

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchung zur Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die ADAM10- und ADAM17-Aktivierung im Endothel

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Marie Magdalena Düppe

aus Fleckeby

Kiel, 2019

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Karina Reiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. J. Saftig

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.09.2019

*Gewidmet meinen Eltern voller Dankbarkeit für die Unterstützung während des
Studiums und der Promotion.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. „A disintegrin and metalloprotease“	1
1.1.1. Aufbau von ADAM17	3
1.1.2. Physiologische Funktion von ADAM10 und ADAM17	4
1.2. Aktivierungsmechanismen von ADAMs	5
1.3. Die Plasmamembran	7
1.4. Sphingolipide und Phospholipide	7
1.5. Sphingomyelinasen und Ceramid	8
1.5.1. Zelluläre Bedeutung der Ceramide	9
1.5.2. Die Sphingomyelinase	10
1.6. Phosphatidylserin	14
2. Fragestellung	15
3. Material & Methoden	16
3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.1.1. Geräte	16
3.1.2. Chemikalien	18
3.1.3. Stimulantien	21
3.1.4. Inhibitoren	21
3.1.5. Antikörper	22
3.1.6. Zellkulturmedien	22
3.1.7. Kits	22
3.1.8. Software	22
3.1.9. Verbrauchsmaterialien	24

3.2.	<i>Plasmide</i>	25
3.3.	<i>Antikörper</i>	25
3.5.	<i>Puffer und Lösungen</i>	27
3.6.	<i>Zellkultur</i>	30
3.6.1.	<i>Zelllinien</i>	30
3.6.2.	<i>Kultivierung</i>	30
3.6.3.	<i>Kryokonservierung</i>	31
3.6.4.	<i>Auftauen von HUVECS</i>	31
3.6.5.	<i>Stimulationsversuche</i>	32
3.6.6.	<i>Kollagenisierung von Zellgefäßen</i>	33
3.7.	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	33
3.8.	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford</i>	34
3.9.	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	34
3.10.	<i>Western Blot</i>	35
3.10.1.	<i>Immunologische Detektion von Proteinen</i>	36
3.10.2.	<i>Strippen von PVDF Membranen</i>	36
3.11.	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	37
3.12.	<i>Alkalische Phosphatase Assay</i>	37
3.12.1.	<i>Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen</i>	38
3.13.	<i>Annexin V-FITC-Färbungen</i>	38
3.14.	<i>Immunozytochemische Färbung (ICC)</i>	39
3.15.	<i>Impedanzmessung mit dem ICelligence System</i>	40
3.16.	<i>Reaktive-Sauerstoffspezies-Detektion</i>	42
3.17.	<i>Statistische Auswertung</i>	43
4.	<i>Ergebnisse</i>	44
4.1.	<i>Moduliert die Sphingomyelinase (SMase) die ADAM10 und ADAM17 Shedding-Aktivität?</i>	44

4.2.	<i>Kurzkettige Ceramide haben keinen Einfluss auf die ADAM-Aktivität</i>	44
4.3.	<i>Langkettige Ceramide beeinflussen die Aktivität von ADAM10 und -17 nicht</i>	47
4.4.	<i>SMase induziert ADAM10 und -17 vermitteltes Shedding</i>	50
4.5.	<i>Erhöhtes Transmembranrezeptor-Shedding nach aSMase-Stimulation</i>	51
4.6.	<i>aSMase induziert die Bildung von Ceramid-reichen Regionen</i>	52
4.7.	<i>ADAM17 und Caveolin-1 sind nicht kolokalisiert</i>	56
4.8.	<i>ADAM17 ist mit Ceramid-reichen Regionen kolokalisiert</i>	58
4.9.	<i>aSMase induziert zeitabhängig die Phosphatidylserin-Externalisierung</i>	61
4.10.	<i>aSMase Stimulation führt zu keiner ADAM-abhängigen Erhöhung der Permeabilität im Endothel</i>	63
4.11.	<i>Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch aSMase erhöht</i>	66
5.	<i>Diskussion</i>	70
5.1.	<i>Führt die aSMase durch die Bildung von Ceramid-reichen Regionen ADAMs und ihre Substrate zusammen?</i>	70
5.2.	<i>Die aSMase führt zur Phosphatidylserin- Externalisation und damit zur ADAM-Aktivierung</i>	75
5.3.	<i>aSMase erhöht nur bedingt die Metalloprotease-abhängige Permeabilität</i>	78
5.4.	<i>Einfluss der aSMase auf ADAM10</i>	81
5.5.	<i>ROS als Ausblick auf weitere Aktivierungswege</i>	82
5.6.	<i>Neuere Erkenntnisse</i>	86
6.	<i>Zusammenfassung</i>	87
7.	<i>Summary</i>	89
8.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	91

