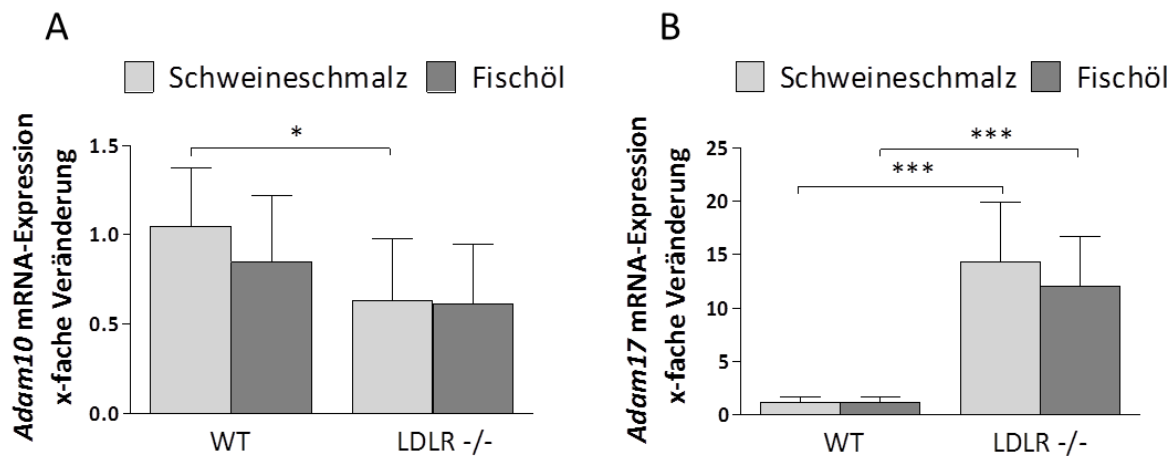


Abbildung 4: mRNA-Expression von *Adam10* und *Adam17* in der Aorta.

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von *Adam10* (A) und *Adam17* (B) in den Aorten der Tiere der verschiedenen Fütterungsgruppen wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet, wobei das Haushaltsgen *Gapdh* als interne Kontrolle verwendet wurde und die Werte auf die WT SS-Gruppe normalisiert wurden. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *Two-way* ANOVA und *post hoc*-Tests, Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $n = 12$ (WT FÖ $n = 11$).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Veränderung der mRNA-Expression auch auf Proteinebene widerspiegelt oder ein Unterschied in der Lokalisation der Metalloproteasen in den Plaques auszumachen ist. Zu diesem Zweck wurden Gefrierschnitte der Aortenwurzel immunhistochemisch mit ADAM10- bzw. ADAM17-spezifischen Antikörpern markiert und die Ergebnisse densitometrisch quantifiziert (Abbildung 5). Es konnte jedoch weder Nahrungs- noch Genotypbedingt ein Unterschied festgestellt werden. Hierzu bleibt festzuhalten, dass die Unterschiede in den Färbungen innerhalb einer Gruppe zu groß waren, um valide Schlussfolgerungen aus diesen Analysen zu ziehen.

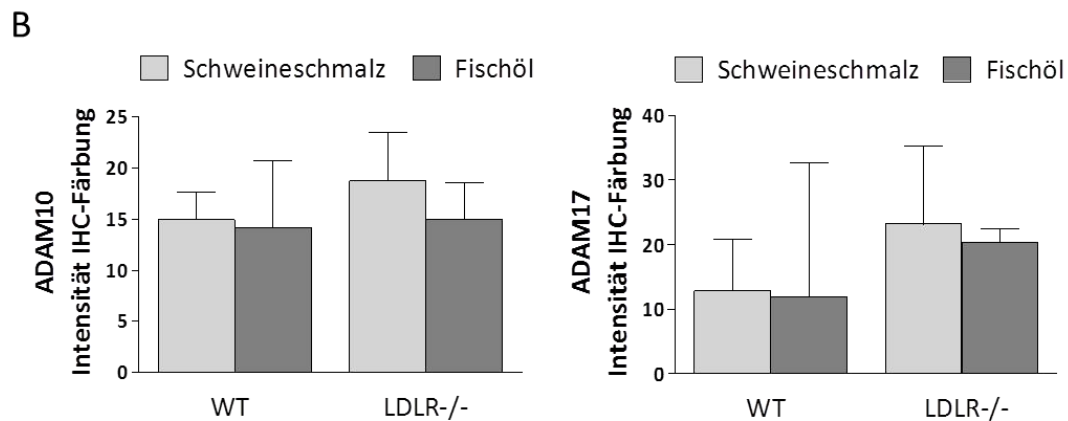
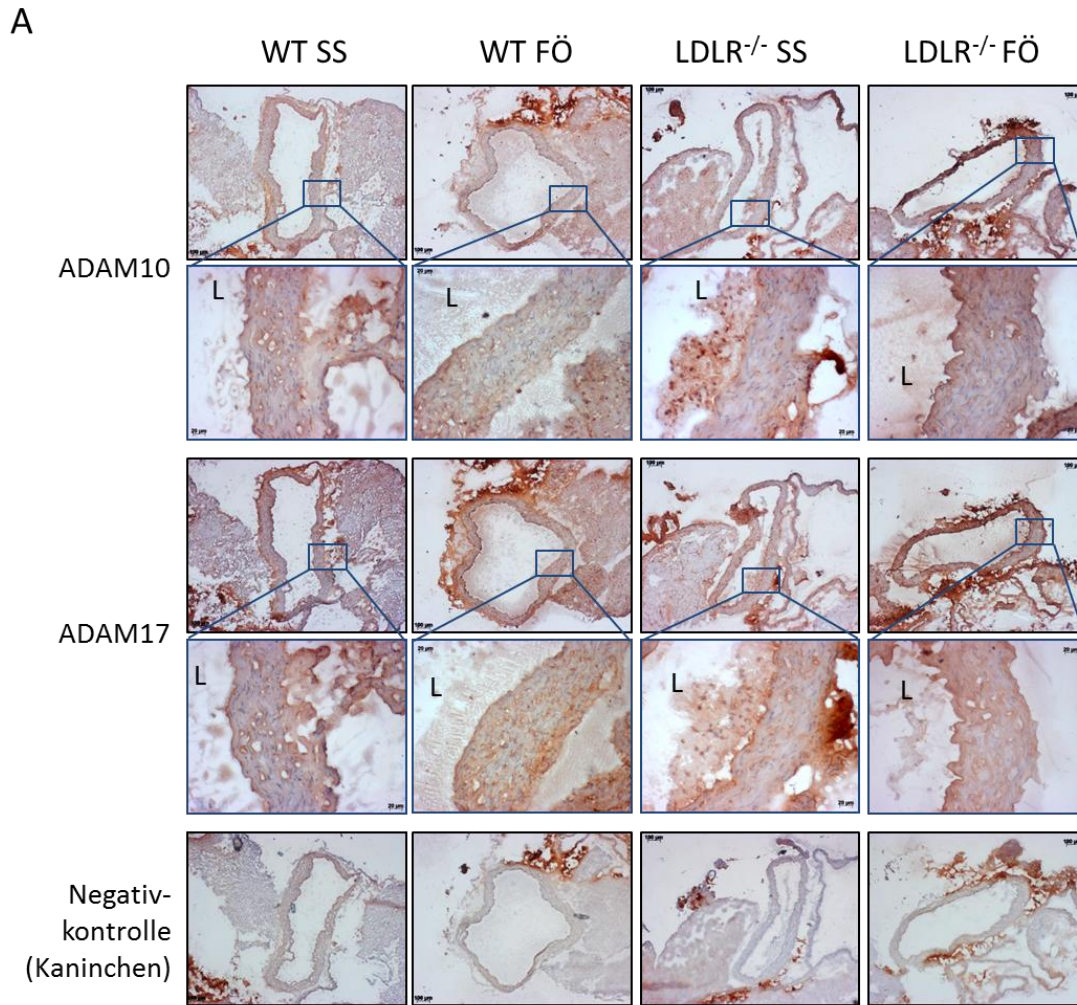


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbungen von ADAM10 und ADAM17 in der Aortenwurzel.

Es wurden immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten der Aorta der jeweiligen Fütterungsgruppen mit ADAM10- und ADAM17-spezifischen Antikörpern angefertigt (A). Jeweils die obere Reihe zeigt Übersichtsaufnahmen mit einem 4er Objektiv. Ausschnitte wurden gewählt (blauer Kasten) und Detailaufnahmen mit einem 20er Objektiv festgehalten. Als Kontrollfärbung diente der speziesspezifische Sekundärantikörper aus Kaninchen. Die Aufnahmen von drei zufällig gewählten Tieren wurden densitometrisch quantifiziert nach Nguyen 2013, dargestellt sind die Mittelwerte + SD (B). L: Lumen.

3.1.3 Lösliche Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorische Marker in der Aorta und im Plasma

Zelladhäsionsmoleküle wie das *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *junctional adhesion molecule A* (JAM-A) und das *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose (Blake & Ridker 2001). Die Proteolyse dieser Proteine durch ADAM10 und ADAM17 beeinflusst entscheidend die Integrität der endothelialen Barriere und die Leukozytentransmigration. Atherosklerose hat zudem eine starke inflammatorische Komponente und Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor TNF α und Interleukin 6 (IL-6), finden sich vermehrt in atherosklerotischen Läsionen (Packard *et al.* 2009). Ein Hauptaugenmerk dieser Studie stellt daher die Untersuchung der Expression und des *Sheddings* dieser Moleküle dar.

Hierfür wurden zunächst ebenfalls Gefrierschnitte mit spezifischen Antikörpern für ICAM-1, JAM-A und VCAM-1 gefärbt. Alle drei Moleküle sind Substrate von ADAM17. Der von-Willebrand-Faktor (vWF) wurde ebenfalls gefärbt und diente als Endothel-spezifischer Marker. Es zeigten sich hier jedoch keine augenscheinlichen Unterschiede hinsichtlich der Expression und der Lokalisation (Abbildung 6 und Abbildung 7). Auf eine Quantifizierung der Färbungen wurde verzichtet, da auch hier keine verlässlichen Resultate zu erwarten waren.

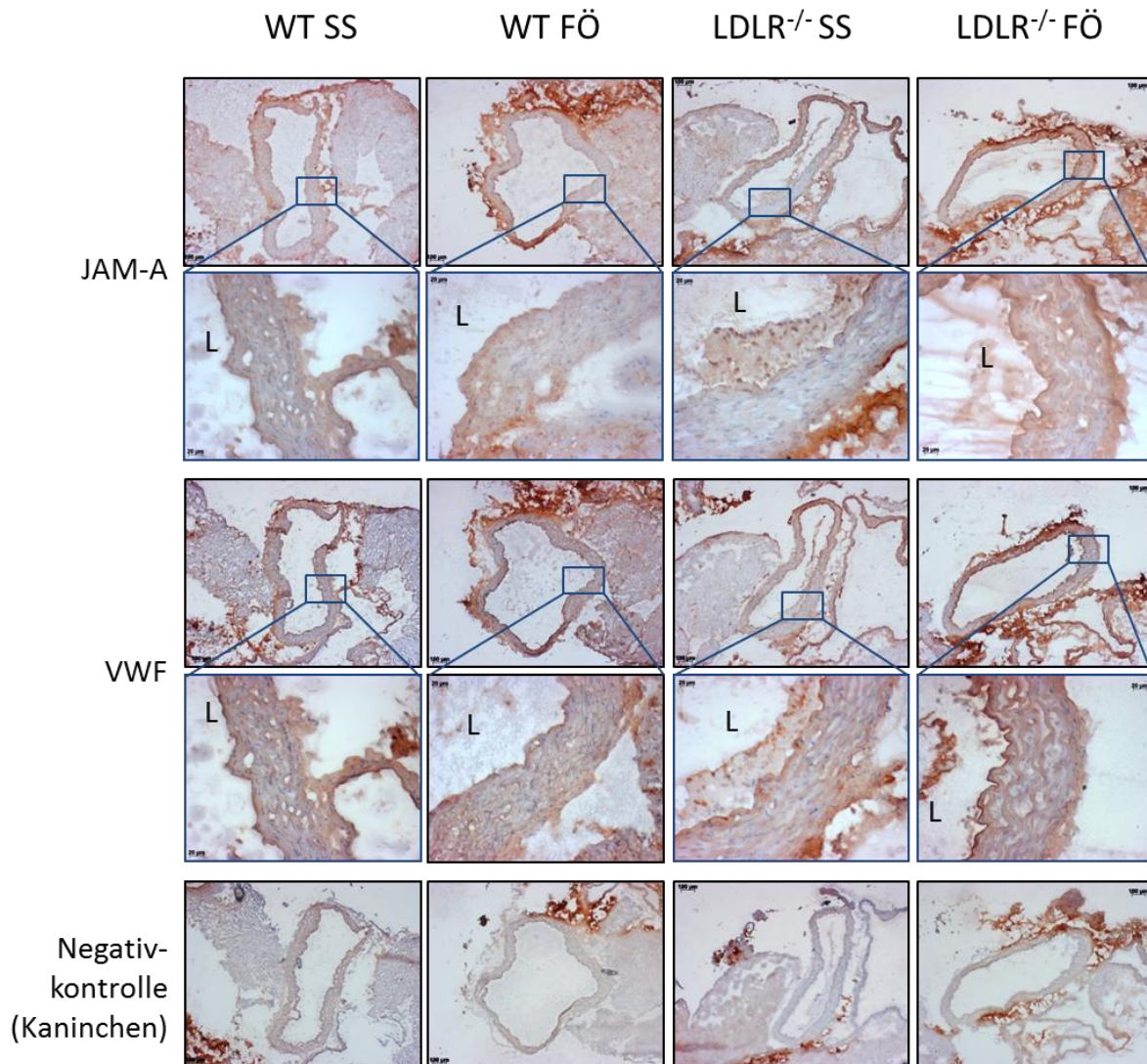


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbungen von JAM-A und vWF in der Aortenwurzel.

Es wurden immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten der Aorta der jeweiligen Fütterungsgruppen mit JAM-A- und von-Willebrand-Faktor (vWF)-spezifischen Antikörpern angefertigt. Als Kontrollfärbung diente der speziesspezifische Sekundärantikörper aus Kaninchen. Jeweils die obere Reihe zeigt Übersichtsaufnahmen mit einem 4er Objektiv. Ausschnitte wurden gewählt (blauer Kasten) und Detailaufnahmen mit einem 20er Objektiv festgehalten. L: Lumen.

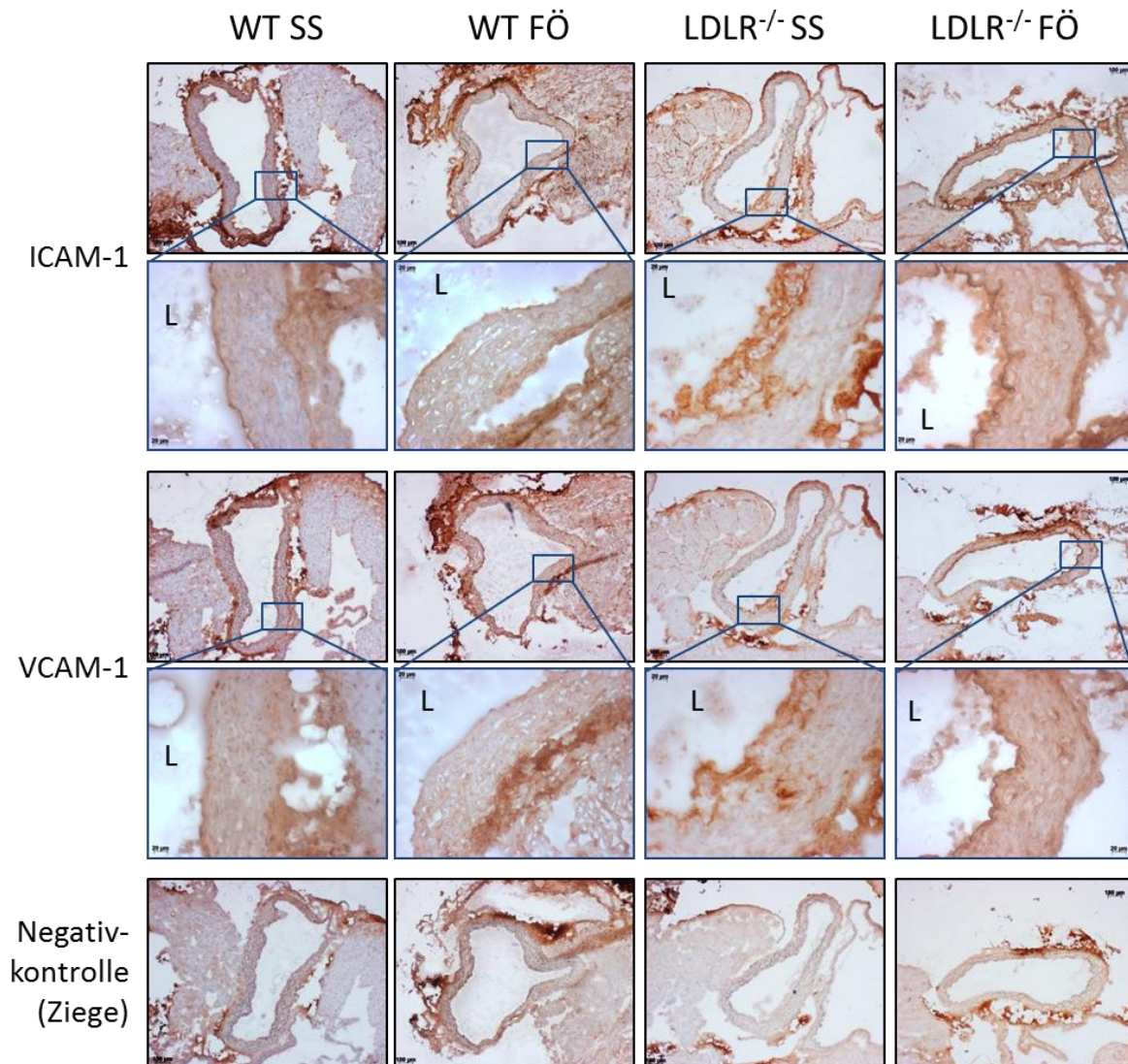


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbungen von ICAM-1 und VCAM-1 in der Aortenwurzel.

Es wurden immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten der Aorta der jeweiligen Fütterungsgruppen mit ICAM-1- und VCAM-1-spezifischen Antikörpern markiert. Als Kontrolle diente hier ein gegen Ziegen-IgG gerichteter Sekundärantikörper. Jeweils die obere Reihe zeigt Übersichtsaufnahmen mit einem 4er Objektiv. Ausschnitte wurden gewählt (blauer Kasten) und Detailaufnahmen mit einem 20er Objektiv festgehalten. L: Lumen.

Die Proteolyse verschiedener Substrate wurde überprüft durch die Bestimmung der Konzentration löslicher Fragmente im Plasma mittels ELISA (Abbildung 8).

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin und ein Substrat von ADAM17. Die Konzentrationen im Plasma waren in allen Gruppen jedoch unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA (31,2 pg/ml) und konnten nicht bestimmt werden.

Die durch ADAM17 freigesetzte lösliche Form des TNF α -Rezeptors 1 (TNFR1) moduliert die Aktivität des zirkulierenden TNF α indem Zellen durch die Proteolyse des Rezeptors desensibilisiert werden,

gleichzeitig erhöht die Bindung von TNF α an sTNFR1 aber auch die Stabilität des Zytokins (Peschon *et al.* 1998; Aderka *et al.* 1992). Die Konzentration von sTNFR1 im Blutplasma konnte durch die Ernährung beeinflusst werden. Eine Fischöl-reiche Diät führte im Wildtyp zu einer signifikanten Zunahme von löslichem TNFR1. Diese Tendenz war auch im Knock-out sichtbar (Abbildung 8 A).

Der Interleukin 6-Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung systemischer Effekte von IL-6 (Chalaris *et al.* 2011). Er kann sowohl von ADAM10 als auch ADAM17 gespalten werden, wobei im murinen System ADAM10 die Haupt-*Sheddase* ist (Garbers *et al.* 2011). Für den sIL-6R konnte in den Wildtyp-Tieren eine geringere Konzentration im Plasma nach Fischöl-angereicherter Diät festgestellt werden. Diese Tendenz zeigte sich auch in den Knock-out-Tieren. Im Vergleich der Genotypen zeigte sich, dass die Fischöl-gefütterten LDLR^{-/-}-Tiere eine höhere sIL-6R-Konzentration aufwiesen als die Wildtypen (Abbildung 8 B).

JAM-A ist am Aufbau von *Tight Junctions* beteiligt, die Proteolyse dieses Moleküls durch ADAM17 führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Leukozyten (Koenen *et al.* 2009). Die Ernährungsweise hatte in den Wildtyp-Tieren keinen Einfluss auf die Plasmakonzentration des sJAM-A. In den LDL-Rezeptor-Knock-out-Mäusen hingegen war die Konzentration in der SS-Gruppe erhöht, konnte jedoch mit der Fischöl-angereicherten Diät signifikant reduziert werden (Abbildung 8 C).

L-Selektin, ein Substrat von ADAM17 auf Leukozyten, ist mitverantwortlich für die Adhäsion der Leukozyten am Endothel (Hafezi-Moghadam *et al.* 2001). Es konnte eine leichte Reduktion in Fischöl-gefütterten Knock-out-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp für dieses Molekül festgestellt werden (Abbildung 8 D).

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Leukozytenadhäsion. Beide werden von ADAM17 prozessiert (Garton *et al.* 2003; Tsakadze *et al.* 2006). Die Menge an löslichem ICAM-1 konnte mit der Fischöl-Diät in den Knock-out-Tieren gesenkt werden. Unterschiede hinsichtlich der Genotypen konnten jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 8 E). Für die Konzentration des sVCAM-1 konnte keine ernährungsabhängige Veränderung festgestellt werden, sie ist aber in beiden Fällen im Wildtyp höher als im Knock-out (Abbildung 8 F).

Vaskulär-endotheliales (VE)-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen und Substrat von ADAM10. Es spielt eine Rolle für die Permeabilität des Endothels (Schulz *et al.* 2008). Fischöl-reiche Nahrung führte zu einer signifikanten Abnahme in den LDLR^{-/-}-Mäusen, zudem war die Konzentration geringer als im Wildtyp (Abbildung 8 G).

Das transmembrane Chemokin CXCL16 fungiert in seiner löslichen Form als Chemoattraktant für Leukozyten und wird vornehmlich von ADAM10 gespalten (Abel *et al.* 2004; Hundhausen *et al.* 2007). Die höchste Konzentration von sCXCL16 wurden im Plasma Schweineschmalz-gefütterter

LDLR^{-/-}-Tiere gemessen und unterschied sich signifikant vom Wildtyp. Ein signifikanter Effekt durch die Fütterung mit Fischöl konnte hingegen nicht ausgemacht werden (Abbildung 8 H).

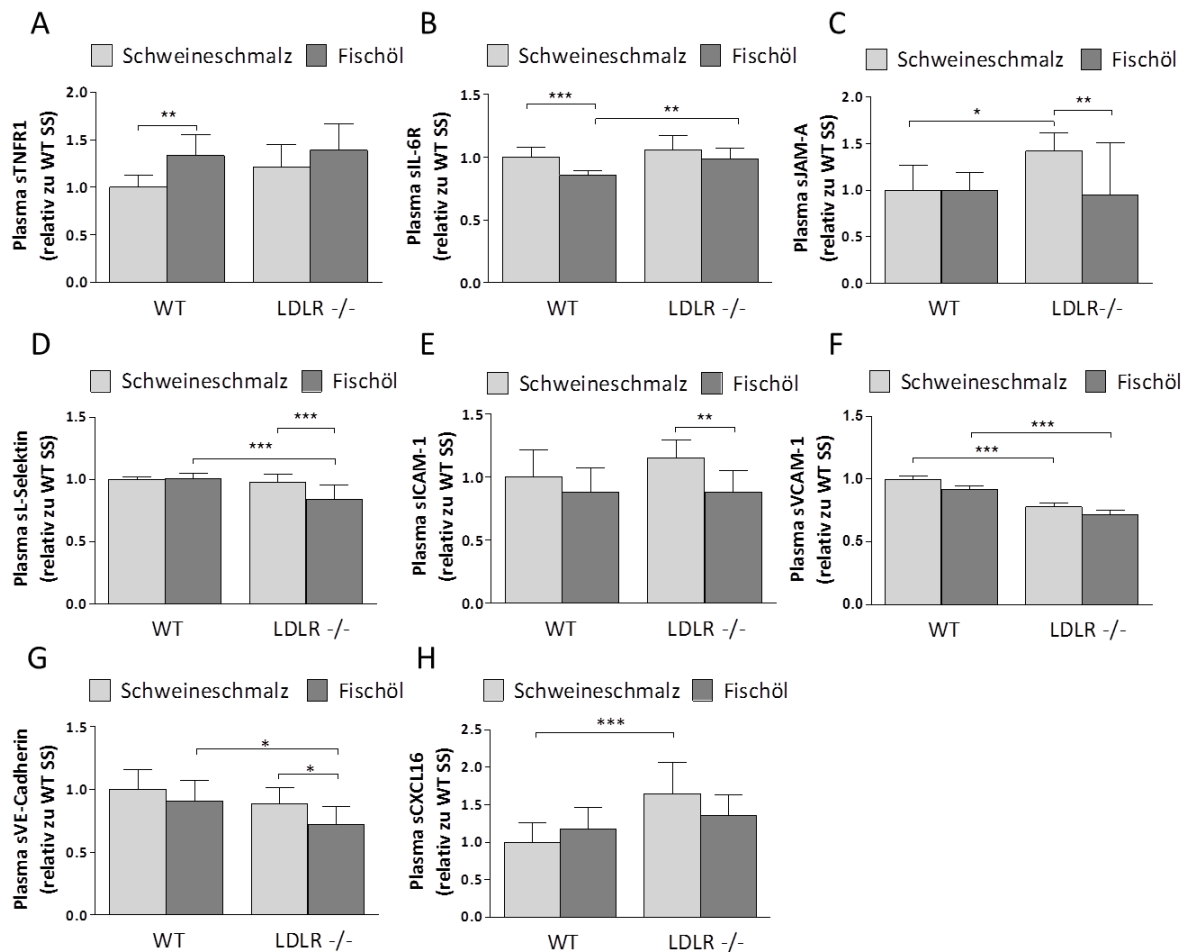


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen verschiedener ADAM-Substrate.

Die Konzentrationen verschiedener Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorischer Marker wurde mit Hilfe von *enzyme-linked immunosorbent assays* bestimmt. Hierfür wurde das Plasma so verdünnt, dass die Konzentrationen innerhalb der Standardkurven lagen. Die Ergebnisse wurden auf die WT SS-Gruppe normalisiert und mittels *Two-way ANOVA* und *post hoc*-Tests ausgewertet. Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n= 12 (WT FÖ n= 11).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Fischöl-reiche Ernährung zu einer verringerten Proteolyse insbesondere von Zelladhäsionsmolekülen führte. Der Effekt war in LDL-Rezeptor-Knock-out Mäusen ausgeprägter als in Wildtyp-Tieren. Dies konnte für JAM-A, L-Selektin, ICAM-1 und VE-Cadherin gezeigt werden. Überraschenderweise führte die stark erhöhte Expression von ADAM17 in den LDLR-defizienten Tieren nicht zu einer Erhöhung der proteolytischen Aktivität. Die geringen Konzentrationen von TNF α , die unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA lagen, deuteten auf einen sehr niedrigen Grad der Inflammation hin. Um dies zu verifizieren, wurde zusätzlich zu den ADAM-

Substraten auch die Plasmakonzentrationen von IL-6 und MCP-1 als pro-inflammatorische Moleküle im ELISA überprüft. Die Konzentrationen von IL-6 in den Wildtyp-Mäusen waren jedoch so gering, dass sie ebenfalls nicht bestimmt werden konnten. Die Konzentration von MCP-1 im Plasma der LDLR^{-/-}-Tiere war zwar tendenziell etwas höher, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Eine Fischöl-Supplementation führte bei keinem der beiden Zytokine zu Veränderungen (Abbildung 9).

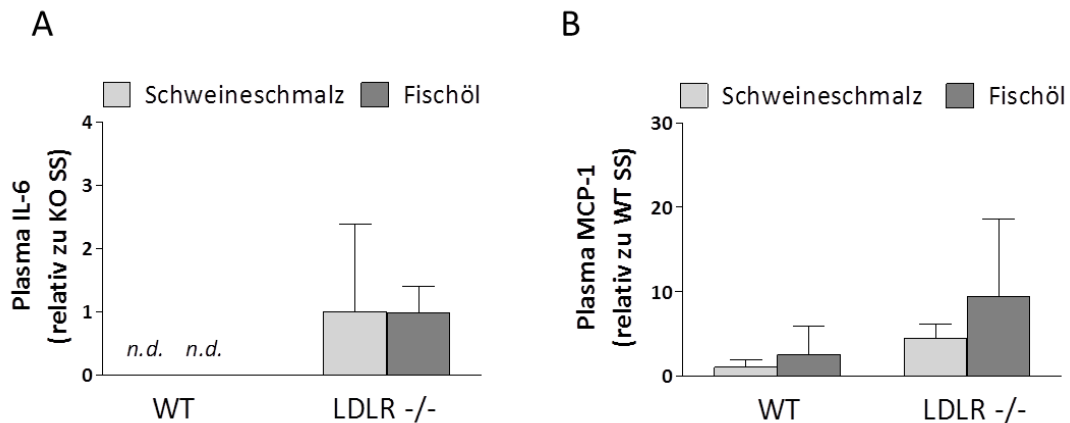


Abbildung 9: Konzentration von IL-6 und MCP-1 im Plasma.

Die Konzentrationen von IL-6 (A) und MCP-1 (B) im Plasma wurden mit Hilfe von *enzyme-linked immunosorbent assays* bestimmt. Hierfür wurde das Plasma so verdünnt, dass die Konzentrationen innerhalb der Standardkurven lagen. Die Ergebnisse wurden auf die KO SS-Gruppe (A) bzw. auf die WT SS-Gruppe (B) normalisiert und mittels Student's t-test (A) oder *Two-way ANOVA* und *post hoc*-Tests ausgewertet. Mittelwerte + SD; n= 6, n.d. nicht detektierbar.

Da eine reduzierte Freisetzung der endothelialen Zelladhäsionsmoleküle nach Fischöl-Supplementation auch auf eine verminderte Expression zurückzuführen sein könnte, wurde exemplarisch die mRNA-Expression von *Icam1* und *Vcam1* im Aortengewebe mittels *Real-Time PCR* überprüft (Abbildung 10). Hier wurden weder Genotyp-abhängig noch fütterungsbedingt Unterschiede in der mRNA-Expression festgestellt. Es kann daher vermutet werden, dass die verringerte Konzentration der Proteine im Plasma tatsächlich durch eine reduzierte Proteolyse bedingt ist.

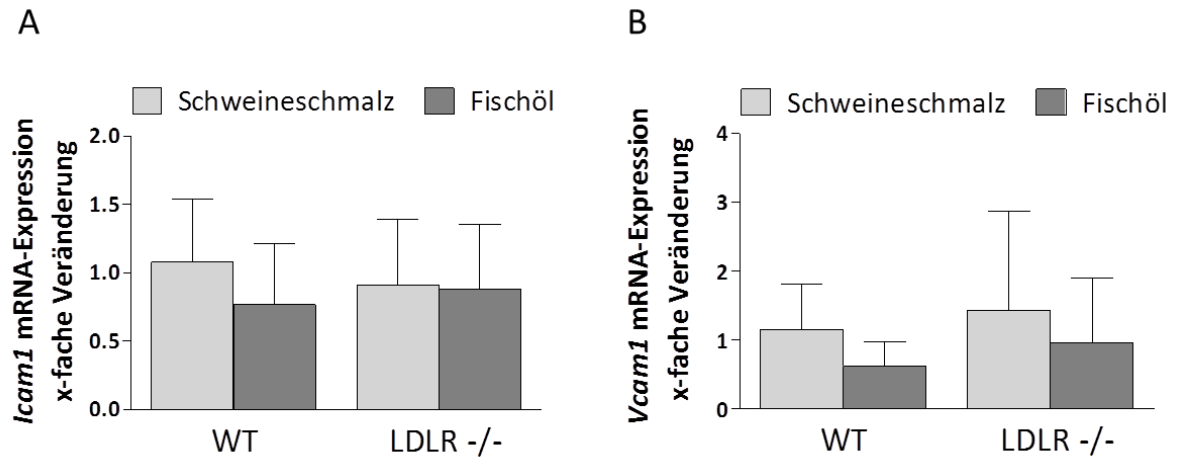


Abbildung 10: mRNA-Expression von *Icam1* und *Vcam1* in der Aorta.