9.	Tabellenverzeichnis	98
10.	Abbildungsverzeichnis	99
11.	Literaturverzeichnis.....	101
12.	Danksagung	118
14.	Erklärung	119

1. Einleitung

1.1. „*A disintegrin and metalloprotease*“

Die proteolytische Prozessierung von Proteinen spielt in vielen Zellprozessen eine wichtige Rolle. Ektodomain-Shedding wird hierbei die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domänen (Ektodomänen) von ihren Membran-assoziierten Vorläuferproteinen genannt. Auf diese Weise werden durch bestimmte Metalloproteasen zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle proteolytisch freigesetzt. Zu diesen Metalloproteasen, auch *Sheddases* genannt, gehören die ADAMs („*A Disintegrin and Metalloprotease*“).

ADAMs sind Typ 1 Transmembranglykoproteine und gehören zur Gruppe der Metzinkine, welche durch drei Histidinreste im aktiven Zentrum gekennzeichnet sind. Die Metzinkine lassen sich in vier Untergruppen gliedern: Serralysine, Astacine, MMPs und Adamalysine. Zu Letzteren zählen die ADAMs, die *snake venom metalloproteases* (SVMPs), sowie die Thrombospondinmotiv-enthaltenen ADAMs (ADAMTS). ADAMs zeigen eine charakteristische Multidomänenstruktur mit einer N-terminalen Prodomäne, einer Metalloprotease-, Disintegrin-ähnlichen, Cystein-reichen, EGFepidermal growth factor)-ähnlichen Domäne, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne (siehe Abbildung 1).

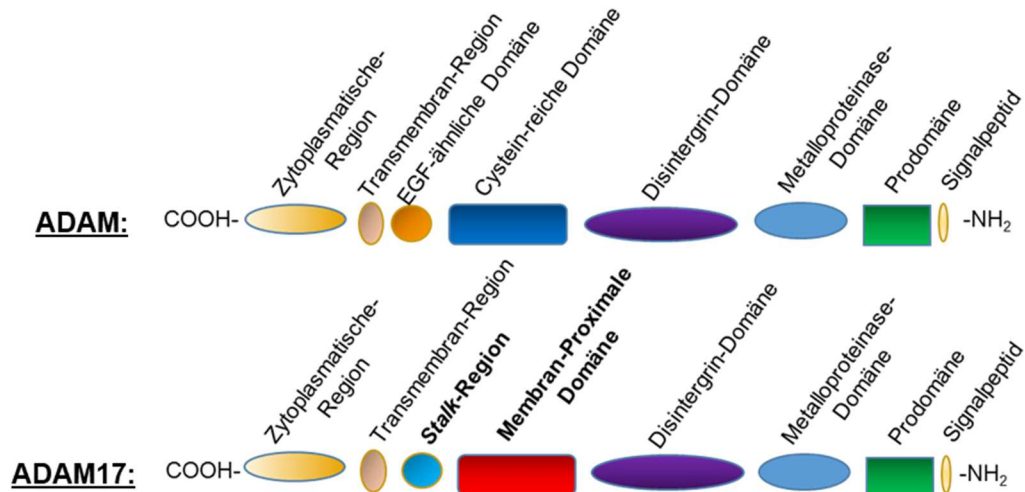


Abbildung 1: Domänenstruktur von ADAM10 und -17 und ADAMs allgemein

Die proteolytisch-aktiven Vertreter der ADAMs bestehen aus einer Signalsequenz, einer Prodomäne, einer Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, der EGF-ähnlichen Domäne, einer Transmembran-Region und einer zytoplasmatischen Region. Anstelle der Cystein-reichen Domäne besitzt ADAM17 eine membran-proximale Domäne und anstelle einer EGF-ähnlichen Domäne eine Stalk- oder auch CANDIS- genannte Region.