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von *Icam1* (A) und *Vcam1* (B) in der Aorta der Tiere verschiedener Fütterungsgruppen wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet, wobei das Haushaltsgen *Gapdh* als interne Kontrolle verwendet wurde und die Werte auf die WT SS-Gruppe normalisiert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte + SD, die statistische Auswertung erfolgte mittels *Two-way* ANOVA und *post hoc*-Tests; n= 12 (WT FÖ n= 11).

3.1.4 Expression der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in der Leber

Die Leber ist als zentrales Organ des Lipid-Stoffwechsels besonders betroffen von Fettstoffwechselstörungen. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der veränderten Ernährung auf hepatisches Gewebe untersucht. Zunächst wurde wiederum die mRNA-Expression der Metalloproteasen analysiert (Abbildung 11 A). Es konnte hier - wie schon in der Aorta - eine signifikante Zunahme der Expression von ADAM17 in den Knock-Out-Tieren festgestellt werden. Ein ernährungsbedingter Unterschied trat nicht auf. Für ADAM10 konnte kein Unterschied in der Expression zwischen den verschiedenen Gruppen ausgemacht werden.

Da von der Leber mehr Gewebe für Analysen zur Verfügung stand, als von den Aorten, konnte zudem die Proteinexpression untersucht werden. Hierfür wurde Gewebe homogenisiert und mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche und eine Membran-Fraktion separiert. Der Überstand wurde zur Analyse löslicher ADAM-Substrate aufbewahrt. Das Membran-Pellet wurde lysiert und sonifiziert, so dass mittels *Western Blot* die Expression von ADAM17 untersucht werden konnte. Die anschließende densitometrische Auswertung ergab jedoch keine signifikante Veränderung der Proteinexpression. Die Maturierung der Protease war ebenfalls weder Genotyp- noch Diät-abhängig verändert (Abbildung 11 B & C).

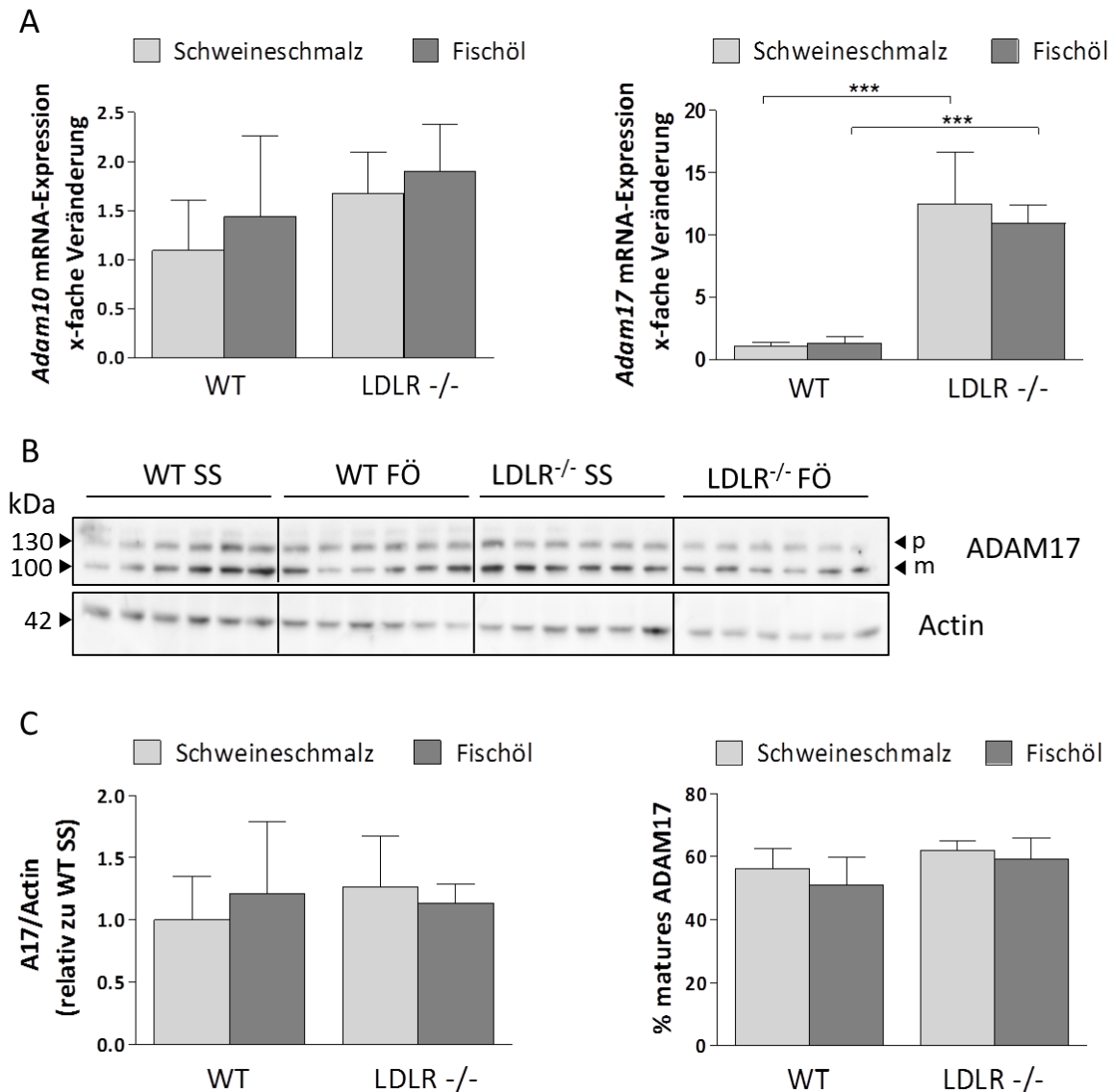


Abbildung 11: mRNA- und Proteinexpression von ADAM10 und ADAM17 in der Leber.

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von *Adam10* und *Adam17* in der Leber der Tiere verschiedener Fütterungsgruppen wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet, wobei das Haushaltsgen *Gapdh* als interne Kontrolle verwendet wurde und die Werte auf die WT SS-Gruppe normalisiert wurden. (A). Die Proteinexpression von ADAM17 wurde mittels *Western Blot* aus Membranfraktionen analysiert. Es konnte Pro- (p) und mature (m) Form detektiert werden. Actin wurde als Kontrolle für gleichmäßig aufgetragene Proteinmengen detektiert und in der densitometrischen Auswertung berücksichtigt. (B) zeigt den *Western Blot*, (C) die densitometrische Auswertung hinsichtlich des totalen Proteins (links) bzw. der maturen Form (rechts). Alle Ergebnisse wurden auf die WT SS-Gruppe normalisiert (außer C rechts) und mittels *Two-way* ANOVA und *post hoc*-Tests ausgewertet. Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; (A) $n = 12$ (WT FÖ $n = 11$), (B) $n = 6$.

3.1.5 Lösliche Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorische Marker in der Leber

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich die Aktivität der Proteasen auch in der Leber Ernährungs- oder Genotyp-bedingt veränderten und ob sich die Ergebnisse der Plasmaanalysen

verifizieren lassen. Hierfür wurden wiederum die Konzentrationen der ADAM-Substrate in den löslichen Fraktionen des Leberhomogenats mittels ELISA bestimmt.

Für den löslichen TNF-Rezeptor, den sIL-6-Rezeptor wie auch sICAM-1 konnte eine Reduktion durch Fischöl-reiche Ernährung in den LDLR-Knock-out-Tieren festgehalten werden, dieser Trend war auch in den Wildtypen zu sehen (Abbildung 12 A, B & D). Die Konzentration des Zelladhäsionsmoleküls sJAM-A war in Schweineschmalz-gefütterten Knock-out-Tieren ebenfalls leicht erhöht, dieser Effekt konnte jedoch durch eine Fischöl-angereicherte Diät wieder reduziert werden. Für sJAM-A ließen sich auch minimale Unterschiede zwischen den Genotypen ermitteln (Abbildung 12 C). Eine Fischöl-reiche Diät führte in den Wildtypen zu einer verringerten Proteolyse von sVE-Cadherin und sVCAM-1, auch hier zeigte sich in den LDLR^{-/-}-Mäusen eine ähnliche Tendenz (Abbildung 12 E & F).

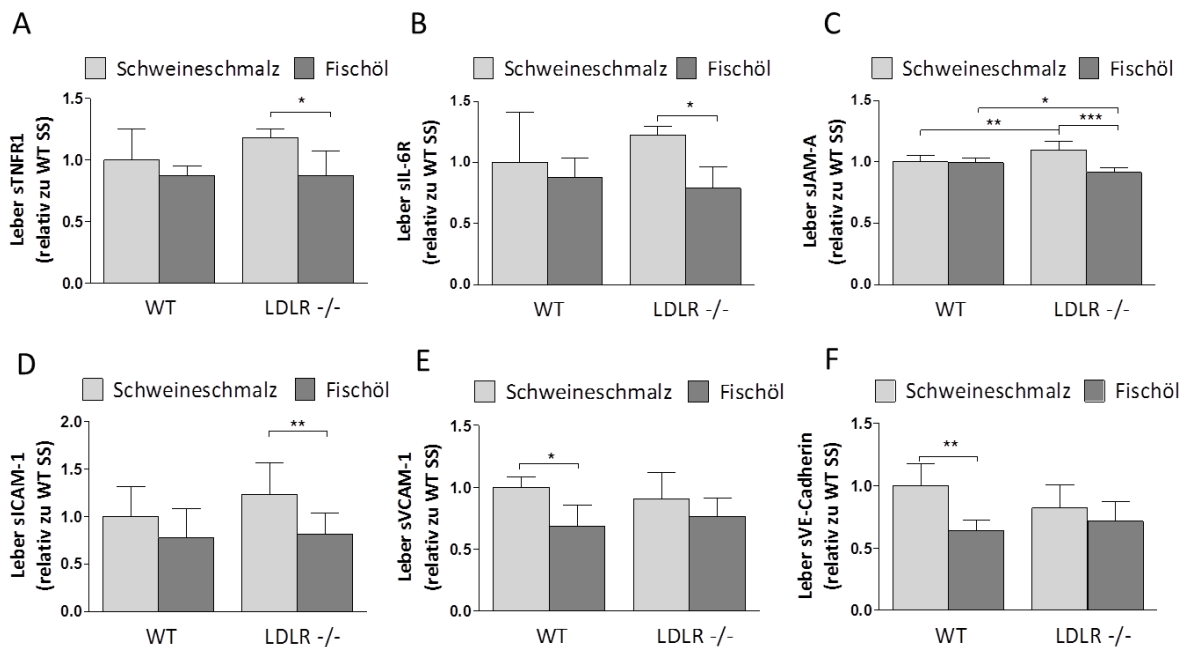


Abbildung 12: Konzentration verschiedener löslicher ADAM-Substrate in der Leber.

Die Konzentrationen verschiedener Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorischer Marker wurden mit Hilfe von *enzyme-linked immunosorbent assays* bestimmt. 50 µg der von der Membranfraktion mittels Zentrifugation getrennten löslichen Proteinfraction wurden pro Loch einer 96-Lochplatte im ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse wurden auf die WT SS-Gruppe normalisiert und mittels *Two-way ANOVA* und *post hoc*-Tests ausgewertet. Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $n = 6$.

Letztlich zeigen die Ergebnisse der Analysen des Leberhomogenats einen vergleichbaren Trend wie die Plasmaanalysen. Die Fütterung mit Fischöl-reicher Nahrung führte auch hier zu einer verminderten Konzentration löslicher ADAM-Substrate. Dies konnte sowohl für Zelladhäsionsmoleküle als auch inflammatorische Proteine gezeigt werden.

3.1.6 Untersuchung der ADAM-Expression und löslicher ADAM-Substrate in Lunge und Niere

Neben den Untersuchungen der Aorta und Leber, sollten auch weitere Organe analysiert werden, um Rückschlüsse auf systemische Veränderungen ziehen zu können. Hierfür wurden die endothelreichen Organe Lunge und Niere gewählt.

In einem ersten Schritt wurde zunächst die mRNA-Expression der Proteasen analysiert. Für *Adam10* konnte in der Niere eine leicht erhöhte Expression durch Fischöl angereicherte Nahrung sowohl im Wildtyp als auch im Knock-out festgestellt werden. Die *Adam17*-Expression war in den Fischöl-gefütterten Wildtypen leicht erhöht im Vergleich zu den Schweineschmalz-gefütterten Tieren (Abbildung 13 A).

In der Lunge konnte keine signifikante Veränderung der Expression sowohl von *Adam10* als auch von *Adam17* gemessen werden (Abbildung 13 B).

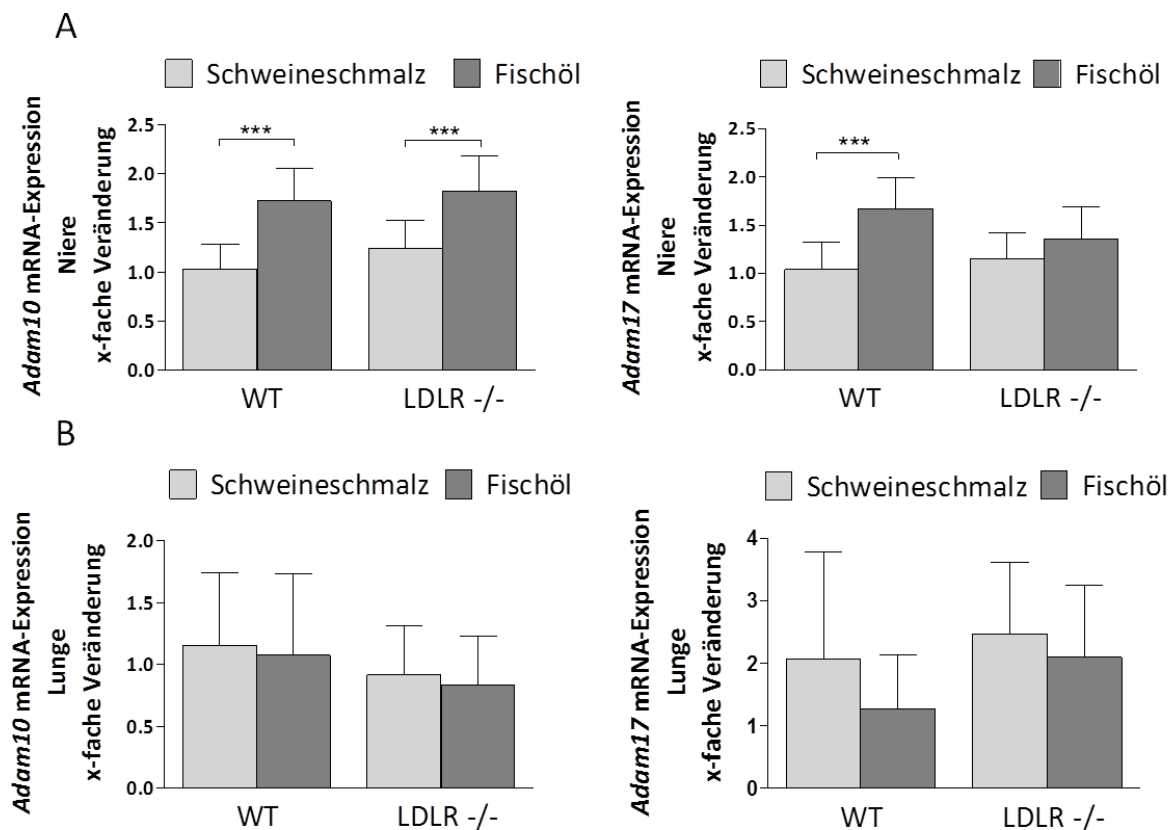


Abbildung 13: mRNA-Expression von *Adam10* und *Adam17* in Niere und Lunge.

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von *Adam10* und *Adam17* in der Niere (A) und der Lunge (B) der Tiere verschiedener Fütterungsgruppen wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet, wobei das Haushaltsgen *Gapdh* als interne Kontrolle verwendet wurde. Alle Ergebnisse wurden auf die WT SS-Gruppe normalisiert und mittels *Two-way* ANOVA und *post hoc*-Tests ausgewertet. Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $n = 12$ (WT FÖ $n = 11$).

Schließlich sollte auch die Aktivität der ADAM-Proteasen in diesen Organen untersucht werden. Hierfür wurden wieder die Konzentrationen löslicher ADAM-Substrate im ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse folgen keinem eindeutigen Trend. So konnte für sJAM-A eine – wenngleich auch sehr kleine - statistisch signifikante Reduktion in der Lunge von Schweineschmalz gefütterten Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt werden, in der Niere hingegen ergab sich keine Veränderung. Für sICAM-1 konnte durch eine Fischöl-reiche Ernährung eine erhöhte Konzentration dieses Substrates sowohl in der Lunge als auch in der Niere erreicht werden. Dies widerspricht jedoch den Veränderungen in Aorta und Leber. Das *Shedding* von Cadherinen war Genotyp-abhängig im Knock-out reduziert, wobei der Unterschied bei E-Cadherin in der Niere nur sehr gering im Vergleich zum VE-Cadherin-*Shedding* in der Lunge ausfiel.

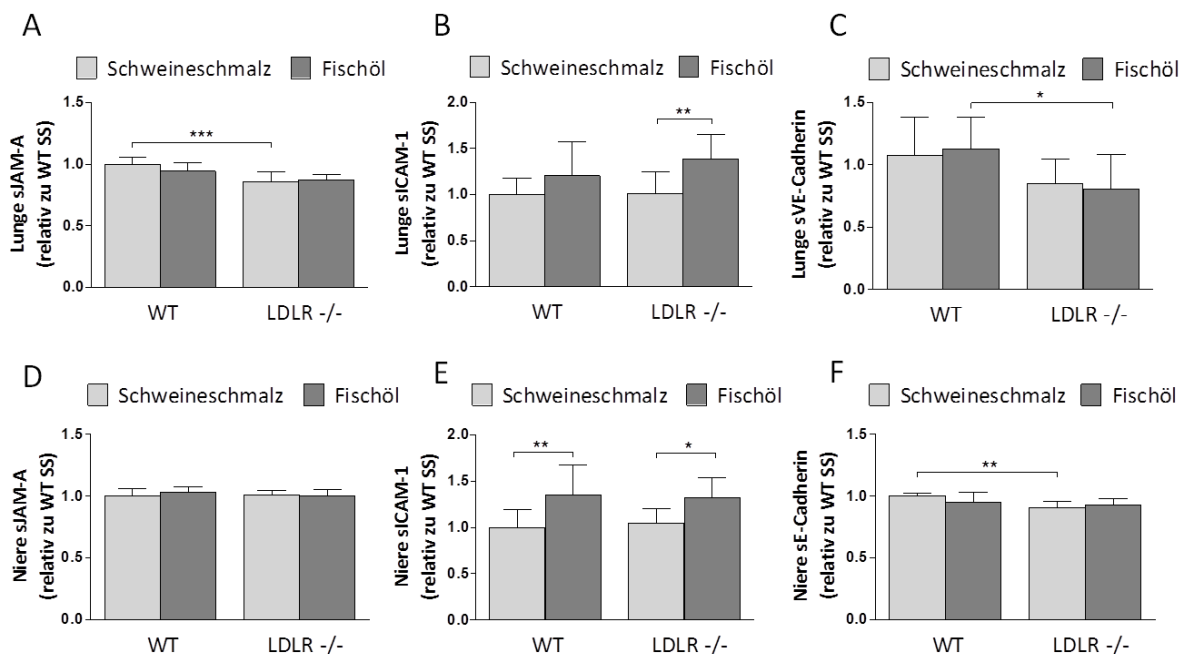


Abbildung 14: Konzentration verschiedener ADAM-Substrate in Lunge und Niere.

Die Konzentrationen verschiedener Zelladhäsionsmoleküle wurden mit Hilfe von *enzyme-linked immunosorbent assays* bestimmt. Hierfür wurden die Organe zunächst homogenisiert und anschließend mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche Proteinfraktion und ein Membranpellet aufgetrennt. 50 µg der löslichen Proteinfraktion wurden pro Loch einer 96-Lochplatte im ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse wurden auf die WT SS-Gruppe normalisiert und mittels *Two-way ANOVA* und *post hoc*-Tests ausgewertet. Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n= 12 (WT FÖ n= 11).

Die Ergebnisse der Analysen von Nieren- und Lungengewebe ähneln nicht den Ergebnissen der Plasma- und Leber-Analysen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Leber als zentrales Organ des Lipidmetabolismus und das Endothel der von den atherosklerotischen Veränderungen betroffenen Aorta von der Fettstoffwechselstörung hauptsächlich betroffen und durch die Ernährung beeinflusst wurden.

3.2 Regulation von ADAMs durch Isothiocyanate

Isothiocyanate (ITCs) sind sekundäre Pflanzenstoffe aus Kreuzblütlergewächsen. Im Fokus der Forschung stehen in erster Linie ihre antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften. So konnte für Sulforaphan gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit diesem Isothiocyanat, die Auswirkungen einer induzierten Colitis in einem Mausmodell vermindern kann (Wagner *et al.* 2013). Eine andere Studie zeigte, dass ADAM17 in diesem Colitismodell ebenfalls protektiv wirkt, da es aufgrund seiner Rolle im EGFR-Signalweg für die Regeneration des Epithels wichtig ist (Chalaris *et al.* 2010). Inwiefern Sulforaphan oder andere Isothiocyanate auch die Aktivität der ADAMs modulieren, ist bislang noch kaum untersucht. Lediglich eine einzige Studie konnte kürzlich zeigen, dass das am besten untersuchte Isothiocyanat Sulforaphan die Expression und die proteolytische Aktivität von ADAM17 in HUVEC-Zellen (humane primäre Endothelzellen) unterbinden kann (Ku *et al.* 2014). In diesem Teil der Arbeit sollte daher eine mögliche Regulation der ADAMs durch Isothiocyanate eingehender untersucht werden. Für diese Analysen wurde die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT gewählt, da ihre Anwendung in der Arbeitsgruppe etabliert ist und eine Reihe möglicher funktioneller *assays* erlaubt.

3.2.1 Isothiocyanate stimulieren die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in Abhängigkeit von Metalloproteasen

Zunächst sollte die proteolytische Aktivität der Metalloproteasen unter dem Einfluss von Isothiocyanaten näher untersucht werden. HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit verschiedenen ITCs stimuliert. Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, lediglich von Phenethyl-Isothiocyanat (PEITC) wurden nur 5 μM verwendet. Diese Mengen richteten sich nach Angaben in der Literatur (Ernst *et al.* 2011) und persönlichen Empfehlungen von Prof. Anika Wagner (Institut für Humanernährung, CAU Kiel). Die Zelllysate wurden mittels *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern untersucht, die zwischen der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form der MAP-Kinasen ERK1/2 unterscheiden. ADAM10 und vor allem ADAM17 sind die Haupt-*Sheddases* für Liganden des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR). Eine Aktivierung der Proteasen hat dementsprechend zur Folge, dass der EGFR durch die freigesetzten Liganden ebenfalls aktiviert wird. Dies löst eine Signalkaskade im Inneren der Zelle aus, bei der letztlich die MAP-Kinasen ERK1/2 phosphoryliert und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Die Phosphorylierung von ERK1/2 kann daher als Maß für die proteolytische Aktivität von ADAM10 und ADAM17 angesehen werden. Um festzustellen, ob Metalloproteasen an der Phosphorylierung von ERK1/2 beteiligt sind und ob dies über eine Aktivierung des EGFR verläuft, wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit des

Metalloproteaseinhibitors Marimastat und des EGFR-blockierenden Antikörpers Cetuximab stimuliert.

Wie in Abbildung 15 A & B gezeigt, stimulierten alle eingesetzten Isothiocyanate signifikant die Phosphorylierung von ERK1/2 in etwa dem gleichen Maße. Die Anwesenheit von Marimastat hatte diese Phosphorylierung vollständig unterbunden, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um einen Metalloprotease-abhängigen Prozess handelt. Die Blockierung des EGFR mit Cetuximab verhinderte ebenfalls die Stimulation von ERK1/2 und unterstrich somit, dass die Phosphorylierung der MAP-Kinase von diesem Rezeptor abhängt. Als zusätzliches *readout*-System wurden die stimulierten Überstände in einem sTNFR1-ELISA analysiert (Abbildung 15 C). Hier konnte jedoch keine erhöhte *Shedding*-Aktivität nach Stimulation mit den ITCs festgestellt werden. Im Gegenteil, die Werte deuteten sogar auf eine verminderte proteolytische Aktivität hin. Hier muss jedoch auch festgehalten werden, dass kein inhibitorischer Effekt von Marimastat auf das konstitutive *Shedding* messbar war. Auf statistische Analysen wurde aufgrund der niedrigen Stichprobenanzahl verzichtet.

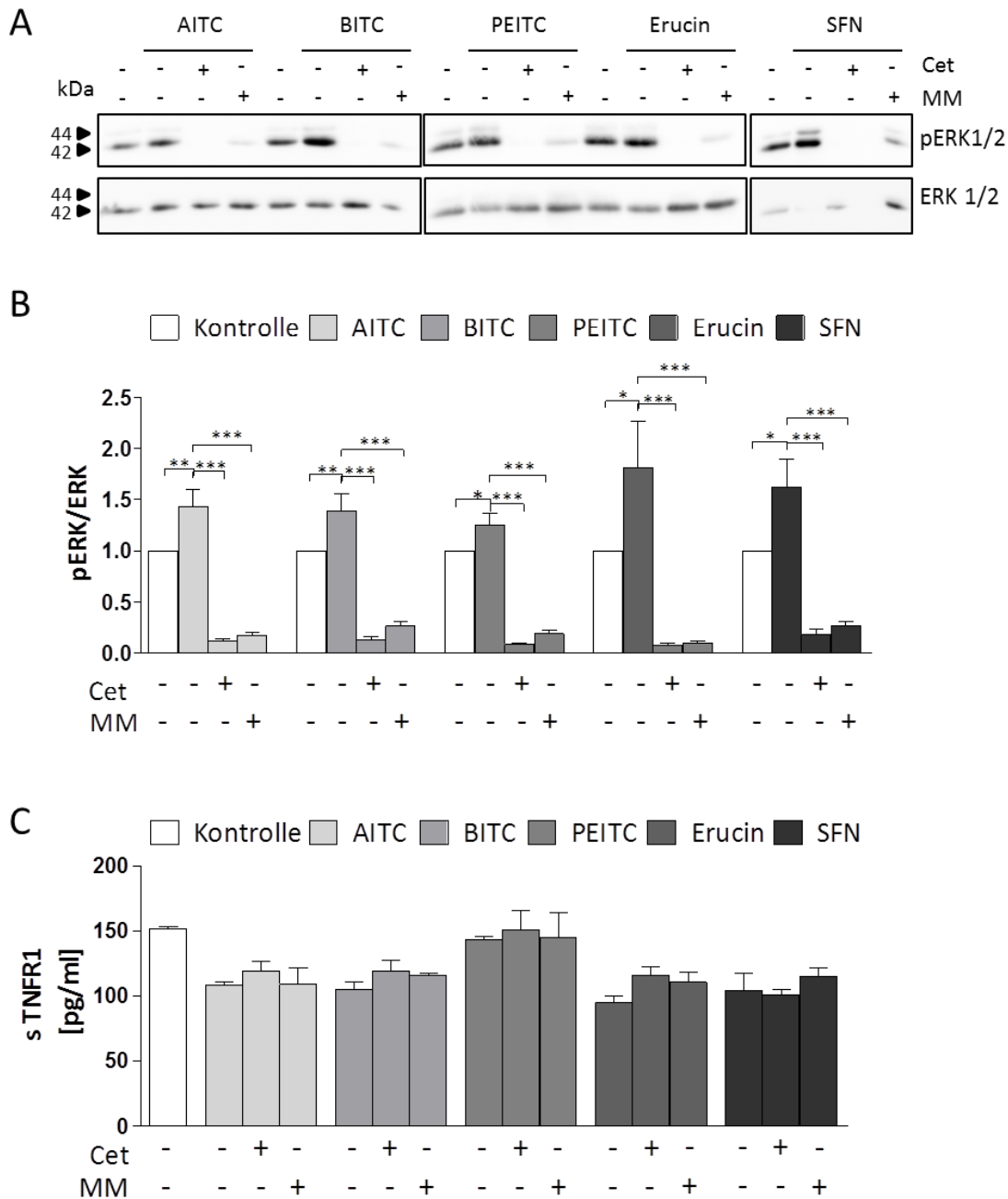


Abbildung 15: Isothiocyanate stimulieren die Phosphorylierung von ERK1/2 Metalloprotease-abhängig, jedoch nicht das Shedding des TNF-Rezeptors 1.

HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit verschiedenen Isothiocyanaten (10 µM, außer PEITC 5 µM) in An- oder Abwesenheit von Marimastat (MM, 10 µM) oder Cetuximab (Cet, 10 µg/ml) stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im *Western Blot* mit Hilfe spezifischer Antikörper für phosphoryliertes (pERK1/2) und nicht-phosphoryliertes ERK1/2 untersucht. (A) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*, (B) die densitometrische Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente (AITC, PEITC, Erucin: n= 8, BITC: n= 14, SFN: n= 11). Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und *post hoc*-Tests, dargestellt sind die Mittelwerte + SD, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001. (C) Die Überstände stimulierter Zellen wurden in einem sTNFR1-ELISA analysiert, dargestellt sind Mittelwerte + SD, n= 2. AITC: Allyl-Isothiocyanat, BITC: Butyl-Isothiocyanat, PEITC: Phenethyl-Isothiocyanat, SFN: Sulforaphan.

3.2.2 Untersuchungen zur Sulforaphan-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 und Aktivierung von Metalloproteasen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle getesteten Isothiocyanate die Phosphorylierung von ERK1/2 ADAM-abhängig stimulieren können, wurde Sulforaphan exemplarisch für weitere Versuche ausgewählt. Nun wurde die ERK1/2-Phosphorylierung näher untersucht und überprüft, wie schnell dieser Prozess startet und wie lange die Aktivierung aufrechterhalten wird.

Hierfür wurden HaCaT-Zellen in Zeiträumen von 5, 15 und 30 min stimuliert. Dies geschah wiederum in An- oder Abwesenheit von Marimastat und Cetuximab. Die Zelllysate wurden anschließend im *Western Blot* hinsichtlich der ERK1/2-Phosphorylierung untersucht (Abbildung 16). Nach 5 min konnte noch keine vermehrte Phosphorylierung beobachtet werden, diese trat erst nach 15 min auf und war nach 30 min wieder verschwunden. Nach dieser Zeit war sogar eine leicht verringerte ERK1/2-Aktivierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu verzeichnen. Die Phosphorylierung war auch in diesen Experimenten abhängig von der Aktivität der Metalloproteasen und des EGFR.

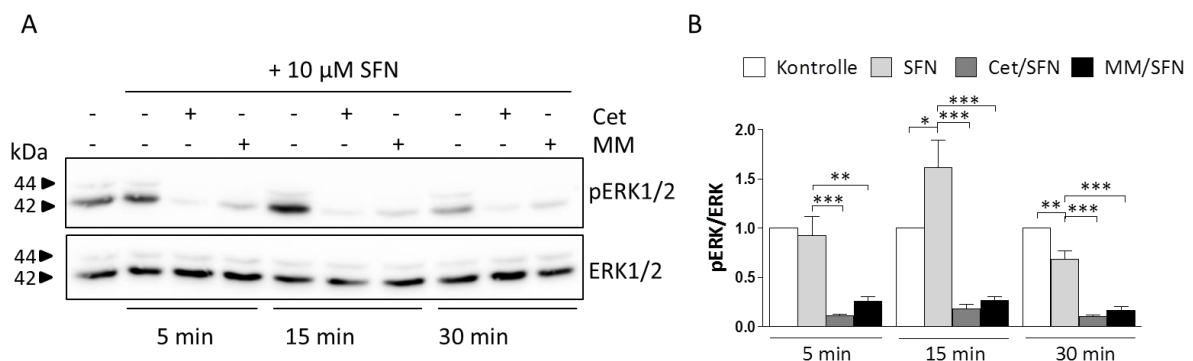


Abbildung 16: Zeitkinetik der Aktivierung von ERK1/2 durch Sulforaphan.

HaCaT-Zellen wurden für 5-30 min mit Sulforaphan (SFN, 10 µM) in An- oder Abwesenheit von Marimastat (MM, 10 µM) oder Cetuximab (Cet, 10 µg/ml) stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK1/2) wurde im *Western Blot* mit Hilfe spezifischer Antikörper für phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes ERK1/2 untersucht. (A) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*, (B) die densitometrische Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente (5 min: n= 4, 15 min: n= 11, 30 min: n= 4). Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und *post hoc*-Tests, dargestellt sind die Mittelwerte + SD, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.

Da die vorangegangenen Versuche darauf hindeuten, dass die ITC-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 abhängig von der Aktivität von Metalloproteasen ist, wurde nun der Mechanismus dieser ADAM-Aktivierung untersucht. Hierfür wurde zunächst das ADAM-vermittelte *Shedding* mit Hilfe eines fluorogenen Peptidsubstrats gemessen. HaCaT-Zellen wurden zu diesem Zweck mit Sulforaphan für 15 min in An- oder Abwesenheit von Marimastat stimuliert, gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Peptidsubstrat inkubiert. Dieses Substrat besitzt eine Aminosäureteilsequenz von

TNF α , die von ADAM17 und zu einem geringeren Teil auch von anderen ADAMs und MMPs erkannt und gespalten werden kann. Geschieht dies, wird nach Anregung eine messbare Fluoreszenz emittiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit dem bekannten ADAM-Aktivator Ionomycin (Ca²⁺-Ionophor) stimuliert (Huovila *et al.* 2005).

Nach Stimulation mit Sulforaphan konnte jedoch keine erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen werden. Lediglich Ionomycin führte zu einer erhöhten Fluoreszenz und somit zu einer erhöhten *Shedding*-Aktivität. Marimastat konnte diese Reaktion allerdings nur geringfügig inhibieren, was auf eine Beteiligung weiterer Proteasen hindeutet (Abbildung 17).

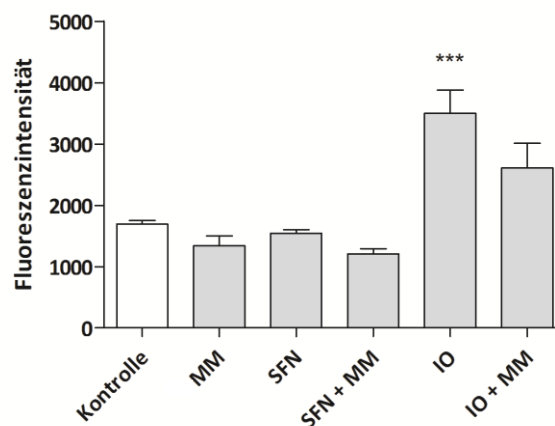


Abbildung 17: Sulforaphan beeinflusst nicht das *Shedding* eines fluorogenen Peptidsubstrates.

HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit Sulforaphan (SFN, 10 μ M), Marimastat (MM, 10 μ M) oder beiden Substanzen inkubiert. Gleichzeitig wurde das fluorogene Peptidsubstrat *ADAM fluorogenic peptide* (Enzo Lifesciences, 5 μ M) zu den Zellen gegeben. Nach 15 min wurde der Überstand abgenommen und die Emission bei 530 nm gemessen. Ionomycin wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way* ANOVA und *post hoc*-Tests, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

3.2.3 Inhibitionsversuche zur Sulforaphan-vermittelten ERK1/2-Aktivierung und Vergleich von Sulforaphanen unterschiedlicher Hersteller

Es existieren verschiedene Aktivierungsmechanismen und Signalwege, die die ADAM-vermittelte Proteolyse stimulieren können. So können ADAMs über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), P2-Rezeptoren, Src-Kinasen, Proteinkinase C-Aktivierung oder Kalziuminflux aktiviert werden (Weber & Saftig 2012). Ob einer dieser Mechanismen auch für die Sulforaphan-induzierte Aktivierung der ADAMs verantwortlich ist, sollte mittels Einsatz verschiedener Inhibitoren untersucht werden. Hierfür wurden HaCaT-Zellen zunächst mit den Inhibitoren vorinkubiert und anschließend für 15 min mit Sulforaphan stimuliert. Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 wurde abermals als Maß für die proteolytische Aktivität der ADAMs im *Western Blot* analysiert (Abbildung 18).

In diesem Versuch konnte jedoch erstmals keine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 durch Stimulation mit Sulforaphan erreicht werden. Daher können auch keine Schlussfolgerungen zur Sulforaphan-induzierten ERK1/2-Aktivierung geschlossen werden.

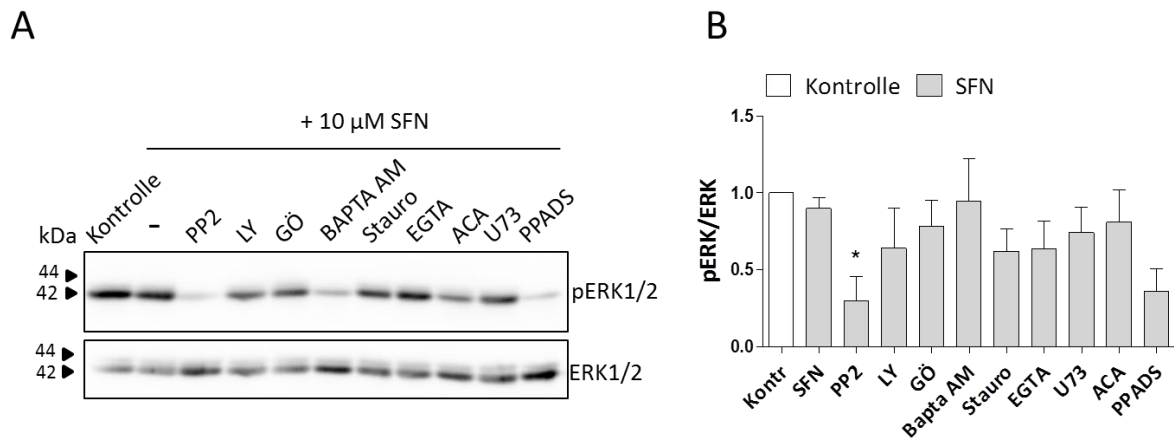


Abbildung 18: Inhibitionsversuche zur Sulforaphan-induzierten ERK1/2-Aktivierung.

HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit Sulforaphan (SFN, 10 μ M) in An- oder Abwesenheit folgender Inhibitoren stimuliert: PP2 (10 μ M), LY 294002 (LY, 10 μ M), GÖ 6976 (GÖ, 1 μ M), BAPTA/AM (30 μ M), Staurosporin (Stauro, 10 μ M), EGTA (3 mM), U-73122 (U73, 10 μ M), ACA (10 μ M), PPADS (200 μ M). Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im *Western Blot* mit Hilfe spezifischer Antikörper für phosphoryliertes (pERK1/2) und nicht-phosphoryliertes ERK1/2 untersucht. (A) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*, (B) die densitometrische Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente ($n = 7$, außer ACA: $n = 5$). Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und *post hoc*-Tests, dargestellt sind die Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Ein Grund für die fehlende ERK1/2-Aktivierung in den Inhibitionsversuchen könnte eine neue Sulforaphan-Charge sein, die in den Inhibitionsversuchen zur Anwendung kam. Frühere Versuche wurden mit einem Aliquot durchgeführt, welches von Frau Prof. Anika Wagner (Institut für Humanernährung, CAU Kiel) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Bei beiden handelte es sich um Substanzen die von Sigma-Aldrich unter der gleichen Produktnummer bezogen wurden. Da die neue Charge nicht mehr für die Aktivierung von ERK1/2 geeignet schien, wurde von Prof. Wagner ein weiteres Aliquot zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um im Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde von Frau Dr. Kalpana Palani selbst synthetisiertes Sulforaphan. Dieses wurde im Folgenden auf die Fähigkeit ERK1/2 in HaCaTs zu aktivieren, getestet. Als Vergleich wurde ebenfalls die neue Charge von Sigma-Aldrich nochmals eingesetzt (Abbildung 19.)

Im Ergebnis zeigte sich, dass die neue Substanz von Sigma-Aldrich nicht zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 führte. Das im Institut für Humanernährung synthetisierte Sulforaphan konnte die Phosphorylierung der MAP-Kinase zwar tendenziell induzieren, jedoch geschah dies nicht so potent wie in den früheren Versuchen, der Unterschied zur unstimulierten Kontrolle war nicht

signifikant. Aus diesem Grund wurde sich dafür entschieden, die Versuche mit Sulforaphan nicht fortzuführen und stattdessen mit Butyl-Isothiocyanat (BITC) weitergearbeitet.

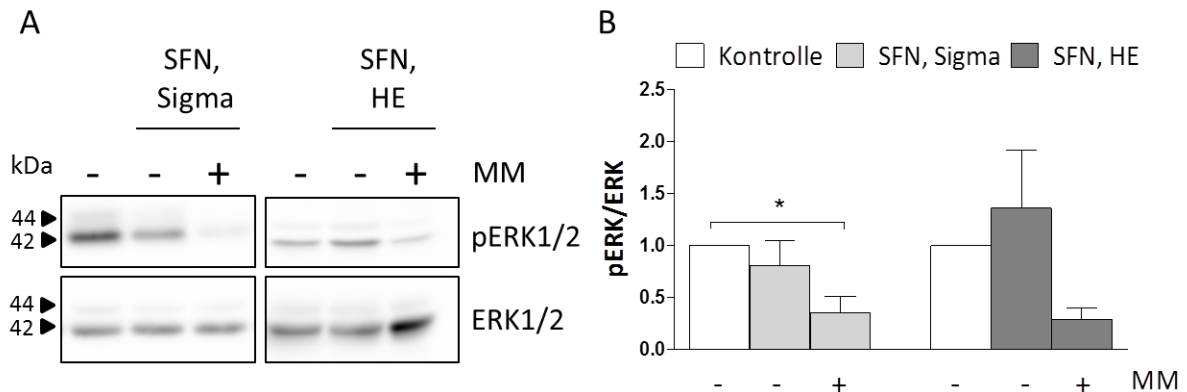


Abbildung 19: Unterschiede in der Aktivierung von ERK1/2 durch Sulforaphan verschiedener Hersteller.

HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit zwei verschiedenen Sulforaphan-Substanzen (10 μ M) in An- oder Abwesenheit von Marimastat (MM, 10 μ M) stimuliert. Hierbei handelte es sich um die neue Charge von Sigma-Aldrich (SFN, Sigma) und das im Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde synthetisierte Sulforaphan (SFN, HE). Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im *Western Blot* mit Hilfe spezifischer Antikörper für phosphoryliertes (pERK1/2) und nicht-phosphoryliertes ERK1/2 untersucht. (A) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*, (B) die densitometrische Auswertung vier unabhängiger Experimente. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und *post hoc*-Tests, dargestellt sind die Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$.

3.2.4 Untersuchungen zur Butyl-Isothiocyanat (BITC)-induzierten ERK1/2-Aktivierung

Für BITC konnte in früheren Versuchen (siehe 3.2.1) bereits gezeigt werden, dass es ebenfalls in der Lage ist, die MAP-Kinasen ERK1/2 Metalloprotease-abhängig zu aktivieren. Wie schon für Sulforaphan sollte diese Phosphorylierung nun zunächst genauer untersucht werden. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BITC in An- und Abwesenheit von Marimastat für 15 min stimuliert und der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 im *Western Blot* analysiert. Parallel dazu wurde eine Zeitreihe der Stimulation von ERK1/2 angefertigt. Hierfür wurden Zeiträume von 5 min, 15 min und 30 min gewählt. BITC wurde dabei wie in den früheren Versuchen in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt (Abbildung 20).

Es zeigte sich, dass BITC bereits ab 1 μ M in der Lage war, die Phosphorylierung von ERK1/2 Metalloprotease-abhängig zu stimulieren. Mit steigender Konzentration nahm dieser Stimulationseffekt zwar wieder leicht ab, jedoch führte auch eine Stimulation mit 10 μ M zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2. Für die Zeitreihe ergab sich ein vergleichbares Ergebnis wie bei der Stimulation mit Sulforaphan. Nach 5 min war noch keine Aktivierung der MAP-Kinasen zu verzeichnen. Nach 15 min sah man eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von

ERK1/2. Der Einsatz von Marimastat und Cetuximab deutete auf die Beteiligung der ADAMs und des EGFR hin. Nach 30 min war die Phosphorylierung zwar weiterhin erhöht, jedoch ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

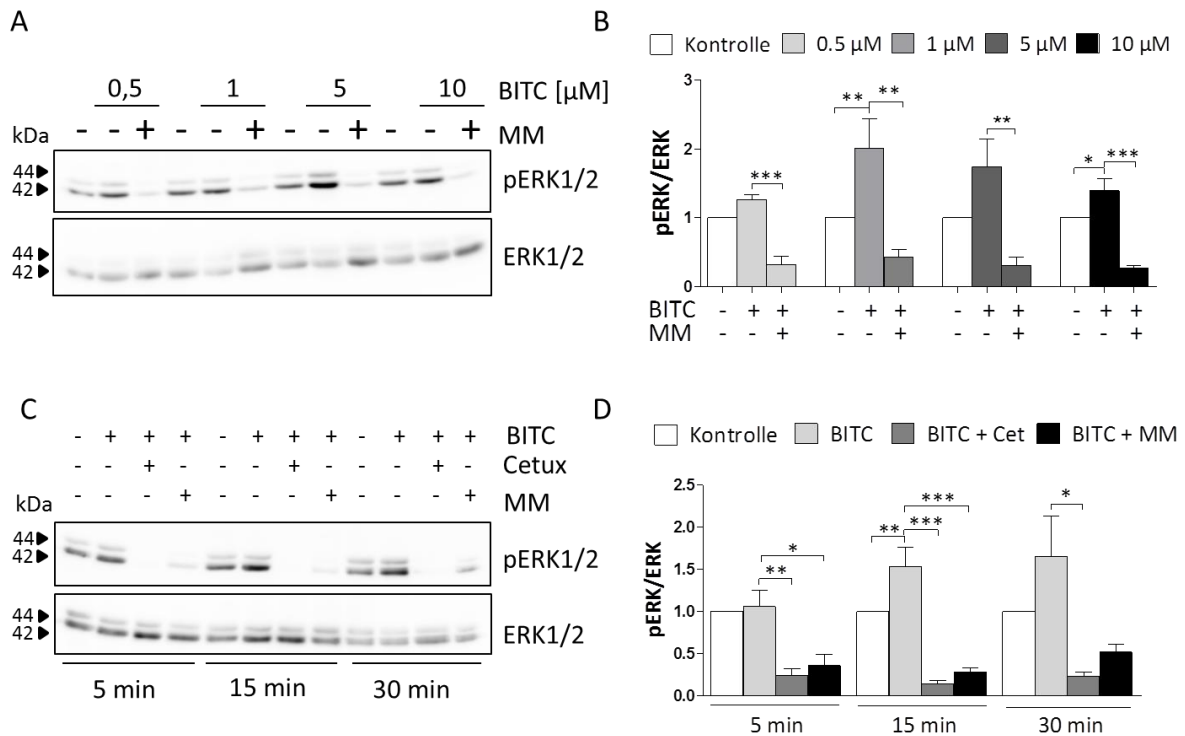


Abbildung 20: Konzentrations- und Zeitreihe der Aktivierung von ERK1/2 durch BITC.

HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit Butyl-Isothiocyanat (BITC) in den angegebenen Konzentrationen und in An- oder Abwesenheit von Marimastat (MM, 10 μ M) stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im *Western Blot* mit Hilfe spezifischer Antikörper für phosphoryliertes (pERK1/2) und nicht-phosphoryliertes ERK1/2 untersucht. (A) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*, (B) die densitometrische Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente (0,5 μ M: n= 3, 1 μ M, 5 μ M: n= 4, 10 μ M: n= 13). Parallel hierzu wurden HaCaT-Zellen mit 10 μ M BITC in Zeiträumen von 5, 15 und 30 min in An- oder Abwesenheit von Marimastat (MM, 10 μ M) oder Cetuximab (10 μ g/ml) stimuliert. (C) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*, (D) die densitometrische Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente (5 min, 30 min: n= 3, 15 min: n= 9). Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und *post hoc*-Tests, dargestellt sind die Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Da die BITC-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung von der Aktivität der Metalloproteasen abhängig war, sollte ein weiteres Mal der Mechanismus der ADAM-Aktivierung näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen wiederum mit verschiedenen Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit 10 μ M BITC stimuliert (Abbildung 21). Die *Western Blot*-Analyse des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 ergab jedoch, dass die Stimulation mit BITC allein, zu keiner erhöhten Aktivierung der MAP-Kinasen führte. Daher kann auch in diesem Versuch keine Aussage zum Mechanismus der BITC-induzierten ERK-Aktivierung gemacht werden.

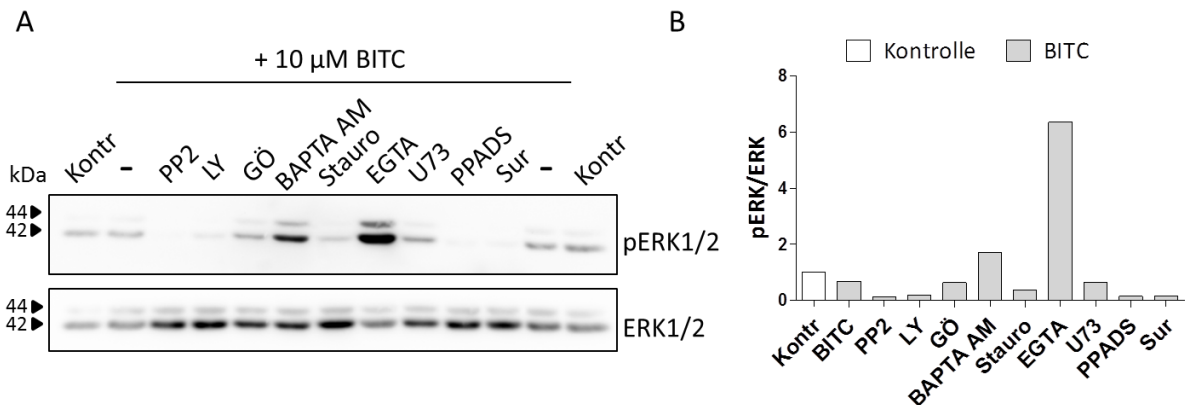


Abbildung 21: Inhibitionsversuch zur BITC-induzierten ERK1/2-Aktivierung.

HaCaT-Zellen wurden für 15 min mit BITC (10 µM) in An- oder Abwesenheit folgender Inhibitoren stimuliert: PP2 (10 µM), LY 294002 (LY, 10 µM), GÖ 6976 (GÖ, 1 µM), BAPTA/AM (30 µM), Staurosporin (Stauro, 10 µM), EGTA (3 mM), U-73122 (U73, 10 µM), PPADS (200 µM), Suramin (Sur, 50 µM). Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im *Western Blot* mit Hilfe spezifischer Antikörper für phosphoryliertes (pERK1/2) und nicht-phosphoryliertes ERK1/2 untersucht. (A) zeigt den *Western Blot*, (B) die densitometrische Auswertung eines unabhängigen Experiments.

Alle Versuche der BITC-Stimulation wurden mit der gleichen Charge durchgeführt, eine definitive Ursache für das erneute Ausbleiben der ERK1/2-Aktivierung durch Isothiocyanate konnte nicht gefunden werden. Aus diesem Grund und aus Zeitgründen wurde auf eine Fortführung des Projektes abgesehen. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Isothiocyanate potentiell in der Lage sind, die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 zu stimulieren. Der Einsatz der Inhibitoren Marimastat und Cetuximab deutet an, dass dieser Prozess über eine Metalloprotease-abhängige EGFR-Aktivierung verläuft. Wie die Aktivität der Metalloproteasen durch die Isothiocyanate moduliert wird, konnte hingegen nicht geklärt werden.

3.3 Regulation von ADAM17 durch IFN γ unter Hypoxie

Neben der Ernährung können auch andere Faktoren wie die Sauerstoffverfügbarkeit die Aktivität der ADAMs maßgeblich beeinflussen. Eine erniedrigte Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie) tritt in vivo vor allem in Tumoren oder bei Entzündungen auf (Vaupel & Höckel 2003; Nizet & Johnson 2009). Für ADAM10 und ADAM17 konnte eine erhöhte Expression bereits für verschiedene Tumorarten beschrieben werden (Kenny 2007; Crawford *et al.* 2009). Zudem gibt es mehrere Hinweise, dass ADAM17 durch Hypoxie-induzierbare Faktoren reguliert werden kann (Marshall *et al.* 2006; Charbonneau *et al.* 2007; Wang *et al.* 2013). Ob dies einen stimulierenden oder einen inhibitorischen Effekt nach sich zieht, scheint allerdings Zell- bzw. Gewebe-abhängig zu sein.

Niedrige Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe spielen auch bei bakteriellen Infektionen eine Rolle. Erste Versuche, die sich mit der Expression von ADAM10 und ADAM17 in einem hypoxischen Milieu befassten, wurden mit der epithelialen Larynxkarzinoma-Zelllinie HEP-2 durchgeführt, die mit dem Bakterium *Chlamydia trachomatis* (Serotyp L2) infiziert wurden. Da das Zytokin Interferon γ (IFN γ) ein bekannter Induktor für chlamydiale Persistenz ist, wurde dies in An- oder Abwesenheit von IFN γ durchgeführt (Roth *et al.* 2010). Eine mRNA-Expressionsanalyse ergab, dass die Infektion keinen Einfluss auf die Expression beider Proteasen hatte, in Anwesenheit von IFN γ jedoch eine erhöhte Expression von *ADAM17* gemessen werden konnte. Wurden die Versuche in Inkubatoren mit verringerter Sauerstoffkonzentration (1 % O₂ statt 20 % O₂) durchgeführt, trat dieser Effekt überraschenderweise nicht auf (Abbildung 22). Diese Beobachtung galt es nun im dritten Teil dieser Arbeit näher zu untersuchen. Dabei wurde sowohl der Einfluss von Hypoxie oder IFN γ auf ADAM17 allein, als auch das Zusammenspiel dieser beiden Faktoren beleuchtet. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Jan Rupp (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, UKSH Lübeck) bearbeitet. Die Stimulation und Infektion der Zellen sowie die Kultivierung unter Hypoxie erfolgte in Lübeck. Nach Beendigung des Versuchs wurden Überstände und Zellpellets gesammelt und für die Analysen nach Kiel transportiert. Parallel dazu wurden auch eigene Stimulationsexperimente unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie, 20 % O₂) durchgeführt.

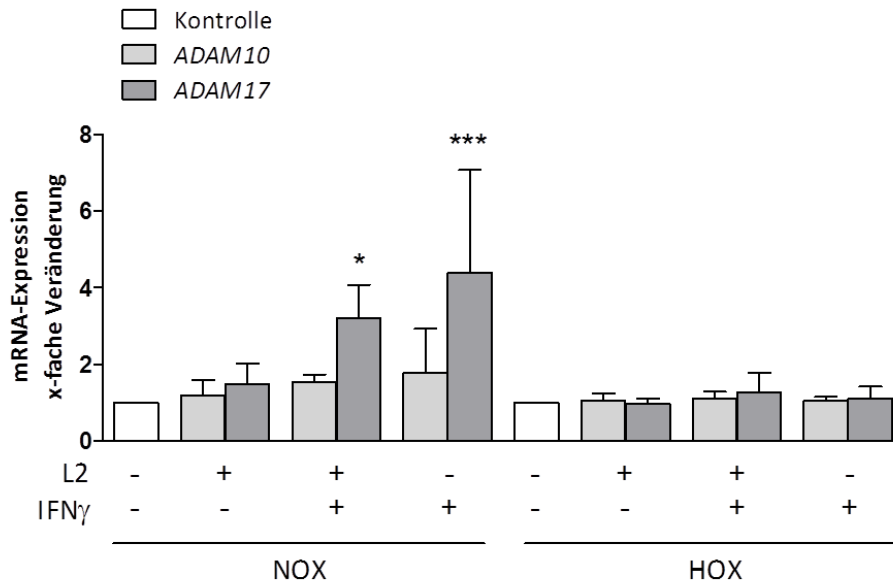


Abbildung 22: mRNA-Expressionsanalyse von *ADAM10* und *ADAM17* in Chlamydien-infizierten HEp2-Zellen. HEp2-Zellen wurden mit IFN γ (25 U/ml) für 24 h stimuliert, anschließend mit *Chlamydia trachomatis* L2 ($1,25 \cdot 10^6$ IFU/well) infiziert und für weitere 24 h inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Normoxie (NOX, 20 % O $_2$) oder unter Hypoxie (HOX, 1% O $_2$). Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von *ADAM10* und *ADAM17* wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet, wobei das Haushaltsgen *HPRT1* als interne Kontrolle verwendet wurde. Alle Ergebnisse wurden auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle normalisiert und mittels *One-way* ANOVA und *post hoc*-Tests statistisch ausgewertet. Mittelwerte + SD; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$; im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, n = 4.

3.3.1 IFN γ stimuliert die mRNA-Expression von *ADAM17* unter Normoxie, nicht jedoch unter Hypoxie

Da erste Experimente auf eine Sauerstoff-abhängige IFN γ -Stimulation der *ADAM17*-Expression hinwiesen, sollte zu Beginn diese Beobachtung in weiteren Experimenten verifiziert und der Einfluss der einzelnen Faktoren genauer überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst getestet, ob eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit allein schon die *ADAM17*-Expression beeinflusst. Hierfür wurden HEp-2-Zellen für 24 oder 48 Stunden unter normalen (20 % O $_2$) oder hypoxischen Bedingungen (1 % O $_2$) inkubiert. Isolierte mRNA wurde anschließend revers transkribiert und mittels *Real-Time* PCR analysiert. Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression beider Proteasen nach 24 Stunden unter Hypoxie reduziert ist und dass dieser Effekt auch nach 48 Stunden bestehen bleibt (Abbildung 23 A). In einem weiteren Versuch wurden die Zellen nun mit IFN γ stimuliert. Dies geschah wiederum sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in den Zeiträumen 24 und 48 Stunden. Nach einem Tag konnte noch keine Veränderung in der mRNA-Expression von *ADAM10* oder *ADAM17* beobachtet werden. Wie schon bei der Stimulation Chlamydien-infizierter HEp-2-Zellen konnte hingegen nach 48 Stunden eine erhöhte Expression von *ADAM17* durch die IFN γ -Zugabe

festgestellt werden. Dies war jedoch nur unter Normoxie der Fall, in einer hypoxischen Umgebung konnte IFN γ die *ADAM17*-Expression nicht stimulieren (Abbildung 23 B).

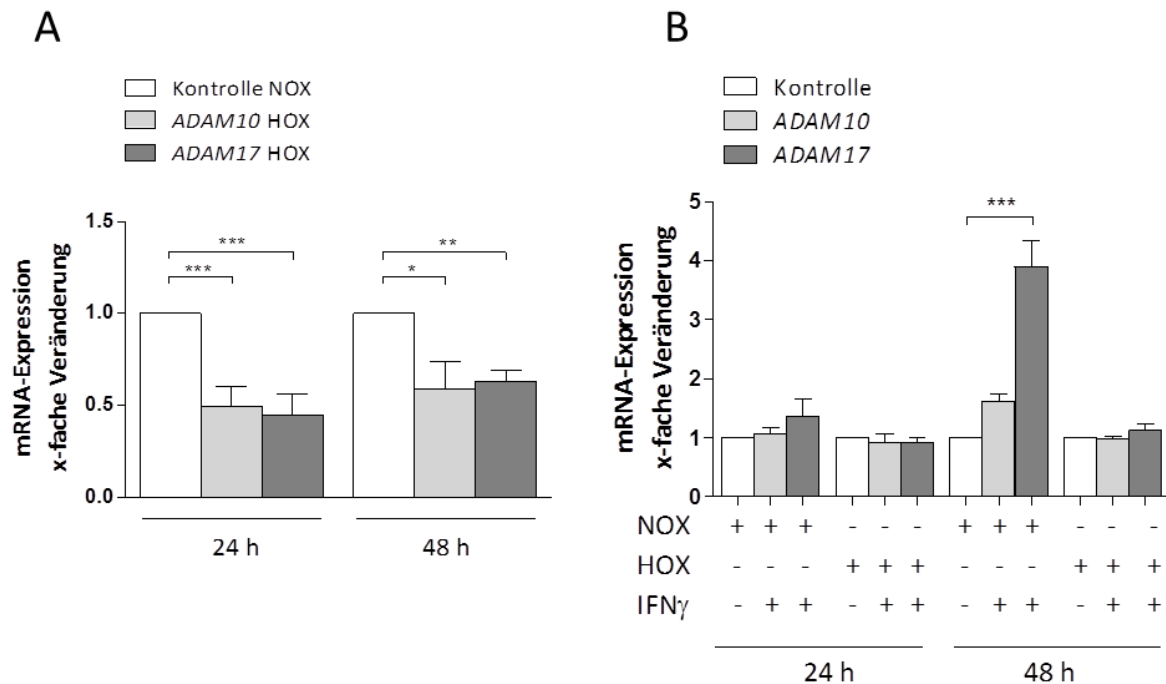


Abbildung 23: mRNA-Expressionsanalyse von *ADAM10* und *ADAM17* in HEp2-Zellen unter Hypoxie und nach Stimulation mit IFN γ .

HEp2-Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h unter Normoxie (NOX, 20 % O₂) oder Hypoxie (HOX, 1 % O₂) inkubiert (A). Desweiteren wurden HEp2-Zellen mit IFN γ (25 U/ml) unter Normoxie oder Hypoxie für 24 h bzw. 48 h stimuliert. Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von *ADAM10* und *ADAM17* wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet, wobei das Haushaltsgen *HPRT1* als interne Kontrolle verwendet wurde. Alle Ergebnisse wurden auf die Normoxie-Kontrolle (A) oder die unstimulierte Kontrolle (B) normalisiert und mittels Student's t-Test (A) oder *One-way* ANOVA und *post hoc*-Tests (B) ausgewertet. Mittelwerte + SD, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; (A) 24 h: n = 5, 48 h: n = 4; (B) NOX: n = 6, HOX: n = 4.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die IFN γ -induzierte mRNA-Expression von *ADAM17* auch auf Proteinebene widerspiegelt. Hierfür wurden HEp2-Zellen unter gleichen Bedingungen stimuliert und die Zelllysate im *Western Blot* mittels *ADAM17*-spezifischer Antikörper analysiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte zum einen hinsichtlich der Fragestellung ob Hypoxie allein bereits einen Einfluss auf die Proteinsynthese von *ADAM17* hat (Abbildung 24 A & B). Die Proteinexpression veränderte sich jedoch weder nach 24 Stunden Hypoxie, noch nach 48 Stunden Inkubation unter diesen Bedingungen. Die *Western Blots* wurden zudem bezüglich der IFN γ -Stimulation densitometrisch ausgewertet. Hier konnte ebenfalls keine Veränderung in der Proteinexpression von *ADAM17* nach IFN γ -Zugabe erreicht werden.

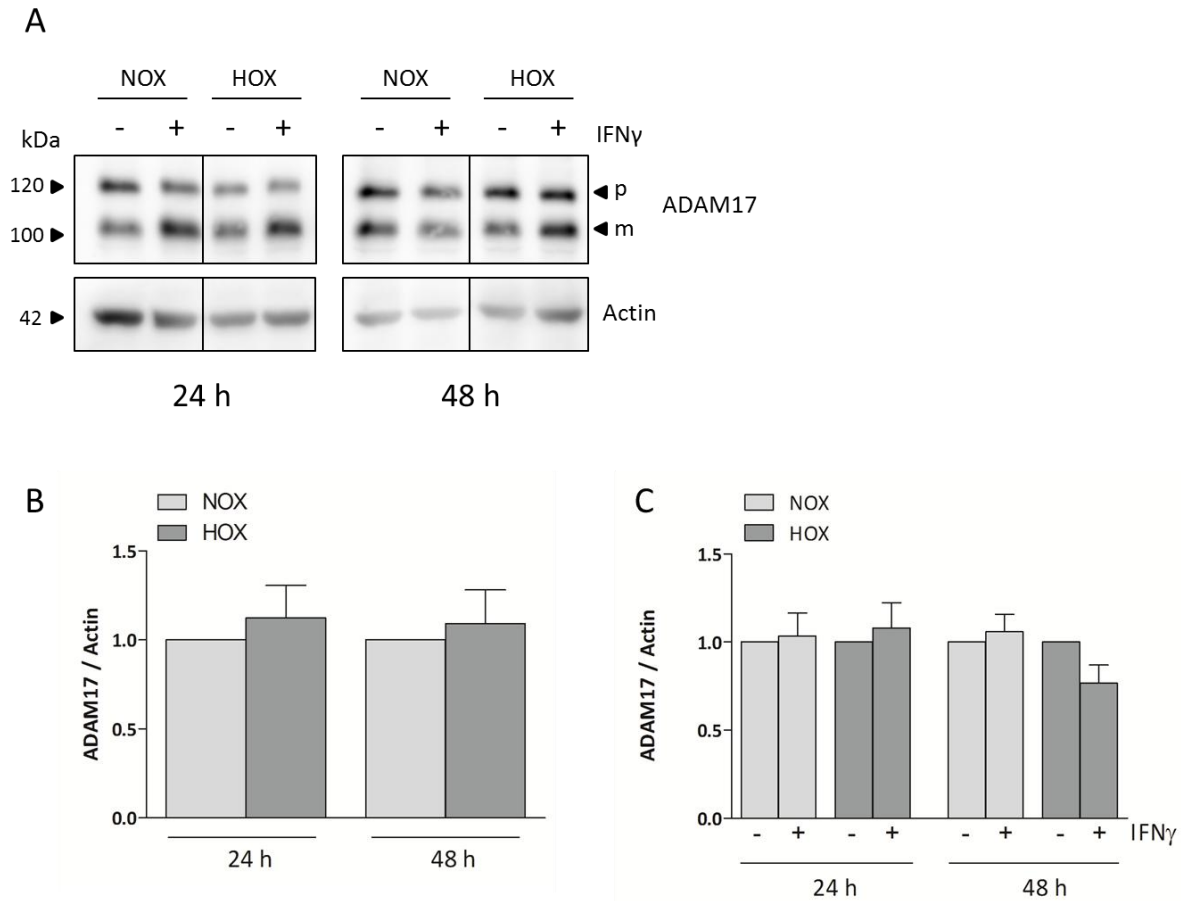


Abbildung 24: Proteinexpression von ADAM17 unter Hypoxie und nach Stimulation durch IFN γ .

Hep2-Zellen wurden mit oder ohne IFN γ (25 U/ml) unter Normoxie oder Hypoxie für 24 h bzw. 48 h stimuliert. Die Proteinexpression von ADAM17 wurde mittels *Western Blot* analysiert. Es konnte Pro- (p) und mature (m) Form detektiert werden. Beide Formen wurden für die densitometrische Auswertung zusammengefasst. Actin wurde als Kontrolle für gleichmäßig aufgetragene Proteinmengen detektiert und in der densitometrischen Auswertung berücksichtigt. (A) zeigt einen exemplarischen *Western Blot*. (B) zeigt die densitometrische Auswertung hinsichtlich der Hypoxie-Bedingungen, (C) die densitometrische Auswertung hinsichtlich der IFN γ -Stimulation. Die Werte wurden auf die Normoxie-Kontrolle (B) bzw. auf die unstimulierte Kontrolle (C) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte + SD; n= 9 (NOX 24 h), n= 8 (HOX 24 h), n= 6 (NOX 48 h) und n= 4 (HOX 48 h).

3.3.2 IFN γ stimuliert das *Shedding* des TNF-Rezeptors 1 unter Normoxie, nicht jedoch unter hypoxischen Bedingungen

Nachdem Veränderungen in der Expression von ADAM17 festgestellt wurden, stellte sich die Frage, ob auch die proteolytische Aktivität von diesen Faktoren beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden HEP-2-Zellen wieder mit IFN γ für 24 oder 48 Stunden unter Normoxie bzw. Hypoxie stimuliert. Dies geschah in An- oder Abwesenheit des Metalloproteaseinhibitors Marimastat. Im Anschluss wurde das *Shedding* des ADAM17-Substrates TNFR1 im ELISA untersucht. Nach 24-stündiger Stimulation mit IFN γ konnte bereits eine erhöhte Konzentration von sTNFR1 im Überstand

gemessen werden. Die Anwesenheit von Marimastat konnte dies verhindern und wies auf auf eine erhöhte Aktivität von Metalloproteasen hin. Unter Hypoxie konnte diese stimulierte *Shedding*-Aktivität jedoch nicht erreicht werden, es traten keine Veränderungen verglichen mit der unstimulierten Kontrolle auf. Eine Stimulation über 48 Stunden lieferte unter Normoxie das gleiche Ergebnis. Unter Hypoxie konnte das *Shedding* zwar leicht, aber nicht signifikant durch IFN γ erhöht werden.

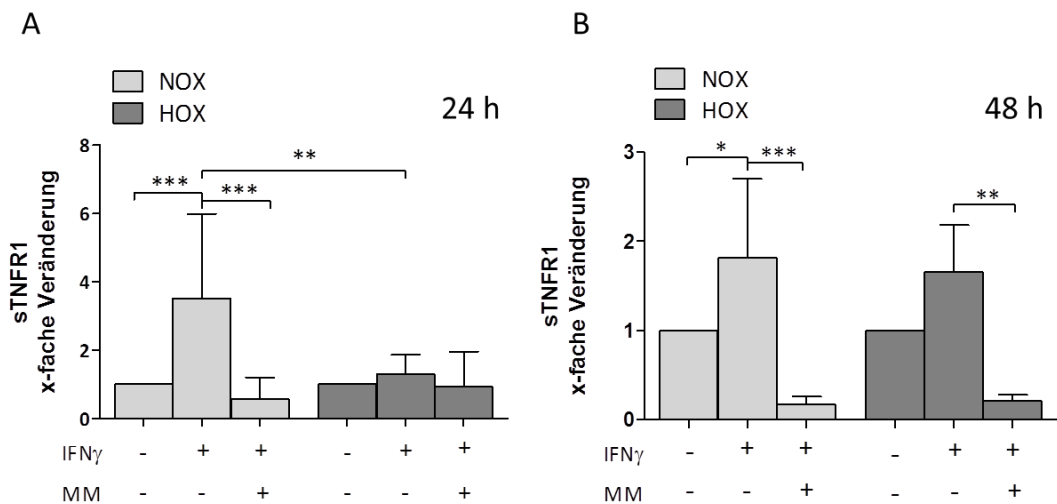


Abbildung 25: Das *Shedding* des TNF-Rezeptors 1 in HEp2 Zellen unter Hypoxie und nach Stimulation mit IFN γ .

HEp2-Zellen wurden mit oder ohne IFN γ (25 U/ml) unter Normoxie oder Hypoxie für 24 h bzw. 48 h stimuliert, in An- oder Abwesenheit von Marimastat (MM, 10 μ M). Die Konzentration des löslichen TNFR1 (sTNFR1) im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. (A) zeigt das Ergebnis der 24-stündigen Stimulation, (B) das Ergebnis nach 48 h Stimulation. Die Werte wurden auf die unstimulierte Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte + SD; n= 9 (NOX 24 h), n= 7 (HOX 24 h), n= 6 (NOX 48 h), n= 3 (HOX 48 h). Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der *One-way ANOVA* und *post hoc*-Tests, * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass eine verringerte Sauerstoffkonzentration in der Umgebung zu einer verminderten mRNA-Expression von *ADAM17* führt. Zudem lässt sich die Expression durch eine Langzeitstimulation mit IFN γ zwar unter normoxischen, jedoch nicht unter hypoxischen Bedingungen induzieren. Im Gegensatz dazu übertragen sich diese Effekte nicht auf die Proteinexpression. Die proteolytische Aktivität wird hingegen ebenfalls durch IFN γ stimuliert, ein Effekt, der nur unter normoxischen, nicht aber unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen zu erreichen war. Auch wenn auf weitere Untersuchungen aus Zeitgründen leider verzichtet werden musste, weisen die bislang gewonnenen Daten auf eine veränderte Regulation von *ADAM17* bei verringerter Sauerstoffverfügbarkeit hin. Dies ist insbesondere relevant für Fragestellungen, die sich mit der Rolle von *ADAM17* in Tumoren und Entzündungen beschäftigen, da diese Bereiche in vivo oftmals von einer Hypoxie betroffen sind.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluss von Fettsäuren aus der Nahrung auf die Metalloproteasen

ADAM10 und ADAM17 in einem Atherosklerose-Mausmodell

Umweltfaktoren können wesentlich zur Entstehung inflammatorischer Erkrankungen beitragen bzw. diese beeinflussen. Atherosklerose beispielsweise, gilt als typische Zivilisationskrankheit. Als einer der wichtigsten Risikofaktoren gelten Fettstoffwechselstörungen, die neben genetischen Dispositionen auf eine zu energie- und fettreiche Ernährung zurückgeführt werden. Neuere Studien deuten darauf hin, dass nicht die Quantität der Nahrungsfette, sondern vielmehr die Qualität der Nahrungsfette von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose ist. Fischöl beispielsweise, ist reich an Omega-3-Fettsäuren, allen voran Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA). Die kardioprotektiven Eigenschaften von Fischöl wurden bereits in einer Vielzahl von Studien belegt. So senkt es den Triacylglyceridspiegel im Plasma, reguliert den Blutdruck und erhöht die vaskuläre Integrität (Sun *et al.* 2014; Schwellenbach *et al.* 2006; Massaro *et al.* 2006). Für die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 kann ebenfalls über eine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten spekuliert werden. Beide konnten bereits in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Oksala *et al.* 2009; Donners *et al.* 2010). Zudem sind sie für eine Reihe proinflammatorischer Reaktionen verantwortlich, welche eine Rolle bei der Entwicklung von Läsionen spielen, wie zum Beispiel die Freisetzung von TNF α . Ihre Aktivität beeinflusst außerdem maßgeblich die Integrität der endothelialen Barriere, da wichtige Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, JAM-A und VE-Cadherin zu ihren Substraten zählen (Dreymueller *et al.* 2012). Im Hauptteil dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob die kardioprotektiven Eigenschaften von Fischöl auch eine Modulation der ADAMs umfassen.

4.1.1 LDL-Rezeptor-Knock-out als Mausmodell für Atherosklerose

Als Mausmodell der Atherosklerose wurden LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse gewählt und Wildtyp-Mäusen gegenüber gestellt. Der Lipoproteinmetabolismus von Mäusen weicht in einigen Punkten von dem im humanen System ab. So fehlt Mäusen das Enzym *cholesterol-ester transfer protein* (CETP) (Barter *et al.* 2003). Im menschlichen Organismus ist es für die Übertragung der Cholesterolester von den anti-atherogenen HDL-Partikeln auf die pro-atherogenen Triglyzerid-reichen Partikel VLDL und LDL verantwortlich. Dies führt dazu, dass Cholesterolester in der Maus vor allem in HDL-Partikeln transportiert wird, wohingegen es im Menschen in LDL-Partikeln verpackt zirkuliert. Aus diesem Grund entwickeln Wildtyp-Mäuse keine spontane Atherosklerose. Des Weiteren absorbiert die Maus wesentlich weniger Cholesterolester aus der Nahrung als der Mensch (Carter *et al.* 1997) und ist

somit resistenter gegenüber Cholesterol-induzierter Atherosklerose. Das Modell des LDLR-Knock-outs eignet sich besonders, da es der familiären Hypercholesterolämie (FH) Typ IIa ähnelt. Hierbei handelt es sich um genetische Mutationen, die phänotypisch zu einem gestörten Lipidmetabolismus führen. Nachdem Goldstein und Brown Mutationen im *LDLR*-Gen als Ursache familiärer Hypercholesterolämien ausmachen konnten, sind inzwischen über 1000 Mutationen in diesem Gen beschrieben worden (Goldstein & Brown 1974; Leigh *et al.* 2008). Der LDL-Rezeptor ist verantwortlich für die Aufnahme und lysosomale Degradation von LDL-Partikeln aus dem Blut und somit von zentraler Bedeutung für die Plasmacholesterolkonzentration (Brown & Goldstein 1986). Patienten, die eine Mutation im *LDLR*-Gen tragen, weisen konsequenterweise eine zwei- bis achtfach erhöhte Menge an LDL-Cholesterol im Plasma auf und entwickeln bereits frühzeitig atherosklerotische Läsionen in den Gefäßwänden, was zu einer geringeren Lebenserwartung führt. FH werden in der Regel autosomal dominant vererbt, wobei homozygote FH nur sehr selten (1:1.000.000) auftritt. Heterozygote *LDLR*-Mutationen hingegen, sind weit verbreitet und treten mit einer Prävalenz von 1:500 auf (Hobbs *et al.* 1992). Sie sind somit ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Für die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen bedarf es bei den *LDLR*^{-/-}-Tieren einer fett- und cholesterolreichen Diät (Ishibashi *et al.* 1993; Knowles & Maeda 2000). In dieser Studie basierte das Futter der Tiere auf einer *Western* Diät. Der Fettanteil lag dabei bei 20 % und ist somit um ein Fünffaches höher als bei einer Standard-Nager-Diät. Die *Western* Diät spiegelt gut die typische humane Ernährungsweise in den westlichen Industrienationen wider, erlaubt also eine bessere Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen. In diesem Zusammenhang ist das *LDLR*^{-/-}-Modell, verglichen mit dem ApoE-Knock-out, auch das geeignetere System um den Einfluss von Veränderungen in der Fettzufuhr auf das vaskuläre System zu untersuchen. Zampolli *et al.* konnten 2006 beispielsweise in einer vergleichenden Studie zeigen, dass eine Anreicherung der Diät mit 1 % Fischöl zu weniger LDL-Cholesterol und Triglyzeriden im Blut führte und konsequenterweise zu einer geringeren Plaqueentwicklung in LDL-Rezeptor-Knock-out-Mäusen. ApoE-KO-Mäuse hingegen, wiesen keine Veränderung im Plasma-Lipidprofil oder der Atherosklerose-Entwicklung auf. Eine frühere Studie aus dem Jahr 2001 konnte bereits zeigen, dass eine Diät angereichert mit 20 % Fischöl den Triglyzeridspiegel im Blut zwar in Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in ApoE-defizienten Tieren senken kann (Asset *et al.* 2001).

4.1.2 Charakterisierung der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen

Die Schweineschmalz-reiche *Western* Diät führte auch in dieser Studie zur Entstehung atherosklerotischer Läsionen mit Lipid- und Kollagenablagerungen in den *LDLR*-KO-Tieren. Eine Fischöl-angereicherte Diät konnte die Atherogenese hingegen reduzieren, wie dies bereits häufig in der Literatur beschrieben wurde. Chang *et al.* fütterten 2014 beispielsweise *LDLR*^{-/-}-Mäuse ebenfalls

über einen Zeitraum von 12 Wochen mit einer *Western* Diät. Der Fettanteil bestand entweder hauptsächlich aus gesättigtem Fett (Kokosnussöl) oder Fischöl bzw. einer Kombination beider Fette. Die Diät mit gesättigtem Fett führte zur Entstehung komplexer atherosklerotischer Plaques, deren Anteil an der Gesamt-Aortenfläche etwa dem Anteil in den Aorten Schweineschmalz-gefütterter Knock-out-Tiere in dieser Studie entsprach ($\approx 30\%$). Ein Austausch von 50 % des Kokosnussöls durch Fischöl führte zu einer stark reduzierten Plaque-Entwicklung (5 % der Gesamt-Aortenfläche). Solch starke Reduktion konnte in dieser Studie nicht erreicht werden (22 % der Gesamt-Aortenfläche), was möglicherweise auf die unterschiedlichen Fettarten zurückgeführt werden kann. In einer anderen Studie wurden LDLR-Knock-out-Mäuse mit einer fettreichen Diät (10 % Schweineschmalz) und unterschiedlichen Konzentrationen von DHA (0,1 %, 1 % und 2 % der Energiezufuhr) über einen Zeitraum von 20 Wochen gefüttert (Gladine *et al.* 2014). Dies führte zu $\approx 22\%$ läsionaler Bereiche / Gesamt-Aortenfläche. Die Zufuhr von DHA bewirkte eine dosisabhängige Reduktion atherosklerotischer Läsionen, wobei erst 2 % DHA zu einem signifikanten Unterschied ($\approx 14\%$ der Aortenfläche) führten. Der Anteil von DHA in der Fischöl-angereicherten Nahrung in dieser Studie lag bei etwa 0,6 % der Gesamt-Energie (siehe auch Tabelle 10 im Anhang). Die Tatsache, dass damit bereits eine signifikant reduzierte Plaqueentwicklung erreicht wurde, kann mit dem Zusammenspiel weiterer Omega-3-Fettsäuren wie EPA begründet werden.

Der Kalzifizierungsgrad war in dieser Studie in allen vier Fütterungsgruppen mit unter einem Prozent noch auf einem sehr niedrigen Niveau. Bei der Kalzifizierung kommt es zu einer osteogenen Umwandlung vaskulärer Zellen durch inflammatorische Faktoren innerhalb atherosklerotischer Plaques. Zytokine wie TNF α , Oncostatin M und IL-6 sind mitverantwortlich für eine erhöhte Osteogenese (Tintut *et al.* 2000; Shioi *et al.* 2002; Deuell *et al.* 2012). Sowohl TNF α als auch IL-6 konnten in dieser Studie nicht eindeutig im Plasma bestimmt werden, was den geringen Kalzifizierungsgrad erklären könnte. Kalziumablagerungen korrelieren mit dem Ausmaß atherosklerotischer Plaqueentwicklung und sind ein starker prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (Sangiorgi *et al.* 1998; Vliegenthart *et al.* 2005; Detrano *et al.* 2008). Aus diesen Gründen wird eine atherosklerotische Kalzifizierung als ein Charakteristikum des späten Stadiums einer Atherosklerose angesehen. Aikawa *et al.* zeigten 2007, dass Osteogenese in ApoE^{-/-}-Mäusen mit der Einwanderung von Makrophagen in die Aorta assoziiert ist und dass diese Prozesse gleichzeitig mit fortschreitender Plaqueentwicklung zunahmten. Der Anteil „von Kossa“-positiver Bereiche befand sich nach 10-20 Wochen atherogener Diät bei unter einem Prozent. Mäuse, welche die Diät über 62 Wochen erhielten, wiesen fortgeschrittene atherosklerotische Plaques auf, der Kalzifizierungsgrad lag bei $\approx 20\%$. Dies zeigt ebenfalls, dass eine starke inflammatorische Komponente wichtig für eine vaskuläre Kalzifizierung ist.

Obwohl die Entstehung atherosklerotischer Plaques durch eine fettreiche Diät in den LDLR^{-/-}-Mäusen zweifelsfrei erreicht und dieser Effekt durch eine Anreicherung von Fischöl reduziert wurde, konnte eine Erhöhung klassischer inflammatorischer Marker wie TNF α , MCP-1, IL-6 und L-Selektin im Plasma von Schweineschmalz-gefütterten LDLR^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht festgestellt werden. Ungesättigte Fettsäuren hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Freisetzung der Zytokine und deren Rezeptoren. Lediglich die Konzentration von zirkulierendem L-Selektin konnte durch Fischöl leicht reduziert werden. Dies konnte auch schon in Menschen mit moderater Hypertriglyceridämie beobachtet werden. Selbst hohe Dosen von EPA und DHA (3,4 g/d) führten nicht zu einer Reduktion der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF α und IL-6 (Skulas-Ray *et al.* 2011). Proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-6 und MCP-1 werden von Makrophagen bzw. Leukozyten exprimiert, was der Hypothese widerspricht, dass Atherogenese ein generell inflammationsgetriebener Prozess ist.

In einer Studie von Canault *et al.* 2008 konnten erhöhte Werte von löslichem TNFR1 und TNFR2 im Plasma von ApoE-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Tieren nach fettreicher Diät festgestellt werden. Hier gilt es zu beachten, dass ApoE-KO-Mäuse bereits bei einer fettarmen Standard-Nager-Diät Läsionen entwickeln und die Atherosklerose bei fettreicher Nahrung wesentlich schneller voranschreitet, als dies in LDLR^{-/-}-Mäusen der Fall ist. Interessanterweise konnten Canault *et al.* die Konzentration von TNF α im Plasma ebenfalls nicht genau bestimmen, da sich diese an der Detektionsgrenze des eingesetzten *assays* befanden. Wang *et al.* fanden in ihrer Studie 2010, dass MCP-1, TNF α und IL-6 nach atherogener Diät (20 % Butterfett und 0,2 % Cholesterol) in LDLR-Knock-outs erhöht waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Diese Fütterung fand jedoch über einen Zeitraum von 32 Wochen statt und war damit fast 3-mal so lang wie in dieser Studie. Die Ergebnisse der IL-6 und MCP-1 ELISA in dieser Arbeit zeigten auch, dass tendenziell die Konzentrationen im Knock-out höher sind als im Wildtyp und es ist zu erwarten, dass sich über einen längeren Zeitraum mit fortschreitender Atherogenese signifikante Unterschiede herausgestellt hätten. Wang *et al.* stellten zudem fest, dass sich die Konzentrationen von TNF α und IL-6 aus isolierten peritonealen Makrophagen der LDLR-Knock-outs nicht zu denen in Wildtyp-Mäusen unterschieden. Die erhöhte Konzentration der Zytokine im Plasma scheint also auf andere Zelltypen zurückzuführen zu sein. TNF α und auch IL-6 sind aufgrund ihrer hohen Bioaktivität und ihr kurzen Halbwertszeit oftmals schwer zu bestimmen, da die Konzentrationen der zirkulierenden Zytokine am Rande der Detektionsgrenze der eingesetzten *assays* sind. Vor diesem Hintergrund postulierten Cortez-Cooper *et al.* 2013, dass die löslichen Formen der TNF-Rezeptoren 1 und 2 sowie des IL-6-Rezeptors geeignete Indikatoren für vaskuläre Erkrankungen in einem frühen Stadium sind, wohingegen sich die Liganden TNF α und IL-6 eher als Marker eignen bei Patienten, die bereits als gefährdet für

kardiovaskuläre Krankheiten eingestuft wurden. Der lösliche IL-6-Rezeptor war im Plasma LDLR-defizienter Mäuse leicht erhöht verglichen mit den Wildtyp-Mäusen, während eine Fischöl-reiche Diät die Konzentration wiederum senkte; ein Effekt der in den Wildtyp-Mäusen und auch tendenziell im LDLR-Knock-out beobachtet werden konnte. Dies entspricht den Erwartungen, da die Atherogenese im LDLR^{-/-} bereits weiter fortgeschritten ist und entsprechend mehr IL-6-Rezeptor-exprimierende Zellen zirkulieren. Die Konzentration von sTNFR1 im Plasma unterschied sich nicht zwischen den Genotypen, Fischöl-angereicherte Nahrung führte jedoch zu einem Anstieg zirkulierender TNFR1-Moleküle. Dies scheint vor dem Hintergrund der anti-inflammatorischen Eigenschaften von Fischöl überraschend. Die Tatsache, dass TNFR1-defiziente Mäuse nach atherogener Diät größere atherosklerotische Läsionen entwickeln als Wildtyp-Mäuse, deutet jedoch auch auf eine anti-atherogene Rolle des TNFR1 hin (Schreyer *et al.* 1996).

Die Daten der histologischen Untersuchung, insbesondere der geringe Kalzifizierungsgrad und die niedrigen Konzentrationen inflammatorischer Proteine im Plasma, lassen den Schluss zu, dass sich die Tiere am Ende dieser Fütterungsstudie noch in einem frühen Stadium der Atherosklerose befanden. Die Daten unterstützen weiterhin die Hypothese, dass eine systemische Inflammation vielmehr als ein Charakteristikum der späten Phase der Atherosklerose angesehen werden kann (Torzewski & Bhakdi 2013).

4.1.3 ADAM-vermittelte Proteolyse endothelialer Zelladhäsionsmoleküle

Das Eindringen atherogener Lipoproteine aus dem Plasma in die *Tunica intima* ist der Schlüsselprozess zur Entstehung von Atherosklerose, im Zuge dessen es zu einer Einwanderung von Monozyten an diesen Stellen kommt. Hierbei handelt es sich um Vorgänge, die durch die proteolytische Aktivität der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 beeinflusst werden. So führt das *Shedding* von Zelladhäsionsmolekülen zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität und fördert die Leukozytenmigration. Interessanterweise war die Konzentration löslicher Zelladhäsionsmoleküle bis auf sJAM-A und sCXCL16 nicht erhöht in SS-gefütterten LDLR-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. JAM-A ist Bestandteil von *Tight Junctions* im Endothel und ein wichtiger Faktor für die Integrität der Barriere. Wird das Endothel aktiviert, transloziert JAM-A von der basalen zur luminalen Seite der Zelle. Dort ist es an der Transmigration von Monozyten beteiligt (Schmitt *et al.* 2014). Da bis auf CXCL16 alle weiteren Zelladhäsionsmoleküle, die in dieser Studie untersucht wurden, nicht erhöht waren, kann spekuliert werden, dass die erhöhte Konzentration in den Schweineschmalz-gefütterten LDLR^{-/-}-Mäusen auf die veränderte Lokalisation zurückzuführen ist.

Der Austausch von Schweineschmalz durch Fischöl führte zu einer signifikanten Reduktion der löslichen ADAM17-Substrate JAM-A und ICAM-1 sowie des ADAM10-Substrates VE-Cadherin. Dies stimmt mit Daten anderer Studien überein. So führte eine PUFA-angereicherte Diät in einer klinischen Studie aus dem Jahr 2004 zu einer verringerten Menge von sICAM-1, sVCAM-1 und sE-Selektin (Zhao *et al.* 2004). Die Reduktion der zirkulierenden Zelladhäsionsmoleküle lag dabei bei etwa 15-20 %; Werte, die in dieser Studie ebenfalls erreicht wurden. Cybulsky & Gimbrone zeigten 1991 die Expression von VCAM-1 in aktivierten Endothelzellen als frühe Antwort auf die Akkumulation von Cholesterin in der *T. intima*. Aus diesem Grund und um auszuschließen, dass die Veränderungen in den Konzentrationen löslicher ADAM-Substrate im Plasma auf Veränderungen in der Expression dieser Moleküle zurückzuführen sind, wurden Gefrierschnitte der Aorta immunhistochemisch analysiert. Die Auswertung lieferte jedoch keine eindeutigen Hinweise auf eine veränderte Expression oder Lokalisation von VCAM-1 oder anderen Substraten. Hier fielen die einzelnen Färbungen zu unterschiedlich aus, als dass valide Aussagen getroffen werden konnten. Daher wurde die mRNA-Expression von *Icam1* und *Vcam1* im Aortengewebe exemplarisch für die hier untersuchten ADAM-Substrate analysiert. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und LDLR^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Lediglich *Vcam1* in Schweineschmalz-gefütterten LDLR^{-/-}-Tieren ist tendenziell höher exprimiert als in den anderen Gruppen. Die Supplementation von Schweineschmalz durch Fischöl hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die mRNA-Expression. Dies deutet darauf hin, dass eine reduzierte proteolytische Aktivität ursächlich für die durch Fischöl erreichte Reduktion zirkulierender endothelialer ADAM-Substrate ist. In diesem Zusammenhang sollte jedoch auch hervorgehoben werden, dass die mRNA von einem Stück der gesamten Aorta und nicht nur der Endothelzellen gewonnen wurde. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression in anderen Zellen wie den glatten Muskelzellen, das Ergebnis der Analyse beeinflusst. Interessanterweise scheint es zeitabhängige Unterschiede in der *Vcam1*-Expression während einer atherogenen Diät in den verschiedenen Zelltypen zu geben. So wird die Expression von *Vcam1* im Endothel zwar früh induziert, dies nimmt nach einigen Wochen jedoch wieder ab, während nun die glatten Muskelzellen der *Intima* mit der Expression von *Vcam1* beginnen (Li *et al.* 1993). Eine geringere Expression von *Vcam1* in den Endothelzellen der von einer Atherogenese stärker betroffenen LDLR^{-/-}-Tiere könnte möglicherweise ein Grund sein, warum im Plasma signifikant weniger sVCAM-1 gemessen wurde als in den Wildtyp-Mäusen.

Die Ergebnisse der Analysen zirkulierender ADAM-Substrate im Plasma Fischöl-gefütterter Mäuse deuten insgesamt darauf hin, dass Fischöl die ADAM-Aktivität in Endothelzellen reduzierte. Eine verminderte Proteolyse von Molekülen wie JAM-A, ICAM-1 und VE-Cadherin führt im Allgemeinen zu einer verbesserten Barrierefunktion des Endothels und einer verringerten Leukozytenadhäsion und

Transmigration (Dreymueller *et al.* 2012). Es ist vor diesem Hintergrund wahrscheinlich, dass das durch Fischöl-reiche Nahrung reduzierte *Shedding* endothelialer Zelladhäsionsmoleküle zu einer Reduktion atherosklerotischer Läsionen in dieser Studie beitrug.

4.1.4 ADAM-vermittelte Proteolyse in Leber, Lunge und Niere

Die Leber ist das zentrale Organ für die Lipidaufnahme und den Lipidmetabolismus und damit besonders betroffen von Fettstoffwechselstörungen. Der Austausch gesättigter Fette durch Fischöl führte in der Leber LDLR-defizienter Mäuse zu einer Reduktion löslicher endothelialer ADAM-Substrate. Damit werden die Resultate aus den Aorten-Analysen bestätigt. Eine fettreiche Ernährung führt bei LDLR^{-/-}-Mäusen nicht nur zur Atherosklerose sondern auch zu einer Fettleber (*Steatosis hepatis*), wobei Fischöl-angereicherte Nahrung die Schwere der Erkrankung reduzieren kann (Saraswathi *et al.* 2007). Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Anreicherung von Triglyzeriden in Hepatozyten aufgrund einer erhöhten Lipolyse und dem damit verbundenem Transport freier Fettsäuren zur Leber (Sanyal 2005). Insulinresistenz und Hyperinsulinämie sind hiermit assoziiert, da dies Lipolyse, Transport von freien Fettsäuren zur Leber und β -Oxidation fördert (Sanyal *et al.* 2001). Im weiteren Verlauf können auch inflammatorische Signalwege aktiviert werden. TNF α ist hierbei ein wichtiger Faktor, da es das *signalling* von Insulin durch die Inhibition des Insulinrezeptors stört (Uysal *et al.* 1997). Hieraus ergibt sich eine funktionelle Relevanz für ADAM17 als Protease für TNF α . So konnte bei Mäusen, bei denen der endogene Metalloprotease-Inhibitor TIMP-3 (*tissue inhibitor of metalloprotease*) ausgeschaltet ist, eine gesteigerte ADAM17-Aktivität mit erhöhten TNF α -Konzentrationen im Serum festgestellt werden. In der Folge entwickelte sich dabei eine Insulinresistenz und eine Fettleber (Menghini *et al.* 2009; Fiorentino *et al.* 2010). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ADAM17 durch den pharmakologischen Metalloprotease-Inhibitor Marimastat die Ausbildung einer Fettleber und einer Insulinresistenz in Mausmodellen Diät-induzierter Adipositas und Leptin-Defizienz vermindert (de Meijer *et al.* 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten sind auch vor diesem Hintergrund interessant. Fischöl führte hier zu einer Reduktion von sTNFR1 und sIL-6R in LDLR^{-/-}-Mäusen. Da Hepatozyten die Hauptquelle für diese Rezeptoren in der Leber sind, kann spekuliert werden, dass die positiven Effekte von Fischöl auf eine *Steatosis hepatis* mitunter auf einer funktionellen Herunterregulierung von ADAM17 beruhen könnten.

Lunge und Niere wurden ebenfalls als endothelreiche Organe untersucht, um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte in der Aorta und in der Leber auch systemisch auftreten. Die Pathogenesen von Atherosklerose und Lungenemphysem weisen einige Parallelen auf. Eine Inflammation beginnt bei beiden mit der Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in die Alveolar- bzw. die

Gefäßwand (Sharafkhaneh *et al.* 2008). Mausmodelle beider Krankheiten haben zudem ein ähnliches Profil inflammatorischer Marker (Stoll & Bendszus 2006; Taraseviciene-Stewart & Voelkel 2008). LDLR^{-/-}-Mäuse entwickeln nach zehnwöchiger *Western* Diät jedoch kein Emphysem, es konnte auch keine Makrophagen-Infiltration in das Lungengewebe festgestellt werden. Dies stand im Gegensatz zu ApoE^{-/-}-Mäusen, welche ein Emphysem entwickelten und vermehrt Makrophagen in der Lunge aufwiesen (Goldklang *et al.* 2012).

Eine fettreiche Ernährungsweise ist ein wichtiger Risikofaktor für chronisches Nierenversagen. (Odermatt 2011). Eine *Western* Diät führte sowohl bei Wildtyp- als auch bei LDLR^{-/-}-Mäusen zu einer renalen Fibrose (Dai *et al.* 2014). Hierbei kommt es zu einer vermehrten Bindegewebsproduktion aufgrund einer Aktivierung und Proliferation von Myofibroblasten durch inflammatorische Zytokine wie *transforming growth factor* TGFβ (Trojanowska 2012). Die LDLR-defizienten Mäuse waren von der Fibrose stärker betroffen, sie wiesen vermehrt Kollagen und Fibronectin im Nierengewebe auf. ADAM17 wird bei der Entstehung einer renalen Fibrose eine Rolle zugeschrieben, da es als Haupt-Sheddase für Liganden des EGFR die Proliferation der Myofibroblasten fördert (Melenhorst *et al.* 2009; Mulder *et al.* 2012). Dai und Kollegen untersuchten daher in ihrer Studie unter anderem auch die Expression der Protease und stellten fest, dass die Proteinexpression im LDLR-Knock-out höher ist als im Wildtyp und dass eine fettreiche Diät diese Expression genotypunabhängig weiter erhöht. Andere Studien zeigten, dass eine Fischöl-reiche Ernährung die Entstehung einer renalen Fibrose vermindern kann (Peake *et al.* 2011; An *et al.* 2009). Die mRNA-Expression von ADAM10 und ADAM17 war in der hier vorliegenden Arbeit sowohl in den Wildtyp- als auch in den LDLR-defizienten Mäusen nach Fischöl-angereicherter Diät leicht erhöht. Ob sich dies auch auf Proteinebene widerspiegelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft, kann jedoch bezweifelt werden, da selbst eine 12-fach höhere mRNA-Expression wie in der Leber, nicht zu einer erhöhten Proteinmenge führte.

Die in dieser Studie gewonnenen Daten bezüglich löslicher ADAM-Substrate im Lungengewebe und im Nierengewebe lassen keinen eindeutigen Trend erkennen und sind daher schwierig zu interpretieren. Aufgrund des noch frühen Stadiums kann angenommen werden, dass diese Organe wenig von der Fettstoffwechselstörung betroffen sind und daher auch eine Fischöl-angereicherte Ernährung keinen Einfluss auf die Proteolyse der hier untersuchten ADAM-Substrate hatte. Um valide Aussagen hinsichtlich dieser Organe treffen zu können, wären jedoch weitere Untersuchungen z.B. zu inflammatorischen Markern oder möglicher Emphysembildung bzw. Fibrose von Nöten.

4.1.5 Expression von ADAM17 im LDLR-Knock-out-Mausmodell

Um zu überprüfen, ob Veränderungen in der Proteolyse der hier untersuchten ADAM-Substrate auf Modifikationen in der Aktivität der Proteasen zurückzuführen sind oder vielmehr durch eine veränderte Expression der ADAMs, wurden parallel zu den ELISA auch quantitative mRNA-Analysen durchgeführt. Überraschenderweise konnte hier eine erhöhte Expression von ADAM17 in LDLR-defizienten Mäusen verglichen mit WT-Mäusen festgestellt werden. Dies betraf die Aorta und die Leber - Gewebe, das primär von einem gestörten Lipidmetabolismus betroffen ist - nicht jedoch die Lunge oder die Niere. Diese Erhöhung der mRNA-Expression spiegelte sich jedoch nicht in der Proteinexpression wider. In der Konsequenz blieben die Werte der prozessierten ADAM-Substrate im Knock-out auf einem ähnlichen Niveau wie in den Wildtyp-Tieren. Die Tatsache, dass mRNA- und Proteinexpression sowie proteolytische Aktivität von ADAM17 nicht immer korrelieren, konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden. So untersuchten Santiago-Josefat *et al.* 2007 die mRNA- und Proteinexpression von ADAM17 nach EGF-Stimulation *in vitro* und *in vivo* in Brusttumorgewebe. Hier zeigte sich, dass sowohl die Proteinexpression als auch die proteolytische Aktivität zunahm. Dies war jedoch nicht auch eine erhöhte Transkription zurückzuführen, sondern auf eine verzögerte Degradation bzw. eine verlängerte Halbwertszeit von ADAM17. Eine andere Studie beschäftigte sich mit den funktionellen Konsequenzen einer systemischen Überexpression von ADAM17 in transgenen Mäusen. Überraschenderweise konnten bei diesen Tieren keine phänotypischen Defekte festgestellt werden; auch die TNF α -Konzentration im Serum nach LPS-Stimulation erhöhte sich nicht signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Yoda *et al.* 2013). Diese Beispiele belegen, dass die proteolytische Aktivität nicht zwingend von der transkriptionalen Aktivität abhängt bzw. dass eine vermehrte mRNA-Expression keine Zunahme der Proteinexpression und der Aktivität zur Folge haben muss. Dies konnte nicht nur in diesem Teil der Arbeit beobachtet werden, sondern auch im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss der Hypoxie auf ADAM17 (siehe Abschnitt 3.3). Hier führte eine Stimulation mit IFN γ zwar zu einer gesteigerten *adam17*-Expression und einer Zunahme des TNFR1-*Sheddings*, nicht jedoch zu einer erhöhten Proteinexpression.

Die proteolytische Aktivität der Proteasen scheint also mehr von posttranslationalen Mechanismen abzuhängen. Die Abspaltung der Prodomäne durch Proprotein-Konvertasen ist Voraussetzung für die Aktivierung der ADAMs. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die proteolytisch inaktive Rhomboid-Protease iRhom2 ebenfalls wichtig für die Maturation und den intrazellulären Transport von ADAM17 ist (Adrain *et al.* 2012; McIlwain *et al.* 2012; Maretzky *et al.* 2013). Die *Western Blot*-Analyse der Leberlysate wies jedoch nicht auf eine veränderte Maturation von ADAM17 hin, was auf andere Regulationsmechanismen schließen lässt. Fischöl-Supplementation führt unter anderem zu vermindertem oxidativem Stress und der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (Balakumar

& Taneja 2012; Taneja *et al.* 2013; Turgeon *et al.* 2013). Diese Effekte könnten zur hier beobachteten reduzierten proteolytischen Aktivität der ADAMs beigetragen haben, da oxidativer Stress die Aktivität sowohl von ADAM10 als auch ADAM17 erhöht und die NO-Synthase das *Shedding* von ADAM17-Substraten inhibiert (Sanderson *et al.* 2006; Myers *et al.* 2009; Bzowska *et al.* 2009). Ein endogener Inhibitor für ADAM17 ist der *tissue inhibitor of metalloproteinases* TIMP3 (Amour *et al.* 1998). Interessanterweise führte eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *peroxisome proliferator-activated receptor* PPAR γ in hepatozellulären Karzinomzellen (Shen *et al.* 2012) *in vitro* und *in vivo* zu einer erhöhten Expression von TIMP3. Mehrere Studien zeigten bereits, dass Omega-3-Fettsäuren PPAR γ aktivieren (Han *et al.* 2014; Li *et al.* 2014). Dies stellt einen weiteren möglichen Mechanismus der Inhibition von ADAM17 durch Fischöl dar.

Die in diesem Hauptteil der Arbeit gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Fettsäuren aus der Nahrung die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 *in vivo* modulieren können. Eine verminderte Freisetzung endothelialer Adhäsionsmoleküle aufgrund von Fischöl-Supplementation könnte zu einer verbesserten endothelialen Barriere führen und somit den Prozess der Atherogenese verlangsamen. Eine endotheliale Dysfunktion steht in Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Diabetes, Hypertonie und Hypercholesterolämie. Typ 2 Diabetes wird ebenfalls mit erhöhten Konzentrationen zirkulierender ADAM-Substrate in Verbindung gebracht (Schram & Stehouwer 2005) und eine fettreiche Ernährung mit einem erhöhten Fischöl-Anteil verbessert in Mäusen metabolische Charakteristika einer Typ 2 Diabetes wie Fettleber (Jelinek *et al.* 2013). Die Konzentration von Omega-3-Fettsäuren im humanen Serum ist zudem assoziiert mit einem reduzierten Risiko für Typ 2 Diabetes (Virtanen *et al.* 2014).

Auch wenn dies hier nicht gezeigt werden konnte, da sich die Atherosklerose noch in einem frühen Stadium befand, ist außerdem anzunehmen, dass sich eine verringerte ADAM-Aktivität auch positiv auf inflammatorische Prozesse auswirken könnte, da wichtige Entzündungsmarker wie TNF α , IL-6-Rezeptor und die TNF-Rezeptoren zu den ADAM-Substraten gehören. Eine reduzierte Aktivität von ADAM10 und ADAM17 kann daher ein Faktor sein, der zu den positiven Effekten von Fischöl aus der Nahrung beiträgt, vor allem im Hinblick auf vaskuläre Dysfunktionen und Fettleber-Erkrankungen. Aus diesen Schlussfolgerungen lässt sich ein Modell der Fischöl-vermittelten Reduktion der ADAM-Aktivität entwickeln, dass zu einer verminderten Entstehung atherosklerotischer Plaques führt (Abbildung 26).

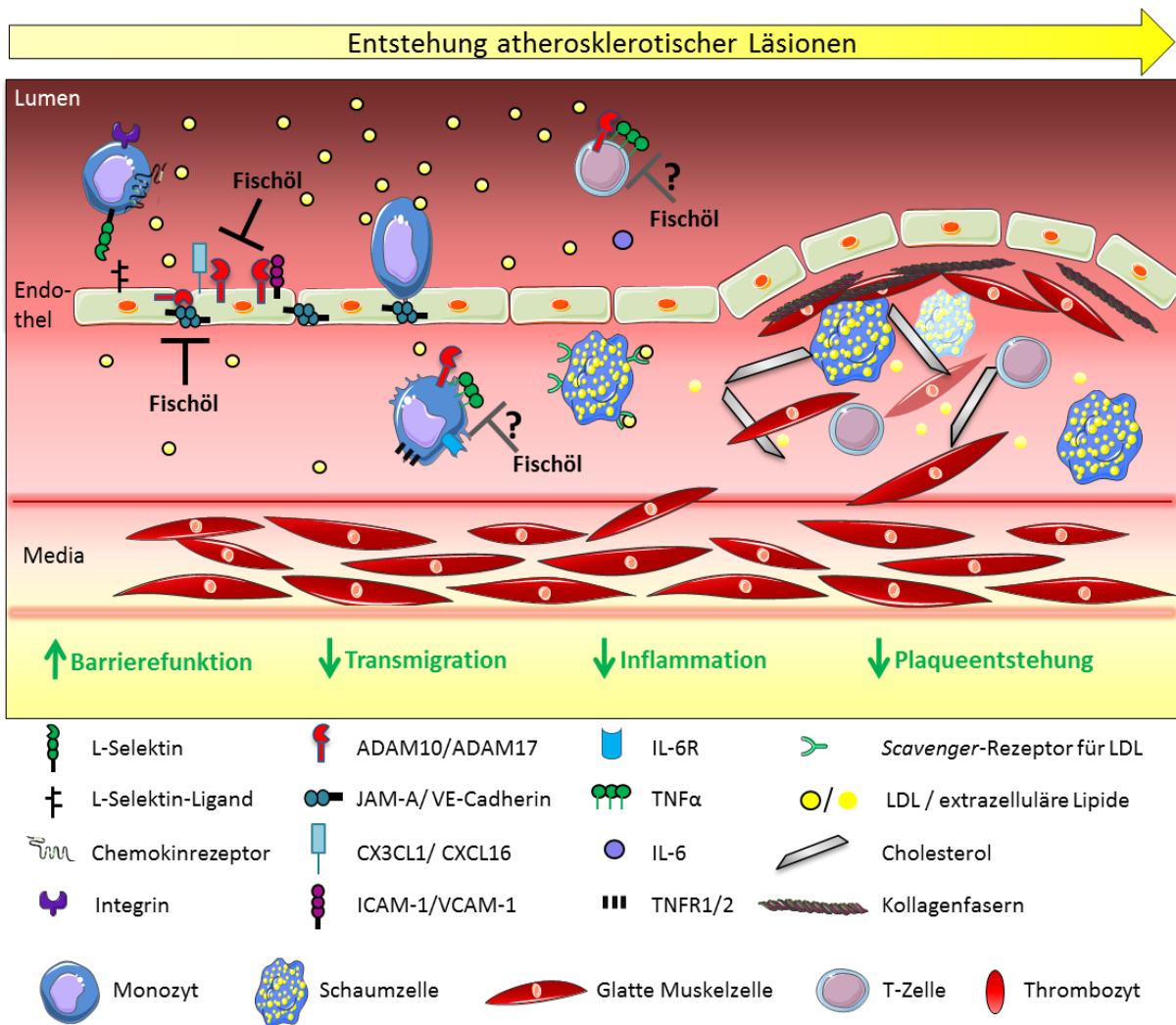


Abbildung 26: Der anti-atherogene Effekt von Fischöl ist assoziiert mit einer verminderten proteolytischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17.

Omega-3-Fettsäuren aus der Nahrung führten in dieser Arbeit zu einer verminderten proteolytischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17 im Endothel. Eine reduzierte Proteolyse endothelialer Adhäsionsmoleküle trägt zu einer erhöhten Barriereintegrität und verringerten Transmigration von Leukozyten bei. Es ist zu vermuten, dass eine Inhibition des *Sheddings* von Zytokinen bzw. deren Rezeptoren sich zudem positiv auf inflammatorische Prozesse auswirken könnte, was letztlich zu einer verminderten Entstehung atherosklerotischer Plaques führt.

4.2 Regulation von ADAMs durch Isothiocyanate

Sekundäre Pflanzenstoffe stellen in den Ernährungswissenschaften ein weiteres wichtiges Forschungsfeld dar. Sie werden vor allem hinsichtlich ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften untersucht. Hierzu zählen unter anderem antikanzerogene, antioxidative, antimikrobielle und anti-inflammatorische Aktivitäten. Ein Einfluss auf Metalloproteasen ist in diesem Zusammenhang jedoch noch kaum untersucht. Hier könnte über eine inhibitorische Wirkung spekuliert werden, da insbesondere ADAM17 als *Sheddase* für Pro-TNFα häufig mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht wird (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997). Zudem ist es mit einer Vielzahl unterschiedlicher

Tumore assoziiert (Kenny & Bissell 2007; Zheng *et al.* 2007; Ding *et al.* 2004). Abhängig vom Krankheitsbild können ADAMs jedoch auch protektiv wirken. ADAM10 und ADAM17 sind beispielsweise für die non-amyloidogene Prozessierung des *amyloid precursor protein* (APP) verantwortlich und erweisen sich somit als neuroprotektiv in der Alzheimer'schen Erkrankung. Des Weiteren ist ADAM17 als Haupt-*Sheddase* von Liganden des EGFR wichtig für die Regeneration des Epithels in einem Colitis-Mausmodell (Chalaris *et al.* 2010). Eine Aktivierung der Proteasen durch sekundäre Pflanzenstoffe ist also durchaus auch möglich. Aus diesem Grund wurde der potentielle Einfluss von Isothiocyanaten auf die Aktivität von ADAMs im dermalen Epithel in einem weiteren Teil dieser Arbeit untersucht.

Isothiocyanate werden häufig hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirkung beschrieben, was unter anderem auf die Fähigkeit zurückzuführen ist, den Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid-related factor-2* (Nrf2) zu aktivieren. Unter normalen Umständen ist Nrf2 an den zytosolischen Inhibitor Keap1 (*Kelch like ECH-associated protein 1*) gebunden, was zu einer raschen Ubiquitylierung von Nrf2 führt (Sekhar *et al.* 2002). Freigesetztes Nrf2 transloziert in den Nukleus wo es mit Hilfe verschiedener Kofaktoren an bestimmte Bereiche in Promotor-Regionen binden kann, den *antioxidant response elements* (ARE). Dies führt zur Induktion von Genen wichtiger antioxidativer Phase II-Enzyme wie beispielsweise die *NADPH-Quinon-Oxidoreduktase 1* (NQO1), die *Hämoxxygenase-1* (HO-1), *Superoxid-Dismutase* (SOD) und die *Glutathion-S-Transferase* (GST) (Surh & Na 2008; Surh *et al.* 2005). Wie die genaue Weiterleitung der Stresssignale bis hin zur ARE-vermittelten Genexpression abläuft, war jedoch lange Zeit unklar. Inzwischen ist bekannt, dass Sulforaphan und andere aktivierende Substanzen Cystein-Thiolgruppen im Keap1-Protein modifizieren, was wiederum die Dissoziation des Inhibitors von Nrf2 zur Folge hat (Dinkova-Kostova *et al.* 2002). Huang *et al.* wiesen in ihrer Studie 2002 zudem nach, dass die Proteinkinase C ebenfalls an der Auflösung des Nrf2/Keap1-Komplexes durch die Phosphorylierung eines Serin-Restes von Nrf2 beteiligt ist. Einige Studien untersuchten zudem, ob die MAP-Kinasen ERK1/2 in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Rolle spielen. Dies wurde in der Tat in einigen Hepatomazellen gezeigt (Yu *et al.* 1999; Yu *et al.* 2000; Zipper & Mulcahy 2000). Weitere Studien konnten dies auch in anderen Zelltypen bestätigen und unterstreichen somit die potentielle Rolle von ERK1/2 in der Aktivierung von Nrf2 durch Isothiocyanate (Xu *et al.* 2006; Ernst *et al.* 2011). Dies wirft die Frage auf, ob ADAMs an der Aktivierung von ERK1/2 durch ITCs beteiligt sein könnten. ERK1/2 sind Serin/Threonin-Proteinkinasen im Ras/Raf-MAP-Kinase-Signalweg. Wie alle MAP-Kinase-Kaskaden fungieren auch in diesem Signalweg GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter, die wiederum eine dreistufige Kaskade aktivieren, welche eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), eine MAP-

Kinase-Kinase (MAP2K) und eine MAP-Kinase (MAPK) umfasst. Diese Signalkaskade wird vornehmlich durch Wachstumsfaktoren aktiviert und reguliert entsprechend eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse wie Zelladhäsion, -proliferation, -migration und Differenzierung (Roskoski 2012). Es gibt verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen, die am Beginn dieses Signalwegs stehen und durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, wie z.B. der *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1-R), der *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) und der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Steelman *et al.* 2011). Da ADAM10 und ADAM17 hauptverantwortlich für die Freisetzung von EGFR-Liganden sind, kann angenommen werden, dass sie wichtige Mediatoren für die Aktivierung des Ras/Raf-MAP-Kinase-Signalwegs in epidermalen Zellen wie der hier verwendeten HaCaT-Keratinozytenzelllinie sind.

In dieser Arbeit führte eine Inkubation der Zellen mit verschiedenen Isothiocyanaten zu einer schnellen Phosphorylierung von ERK1/2 nach 15 Minuten. Die Beteiligung von ADAM-Proteasen konnte durch den Einsatz des Breitband-Metalloproteaseinhibitors Marimastat belegt werden, was zu einer vollständigen Unterbindung der ERK1/2-Phosphorylierung führte. Die Vermutung, dass die Phosphorylierung der MAP-Kinasen über die Aktivierung des EGFR infolge einer ADAM-vermittelten Ligandenfreisetzung erfolgte, konnte durch die Blockade des EGFR mittels des Antikörpers Cetuximab untermauert werden. Einige Studien zeigten, dass Isothiocyanate die intrazelluläre Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erhöhen (Murata *et al.* 2000; Valgimigli & Iori 2009). ROS wurden bereits mehrfach mit der Aktivierung von ADAM17 durch den Phorbolester PMA oder Stressfaktoren in Verbindung gebracht (Zhang *et al.* 2001; Fischer *et al.* 2004; Wang *et al.* 2009). Dies könnte einen möglichen Mechanismus für eine Sulforaphan-induzierte ADAM-Aktivierung darstellen. Weitere Analysen im Rahmen dieses Teilprojektes konnten hingegen keinen Nachweis für eine erhöhte ADAM-Aktivität infolge einer ITC-Stimulation erbringen. Weder das *Shedding* des TNFR1 noch das eines synthetischen Peptidsubstrates konnten induziert werden. Eine mögliche Beteiligung von ADAM10 wurde mittels *Western Blot*-Analyse des ADAM10-Substrates E-Cadherin überprüft. Dies lieferte jedoch auch keine Hinweise auf eine veränderte *Shedding*-Aktivität von ADAM10 (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man die funktionellen Konsequenzen einer ITC-Stimulation mit denen der ADAM-Aktivität, scheint es wahrscheinlicher, dass Isothiocyanate die Aktivität der Proteasen eher negativ beeinflussen. So fördert eine ADAM-vermittelte Proteolyse im Allgemeinen Prozesse wie Zellproliferation und -migration. Dies ist beispielsweise auf die besondere Rolle von ADAM17 als Haupt-*Sheddase* von EGFR-Liganden zurückzuführen (Lee *et al.* 2003). Zudem führt die Proteolyse von Adhäsionsmolekülen wie unter anderem E- und VE-Cadherin die Migration von Keratinozyten und Endothelzellen (Maretzky, Reiss, *et al.* 2005; Schulz *et al.* 2008). Isothiocyanate hingegen, vermindern eine Proliferation und Migration entsprechend ihrer antikanzerogenen Eigenschaften. So

führt Sulforaphan zu einem Zellzyklusarrest vor allem in der G₂/M-Phase (Parnaud *et al.* 2004; Gamet-Payrastre *et al.* 2000). Die chemotaktische Migration von LPS-aktivierten Monozyten kann durch Sulforaphan ebenfalls inhibiert werden (Reddy *et al.* 2015). In diesem Zusammenhang sei auch auf die Studie von Bao *et al.* 2014 verwiesen. Diese beschäftigte sich mit den biphasischen Dosiseffekten von Sulforaphan und konnte zeigen, dass SFN in geringen Dosen (1-5 µM) die Proliferation in einer Reihe von Zelllinien fördert und erst in höheren Dosen (10-40 µM) anti-proliferativ wirkt. Ähnliches konnte auch für Migration und Angiogenese festgestellt werden. Die antiinflammatorischen Eigenschaften von Isothiocyanaten sind ebenfalls bereits vielfach beschrieben worden. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Sulforaphan die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-6 und TNFα inhibiert (Folkard *et al.* 2014; Yehuda *et al.* 2012; Lin *et al.* 2008). Im Gegensatz hierzu ist ADAM17 für die proteolytische Freisetzung der aktiven Form von TNFα überhaupt erst verantwortlich (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997). Die bislang einzige Studie, die sich mit dem Einfluss von Sulforaphan auf ADAM17 beschäftigte, zeigte konsequenterweise, dass Sulforaphan eine PMA-induzierte mRNA- und Proteinexpression von ADAM17 verhindern konnte, was mit einem reduzierten *Shedding* des EPCRs (*endothelial protein C receptor*) einher ging (Ku *et al.* 2014). Hier überrascht der kurze Zeitraum der Stimulation von nur einer Stunde, in der eine fünffache Erhöhung der *adam17*-Expression durch PMA-Stimulation erreicht werden konnte, zumal PMA eher als Stimulanz der proteolytischen Aktivität beschrieben wird, anstatt als Aktivator der Transkription und Translation von ADAM17.

Eine definitive Aussage zum Einfluss von Sulforaphan auf ADAM17 kann aus den Ergebnissen dieses Teilprojektes nicht getroffen werden. Dies ist insbesondere der fehlenden Reproduzierbarkeit der Daten mit unterschiedlichen Chargen von Sulforaphan geschuldet. Eine Kontamination synthetisch hergestellter Substanzen kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint in diesem Fall jedoch nicht wahrscheinlich. So konnte durch Kommunikation mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Anika Wagner (Institut für Humanernährung, CAU Kiel) in Erfahrung gebracht werden, dass auch ihre Experimente mit einer neuen Charge des Sulforaphans (bezogen von Sigma-Aldrich, im gleichen Zeitraum) nicht reproduziert werden konnten. Hier wurde die Aktivierung von Nrf2 als *read-out*-System verwendet. Dies deutet darauf hin, dass die Bioaktivität in dieser Charge wesentlich geringer ausfiel, als in älteren Chargen. Das im Institut für Humanernährung (CAU Kiel) synthetisierte und daraufhin zur Verfügung gestellte Sulforaphan, führte in dieser Arbeit jedoch auch nicht zu einer erhöhten Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2. In Versuchen der AG Wagner konnte mit dieser Substanz zwar eine Induktion von Nrf2 erreicht werden, hierfür waren jedoch höhere Konzentrationen bzw. längere Inkubationszeiten von Nöten. Dies lässt den Schluss zu, dass dieses Sulforaphan zwar aktiv ist, jedoch nicht so potent wie die Substanz aus den früheren Versuchen.

Die Versuche mit einem weiteren Isothiocyanat, Butyl-Isothiocyanat, deuteten ebenfalls darauf hin, dass dieses ITC in der Lage ist, die Phosphorylierung von ERK1/2 Metalloprotease-abhängig zu stimulieren. Leider konnte dies im Laufe der Zeit ebenfalls nicht mehr reproduziert werden. Ursächlich hierfür könnte eine nachlassende Stabilität der Substanz insbesondere nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen sein. Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass in diesem Zeitraum bei Kollegen Kontaminationen im Zellkulturlabor auftraten, deren Ursache erst nach mehreren Wochen ausgemacht werden konnte. Zwar wurden eigene Versuche eingestellt, sobald dies auch hier auftrat, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen bereits voraktiviert waren und daher bereits im unstimulierten Zustand eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung vorlag.

Zusammengenommen müssen die hier gewonnenen Daten mit Vorsicht betrachtet werden. Erste Versuche weisen darauf hin, dass Isothiocyanate potentiell in der Lage sind, die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 zu stimulieren. Der Einsatz der Inhibitoren Marimastat und Cetuximab deutet an, dass dieser Prozess über eine Metalloprotease-vermittelte EGFR-Aktivierung verläuft. Vergleiche mit der Literatur lassen zudem den Schluss zu, dass Sulforaphan und andere Isothiocyanate durchaus die Aktivität von Metalloproteasen beeinflussen können. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch leider nicht eindeutig geklärt werden.

4.3 Regulation von ADAM17 durch Interferon γ unter Hypoxie

ADAM17 wird nahezu ubiquitär in Tumorzellen exprimiert, wie z. B. in Brust-, Gehirn- und Leberkrebszellen (Kenny & Bissell 2007; Zheng *et al.* 2007; Ding *et al.* 2004). Dies ist assoziiert mit einem dysregulierten EGFR-Signalweg und trägt so zu erhöhtem Zellwachstum, erhöhter Proliferation und Differenzierung bei (Dhomen *et al.* 2012). Das Mikro-Milieu neoplastischer Zellen ist für die Tumorigenese von entscheidender Bedeutung, da es Eigenschaften wie Proliferation, Invasivität und die Metastasierung enorm beeinflussen kann. Hierzu zählen Faktoren wie die extrazelluläre Matrix, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (Murphy 2008). Ein nicht zu vernachlässigender Faktor stellt zudem die Sauerstoffverfügbarkeit dar. Hypoxie tritt sehr häufig in Tumorgewebe auf und wird beispielsweise verursacht durch ein gestörtes Gefäßnetzwerk oder eine unzureichende Neovaskularisation (Semenza 2003). Inwiefern die Expression und Aktivität der ADAM-Proteasen durch eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst wird, ist jedoch bislang kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine verminderte mRNA-Expression von *ADAM10* und *ADAM17* in der epithelialen Karzinoma-Zelllinie HEp-2 nach 24 und 48 Stunden Inkubation der Zellen unter

hypoxischen Bedingungen festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch schon in anderen Studien gemacht werden. Die mRNA-Expression von *ADAM10* und *ADAM17* konnte durch eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit (2,5 % O₂) in der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SHSY-5Y nach 48 h zwar nicht reduziert werden, jedoch führten diese Kultivierungsbedingungen zu einer verminderten Proteinexpression von ADAM10 und ADAM17. Dies korrelierte mit einer geringeren α -Sekretaseaktivität für das mit der Alzheimer'schen Erkrankung assoziierte *amyloid precursor protein* APP (Marshall *et al.* 2006). Rybnikova *et al.* untersuchten 2012 die Expression von ADAM17 in verschiedenen Arealen des Rattenhirns nach 3-72 Stunden unter Hypoxie (5 % des normobarischen Sauerstoffs). Es zeigte sich, dass die Expression der mRNA nach 3 und 24 Stunden im Hippocampus reduziert war, nicht jedoch in anderen Bereichen wie im Neokortex oder im Hypothalamus. Diese Arbeiten blieben allerdings primär deskriptiv, konnten also keine Erklärung für die veränderte Expression von ADAM17 unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen liefern.

Der *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) ist der Hauptmediator der zellulären Antwort auf eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert über 100 verschiedene Gene aus allen Bereichen des Zellmetabolismus, vor allem solche für einen erhöhten Sauerstofftransport, Glukosestoffwechsel, aber auch solche für die Angiogenese und Apoptose (Semenza 1999; Feldser *et al.* 1999; Hirota & Semenza 2006). Im Promotorbereich von *ADAM17* wurden ebenfalls Hypoxie-regulierte Bereiche (*hypoxia responsive elements*, HRE) identifiziert, was die zwei- bis vierfach erhöhte Expression der Protease in diesen Studien erklären könnte (Charbonneau *et al.* 2007; Obama *et al.* 2014). Andere Studien wiesen auf eine Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren in der Regulation von ADAM17 hin. So zeigten Szalad *et al.* 2009, dass der *ADAM17*-Promotorbereich ebenfalls Bindestellen für das *specificity protein 1* (Sp1) aufweist und dass dieser Faktor für die deutlich erhöhte Expression (etwa 15-fach) und Aktivität von ADAM17 in der U87 Glioma-Zelllinie unter Hypoxie (O₂ < 1 %) verantwortlich ist. Die dabei angewandte Sauerstoffkonzentration ist geringer als die in vielen anderen Studien, was darauf hindeutet, dass der Grad einer Hypoxie für die Regulation von ADAM17 eine wichtige Rolle spielen könnte. Rzymiski *et al.* untersuchten 2012 die Expression und Aktivität von ADAM17 sowohl bei einer einprozentigen Sauerstoffkonzentration als auch unter nahezu anoxischen Bedingungen (< 0,1 % O₂). Die mildere Hypoxie führte nur zu einer leichten Induktion von *ADAM17* in HeLa-Zellen, wohingegen die schwere Hypoxie zu einer stark erhöhten Expression der Protease (10- bis 15-fach) in verschiedenen Zelllinien führte. Solche stark verringerte Sauerstoffkonzentrationen können zur Aktivierung der sogenannten *unfolded protein response* (UPR) infolge zellulären Stresses durch eine Ansammlung falsch gefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum führen. Eine wichtige Rolle bei der UPR spielen die Proteinkinasen *inositol-requiring protein 1* (IRE1), *protein kinase RNA activated (PKR)-like ER kinase*

(PERK) und der Transkriptionsfaktor *activating transcription factor 6* (ATF6) (Koumenis *et al.* 2002). Rzymiski und Kollegen konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die starke Induktion von *ADAM17* unter schwerer Hypoxie tatsächlich auf die Aktivität von PERK und ATF6 zurückzuführen ist.

In diesem Teil der Arbeit konnte trotz reduzierter mRNA-Expression keine verminderte Proteinsynthese von *ADAM17* festgestellt werden. Eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Proteinmenge tritt nicht immer auf. Dies konnte für *ADAM17* bereits im Hauptteil dieser Arbeit, der sich mit dem Einfluss von Nahrungsfetten auf die Regulation der ADAM-Proteasen befasste, gezeigt werden. Eine erhöhte mRNA-Expression in der Aorta und der Leber LDLR-defizienter Mäuse führte dort nicht zu einer verstärkten Proteinsynthese. Wie bereits unter Abschnitt 4.1.5 diskutiert, konnten vergleichbare Beobachtungen auch in anderen Veröffentlichungen gezeigt werden (Santiago-Josefat *et al.* 2007; Yoda *et al.* 2013). Im Hinblick einer Hypoxie-vermittelten Veränderung in der Expression, wurde dies bereits in der Studie von (Marshall *et al.* 2006) gezeigt. Dort konnte eine reduzierte Proteinmenge von *ADAM17* infolge einer 48-stündigen Hypoxie festgestellt werden, was nicht auf eine Veränderung in der mRNA-Expression zurückgeführt wurde. Eine differentielle Regulation von *ADAM10* und *ADAM17* unter Hypoxie und Anoxie zeigten auch Auerbach & Vinters in ihrer Studie 2006 in ihren Primärkulturen humaner cerebraler mikrovaskulärer glatter Muskelzellen. Dort wurde herausgefunden, dass sich die Proteinexpression von *ADAM17* unter Hypoxie (1 % O₂) nicht veränderte, während die mature Form von *ADAM10* signifikant abnahm. Die mRNA-Expression von *ADAM17* nahm hingegen nach 48 Stunden zu, im Gegensatz dazu veränderte sich die von *ADAM10* über den ganzen Zeitraum jedoch nicht. Eine andere Regulation zeigte sich, wurden die Zellen unter Anoxie kultiviert. So war die Proteinexpression von *ADAM10*, sowie die der maturen Form von *ADAM17* nach 24 und 48 Stunden reduziert, während die immature Form von *ADAM17* zunahm. Interessanterweise erhöhte sich die mRNA-Expression von *ADAM17* im gleichen Zeitraum, wohingegen die Expression von *ADAM10* in den ersten 6 Stunden ebenfalls zunahm, nach 24 Stunden jedoch reduziert war. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse der Proteinmengen in glatten Muskelzellen der Aorta. Die mRNA-Expression der Proteasen wurde ebenfalls in diesen Zellen untersucht, welche nach 24 Stunden deutlich reduziert war. In HeLa-Zellen nahm die Expression beider Proteasen hingegen zunächst nach 24 Stunden ab, nach 48 Stunden konnte jedoch eine vermehrte Proteinmenge festgestellt werden. All diese Studien, wie auch die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten, zeigen auf, dass die Sauerstoffverfügbarkeit einen Einfluss auf die Expression und Aktivität von *ADAM17* hat. Wie dieser Einfluss jedoch aussieht – ob es einen stimulierenden Effekt oder eine inhibitorische Wirkung hat – hängt stark vom Zelltyp, der Schwere der Hypoxie und der Länge des gewählten Zeitraumes ab. Um

die hier gewonnenen Resultate genauer einordnen zu können, sind daher weitere Analysen erforderlich, welche beispielsweise die Rolle von HIF-1 näher beleuchten.

Neben der Hypoxie-vermittelten Regulation von ADAM17, wurde in diesem Teil der Arbeit ebenfalls der Einfluss des Zytokins Interferon γ auf die Metalloprotease unter Normoxie und Hypoxie untersucht. Hier zeigte sich unter normoxischen Bedingungen eine Induzierung der mRNA-Expression nach 48 Stunden. Auf Proteinebene konnten hingegen erneut keine Unterschiede ausgemacht werden. Interferone sind Zytokine die zunächst aufgrund ihrer antiviralen Aktivität beschrieben wurden (Isaacs & Lindenmann 1957). Im Laufe der Jahre konnte das Spektrum ihrer biologischen Aktivität um einige zelluläre Funktionen wie antimikrobielle Aktivität, Apoptose und Kontrolle des Zellzyklus erweitert werden. Interferon γ ist der einzige Vertreter der Klasse der Typ II Interferone und wird hauptsächlich von T- und NK-Zellen sezerniert, zum Teil auch von B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (Schroder *et al.* 2004). Im klassischen IFN γ -Signalweg führt die Bindung des zirkulierenden Zytokins an den Interferon γ -Rezeptor (IFNGR) zur Aktivierung der JAK1/2-STAT (*janus kinase/signal transducer and activator of transcription*)-Signalkaskade. Bislang gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die sich mit einer Regulation von ADAM17 durch IFN γ beschäftigten und keine konnte feststellen, dass die Expression von ADAM17 durch STAT1 induziert werden kann. Eine Studie zeigte, dass die Expression und Aktivität von ADAM17 in Primärkulturen von hepatischen Itozellen der Ratte nach 48-stündiger Stimulation mit IFN γ signifikant reduziert war (Fujita *et al.* 2006). In der Analyse des Promotorbereiches von *ADAM17* konnten jedoch keine *IFN γ -activated site*-Elemente gefunden werden, was den Schluss nahe legt, dass die Regulation von *ADAM17* durch IFN γ über indirekte Wege erfolgen muss. Die in der Studie gezeigte Reduktion der *ADAM17*-Expression widerspricht der in diesem Teil der Arbeit beobachteten Stimulation durch IFN γ . Es sei jedoch darauf verwiesen, dass Fujita und Kollegen mit 1000 U/ml eine 40-fach höhere Konzentration des Zytokins einsetzten als in dieser Arbeit, was die unterschiedliche Regulation erklären könnte. Während in dieser Arbeit erst nach 48 Stunden Unterschiede in der Expression durch IFN γ -Stimulation ausgemacht werden konnten, zeigte sich in den Experimenten von Fujita *et al.* eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression bereits nach 6 Stunden. Hurst *et al.* nutzten in ihrer Studie 2009 auch geringere Konzentrationen von 1-100 ng/ml IFN γ und konnten nach 24-stündiger Inkubation von HCMEC/D3-Zellen (humane cerebrale endotheliale Zelllinie) mit IFN γ ebenfalls keine Induzierung der mRNA-Expression von *ADAM17* feststellen. Die in dieser Arbeit eingesetzten 25 U/ml IFN γ entsprechen 125 ng/ml und sind daher mit den Konzentrationen, die von Hurst und Kollegen eingesetzt wurden, vergleichbar. Neben der direkten Aktivierung von Genen mittels STAT1, können auch andere Transkriptionsfaktoren durch IFN γ STAT1-abhängig aktiviert werden. So ist beispielsweise *interferon regulatory factor 1* (IRF-1) ein Zielgen von STAT1. Es ist zwar

nicht bekannt, ob dieser oder ein anderer IFN γ /STAT1-abhängiger Transkriptionsfaktor die Expression von *ADAM17* beeinflusst, solch ein sekundärer Effekt könnte jedoch eine Erklärung für die erst sehr spät aufgetretene Erhöhung der *ADAM17*-Expression nach 48 Stunden darstellen.

Abgesehen von der JAK/STAT-Signalkaskade, existieren noch andere Signalwege die durch IFN γ initiiert werden können. Dies betrifft beispielsweise MAP-Kinasen, Akt-Kinasen, Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II und die I κ B-Kinase. Sie alle haben eine Vielzahl an Substraten, welche somit zum STAT1-unabhängigen IFN γ -Signalweg beitragen können. IFN γ aktiviert beispielsweise den MEK1/ERK1/2-Signalweg in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen (Hu *et al.* 2001; Gough *et al.* 2007). Dieser Signalweg aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, c-Fos und Sp1 (Roskoski 2012). Sp1 wurde bereits mehrfach als Induktor für die *ADAM17* mRNA-Expression beschrieben (Szalad *et al.* 2009; Liu & Chang 2012). Es ist also durchaus möglich, dass dieser Mechanismus zur erhöhten mRNA-Expression, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, beigetragen hat.

Eine IFN γ -vermittelte Induzierung der *ADAM17*-Expression war in dieser Arbeit nur unter Normoxie möglich, unter hypoxischen Bedingungen trat dieser Effekt nicht auf. Roth *et al.* konnten 2010 zeigen, dass Hypoxie die Aktivität von IFN γ herabsetzte, was auf eine reduzierte IFN γ -Rezeptor-Expression und eine verminderte Phosphorylierung von STAT1 zurückgeführt werden konnte. Die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 war zudem verringert. In der Studie wurden ebenfalls HEp-2 Zellen mit 25 U/ml IFN γ stimuliert, die Inkubation erfolgte für mindestens 28 Stunden bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 %. Jene Bedingungen ähneln stark den hier angewendeten, daher ist es naheliegend, dass vergleichbare Mechanismen wahrscheinlich auch hier zur verminderten Effektivität von IFN γ beitrugen.

In diesem Teil der Arbeit konnte eine Erhöhung der proteolytischen Prozessierung des TNFR1 bereits 24 Stunden nach Stimulation mit IFN γ unter Normoxie erreicht werden. Dies war unter Hypoxie nicht möglich, was vermutlich mit der reduzierten Effektivität des IFN γ *signalling* bei geringer Sauerstoffkonzentration begründet werden kann. Für die erhöhte Proteolyse könnten Mechanismen verantwortlich sein, die neben JAK/STAT durch IFN γ aktiviert werden. So konnte bislang eine IFN γ -induzierte Aktivierung der Proteinkinase C-Isoformen α , δ , ϵ beschrieben werden (Chang *et al.* 2002; Deb *et al.* 2003; Choudhury 2004). Diese wiederum sind bekannte Regulatoren der proteolytischen Aktivität von ADAMs (Nagano *et al.* 2004; Kveiborg *et al.* 2011; Yamashita *et al.* 2014). Die Src-Familie der Non-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src, Fyn und Lyn werden ebenfalls in Gegenwart von IFN γ JAK-abhängig phosphoryliert (Qing & Stark 2004; Ramana *et al.* 2005; Chang *et al.* 2002). Marezky *et al.* beschrieben 2011, dass Src das *ADAM17*-vermittelte *Shedding* des EGFR-Liganden TGF α stimuliert. Die MAP-Kinasen ERK1/2 stellen nicht nur Effektormoleküle der *ADAM*-vermittelten

EGFR-Aktivierung dar, sondern können auch selbst die Proteasen aktivieren und somit zur erhöhten Proteolyse von TNFR1 in dieser Arbeit beigetragen haben. So weist ADAM17 einige SH3-Bindungsdomänen auf und mehrere Studien zeigten eine Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threoninreste innerhalb der zytoplasmatischen Domäne (Fan *et al.* 2003; Díaz-Rodríguez *et al.* 2002). Rousseau *et al.* beispielsweise wiesen 2008 nach, dass die Phosphorylierung am Thr735-Rest von ERK1/2 vermittelt wird. Diese Modifikation trägt zur Maturierung und zum Transport der Protease zur Zelloberfläche bei (Soond *et al.* 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass ADAM17 an der Zelloberfläche als Multimer vorliegen kann (Lorenzen *et al.* 2011). In dieser Form ist es mit dem endogenen Inhibitor TIMP3 assoziiert. Eine MAPK-vermittelte Phosphorylierung von ADAM17 führt zur Dissoziation des Komplexes und somit zu einer Aktivierung der Metalloprotease (Xu *et al.* 2012).

In der Konsequenz lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit schließen, dass eine Stimulation mit Interferon γ vermutlich über sekundäre Signalwege zu einer induzierten ADAM17-Expression führt. Weiterführende Experimente sind hier notwendig, um zu überprüfen, ob dies beispielsweise vom JAK/STAT-Signalweg oder der MAP-Kinase ERK1/2 abhängig ist. Überraschenderweise trat dieser Effekt nicht unter Hypoxie auf. Ein Faktor der in vielen Zellkulturexperimenten nicht berücksichtigt wird, ist die Sauerstoffverfügbarkeit. Diese liegt *in vivo* mit etwa 1-11 % in den Geweben meist deutlich geringer vor, als in der Umgebungsluft (21,1 %) oder in den für die Zellkultur verwendeten Inkubatoren (20 %) (Carreau *et al.* 2011). Krebsentstehung, Infektionen oder Entzündungen lassen diese Werte sogar noch weiter absinken, was zu entscheidenden Veränderungen im zellulären Stoffwechsel führt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur verringerten Effektivität von IFN γ unter Hypoxie verdeutlichen, dass Studien, die sich mit der Regulation von ADAM17 in diesen pathologischen Prozessen beschäftigen, Gewebe-abhängige Umweltfaktoren wie die Sauerstoffverfügbarkeit ebenfalls berücksichtigen sollten.

4.4 Ausblick

Im Hauptteil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Fischöl-angereicherte Ernährung die ADAM-vermittelte Proteolyse endothelialer Adhäsionsmoleküle im Mausmodell reduzierte, was mit einer verminderten Entstehung atherosklerotischer Läsionen in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen korrelierte. Weiterführende Studien müssten nun prüfen, wie die Aktivität der Metalloproteasen durch Fischöl reguliert wird. Zellkulturexperimente mit endothelialen Zelllinien wie HMEC-1 oder HUVECs bieten sich hier für erste Experimente an. Über eine mögliche Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder NO-Synthase an der durch Fischöl-Supplementation erreichten verringerten proteolytischen Aktivität der Proteasen wurde bereits spekuliert. Mittels Ko-

Stimulationsexperimenten mit oxidativem Stress-auslösenden Substanzen könnte die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies näher untersucht werden. Eine mögliche Beteiligung der NO-Synthase kann mit Hilfe von siRNA-Versuchen überprüft werden. Die Inhibition des *Sheddings* könnte auch auf eine erhöhte Expression den endogenen Inhibitors TIMP-3 zurückzuführen sein. Da cDNA der Aorta aus dieser Studie noch vorhanden ist, kann hier sogar die mRNA-Expression von *Timp3* analysiert werden. Ob der inhibitorische Effekt von Fischöl auf die Aktivität der ADAMs darauf zurückzuführen ist, ließe sich wiederum in Zellkulturexperimenten funktionell untersuchen. Es kann spekuliert werden, dass die verminderte Proteolyse endothelialer Adhäsionsmoleküle zu einer verbesserten Barriereintegrität des Endothels und reduzierter Leukozytentransmigration führte, was letztlich die hier gezeigte Ausbildung atherosklerotischer Plaques verhinderte. Transmigrationsversuche könnten zur Klärung dieser Frage beitragen. Hierbei werden HUVECs und T-Zellen in *transwells* kultiviert und nach Stimulation die Transmigration der T-Zellen durch den Filtereinsatz analysiert. Letztlich muss bei Zellkulturexperimenten aber immer beachtet werden, dass es sich hierbei um isolierte Zellsysteme handelt, wohingegen in vivo ein komplexer Verbund verschiedener Zelltypen vorliegt, die unterschiedlich regulatorisch wirken können. So müssen die aus in vitro Versuchen gewonnenen Erkenntnisse letztlich wieder in einem in vivo Modell überprüft werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sekundäre Pflanzenstoffe wie Isothiocyanate einen Einfluss auf die Aktivität von ADAM17 haben können. Leider konnte diese Frage aufgrund der mangelnden Reproduzierbarkeit initialer Experimente nicht geklärt werden. Hier gilt es diese Versuche zunächst zu wiederholen, wobei vorab überprüft werden sollte, ob die eingesetzte Substanz funktionell aktiv ist. Die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Nukleus wäre beispielsweise ein geeignetes *readout*-System für Sulforaphan. Zudem könnten weitere ADAM17-Substrate hinsichtlich ihrer Prozessierung zusätzlich zur Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht werden. Die Aktivität der Protease kann weiterhin mittels Ko-Transfektionen mit alkalische Phosphatase-gekoppelten Substraten bestimmt werden. Hierbei dient die Aktivität der Phosphatase als Maß für die *Shedding*-Aktivität von ADAM17. Falls diese Versuche auf eine mögliche Regulation hindeuten, könnten im weiteren Verlauf beispielsweise in vitro Wundheilungsversuche Hinweise auf mögliche funktionelle Konsequenzen geben.

Die Regulation von ADAM17 bei verringerter Sauerstoffverfügbarkeit war ebenfalls ein Gegenstand dieser Arbeit. Hier wurde festgestellt, dass eine Kultivierung der eingesetzten HEp2-Zellen unter Hypoxie zu einer verminderten mRNA-Expression von *ADAM10* und *ADAM17* führte. Hier muss zunächst die Frage geklärt werden, ob dies auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 zurückgeführt werden kann oder gegebenenfalls noch andere Mechanismen eine Rolle spielen. Eine Auswirkung auf die

proteolytische Aktivität und mögliche funktionelle Konsequenzen müssen ebenfalls noch untersucht werden. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine unter Normoxie erreichte Stimulation durch das Zytokin Interferon γ unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen nicht mehr möglich ist. Hierbei handelt es sich in erster Linie um deskriptive Ergebnisse, so dass beispielsweise die Frage nach den molekularen Mechanismen der IFN γ -induzierten mRNA-Expression noch geklärt werden muss. Eine Analyse des Promotorbereiches könnte Hinweise auf mögliche Erkennungssequenzen IFN γ -gesteuerter Transkriptionsfaktoren liefern. Ob diese regulatorisch auf die Expression von *ADAM17* wirken, könnte nun mittels siRNA-Versuchen überprüft werden. Eine direkte Interaktion eines Transkriptionsfaktors mit bestimmten Bereichen des Promotors kann auch mit Hilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation untersucht werden. Die proteolytische Prozessierung des *ADAM17*-Substrats TNFR1 konnte mit IFN γ ebenfalls stimuliert werden. Die Beteiligung von IFN γ -aktivierten Kinasen wie ERK1/2, Src oder Proteinkinase C liegt nahe und könnte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren geklärt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 sind für die Proteolyse diverser Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Zytokine und auch von deren Rezeptoren verantwortlich, welche in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund steht die Regulation der Proteasen in einem besonderen Fokus vieler Forschergruppen. Gleichzeitig rückte in den letzten Jahren auch der Einfluss von Umweltfaktoren auf verschiedene zelluläre Prozesse und die Entstehung von beispielsweise inflammatorischen Erkrankungen zunehmend in den Mittelpunkt. Inwiefern diese Faktoren auch die Metalloproteasen beeinflussen könnten, ist bislang jedoch noch kaum untersucht.

Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, inwieweit Fettsäuren aus der Nahrung ADAM10 und ADAM17 in einem Mausmodell der Atherosklerose (*low density lipoprotein*-Rezeptor-Knock-out, LDLR^{-/-}) regulieren. Eine wichtige Rolle beider Proteasen in der Atherogenese ist wahrscheinlich, da sie für die Prozessierung einer Reihe von Entzündungsmediatoren und Zelladhäsionsmolekülen verantwortlich sind, die in die Entstehung der Atherosklerose involviert sind. Zahlreiche Studien zeigten in der Vergangenheit, dass Fischöl, welches reich an mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäuren ist, protektiv auf die Atherogenese wirkt. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Hier wurden Wildtyp- und LDLR^{-/-}-Mäuse mit einer fettreichen Diät gefüttert, deren Fettanteil entweder hauptsächlich aus gesättigten Fettsäuren (Schweineschmalz) bestand oder mit Fischöl angereichert war. Es konnte gezeigt werden, dass Fischöl-reiche Nahrung zu weniger atherosklerotischen Plaques in den Aorten der LDLR^{-/-}-Mäuse führte, als eine Schweineschmalz-angereicherte Diät. Dieser anti-atherogene Effekt von Fischöl konnte nicht auf eine verminderte systemische Inflammation zurückgeführt werden, da die Konzentration zirkulierender inflammatorischer Marker nicht beeinflusst wurde. Die Reduktion atherosklerotischer Läsionen korrelierte jedoch mit einer signifikant verringerten Konzentration zirkulierender endothelialer Zelladhäsionsmoleküle, die Substrate von ADAM10 und ADAM17 sind. Da sich die Proteinexpression der Proteasen nicht veränderte, kann spekuliert werden, dass eine reduzierte Aktivität hierfür verantwortlich ist. Im Ergebnis zeigen diese Daten, dass Fischöl aus der Nahrung die proteolytische Aktivität von ADAM10 und ADAM17 *in vivo* beeinflussen kann. Eine reduzierte Prozessierung endothelialer Zelladhäsionsproteine könnte die Barrierefunktion des Endothels verbessern und so zu einer verminderten Lipoproteininsudation und Makrophagenakkumulation in der *Intima* führen, was letztlich der Atherogenese entgegen wirkt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde eine mögliche ernährungsspezifische Regulation von ADAMs durch Isothiocyanate untersucht. Diese sekundären Pflanzenstoffe sind in vielen

Kreuzblütlergewächsen wie Senf oder Brokkoli zu finden und Gegenstand der Forschung aufgrund ihrer potenziellen antioxidativen, antiinflammatorischen und antikanzerogenen Eigenschaften. Die hier gewonnenen Daten lassen vermuten, dass Isothiocyanate in der Lage sind, die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in einer epidermalen Keratinozyten-Zelllinie zu stimulieren. Der Einsatz verschiedener Inhibitoren, ließ den Schluss zu, dass dies auf eine Metalloprotease-abhängige Aktivierung des *epidermal growth factor receptor* EGFR zurückzuführen ist. Letztlich scheiterten weitere Versuche diesen Mechanismus zu reproduzieren und im Detail zu untersuchen. Es konnte daher nicht abschließend geklärt werden, inwiefern Isothiocyanate die Aktivität von ADAMs in diesem Zellsystem modulieren können.

Neben der Ernährung ist die Beeinflussung der ADAMs durch zahlreiche weitere Umweltfaktoren denkbar. Im dritten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob eine hypoxische Umgebung der Zellen die Proteasen beeinflusst. Eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit tritt beispielsweise sehr häufig in Tumoren und Entzündungsherden auf und eine erhöhte Expression von ADAM17 wird mit diversen Tumorarten assoziiert. Das Mikro-Milieu neoplastischer Zellen ist für die Tumorgenese von entscheidender Bedeutung, da es Eigenschaften wie Proliferation, Invasivität und die Metastasierung enorm beeinflussen kann. Es konnte hier gezeigt werden, dass eine 48-stündige Langzeitstimulation der epithelialen Karzinoma-Zelllinie HEP-2 mit Interferon γ zu einer erhöhten mRNA-Expression von ADAM17 führte, was mit einer erhöhten Prozessierung des Substrates TNFR1 korrelierte. Eine Kultivierung der Zellen unter Hypoxie verhinderte diese Stimulation jedoch. Die molekularen Mechanismen dieser differentiellen Regulation von ADAM17 konnten im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht geklärt werden, die hier gewonnenen Erkenntnisse weisen dennoch darauf hin, dass die Sauerstoffverfügbarkeit bei Experimenten, die sich mit der Regulation von ADAM17 in Tumoren beschäftigen, eine größere Beachtung finden sollte.

Zusammenfassend lieferte diese Arbeit neue Erkenntnisse zur Regulation der Aktivität von ADAM10 und ADAM17 durch verschiedene Umweltfaktoren. Ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für ADAM-assoziierte Krankheiten wie kardiovaskulären Erkrankungen, Entzündungen und verschiedenen Tumorarten beitragen. Zusätzlich zu pharmazeutischen Interventionen, könnte dies beispielsweise auch eine Änderung von Lebensgewohnheiten wie der Ernährung umfassen.

6 SUMMARY

The metalloproteases ADAM10 and ADAM17 are responsible for the proteolysis of a number of cell adhesion molecules, growth factors, cytokines and even their receptors. Such molecules play important roles in physiological and pathological processes. The regulation of ADAM proteases is therefore of major importance for many research groups. In this respect, the influence of environmental factors on several cellular processes has become an emerging field of interest due to the potential impact of these factors on the development of for example inflammatory diseases. However, so far little is known about a potential regulation of ADAM10 and ADAM17 by environmental factors.

Therefore, the main part of this thesis deals with the question whether dietary fatty acids might regulate ADAM10 and ADAM17 in an atherosclerosis mouse model (low density lipoprotein receptor knockout, $LDLR^{-/-}$). An important role for both proteases in this disease can be estimated, since a number of inflammatory mediators and cell adhesion molecules, who are involved in atherogenesis, are actual substrates for ADAM10 and -17. It has already been shown that polyunsaturated omega-3 fatty acids of fish oil exert protective effects in atherosclerosis. This could be confirmed in the present work. In this study, wild-type and $LDLR^{-/-}$ mice were fed a high fat diet supplemented with either lard (rich in saturated fatty acids) or fish oil. The fish oil-supplemented diet led to less atherosclerotic lesion development in the aorta of $LDLR^{-/-}$ animals than the lard-rich diet. This anti-atherogenic effect of fish oil was not due to a reduction of systemic inflammation, since the plasma concentrations of several classical inflammatory molecules were not reduced. In contrast, the reduction of atherosclerotic lesions in fish oil-fed animals correlated with a significant reduction of a couple of circulating endothelial cell adhesion molecules that are substrates for ADAM10 and ADAM17. This was not accompanied by changes in the protein expression of the proteases, suggesting that this can be rather ascribed to a reduced proteolytic activity. Taken together, evidence is provided here, that fish oil exerted an anti-atherogenic effect in $LDLR^{-/-}$ mice which was accompanied by a reduced release of ADAM17 and ADAM10 substrates from endothelial cells. It is suggested that fish oil-decreased ADAM activity contributes to improved endothelial barrier function and thus counteracts intimal lipoprotein insudation and macrophage accumulation.

A second part of this thesis dealt with another possible dietary regulation of ADAMs by isothiocyanates. These secondary plant metabolites are present in cruciferious vegetables such as mustard and broccoli and are of particular interest thanks to their antioxidative, anti-inflammatory and anti-cancerous properties. Results obtained here indicate, that isothiocyanates are able to

stimulate the phosphorylation of the MAP-kinases ERK1/2 in an epidermal keratinocyte cell line. The use of different inhibitors suggested, that this is due to a metalloprotease-mediated activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). However, other experiments failed to reproduce these data and analyse the mechanisms in detail. In this respect, it cannot be concluded with certainty if isothiocyanates regulate the activity of ADAMs.

Apart from nutrition, it is possible that ADAMs can be influenced by a number of other environmental factors. Hence, a third part of this work analysed whether a hypoxic environment has an impact on ADAM10 or ADAM17 activity. Reduced oxygen availability is present in many cancers and at sites of inflammation and ADAM17 is associated with several types of cancer. The micro-environment of neoplastic cells is of uppermost importance for tumorigenesis, since it can greatly influence processes such as proliferation, invasiveness and metastasis. In this work, a long-term (48 hrs) stimulation of the epithelial carcinoma cell line HEp-2 with interferon γ led to an increased mRNA expression of ADAM17, which correlated with an increase in the processing of tumor necrosis factor α receptor 1. Surprisingly, incubation of the cells in a hypoxic environment completely abrogated this stimulation. While the molecular mechanisms underlying this effect could not be addressed in this work, it nevertheless points out, that the oxygen availability has to be carefully taken into account in experiments that analyse the regulation of ADAM17 in cancer tissue.

Taken together, the results of this thesis provide new insights into the regulation of ADAM activity by several environmental factors. A detailed understanding of the regulatory mechanisms could possibly contribute to the development of new therapeutic strategies for ADAM-associated diseases such as cardiovascular diseases, inflammation or certain types of cancer. Apart from pharmaceutical intervention, one such strategy could be a change in lifestyle like nutrition.

7 LITERATUR

- ABEL, S., HUNDHAUSEN, C., MENTLEIN, R., SCHULTE, A., BERKHOUT, T.A., BROADWAY, N., HARTMANN, D., SEDLACEK, R., DIETRICH, S., MUETZE, B., ET AL., 2004. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *Journal of immunology*, 172(10), pp.6362–6372.
- ADERKA, D., ENGELMANN, H., MAOR, Y., BRAKEBUSCH, C. & WALLACH, D., 1992. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *The Journal of experimental medicine*, 175(2), pp.323–329.
- ADRAIN, C., ZETTL, M., CHRISTOVA, Y., TAYLOR, N. & FREEMAN, M., 2012. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science*, 335(6065), pp.225–228.
- AIKAWA, E., NAHRENDORF, M., FIGUEIREDO, J.-L., SWIRSKI, F.K., SHTATLAND, T., KOHLER, R.H., JAFFER, F.A., AIKAWA, M. & WEISSLEDER, R., 2007. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*, 116(24), pp.2841–2850.
- AKIYAMA, T., ISHIDA, J., NAKAGAWA, S., OGAWARA, H., WATANABE, S., ITOH, N., SHIBUYA, M. & FUKAMI, Y., 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, 262(12), pp.5592–5595.
- AMOUR, A., SLOCOMBE, P.M., WEBSTER, A., BUTLER, M., KNIGHT, C.G., SMITH, B.J., STEPHENS, P.E., SHELLEY, C., HUTTON, M., KNÄUPER, V., ET AL., 1998. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS letters*, 435(1), pp.39–44.
- AN, W.S., KIM, H.J., CHO, K.-H. & VAZIRI, N.D., 2009. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297(4), pp.F895–903.
- ASSET, G., BAUGE, E., FRUCHART, J.C. & DALLONGEVILLE, J., 2001. Lack of Triglyceride-Lowering Properties of Fish Oil in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(3), pp.401–406.
- AUERBACH, I.D. & VINTERS, H. V., 2006. Effects of anoxia and hypoxia on amyloid precursor protein processing in cerebral microvascular smooth muscle cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65(6), pp.610–620.
- BALAKUMAR, P. & TANEJA, G., 2012. Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free radical biology & medicine*, 53(2), pp.271–279.
- BAO, Y., WANG, W., ZHOU, Z. & SUN, C., 2014. Benefits and risks of the hormetic effects of dietary isothiocyanates on cancer prevention. *PloS one*, 9(12), p.e114764.
- BARCELO, S., GARDINER, J.M., GESCHER, A. & CHIPMAN, J.K., 1996. CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, 17(2), pp.277–282.

- BARTER, P.J., BREWER, H.B.J., CHAPMAN, M.J., HENNEKENS, C.H., RADER, D.J. & TALL, A.R., 2003. Cholesteryl Ester Transfer Protein: A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), pp.160–167.
- BLACK, R.A., RAUCH, C.T., KOZLOSKY, C.J., PESCHON, J.J., SLACK, J.L., WOLFSON, M.F., CASTNER, B.J., STOCKING, K.L., REDDY, P., SRINIVASAN, S., ET AL., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618), pp.729–733.
- BLAKE, G.J. & RIDKER, P.M., 2001. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circulation research*, 89(9), pp.763–771.
- BLOBEL, C.P., 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(1), pp.32–43.
- BLOBEL, C.P. & WHITE, J.M., 1992. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Current opinion in cell biology*, 4(5), pp.760–765.
- BODE, W., GOMIS-RÜTH, F.-X. & STÖCKLER, W., 1993. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Letters*, 331(1-2), pp.134–140.
- BONES, A.M. & ROSSITER, J.T., 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97(1), pp.194–208.
- BORÉN, J., OLIN, K., LEE, I., CHAIT, A., WIGHT, T.N. & INNERARITY, T.L., 1998. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *The Journal of clinical investigation*, 101(12), pp.2658–2664.
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R.T., BREITKREUTZ, D., HORNING, J., MARKHAM, A. & FUSENIG, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3), pp.761–771.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L., 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), pp.34–47.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L., 1990. Scavenging for receptors. *Nature*, 343(6258), pp.508–509.
- BUTTE, W., 1983. Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification. *Journal of Chromatography A*, 261, pp.142–145.
- BZOWSKA, M., STALIŃSKA, K., MEZYK-KOPEĆ, R., WAWRO, K., DUDA, K., DAS, S. & BERETA, J., 2009. Exogenous nitric oxide inhibits shedding of ADAM17 substrates. *Acta biochimica Polonica*, 56(2), pp.325–335.

- CALDER, P.C., 2002. Dietary modification of inflammation with lipids. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61(3), pp.345–358.
- CANAULT, M., LEROYER, A.S., PEIRETTI, F., LESÈCHE, G., TEDGUI, A., BONARDO, B., ALESSI, M.-C., BOULANGER, C.M. & NALBONE, G., 2007. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *The American journal of pathology*, 171(5), pp.1713–1723.
- CANAULT, M., PEIRETTI, F., KOPP, F., BONARDO, B., BONZI, M.-F., COUDEYRE, J.-C., ALESSI, M.-C., JUHAN-VAGUE, I. & NALBONE, G., 2006. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis*, 187(1), pp.82–91.
- CANAULT, M., PEIRETTI, F., POGGI, M., MUELLER, C., KOPP, F., BONARDO, B., BASTELICA, D., NICOLAY, A., ALESSI, M.-C. & NALBONE, G., 2008. Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF-alpha. *The Journal of pathology*, 214(5), pp.574–583.
- CARREAU, A., EL HAFNY-RAHBI, B., MATEJUK, A., GRILLON, C. & KIEDA, C., 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(6), pp.1239–1253.
- CARTER, C.P., HOWLES, P.N. & HUI, D.Y., 1997. Genetic Variation in Cholesterol Absorption Efficiency among Inbred Strains of Mice. *Journal of Nutrition*, 127(7), pp.1344–1348.
- CHALARIS, A., ADAM, N., SINA, C., ROSENSTIEL, P., LEHMANN-KOCH, J., SCHIRMACHER, P., HARTMANN, D., CICHY, J., GAVRILOVA, O., SCHREIBER, S., ET AL., 2010. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *The Journal of experimental medicine*, 207(8), pp.1617–1624.
- CHALARIS, A., GARBERS, C., RABE, B., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J., 2011. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *European journal of cell biology*, 90(6-7), pp.484–494.
- CHANG, C.L., TORREJON, C., JUNG, U.J., GRAF, K. & DECKELBAUM, R.J., 2014. Incremental replacement of saturated fats by n-3 fatty acids in high-fat, high-cholesterol diets reduces elevated plasma lipid levels and arterial lipoprotein lipase, macrophages and atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice. *Atherosclerosis*, 234(2), pp.401–409.
- CHANG, Y.-J., HOLTZMAN, M.J. & CHEN, C.-C., 2002. Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *The Journal of biological chemistry*, 277(9), pp.7118–7126.
- CHAPKIN, R.S., AKOH, C.C. & MILLER, C.C., 1991. Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. *Journal of lipid research*, 32(7), pp.1205–1213.
- CHARBONNEAU, M., HARPER, K., GRONDIN, F., PELMUS, M., McDONALD, P.P. & DUBOIS, C.M., 2007. Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor alpha-induced increases in tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells. *The Journal of biological chemistry*, 282(46), pp.33714–33724.

- CHOUDHURY, G.G., 2004. A linear signal transduction pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase Cepsilon, and MAPK in mesangial cells regulates interferon-gamma-induced STAT1alpha transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry*, 279(26), pp.27399–27409.
- CLARKE, R., FROST, C., COLLINS, R., APPLEBY, P. & PETO, R., 1997. Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *BMJ*, 314(7074), pp.112–117.
- CORTEZ-COOPER, M., MEADERS, E., STALLINGS, J., HADDOW, S., KRAJ, B., SLOAN, G., MCCULLY, K.K. & CANNON, J.G., 2013. Soluble TNF and IL-6 receptors: indicators of vascular health in women without cardiovascular disease. *Vascular medicine*, 18(5), pp.282–289.
- CRAWFORD, H.C., DEMPSEY, P.J., BROWN, G., ADAM, L. & MOSS, M.L., 2009. ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Current pharmaceutical design*, 15(20), pp.2288–2299.
- CYBULSKY, M.I. & GIMBRONE, M.A., 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251(4995), pp.788–791.
- DAI, Y., PALADE, P., WANG, X., MERCANTI, F., DING, Z., DAI, D. & MEHTA, J.L., 2014. High fat diet causes renal fibrosis in LDLr-null mice through MAPK-NF-κB pathway mediated by Ox-LDL. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 63(2), pp.158–166.
- DEB, D.K., SASSANO, A., LEKMINI, F., MAJCHRZAK, B., VERMA, A., KAMBHAMPATI, S., UDDIN, S., RAHMAN, A., FISH, E.N. & PLATANIAS, L.C., 2003. Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *Journal of immunology*, 171(1), pp.267–273.
- DENTIN, R., BENHAMED, F., PÉGORIER, J.-P., FOUFFELLE, F., VIOLLET, B., VAULONT, S., GIRARD, J. & POSTIC, C., 2005. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), pp.2843–2854.
- DETRANO, R., GUERCI, A.D., CARR, J.J., BILD, D.E., BURKE, G., FOLSOM, A.R., LIU, K., SHEA, S., SZKLO, M., BLUEMKE, D.A., ET AL., 2008. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *The New England journal of medicine*, 358(13), pp.1336–1345.
- DEUEL, K.A., CALLEGARI, A., GIACHELLI, C.M., ROSENFELD, M.E. & SCATENA, M., 2012. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF-α. *Journal of vascular research*, 49(6), pp.510–521.
- DHOMEN, N.S., MARIADASON, J., TEBBUTT, N. & SCOTT, A.M., 2012. Therapeutic targeting of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Critical reviews in oncogenesis*, 17(1), pp.31–50.
- DÍAZ-RODRÍGUEZ, E., MONTERO, J.C., ESPARÍS-OGANDO, A., YUSTE, L. & PANDIELLA, A., 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Molecular biology of the cell*, 13(6), pp.2031–2044.
- DING, X., YANG, L.-Y., HUANG, G.-W., WANG, W. & LU, W.-Q., 2004. ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 10(18), pp.2735–2739.

- DINKOVA-KOSTOVA, A.T., HOLTZCLAW, W.D., COLE, R.N., ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., YAMAMOTO, M. & TALALAY, P., 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), pp.11908–11913.
- DINKOVA-KOSTOVA, A.T. & KOSTOV, R. V., 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 18(6), pp.337–347.
- DONNERS, M.M.P.C., WOLFS, I.M.J., OLIESLAGERS, S., MOHAMMADI-MOTAHARI, Z., TCHAIKOVSKI, V., HEENEMAN, S., VAN BUUL, J.D., CAOLO, V., MOLIN, D.G.M., POST, M.J., ET AL., 2010. A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(11), pp.2188–2195.
- DREYMUELLER, D., PRUESSMEYER, J., GROTH, E. & LUDWIG, A., 2012. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *European journal of cell biology*, 91(6-7), pp.472–485.
- EDWARDS, D.R., HANDSLEY, M.M. & PENNINGTON, C.J., 2008. The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine*, 29(5), pp.258–289.
- EMKEN, E.A., ADLOF, R.O., DUVAL, S.M. & NELSON, G.J., 1999. Effect of dietary docosahexaenoic acid on desaturation and uptake in vivo of isotope-labeled oleic, linoleic, and linolenic acids by male subjects. *Lipids*, 34(8), pp.785–791.
- ERNST, I.M.A., WAGNER, A.E., SCHUEMANN, C., STORM, N., HÖPPNER, W., DÖRING, F., STOCKER, A. & RIMBACH, G., 2011. Allyl-, butyl- and phenylethyl-isothiocyanate activate Nrf2 in cultured fibroblasts. *Pharmacological research*, 63(3), pp.233–240.
- FABER, T.W., PULLEN, N.A., FERNANDO, J.F.A., KOLAWOLE, E.M., MCLEOD, J.J.A., TARUSELLI, M., WILLIAMS, K.L., RIVERA, K.O., BARNSTEIN, B.O., CONRAD, D.H., ET AL., 2014. ADAM10 is required for SCF-induced mast cell migration. *Cellular immunology*, 290(1), pp.80–88.
- FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T. & TALALAY, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), pp.5–51.
- FAN, H., TURCK, C.W. & DERYNCK, R., 2003. Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor- α converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *The Journal of biological chemistry*, 278(20), pp.18617–18627.
- FAN, Y.-Y., LY, L.H., BARHOUMI, R., MCMURRAY, D.N. & CHAPKIN, R.S., 2004. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C θ lipid raft recruitment and IL-2 production. *Journal of immunology*, 173(10), pp.6151–6160.
- FELDSER, D., AGANI, F., IYER, N. V, PAK, B., FERREIRA, G. & SEMENZA, G.L., 1999. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer research*, 59(16), pp.3915–3918.
- FERNANDEZ, J.W., REZAI-ZADEH, K., OBREGON, D. & TAN, J., 2010. EGCG functions through estrogen receptor-mediated activation of ADAM10 in the promotion of non-amyloidogenic processing of APP. *FEBS letters*, 584(19), pp.4259–4267.

- FIORENTINO, L., VIVANTI, A., CAVALERA, M., MARZANO, V., RONCI, M., FABRIZI, M., MENINI, S., PUGLIESE, G., MENGHINI, R., KHOKHA, R., ET AL., 2010. Increased tumor necrosis factor alpha-converting enzyme activity induces insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Hepatology*, 51(1), pp.103–110.
- FISCHER, O.M., HART, S., GSCHWIND, A., PRENZEL, N. & ULLRICH, A., 2004. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology*, 24(12), pp.5172–5183.
- FJELDE, A., 1955. Human tumor cells in tissue culture. *Cancer*, 8(4), pp.845–851.
- FOLKARD, D.L., MELCHINI, A., TRAKA, M.H., AL-BAKHEIT, A., SAHA, S., MULHOLLAND, F., WATSON, A. & MITHEN, R.F., 2014. Suppression of LPS-induced transcription and cytokine secretion by the dietary isothiocyanate sulforaphane. *Molecular nutrition & food research*, 58(12), pp.2286–2296.
- FUJITA, T., MAESAWA, C., OIKAWA, K., NITTA, H., WAKABAYASHI, G. & MASUDA, T., 2006. Interferon-gamma down-regulates expression of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/a disintegrin and metalloproteinase 17 in activated hepatic stellate cells of rats. *International journal of molecular medicine*, 17(4), pp.605–616.
- GAMET-PAYRASTRE, L., LI, P., LUMEAU, S., CASSAR, G., DUPONT, M.A., CHEVOLLEAU, S., GASC, N., TULLIEZ, J. & TERCÉ, F., 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer research*, 60(5), pp.1426–1433.
- GARBERS, C., JÄNNER, N., CHALARIS, A., MOSS, M.L., FLOSS, D.M., MEYER, D., KOCH-NOLTE, F., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J., 2011. 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. *The Journal of biological chemistry*, 286(17), pp.14804–14811.
- GARTON, K.J., GOUGH, P.J., BLOBEL, C.P., MURPHY, G., GREAVES, D.R., DEMPSEY, P.J. & RAINES, E.W., 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *The Journal of biological chemistry*, 276(41), pp.37993–38001.
- GARTON, K.J., GOUGH, P.J., PHILALAY, J., WILLE, P.T., BLOBEL, C.P., WHITEHEAD, R.H., DEMPSEY, P.J. & RAINES, E.W., 2003. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *The Journal of biological chemistry*, 278(39), pp.37459–37464.
- GLADINE, C., NEWMAN, J.W., DURAND, T., PEDERSEN, T.L., GALANO, J.-M., DEMOUGEOT, C., BERDEAUX, O., PUJOS-GUILLOT, E., MAZUR, A. & COMTE, B., 2014. Lipid profiling following intake of the omega 3 fatty acid DHA identifies the peroxidized metabolites F4-neuroprostanes as the best predictors of atherosclerosis prevention. *PLoS one*, 9(2), p.e89393.
- GOLDKLANG, M., GOLOVATCH, P., ZELONINA, T., TRISCHLER, J., RABINOWITZ, D., LEMAÎTRE, V. & D'ARMIENTO, J., 2012. Activation of the TLR4 signaling pathway and abnormal cholesterol efflux lead to emphysema in ApoE-deficient mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 302(11), pp.L1200–1208.
- GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S., 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *The Journal of biological chemistry*, 249(16), pp.5153–5162.

- GOUGH, D.J., SABAPATHY, K., KO, E.Y.-N., ARTHUR, H.A., SCHREIBER, R.D., TRAPANI, J.A., CLARKE, C.J.P. & JOHNSTONE, R.W., 2007. A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. *The Journal of biological chemistry*, 282(2), pp.938–46.
- GOUGH, P.J., GARTON, K.J., WILLE, P.T., RYCHLEWSKI, M., DEMPSEY, P.J. & RAINES, E.W., 2004. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *Journal of immunology*, 172(6), pp.3678–3685.
- GSCHWIND, A., HART, S., FISCHER, O.M. & ULLRICH, A., 2003. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *The EMBO journal*, 22(10), pp.2411–2421.
- HAFEZI-MOGHADAM, A., THOMAS, K.L., PROROCK, A.J., HUO, Y. & LEY, K., 2001. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *The Journal of experimental medicine*, 193(7), pp.863–872.
- HAN, W., ZHAO, H., JIAO, B. & LIU, F., 2014. EPA and DHA increased PPAR γ expression and decreased integrin-linked kinase and integrin β 1 expression in rat glomerular mesangial cells treated with lipopolysaccharide. *Bioscience trends*, 8(2), pp.120–125.
- HANSEN, S.N. & HARRIS, W.S., 2007. New evidence for the cardiovascular benefits of long chain omega-3 fatty acids. *Current atherosclerosis reports*, 9(6), pp.434–440.
- HARA, A. & RADIN, N.S., 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical biochemistry*, 90(1), pp.420–426.
- HARRIS, A.L., 2002. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer*, 2(1), pp.38–47.
- HARRIS, W.S., KRIS-ETHERTON, P.M. & HARRIS, K.A., 2008. Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. *Current atherosclerosis reports*, 10(6), pp.503–509.
- HARTMANN, D., DE STROOPER, B., SERNEELS, L., CRAESSAERTS, K., HERREMAN, A., ANNAERT, W., UMANS, L., LÜBKE, T., LENA ILLERT, A., VON FIGURA, K., ET AL., 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics*, 11(21), pp.2615–2624.
- HEISS, E., HERHAUS, C., KLIMO, K., BARTSCH, H. & GERHÄUSER, C., 2001. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 276(34), pp.32008–32015.
- HELLER, R.A., SONG, K., ONASCH, M.A., FISCHER, W.H., CHANG, D. & RINGOLD, G.M., 1990. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), pp.6151–6155.
- HIROTA, K. & SEMENZA, G.L., 2006. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical reviews in oncology/hematology*, 59(1), pp.15–26.

- HOBBS, H.H., BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L., 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human mutation*, 1(6), pp.445–466.
- HORIUCHI, K., KIMURA, T., MIYAMOTO, T., TAKAISHI, H., OKADA, Y., TOYAMA, Y. & BLOBEL, C.P., 2007. Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *Journal of immunology*, 179(5), pp.2686–2689.
- HOWARD, B., HANNAH, J., HEISER, C., JABLONSKI, K., PAIDI, M., ALARIF, L., ROBBINS, D. & HOWARD, W., 1995. Polyunsaturated fatty acids result in greater cholesterol lowering and less triacylglycerol elevation than do monounsaturated fatty acids in a dose-response comparison in a multiracial study group. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(2), pp.392–402.
- HU, J., ROY, S.K., SHAPIRO, P.S., RODIG, S.R., REDDY, S.P., PLATANIAS, L.C., SCHREIBER, R.D. & KALVAKOLANU, D. V., 2001. ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry*, 276(1), pp.287–297.
- HUANG, H.-C., NGUYEN, T. & PICKETT, C.B., 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 277(45), pp.42769–42774.
- HUNDHAUSEN, C., MISZTELA, D., BERKHOUT, T.A., BROADWAY, N., SAFTIG, P., REISS, K., HARTMANN, D., FAHRENHOLZ, F., POSTINA, R., MATTHEWS, V., ET AL., 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102(4), pp.1186–1195.
- HUNDHAUSEN, C., SCHULTE, A., SCHULZ, B., ANDRZEJEWSKI, M.G., SCHWARZ, N., VON HUNDELSHAUSEN, P., WINTER, U., PALIGA, K., REISS, K., SAFTIG, P., ET AL., 2007. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *Journal of immunology*, 178(12), pp.8064–8072.
- HUOVILA, A.-P.J., TURNER, A.J., PELTO-HUIKKO, M., KÄRKKÄINEN, I. & ORTIZ, R.M., 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(7), pp.413–422.
- HURST, L.A., BUNNING, R.A.D., COURAUD, P.-O., ROMERO, I.A., WEKSLER, B.B., SHARRACK, B. & WOODROOFE, M.N., 2009. Expression of ADAM-17, TIMP-3 and fractalkine in the human adult brain endothelial cell line, hCMEC/D3, following pro-inflammatory cytokine treatment. *Journal of neuroimmunology*, 210(1-2), pp.108–112.
- HUXLEY-JONES, J., CLARKE, T.-K., BECK, C., TOUBARIS, G., ROBERTSON, D.L. & BOOT-HANDFORD, R.P., 2007. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC evolutionary biology*, 7(1), p.63.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J., 1957. Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147(927), pp.258–267.
- ISHIBASHI, S., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L., GERARD, R.D., HAMMER, R.E. & HERZ, J., 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation*, 92(2), pp.883–893.

- ISHIBASHI, S., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., HERZ, J. & BURNS, D.K., 1994. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of clinical investigation*, 93(5), pp.1885–1893.
- JACKSON, L.F., QIU, T.H., SUNNARBORG, S.W., CHANG, A., ZHANG, C., PATTERSON, C. & LEE, D.C., 2003. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *The EMBO journal*, 22(11), pp.2704–2716.
- JAKUBÍKOVÁ, J., SEDLÁK, J., BOD'Ů, J. & BAO, Y., 2006. Effect of isothiocyanates on nuclear accumulation of NF-kappaB, Nrf2, and thioredoxin in caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), pp.1656–1662.
- JAKUBÍKOVÁ, J., SEDLÁK, J., MITHEN, R. & BAO, Y., 2005. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochemical pharmacology*, 69(11), pp.1543–1552.
- JANES, P.W., SAHA, N., BARTON, W.A., KOLEV, M. V, WIMMER-KLEIKAMP, S.H., NIEVERGALL, E., BLOBEL, C.P., HIMANEN, J.-P., LACKMANN, M. & NIKOLOV, D.B., 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, 123(2), pp.291–304.
- JELINEK, D., CASTILLO, J.J., ARORA, S.L., RICHARDSON, L.M. & GARVER, W.S., 2013. A high-fat diet supplemented with fish oil improves metabolic features associated with type 2 diabetes. *Nutrition*, 29(9), pp.1159–1165.
- JEONG, W.-S., KIM, I.-W., HU, R. & KONG, A.-N.T., 2004. Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. *Pharmaceutical research*, 21(4), pp.661–670.
- JOHNSON-TIDEY, R.R., MCGREGOR, J.L., TAYLOR, P.R. & POSTON, R.N., 1994. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *The American journal of pathology*, 144(5), pp.952–961.
- JONG, M.C., HOFKER, M.H. & HAVEKES, L.M., 1999. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(3), pp.472–484.
- JUMP, D.B., 2008. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Current opinion in lipidology*, 19(3), pp.242–247.
- JUUL, N., JENSEN, H., HVID, M., CHRISTIANSEN, G. & BIRKELUND, S., 2007. Characterization of in vitro chlamydial cultures in low-oxygen atmospheres. *Journal of bacteriology*, 189(18), pp.6723–6726.
- KENNY, P.A., 2007. TACE: a new target in epidermal growth factor receptor dependent tumors. *Differentiation*, 75(9), pp.800–808.
- KENNY, P.A. & BISSELL, M.J., 2007. Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), pp.337–345.

- KEYS, A., MENOTTI, A., KARVONEN, M.J., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., DJORDJEVIC, B.S., DONTAS, A.S., FIDANZA, F., KEYS, M.H., ET AL., 1986. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American journal of epidemiology*, 124(6), pp.903–915.
- KIM, H.-N., KIM, D.-H., KIM, E.-H., LEE, M.-H., KUNDU, J.K., NA, H.-K., CHA, Y.-N. & SURH, Y.-J., 2014. Sulforaphane inhibits phorbol ester-stimulated IKK-NF- κ B signaling and COX-2 expression in human mammary epithelial cells by targeting NF- κ B activating kinase and ERK. *Cancer letters*, 351(1), pp.41–49.
- KNOWLES, J.W. & MAEDA, N., 2000. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(11), pp.2336–2345.
- KOENEN, R.R., PRUESSMEYER, J., SOEHNLEIN, O., FRAEMOHS, L., ZERNECKE, A., SCHWARZ, N., REISS, K., SARABI, A., LINDBOM, L., HACKENG, T.M., ET AL., 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*, 113(19), pp.4799–4809.
- KOJRO, E., FÜGER, P., PRINZEN, C., KANAREK, A.M., RAT, D., ENDRES, K., FAHRENHOLZ, F. & POSTINA, R., 2010. Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *Journal of Alzheimer's disease*, 20(4), pp.1215–1231.
- KOTTKE, T.E., 1988. Reducing community risk of heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 12(4), pp.1113–1116.
- KOUMENIS, C., NACZKI, C., KORITZINSKY, M., RASTANI, S., DIEHL, A., SONENBERG, N., KOROMILAS, A. & WOUTERS, B.G., 2002. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Molecular and cellular biology*, 22(21), pp.7405–7416.
- KREBS, L.T., XUE, Y., NORTON, C.R., SHUTTER, J.R., MAGUIRE, M., SUNDBERG, J.P., GALLAHAN, D., CLOSSON, V., KITAJEWSKI, J., CALLAHAN, R., ET AL., 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & development*, 14(11), pp.1343–1352.
- KU, S.-K., HAN, M.-S. & BAE, J.-S., 2014. Sulforaphane inhibits endothelial protein C receptor shedding in vitro and in vivo. *Vascular pharmacology*, 63(1), pp.13–18.
- KVEIBORG, M., INSTRELL, R., ROWLANDS, C., HOWELL, M. & PARKER, P.J., 2011. PKC α and PKC δ regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding of heparin binding-EGF through separate pathways. *PLoS one*, 6(2), p.e17168.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- LEE, D.C., SUNNARBORG, S.W., HINKLE, C.L., MYERS, T.J., STEVENSON, M.Y., RUSSELL, W.E., CASTNER, B.J., GERHART, M.J., PAXTON, R.J., BLACK, R.A., ET AL., 2003. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 995, pp.22–38.

- LEIGH, S.E.A., FOSTER, A.H., WHITTALL, R.A., HUBBART, C.S. & HUMPHRIES, S.E., 2008. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Annals of human genetics*, 72(Pt 4), pp.485–498.
- LEMAIRE-EWING, S., LAGROST, L. & NÉEL, D., 2012. Lipid rafts: a signalling platform linking lipoprotein metabolism to atherogenesis. *Atherosclerosis*, 221(2), pp.303–310.
- LEWIS, G.F. & RADER, D.J., 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation research*, 96(12), pp.1221–32.
- LI, C.-C., YANG, H.-T., HOU, Y.-C., CHIU, Y.-S. & CHIU, W.-C., 2014. Dietary fish oil reduces systemic inflammation and ameliorates sepsis-induced liver injury by up-regulating the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated pathway in septic mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(1), pp.19–25.
- LI, H., CYBULSKY, M.I., GIMBRONE, M.A. & LIBBY, P., 1993. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *The American journal of pathology*, 143(6), pp.1551–1559.
- LIBBY, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), pp.868–874.
- LIM, Y.-P., CHEN, W.-C., CHENG, C.-H., MA, W.-C., LIN, Y.-H., CHEN, C.-Y., HUNG, D.-Z., CHEN, J.-J., YOKOI, T., NAKAJIMA, M., ET AL., 2014. Inhibition of cytochrome P450 2C9 expression and activity in vitro by allyl isothiocyanate. *Planta medica*, 80(13), pp.1097–1106.
- LIN, W., WU, R.T., WU, T., KHOR, T.-O., WANG, H. & KONG, A.-N., 2008. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochemical pharmacology*, 76(8), pp.967–973.
- LINGWOOD, D. & SIMONS, K., 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), pp.46–50.
- LIU, W.-H. & CHANG, L.-S., 2012. Suppression of Akt/Foxp3-mediated miR-183 expression blocks Sp1-mediated ADAM17 expression and TNF α -mediated NF κ B activation in piceatannol-treated human leukemia U937 cells. *Biochemical pharmacology*, 84(5), pp.670–680.
- LORENZEN, I., LOKAU, J., DÜSTERHÖFT, S., TRAD, A., GARBERS, C., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S. & GRÖTZINGER, J., 2012. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS letters*, 586(8), pp.1093–1100.
- LORENZEN, I., TRAD, A. & GRÖTZINGER, J., 2011. Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 415(2), pp.330–336.
- LUDWIG, A. & WEBER, C., 2007. Transmembrane chemokines: Versatile “special agents” in vascular inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, 97(5), pp.694–703.
- MAHÉO, K., MOREL, F., LANGOUËT, S., KRAMER, H., LE FERREC, E., KETTERER, B. & GUILLOUZO, A., 1997. Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer research*, 57(17), pp.3649–3652.

- MARETZKY, T., MCLLWAIN, D.R., ISSUREE, P.D.A., LI, X., MALAPEIRA, J., AMIN, S., LANG, P.A., MAK, T.W. & BLOBEL, C.P., 2013. iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), pp.11433–11438.
- MARETZKY, T., REISS, K., LUDWIG, A., BUCHHOLZ, J., SCHOLZ, F., PROKSCH, E., DE STROOPER, B., HARTMANN, D. & SAFTIG, P., 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp.9182–9187.
- MARETZKY, T., SCHULTE, M., LUDWIG, A., ROSE-JOHN, S., BLOBEL, C., HARTMANN, D., ALTEVOGT, P., SAFTIG, P. & REISS, K., 2005. L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Molecular and cellular biology*, 25(20), pp.9040–9053.
- MARETZKY, T., ZHOU, W., HUANG, X.-Y. & BLOBEL, C.P., 2011. A transforming Src mutant increases the bioavailability of EGFR ligands via stimulation of the cell-surface metalloproteinase ADAM17. *Oncogene*, 30(5), pp.611–618.
- MARSHALL, A.J., RATTRAY, M. & VAUGHAN, P.F.T., 2006. Chronic hypoxia in the human neuroblastoma SH-SY5Y causes reduced expression of the putative alpha-secretases, ADAM10 and TACE, without altering their mRNA levels. *Brain research*, 1099(1), pp.18–24.
- MARTÌN-PADURA, I., LOSTAGLIO, S., SCHNEEMANN, M., WILLIAMS, L., ROMANO, M., FRUSCELLA, P., PANZERI, C., STOPPACCIARO, A., RUCO, L., VILLA, A., ET AL., 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of cell biology*, 142(1), pp.117–127.
- MASQUIO, D.C.L., DE PIANO, A., CAMPOS, R.M.S., SANCHES, P.L., CARNIER, J., CORGOSINHO, F.C., NETTO, B.D.M., CARVALHO-FERREIRA, J.P., OYAMA, L.M., OLLER DO NASCIMENTO, C.M., ET AL., 2014. Reduction in saturated fat intake improves cardiovascular risks in obese adolescents during interdisciplinary therapy. *International journal of clinical practice*.
- MASSARO, M., HABIB, A., LUBRANO, L., DEL TURCO, S., LAZZERINI, G., BOURCIER, T., WEKSLER, B.B. & DE CATERINA, R., 2006. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), pp.15184–15189.
- MATTHEWS, V., SCHUSTER, B., SCHÜTZE, S., BUSSMEYER, I., LUDWIG, A., HUNDHAUSEN, C., SADOWSKI, T., SAFTIG, P., HARTMANN, D., KALLEN, K.-J., ET AL., 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Journal of biological chemistry*, 278(40), pp.38829–38839.
- MCLLWAIN, D.R., LANG, P.A., MARETZKY, T., HAMADA, K., OHISHI, K., MANEY, S.K., BERGER, T., MURTHY, A., DUNCAN, G., XU, H.C., ET AL., 2012. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science*, 335(6065), pp.229–232.
- MCINNES, I.B. & SCHETT, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 365(23), pp.2205–2219.

- DE MEIJER, V.E., LE, H.D., MEISEL, J.A., SHARMA, A.K., POPOV, Y. & PUDER, M., 2011. Tumor necrosis factor α -converting enzyme inhibition reverses hepatic steatosis and improves insulin sensitivity markers and surgical outcome in mice. *PLoS one*, 6(9), p.e25587.
- MELENHORST, W.B., VISSER, L., TIMMER, A., VAN DEN HEUVEL, M.C., STEGEMAN, C.A. & VAN GOOR, H., 2009. ADAM17 upregulation in human renal disease: a role in modulating TGF- α availability? *American journal of physiology. Renal physiology*, 297(3), pp.F781–790.
- MENGHINI, R., MENINI, S., AMORUSO, R., FIORENTINO, L., CASAGRANDE, V., MARZANO, V., TORNEI, F., BERTUCCI, P., IACOBINI, C., SERINO, M., ET AL., 2009. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. *Gastroenterology*, 136(2), pp.663–672.e4.
- MENSINK, R.P. & KATAN, M.B., 1992. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta- analysis of 27 trials. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 12(8), pp.911–919.
- MOSS, M.L., JIN, S.L., MILLA, M.E., BICKETT, D.M., BURKHART, W., CARTER, H.L., CHEN, W.J., CLAY, W.C., DIDSBURY, J.R., HASSLER, D., ET AL., 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 385(6618), pp.733–736.
- MOSS, M.L. & LAMBERT, M.H., 2002. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays in biochemistry*, 38, pp.141–153.
- MOZAFFARIAN, D., 2005. Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. *Alternative therapies in health and medicine*, 11(3), pp.24–30; quiz 31, 79.
- MULDER, G.M., MELENHORST, W.B.W.H., CELIE, J.W.A.M., KLOOSTERHUIS, N.J., HILLEBRANDS, J.-L., PLOEG, R.J., SEELEN, M.A., VISSER, L., VAN DIJK, M.C.R.F. & VAN GOOR, H., 2012. ADAM17 up-regulation in renal transplant dysfunction and non-transplant-related renal fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 27(5), pp.2114–2122.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GÜNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P.C. & ROSE-JOHN, S., 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European journal of immunology*, 23(2), pp.473–480.
- MURATA, M., YAMASHITA, N., INOUE, S. & KAWANISHI, S., 2000. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free radical biology & medicine*, 28(5), pp.797–805.
- MURPHY, G., 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 8(12), pp.929–941.
- MYERS, T.J., BRENNAMAN, L.H., STEVENSON, M., HIGASHIYAMA, S., RUSSELL, W.E., LEE, D.C. & SUNNARBORG, S.W., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor- α shedding. *Molecular biology of the cell*, 20(24), pp.5236–5249.
- NAGANO, O., MURAKAMI, D., HARTMANN, D., DE STROOPER, B., SAFTIG, P., IWATSUBO, T., NAKAJIMA, M., SHINOHARA, M. & SAYA, H., 2004. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by

- different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *The Journal of cell biology*, 165(6), pp.893–902.
- NAIK, M.U. & NAIK, U.P., 2006. Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta 3 specific. *Journal of cell science*, 119(Pt 3), pp.490–499.
- NAKAJIMA, M., YOSHIDA, R., SHIMADA, N., YAMAZAKI, H. & YOKOI, T., 2001. Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 29(8), pp.1110–1113.
- NAKAMURA, T., ABE, H., HIRATA, A. & SHIMODA, C., 2004. ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, 3(1), pp.27–39.
- NAKASHIMA, Y., PLUMP, A.S., RAINES, E.W., BRESLOW, J.L. & ROSS, R., 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(1), pp.133–140.
- NELSON-REES, W. A, DANIELS, D.W. & FLANDERMEYER, R.R., 1981. Cross-contamination of cells in culture. *Science*, 212(4493), pp.446–452.
- NGUYEN, D., 2013. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer InCytes 2(1):e*, 2(1):e.
- NIZET, V. & JOHNSON, R.S., 2009. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 9(9), pp.609–617.
- OBAMA, T., TAKAYANAGI, T., KOBAYASHI, T., BOURNE, A.M., ELLIOTT, K.J., CHARBONNEAU, M., DUBOIS, C.M. & EGUCHI, S., 2014. Vascular Induction of a Disintegrin and Metalloprotease 17 by Angiotensin II Through Hypoxia Inducible Factor 1 α . *American journal of hypertension*, pp.1–5.
- OBREGON, D.F., REZAI-ZADEH, K., BAI, Y., SUN, N., HOU, H., EHRHART, J., ZENG, J., MORI, T., ARENDASH, G.W., SHYBLE, D., ET AL., 2006. ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry*, 281(24), pp.16419–16427.
- ODERMATT, A., 2011. The Western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology*, 301(5), pp.F919–931.
- OKSALA, N., LEVULA, M., AIRLA, N., PELTO-HUIKKO, M., ORTIZ, R.M., JÄRVINEN, O., SALENIUS, J.-P., OZSAIT, B., KOMURCU-BAYRAK, E., ERGINEL-UNALTUNA, N., ET AL., 2009. ADAM-9, ADAM-15, and ADAM-17 are upregulated in macrophages in advanced human atherosclerotic plaques in aorta and carotid and femoral arteries--Tampere vascular study. *Annals of medicine*, 41(4), pp.279–290.
- ONUKE, Y., MORISHITA, M., CHIBA, Y., TOKIWA, S. & TAKAYAMA, K., 2006. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid induce changes in the physical properties of a lipid bilayer model membrane. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 54(1), pp.68–71.
- PACKARD, R.R.S., LICHTMAN, A.H. & LIBBY, P., 2009. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Seminars in immunopathology*, 31(1), pp.5–22.

- PAN, D. & RUBIN, G.M., 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*, 90(2), pp.271–280.
- PAN, M., CEDERBAUM, A.I., ZHANG, Y.-L., GINSBERG, H.N., WILLIAMS, K.J. & FISHER, E.A., 2004. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *The Journal of clinical investigation*, 113(9), pp.1277–1287.
- PAPADAKIS, K.A. & TARGAN, S.R., 2000. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual review of medicine*, 51, pp.289–298.
- PARK, Y. & HARRIS, W.S., 2003. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *Journal of lipid research*, 44(3), pp.455–463.
- PARNAUD, G., LI, P., CASSAR, G., ROUIMI, P., TULLIEZ, J., COMBARET, L. & GAMET-PAYRASTRE, L., 2004. Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Nutrition and cancer*, 48(2), pp.198–206.
- PEAKE, J.M., GOBE, G.C., FASSETT, R.G. & COOMBES, J.S., 2011. The effects of dietary fish oil on inflammation, fibrosis and oxidative stress associated with obstructive renal injury in rats. *Molecular nutrition & food research*, 55(3), pp.400–410.
- PESCHON, J.J., SLACK, J.L., REDDY, P., STOCKING, K.L., SUNNARBORG, S.W., LEE, D.C., RUSSELL, W.E., CASTNER, B.J., JOHNSON, R.S., FITZNER, J.N., ET AL., 1998. An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science*, 282(5392), pp.1281–1284.
- PIEGHOLDT, S., PALLAUF, K., ESATBEYOGLU, T., SPECK, N., REISS, K., RUDDIGKEIT, L., STOCKER, A., HUEBBE, P. & RIMBACH, G., 2014. Biochanin A and prunetin improve epithelial barrier function in intestinal CaCo-2 cells via downregulation of ERK, NF- κ B, and tyrosine phosphorylation. *Free radical biology & medicine*, 70, pp.255–264.
- PLUMP, A.S., SMITH, J.D., HAYEK, T., AALTO-SETÄLÄ, K., WALSH, A., VERSTUYFT, J.G., RUBIN, E.M. & BRESLOW, J.L., 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), pp.343–353.
- POSTON, R.N., HASKARD, D.O., COUCHER, J.R., GALL, N.P. & JOHNSON-TIDEY, R.R., 1992. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *The American journal of pathology*, 140(3), pp.665–673.
- PRAWAN, A., SAW, C.L.L., KHOR, T.O., KEUM, Y.-S., YU, S., HU, L. & KONG, A.-N., 2009. Anti-NF-kappaB and anti-inflammatory activities of synthetic isothiocyanates: effect of chemical structures and cellular signaling. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), pp.202–211.
- PROX, J., WILLENBROCK, M., WEBER, S., LEHMANN, T., SCHMIDT-ARRAS, D., SCHWANBECK, R., SAFTIG, P. & SCHWAKE, M., 2012. Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cellular and molecular life sciences*, 69(17), pp.2919–2932.
- QING, Y. & STARK, G.R., 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry*, 279(40), pp.41679–41685.

- RAMANA, C. V., KUMAR, A. & ENELOW, R., 2005. Stat1-independent induction of SOCS-3 by interferon-gamma is mediated by sustained activation of Stat3 in mouse embryonic fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 327(3), pp.727–733.
- REDDY, P., SLACK, J.L., DAVIS, R., CERRETTI, D.P., KOZLOSKY, C.J., BLANTON, R.A., SHOWS, D., PESCHON, J.J. & BLACK, R.A., 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), pp.14608–14614.
- REDDY, S.A., SHELAR, S.B., DANG, T.-M., LEE, B.N.-C., YANG, H., ONG, S.-M., NG, H.-L., CHUI, W.-K., WONG, S.-C. & CHEW, E.-H., 2015. Sulforaphane and its methylcarbonyl analogs inhibit the LPS-stimulated inflammatory response in human monocytes through modulating cytokine production, suppressing chemotactic migration and phagocytosis in a NF- κ B- and MAPK-dependent manner. *International immunopharmacology*, 24(2), pp.440–450.
- REISS, K., CORNELSEN, I., HUSMANN, M., GIMPL, G. & BHAKDI, S., 2011. Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), pp.26931–26942.
- REISS, K., MARETZKY, T., LUDWIG, A., TOUSSEYN, T., DE STROOPER, B., HARTMANN, D. & SAFTIG, P., 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *The EMBO journal*, 24(4), pp.742–752.
- REISS, K. & SAFTIG, P., 2009. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology*, 20(2), pp.126–137.
- REZAI-ZADEH, K., SHYTLER, D., SUN, N., MORI, T., HOU, H., JEANNITON, D., EHRHART, J., TOWNSEND, K., ZENG, J., MORGAN, D., ET AL., 2005. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *The Journal of neuroscience*, 25(38), pp.8807–8814.
- RICHARDSON, M., HADCOCK, S.J., DERESKE, M. & CYBULSKY, M.I., 1994. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(5), pp.760–769.
- RIEDL, M.A., SAXON, A. & DIAZ-SANCHEZ, D., 2009. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clinical immunology*, 130(3), pp.244–251.
- ROBLIN, P.M., DUMORNAY, W. & HAMMERSCHLAG, M.R., 1992. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae. *Journal of clinical microbiology*, 30(8), pp.1968–1971.
- ROSKOSKI, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 66(2), pp.105–143.
- ROSSI, D. & ZLOTNIK, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology*, 18, pp.217–242.
- ROTH, A., KÖNIG, P., VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., HELLWIG-BÜRCEL, T., DÄUBENER, W., BOHLMANN, M.K. & RUPP, J., 2010. Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN- γ in human fallopian tube

- cells in vitro and ex vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp.19502–19507.
- ROUSSEAU, S., PAPOUTSOPOULOU, M., SYMONS, A., COOK, D., LUCOCQ, J.M., PRESCOTT, A.R., O’GARRA, A., LEY, S.C. & COHEN, P., 2008. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *Journal of cell science*, 121(Pt 2), pp.149–154.
- RYBNIKOVA, E., GLUSCHENKO, T., GALEEVA, A., TULKOVA, E., NALIVAEVA, N.N., MAKOVA, N.Z., TURNER, A.J. & SAMOILOV, M., 2012. Differential expression of ADAM15 and ADAM17 metalloproteases in the rat brain after severe hypobaric hypoxia and hypoxic preconditioning. *Neuroscience research*, 72(4), pp.364–373.
- RZYMSKI, T., PETRY, A., KRAČUN, D., RIEß, F., PIKE, L., HARRIS, A L. & GÖRLACH, A., 2012. The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene*, 31(31), pp.3621–3634.
- SAFTIG, P. & REISS, K., 2011. The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *European journal of cell biology*, 90(6-7), pp.527–535.
- SAHIN, U., WESKAMP, G., KELLY, K., ZHOU, H.-M., HIGASHIYAMA, S., PESCHON, J., HARTMANN, D., SAFTIG, P. & BLOBEL, C.P., 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology*, 164(5), pp.769–779.
- SANDERSON, M.P., ABBOTT, C.A., TADA, H., SENO, M., DEMPSEY, P.J. & DUNBAR, A.J., 2006. Hydrogen peroxide and endothelin-1 are novel activators of betacellulin ectodomain shedding. *Journal of cellular biochemistry*, 99(2), pp.609–623.
- SANGIORGI, G., RUMBERGER, J.A., SEVERSON, A., EDWARDS, W.D., GREGOIRE, J., FITZPATRICK, L.A. & SCHWARTZ, R.S., 1998. Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *Journal of the American College of Cardiology*, 31(1), pp.126–133.
- SANTIAGO-JOSEFAT, B., ESSELENS, C., BECH-SERRA, J.J. & ARRIBAS, J., 2007. Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors. *The Journal of biological chemistry*, 282(11), pp.8325–8331.
- SANYAL, A.J., 2005. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 2(1), pp.46–53.
- SANYAL, A.J., CAMPBELL-SARGENT, C., MIRSHAHI, F., RIZZO, W.B., CONTOS, M.J., STERLING, R.K., LUKETIC, V.A., SHIFFMAN, M.L. & CLORE, J.N., 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5), pp.1183–1192.
- SARASWATHI, V., GAO, L., MORROW, J.D., CHAIT, A., NISWENDER, K.D. & HASTY, A.H., 2007. Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice. *The Journal of nutrition*, 137(7), pp.1776–1782.
- SATOH, M., ISHIKAWA, Y., ITOH, T., MINAMI, Y., TAKAHASHI, Y. & NAKAMURA, M., 2008. The expression of TNF-alpha converting enzyme at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *European journal of clinical investigation*, 38(2), pp.97–105.

- SCHMITT, M.M.N., FRAEMOHS, L., HACKENG, T.M., WEBER, C. & KOENEN, R.R., 2014. Atherogenic mononuclear cell recruitment is facilitated by oxidized lipoprotein-induced endothelial junctional adhesion molecule-A redistribution. *Atherosclerosis*, 234(2), pp.254–264.
- SCHOLZ, F., SCHULTE, A., ADAMSKI, F., HUNDHAUSEN, C., MITTAG, J., SCHWARZ, A., KRUSE, M.-L., PROKSCH, E. & LUDWIG, A., 2007. Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. *The Journal of investigative dermatology*, 127(6), pp.1444–1455.
- SCHRAM, M.T. & STEHOUWER, C.D.A., 2005. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 37 Suppl 1, pp.49–55.
- SCHREYER, S.A., PESCHON, J.J. & LEBOEUF, R.C., 1996. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *The Journal of biological chemistry*, 271(42), pp.26174–26178.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P.J., RAVASI, T. & HUME, D.A., 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), pp.163–189.
- SCHULTE, A., SCHULZ, B., ANDRZEJEWSKI, M.G., HUNDHAUSEN, C., MLETZKO, S., ACHILLES, J., REISS, K., PALIGA, K., WEBER, C., JOHN, S.R., ET AL., 2007. Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(1), pp.233–240.
- SCHULZ, B., PRUESSMEYER, J., MARETZKY, T., LUDWIG, A., BLOBEL, C.P., SAFTIG, P. & REISS, K., 2008. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circulation research*, 102(10), pp.1192–1201.
- SCHWELLENBACH, L.J., OLSON, K.L., MCCONNELL, K.J., STOLCPART, R.S., NASH, J.D. & MERENICH, J.A., 2006. The triglyceride-lowering effects of a modest dose of docosahexaenoic acid alone versus in combination with low dose eicosapentaenoic acid in patients with coronary artery disease and elevated triglycerides. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(6), pp.480–485.
- SEALS, D.F. & COURTNEIDGE, S. A., 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development*, 17(1), pp.7–30.
- SEKHAR, K.R., YAN, X.X. & FREEMAN, M.L., 2002. Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2. *Oncogene*, 21(44), pp.6829–6834.
- SEMENZA, G.L., 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, pp.551–578.
- SEMENZA, G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(10), pp.721–732.
- SEMENZA, G.L. & WANG, G.L., 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*, 12(12), pp.5447–5454.
- SHARAFKHANEH, A., HANANIA, N.A. & KIM, V., 2008. Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(4), pp.475–477.

- SHEN, B., CHU, E.S.H., ZHAO, G., MAN, K., WU, C.-W., CHENG, J.T.Y., LI, G., NIE, Y., LO, C.M., TEOH, N., ET AL., 2012. PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *British journal of cancer*, 106(9), pp.1486–1494.
- SHIOI, A., KATAGI, M., OKUNO, Y., MORI, K., JONO, S., KOYAMA, H. & NISHIZAWA, Y., 2002. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation research*, 91(1), pp.9–16.
- SIBILIA, M. & WAGNER, E.F., 1995. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, 269(5221), pp.234–238.
- SIRI-TARINO, P.W., SUN, Q., HU, F.B. & KRAUSS, R.M., 2010. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 91(3), pp.535–546.
- SKULAS-RAY, A.C., KRIS-ETHERTON, P.M., HARRIS, W.S., VANDEN HEUVEL, J.P., WAGNER, P.R. & WEST, S.G., 2011. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *The American journal of clinical nutrition*, 93(2), pp.243–252.
- SMALLEY, D.M. & LEY, K., 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(2), pp.255–266.
- SOOND, S.M., EVERSON, B., RICHES, D.W.H. & MURPHY, G., 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of cell science*, 118(Pt 11), pp.2371–2380.
- SPRINGER, T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2), pp.301–314.
- STEELMAN, L.S., CHAPPELL, W.H., ABRAMS, S.L., KEMPF, R.C., LONG, J., LAIDLER, P., MIJATOVIC, S., MAKSIMOVIC-IVANIC, D., STIVALA, F., MAZZARINO, M.C., ET AL., 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*, 3(3), pp.192–222.
- STOLL, G. & BENDSZUS, M., 2006. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*, 37(7), pp.1923–1932.
- STONE, A.L., KROEGER, M. & SANG, Q.X., 1999. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *Journal of protein chemistry*, 18(4), pp.447–465.
- SUN, R., WANG, X., LIU, Y. & XIA, M., 2014. Dietary supplementation with fish oil alters the expression levels of proteins governing mitochondrial dynamics and prevents high-fat diet-induced endothelial dysfunction. *The British journal of nutrition*, 112(2), pp.145–153.
- SURH, Y.-J., KUNDU, J.K., NA, H.-K. & LEE, J.-S., 2005. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *The Journal of nutrition*, 135(12 Suppl), p.2993S–3001S.

- SURH, Y.-J. & NA, H.-K., 2008. NF-kappaB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes & nutrition*, 2(4), pp.313–317.
- SZALAD, A., KATAKOWSKI, M., ZHENG, X., JIANG, F. & CHOPP, M., 2009. Transcription factor Sp1 induces ADAM17 and contributes to tumor cell invasiveness under hypoxia. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 28, p.129.
- TAKEDA, S., 2009. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Seminars in cell & developmental biology*, 20(2), pp.146–152.
- TANEJA, G., MAHADEVAN, N. & BALAKUMAR, P., 2013. Fish oil blunted nicotine-induced vascular endothelial abnormalities possibly via activation of PPAR γ -eNOS-NO signals. *Cardiovascular toxicology*, 13(2), pp.110–122.
- TARASEVICIENE-STEWART, L. & VOELKEL, N.F., 2008. Molecular pathogenesis of emphysema. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), pp.394–402.
- TELLIER, E., CANAULT, M., REBSOMEN, L., BONARDO, B., JUHAN-VAGUE, I., NALBONE, G. & PEIRETTI, F., 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Experimental cell research*, 312(20), pp.3969–3980.
- TERRY, P., WOLK, A., PERSSON, I. & MAGNUSSON, C., 2001. Brassica vegetables and breast cancer risk. *JAMA*, 285(23), pp.2975–2977.
- THANGSTAD, O.P., IVERSEN, T.H., SLUPPHAUG, G. & BONES, A., 1990. Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L. *Planta*, 180(2), pp.245–248.
- TINTUT, Y., PATEL, J., PARHAMI, F. & DEMER, L.L., 2000. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*, 102(21), pp.2636–2642.
- TIPPMANN, F., HUNDT, J., SCHNEIDER, A., ENDRES, K. & FAHRENHOLZ, F., 2009. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB journal*, 23(6), pp.1643–1654.
- TORZEWSKI, M. & BHAKDI, S., 2013. Complement and atherosclerosis-united to the point of no return? *Clinical biochemistry*, 46(1-2), pp.20–25.
- TROJANOWSKA, M., 2012. Mediators of fibrosis. *The open rheumatology journal*, 6, pp.70–71.
- TSAKADZE, N.L., SITHU, S.D., SEN, U., ENGLISH, W.R., MURPHY, G. & D'SOUZA, S.E., 2006. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *The Journal of biological chemistry*, 281(6), pp.3157–3164.
- TURGEON, J., DUSSAULT, S., MAINGRETTE, F., GROLEAU, J., HADDAD, P., PEREZ, G. & RIVARD, A., 2013. Fish oil-enriched diet protects against ischemia by improving angiogenesis, endothelial progenitor cell function and postnatal neovascularization. *Atherosclerosis*, 229(2), pp.295–303.
- UYVAL, K.T., WIESBROCK, S.M., MARINO, M.W. & HOTAMISLIGIL, G.S., 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389(6651), pp.610–614.

- VALGIMIGLI, L. & IORI, R., 2009. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environmental and molecular mutagenesis*, 50(3), pp.222–237.
- VAUPEL, P. & HÖCKEL, M., 2003. Tumor oxygenation and its relevance to tumor physiology and treatment. *Advances in experimental medicine and biology*, 510, pp.45–49.
- VEGA, G.L. & GRUNDY, S.M., 1996. Hypoalphalipoproteinemia (low high density lipoprotein) as a risk factor for coronary heart disease. *Current opinion in lipidology*, 7(4), pp.209–216.
- VIRTANEN, J.K., MURSU, J., VOUTILAINEN, S., UUSITUPA, M. & TUOMAINEN, T.-P., 2014. Serum omega-3 polyunsaturated fatty acids and risk of incident type 2 diabetes in men: the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor study. *Diabetes care*, 37(1), pp.189–196.
- VLIEGENTHART, R., OUDKERK, M., HOFMAN, A., OEI, H.-H.S., VAN DIJCK, W., VAN ROOIJ, F.J.A. & WITTEMAN, J.C.M., 2005. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation*, 112(4), pp.572–577.
- WAGNER, A.E., WILL, O., STURM, C., LIPINSKI, S., ROSENSTIEL, P. & RIMBACH, G., 2013. DSS-induced acute colitis in C57BL/6 mice is mitigated by sulforaphane pre-treatment. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(12), pp.2085–2091.
- WANG, S., WU, D., MATTHAN, N.R., LAMON-FAVA, S., LECKER, J.L. & LICHTENSTEIN, A.H., 2010. Enhanced aortic macrophage lipid accumulation and inflammatory response in LDL receptor null mice fed an atherogenic diet. *Lipids*, 45(8), pp.701–711.
- WANG, X.-J., FENG, C.-W. & LI, M., 2013. ADAM17 mediates hypoxia-induced drug resistance in hepatocellular carcinoma cells through activation of EGFR/PI3K/Akt pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 380(1-2), pp.57–66.
- WANG, Y., HERRERA, A.H., LI, Y., BELANI, K.K. & WALCHECK, B., 2009. Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. *Journal of immunology*, 182(4), pp.2449–2457.
- WEBER, S. & SAFTIG, P., 2012. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development*, 139(20), pp.3693–3709.
- WEIDEMANN, A. & JOHNSON, R.S., 2008. Biology of HIF-1alpha. *Cell death and differentiation*, 15(4), pp.621–627.
- WHO, 2011. *Global status report on noncommunicable diseases 2010*,
- WILLEMS, S.H., TAPE, C.J., STANLEY, P.L., TAYLOR, N.A., MILLS, I.G., NEAL, D.E., MCCAFFERTY, J. & MURPHY, G., 2010. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *The Biochemical journal*, 428(3), pp.439–450.
- WILLIAMS, K.J. & TABAS, I., 1995. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(5), pp.551–561.
- Woo, K.J. & KWON, T.K., 2007. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter. *International immunopharmacology*, 7(13), pp.1776–1783.

- WOODFIN, A., REICHEL, C.A., KHANDOGA, A., CORADA, M., VOISIN, M.-B., SCHEIERMANN, C., HASKARD, D.O., DEJANA, E., KROMBACH, F. & NOURSHARGH, S., 2007. JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood*, 110(6), pp.1848–1856.
- XU, C., SHEN, G., CHEN, C., GÉLINAS, C. & KONG, A.-N.T., 2005. Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene*, 24(28), pp.4486–4495.
- XU, C., YUAN, X., PAN, Z., SHEN, G., KIM, J.-H., YU, S., KHOR, T.O., LI, W., MA, J. & KONG, A.-N.T., 2006. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular cancer therapeutics*, 5(8), pp.1918–1926.
- XU, J., TERAN-GARCIA, M., PARK, J.H., NAKAMURA, M.T. & CLARKE, S.D., 2001. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *The Journal of biological chemistry*, 276(13), pp.9800–9807.
- XU, P., LIU, J., SAKAKI-YUMOTO, M. & DERYNCK, R., 2012. TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Science signaling*, 5(222), p.ra34.
- XUE, L. & LUCOCCO, J., 1998. ERK2 signalling from internalised epidermal growth factor receptor in broken A431 cells. *Cellular signalling*, 10(5), pp.339–348.
- YAMASHITA, Y., OKAMOTO, M., IKEDA, M., OKAMOTO, A., SAKAI, M., GUNJI, Y., NISHIMURA, R., HISHINUMA, M. & SHIMADA, M., 2014. Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology*, 155(3), pp.1080–1090.
- YANG, C.S., SMITH, T.J. & HONG, J.Y., 1994. Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer research*, 54(7 Suppl), p.1982s–1986s.
- YAQOUB, P. & CALDER, P., 1995. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cellular immunology*, 163(1), pp.120–128.
- YARDEN, Y. & SLIWKOWSKI, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(2), pp.127–137.
- YEHUDA, H., SOROKA, Y., ZLOTKIN-FRUŠIĆ, M., GILHAR, A., MILNER, Y. & TAMIR, S., 2012. Isothiocyanates inhibit psoriasis-related proinflammatory factors in human skin. *Inflammation research*, 61(7), pp.735–742.
- YODA, M., KIMURA, T., TOHMONDA, T., MORIOKA, H., MATSUMOTO, M., OKADA, Y., TOYAMA, Y. & HORIUCHI, K., 2013. Systemic overexpression of TNF α -converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. *PLoS one*, 8(1), p.e54412.
- YOXALL, V., KENTISH, P., COLDHAM, N., KUHNERT, N., SAUER, M.J. & IOANNIDES, C., 2005. Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *International journal of cancer*, 117(3), pp.356–362.

- YU, R., CHEN, C., MO, Y.Y., HEBBAR, V., OWUOR, E.D., TAN, T.H. & KONG, A.N., 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 275(51), pp.39907–39913.
- YU, R., LEI, W., MANDLEKAR, S., WEBER, M.J., DER, C.J., WU, J. & KONG, A.N., 1999. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *The Journal of biological chemistry*, 274(39), pp.27545–27552.
- ZAMPOLLI, A., BYSTED, A., LETH, T., MORTENSEN, A., DE CATERINA, R. & FALK, E., 2006. Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models. *Atherosclerosis*, 184(1), pp.78–85.
- VAN ZEE, K.J., KOHNO, T., FISCHER, E., ROCK, C.S., MOLDAWER, L.L. & LOWRY, S.F., 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), pp.4845–4849.
- ZHANG, S.H., REDDICK, R.L., PIEDRAHITA, J.A. & MAEDA, N., 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258(5081), pp.468–471.
- ZHANG, Y., TALALAY, P., CHO, C.G. & POSNER, G.H., 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), pp.2399–2403.
- ZHANG, Z., OLIVER, P., LANCASTER, J.R., SCHWARZENBERGER, P.O., JOSHI, M.S., CORK, J. & KOLLS, J.K., 2001. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB journal*, 15(2), pp.303–305.
- ZHAO, G., ETHERTON, T.D., MARTIN, K.R., WEST, S.G., GILLIES, P.J. & KRIS-ETHERTON, P.M., 2004. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *The Journal of nutrition*, 134(11), pp.2991–2997.
- ZHENG, X., JIANG, F., KATAKOWSKI, M., KALKANIS, S.N., HONG, X., ZHANG, X., ZHANG, Z.G., YANG, H. & CHOPP, M., 2007. Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness. *Cancer science*, 98(5), pp.674–684.
- ZIPPER, L.M. & MULCAHY, R.T., 2000. Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 278(2), pp.484–492.

8 PUBLIKATIONEN

Ein Manuskript, das Teile dieser Arbeit enthält, wurde beim *Journal of Nutrition* zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert:

SPECK, N., BRANDSCH, C., SCHMIDT, N., YAZDEKHASTI, N., HIRCHE, F., LUCIUS, R., RIMBACH, G., STANGL, G.I., REISS, K., 2015. The Anti-Atherogenic Effect of Fish Oil in Male Mice is Associated with a Diminished Release of Endothelial ADAM17 and ADAM10 Substrates. *Journal of Nutrition*. PMID 25926412.

Darüber hinaus führten Arbeiten innerhalb weiterer Kooperationsprojekte zu folgenden Publikationen:

SOMMER, A., FRIES, A., CORNELSEN, I., **SPECK, N.**, KOCH-NOLTE, F., GIMPL, G., ANDRÄ, J., BHAKDI, S., REISS, K., 2012. Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *Journal of biological chemistry*, 287(28), pp.23678-23689, PMID 22613720.

PIEGHOLDT, S., PALLAUF, K., ESATBEYOGLU, T., **SPECK, N.**, REISS, K., RUDDIGKEIT, L., STOCKER, A., HUEBBE, P., RIMBACH, G., 2014. Biochanin A and prunetin improve epithelial barrier function in intestinal CaCo-2 cells via downregulation of ERK, NF- κ B, and tyrosine phosphorylation. *Free Radical Biology and Medicine*, 70, pp.255-264, PMID 24631489.

MARETZKY, T., EVERS, A., LE GALL, S., ALABI, R.O., **SPECK, N.**, REISS, K., BLOBEL, C.P., 2015. The Cytoplasmic Domain of A Disintegrin and Metalloproteinase 10 (ADAM10) Regulates its Constitutive Activity but is Dispensable for Stimulated ADAM10-dependent Shedding. *Journal of biological chemistry*. PMID 25605720.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Domänenstruktur atypischer ADAMs und <i>Shedding</i> eines Transmembranproteins... ..	10
Abbildung 2: Entstehung atherosklerotischer Läsionen unter Beteiligung von ADAM10 und ADAM17.....	19
Abbildung 3: Charakterisierung der Gewichtszunahme und atherosklerotischen Plaque- entwicklung in den verschiedenen Fütterungsgruppen.....	54
Abbildung 4: mRNA-Expression von <i>Adam10</i> und <i>Adam17</i> in der Aorta.. ..	56
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbungen von ADAM10 und ADAM17 in der Aortenwurzel. .	57
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbungen von JAM-A und vWF in der Aortenwurzel.....	59
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbungen ICAM-1 und VCAM-1 in der Aortenwurzel.....	60
Abbildung 8: Plasmakonzentration verschiedener ADAM-Substrate.	62
Abbildung 9: Konzentration von IL-6 und MCP-1 im Plasma.	63
Abbildung 10: mRNA-Expression von <i>Icam1</i> und <i>Vcam1</i> in der Aorta.	64
Abbildung 11: mRNA- und Protein-Expression von ADAM10 und ADAM17 in der Leber.	65
Abbildung 12: Konzentration verschiedener löslicher ADAM-Substrate in der Leber.....	66
Abbildung 13: mRNA-Expression von <i>Adam10</i> und <i>Adam17</i> in Niere und Lunge.	67
Abbildung 14: Konzentration verschiedener ADAM-Substrate in Lunge und Niere.....	68
Abbildung 15: Isothiocyanate stimulieren die Phosphorylierung von ERK1/2 Metalloprotease- abhängig, jedoch nicht das <i>Shedding</i> des TNF-Rezeptors 1.	71
Abbildung 16: Zeitkinetik der Aktivierung von ERK1/2 durch Sulforaphan.. ..	72
Abbildung 17: Sulforaphan beeinflusst nicht das <i>Shedding</i> eines fluorogenen Peptidsubstrates.. ..	73
Abbildung 18: Inhibitionsversuche zur Sulforaphan-induzierten ERK1/2-Aktivierung.. ..	74
Abbildung 19: Unterschiede in der Aktivierung von ERK1/2 durch Sulforaphan verschiedener Hersteller.. ..	75
Abbildung 20: Konzentrations- und Zeitreihe der Aktivierung von ERK1/2 durch BITC.	76
Abbildung 21: Inhibitionsversuch zur BITC-induzierten ERK1/2-Aktivierung.	77
Abbildung 22: mRNA-Expressionsanalyse von <i>ADAM10</i> und <i>ADAM17</i> in Chlamydien-infizierten HEp2-Zellen.....	79
Abbildung 23: mRNA-Expressionsanalyse von <i>ADAM10</i> und <i>ADAM17</i> in HEp2-Zellen unter Hypoxie und nach Stimulation mit IFN γ	80
Abbildung 24: Proteinexpression von ADAM17 unter Hypoxie und nach Stimulation durch IFN γ	81
Abbildung 25: Das <i>Shedding</i> des TNF-Rezeptors 1 in HEp2 Zellen unter Hypoxie und nach Stimulation mit IFN γ	82

Abbildung 26: Der anti-atherogene Effekt von Fischöl ist assoziiert mit einer verminderten proteolytischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17.	93
--	----

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	ausgewählte Substrate der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17.....	11
Tabelle 2:	in dieser Arbeit eingesetzte Isothiocyanate, deren Vorstufen und Struktur	23
Tabelle 3:	verwendete Antikörper	34
Tabelle 4:	eingesetzte Stimulanzien und Inhibitoren	37
Tabelle 5:	Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele nach Laemmli.....	41
Tabelle 6:	verwendete Oligonukleotide.....	48
Tabelle 7:	Programm für Gradienten-PCR	49
Tabelle 8:	<i>Real-Time</i> PCR-Programm	50
Tabelle 9:	Fettsäurezusammensetzung in Lipidextrakten aus isolierten Lebermikrosomen	55
Tabelle 10:	Fettsäurezusammensetzung von Schweineschmalz und Fischöl.....	139

11 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Thomas Roeder** dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, die offizielle Betreuung und das Gutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Ein besonderer Dank gilt Frau **Prof. Dr. Karina Reiß** für die Betreuung und Vergabe des interessanten, breitgefächerten Themas, für die unermüdliche Suche nach neuen Forschungsprojekten, wenn mal eine Sackgasse erreicht war und viele praktische und hilfreiche Ratschläge. Vor allem aber auch Chapeau! für die Zusammenstellung dieser großartigen Arbeitsgruppe.

Das führt mich auch gleich zu Euch meine lieben aktuellen und ehemaligen Reiß-Schrecken – **Björn Ahrens, Florian Bleibaum, Astrid Evers, Felix Kordowski, Anselm Sommer, Maria Sperrhacker, Joscha Büch, Marie Düppe** und **Martin Munz**. Diese Seite ist zu kurz um mich für alles im Einzelnen zu bedanken, aber um es auf den Punkt zu bringen: Mit euch ließ es sich hervorragend sowohl über fachliche Themen als auch über die absurdesten Dinge diskutieren. Die Zeit in diesem Team trage ich meinem Herzen! Ich bin sehr dankbar euch nicht nur Kollegen, sondern Freunde nennen zu dürfen und hoffe auf noch viele weitere gemeinsame Grill-, Strand-, Spiele-, Singstar- oder Stammtisch-Abende ☺.

Sarah Klünder möchte ich vor allem für ihre Freundschaft und die vielen lustigen Wochenenden in Hamburg danken, die so gut von schlechten Ergebnissen abzulenken mussten!

Desweiteren möchte ich mich bei allen weiteren Kollegen des sechsten Stocks für die nette Atmosphäre bedanken. Insbesondere **Britta Hansmann** - Gründungsmitglied des Pöbel-Büros, Miterfinderin des Schnaps-Freitags - die jederzeit für Gespräche über allerlei Problemchen zur Verfügung stand und mir nicht zuletzt das Laufen beibrachte ☺. Auch für dich reicht der Platz hier nicht aus, daher schließe ich an dieser Stelle mit einem herzlichen #WHOO WHOO!

Ein ganz besonderer Dank gilt auch **Yuk Lung Wong**. Niemand kann so gut meine Sorgenfalten ausbügeln wie Du!

Ein großer Dank auch an meine **Familie**, durch deren Unterstützung mein Studium möglich war und die mir jederzeit bedingungslos Rückhalt geben.

Ich möchte mich auch bei meinen Kooperationspartnern bedanken, ohne die diese Arbeit kaum möglich gewesen wäre: **Prof. Dr. Gabriele Stangl** und den **Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe** von der Uni Halle, **Prof. Dr. Jan Rupp** und **Kristin Wischnat** vom UKSH Lübeck sowie **Prof. Dr. Gerald Rimbach** und **Prof. Dr. Anika Wagner** von der CAU Kiel.

Und *last but not least*.... danke ich einem Bären namens **Pu!**

12 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Nancy Speck, dass ich die vorliegende Arbeit -abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen akademischen Betreuer- selbständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Desweiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Ein Manuskript, das Teile dieser Arbeit enthält, wurde beim *Journal of Nutrition* zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert:

SPECK, N., BRANDSCH, C., SCHMIDT, N., YAZDEKHASTI, N., HIRCHE, F., LUCIUS, R., RIMBACH, G., STANGL, G.I., REISS, K., 2015. The Anti-Atherogenic Effect of Fish Oil in Male Mice is Associated with a Diminished Release of Endothelial ADAM17 and ADAM10 Substrates. *Journal of Nutrition*

Kiel, April 2015

Nancy Speck

13 LEBENS LAUF

Name	Nancy Speck
geboren am	20. Januar 1984
in	Kyritz
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulausbildung

seit 01/2010	<p>Doktorarbeit an der Klinik für Dermatologie des UKSH Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß unter externer Betreuung von Prof. Dr. Thomas Roeder</p> <p>Titel: Einfluss von Umweltfaktoren auf die Regulation der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17</p>
06/2008 – 04/2009	<p>Masterarbeit in der Abteilung Neurobiologie des Fachbereiches Biologie der Universität Osnabrück bei Prof. Dr. Roland Brandt</p> <p>Titel: Klonierung und Charakterisierung multimerer Fluoreszenzproteine zur lentiviralen Infektion – am Beispiel von mRFP</p>
10/2006 – 04/2009	Studium Biologie der Zellen (M.Sc.), Universität Osnabrück
04/2006 – 09/2006	<p>Bachelorarbeit in der Abteilung Tierphysiologie des Fachbereiches Biologie der Universität Osnabrück bei Dr. Dirk Weihrauch</p> <p>Titel: Molekulare Identifikation und mRNA-Expressionsanalyse zweier Isoformen eines putativen Ammoniak-Transporters aus <i>Manduca sexta</i></p>
10/2003 – 09/2006	Studium Biologie der Zellen (B.Sc.), Universität Osnabrück

Schulbildung

2003	Abitur
1996 – 2003	Gymnasium Friedrich-Ludwig-Jahn, Kyritz
09/1990 – 06/1996	Grundschule , Neustadt/Dosse

14 ANHANG

Tabelle 10: Fettsäurezusammensetzung von Schweineschmalz und Fischöl

Analysen durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch AG Stangl (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

Fettsäure	Schweineschmalz	Fischöl
	%	%
14:0	2,01	7,99
14:1	n.d.	0,05
16:0	29,30	18,12
16:1	2,56	8,50
18:0	18,41	3,63
18:1n-9	36,10	29,36
18:2n-6	10,62	8,13
18:3n-6	0,06	0,29
18:3n-3	0,80	2,85
18:4n-3	n,d,	1,74
20:4n-6	0,15	0,72
20:5n-3	n.d.	10,25
22:5n-3	n.d.	1,80
22:6n-3	n.d.	6,56
Summe	100,0	100,0
SFA	49,7	29,7
MUFA	38,7	37,9
PUFA	11,6	32,4
Sum n-6	10,8	9,1
Sum n-3	0,8	23,2
n-6/n-3	13,6	0,4
n-3/n-6	0,1	2,5

n.d., nicht detektierbar

SFA, *saturated fatty acids*

MUFA, *monounsaturated fatty acids*

PUFA, *polyunsaturated fatty acids*