Alle ADAM-Substrate sind Transmembranproteine, bzw. mit der Membran assoziierte Moleküle. Die abgespaltenen Ektodomänen können durch das *Shedding* teilweise zu aktiven löslichen Faktoren werden. So schneidet ADAM17 zum Beispiel pro-TNF- α (Lisi et al. 2014; Black et al. 1997; Moss et al. 1997), welches so in seiner löslichen Form zum aktiven Zytokin wird und als wichtiger Faktor der Immunantwort die Akut-Phase-Proteine aktiviert. Des Weiteren schneiden ADAMs Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren.

Es wurden bislang mehr als 40 ADAMs in Säugetieren gefunden (Reiss und Saftig 2009). Bisher konnten in Pflanzen keine ADAMs nachgewiesen werden (Seals und Courtneidge 2003). Von den 40 bekannten ADAMs sind 21 proteolytisch aktiv, darunter ADAMDEC-1, ADAM-8, -9, -10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 und -33.

ADAMs werden am endoplasmatischen Retikulum als Zymogene synthetisiert. Für die vorläufige Inaktivierung des katalytisch aktiven Zentrums ist die Prodomäne verantwortlich (van Wart und Birkedal-Hansen 1990). In der nachfolgenden Prozessierung im Golgi-Apparat wird das noch inaktive ADAM-Enzym durch komplexe Glykosylierungen weiter modifiziert. Im Trans-Golgi-Netzwerk wird die Prodomäne durch Proprotein-Konvertase 7 oder Furin-ähnliche Proteasen entfernt (Endres et al. 2003). Die sich anschließende Metalloprotease-Domäne beinhaltet das aktive Zentrum mit der Zink-bindenden Konsensussequenz HEXXHXXG, drei Histidin-

Resten, einen konservierten Methionin-Rest sowie eine folgende Aminosäure. Diese Konsensussequenz fehlt den nicht proteolytisch aktiven ADAMs.

Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit ADAM10 und ADAM17, weshalb sich die kommenden Kapitel mit diesen beiden Vertretern der ADAM-Familie befassen werden.

1.1.1. Aufbau von ADAM17

ADAM17 ist kein typischer Vertreter der ADAM-Familie, da sich an die Disintegrin-ähnliche Domäne eine Membran-proximale Domäne (MPD) mit einer α/β -Faltblattstruktur und eine *Stalk*-Region anschließt (Düsterhöft et al. 2014; Lisi et al. 2014). Die MPD beeinflusst möglicherweise die Aktivität des Enzyms. *In vitro* liegt diese Region in zwei unterschiedlichen Formen vor. Eine Form ist offen und könnte die aktive Form des Enzyms darstellen, die andere Form ist kompakter und als geschlossene Form zu betrachten. Beide Formen unterscheiden sich in ihrer Disulfid-Brücken-Anordnung. Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) kann *in vitro* die offene aktive in die geschlossene inaktive Form umwandeln (Düsterhöft et al. 2013).

Die ADAM17 *Stalk*-Region wird auch „*conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence*„ (CANDIS) genannt (Düsterhöft et al. 2014). Sie ist für die Bindung an den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) verantwortlich, nicht aber an Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und wird durch die MPD reguliert. Diese beinhaltet Aminosäuren mit positiven Ladungen, welche vermutlich an Phosphatidylserin (PS) binden und so für das „Herunterbiegen“ des katalytisch-aktiven Zentrums und der Disintegrin-ähnlichen Domäne der ADAMs verantwortlich sind. Wie in **Abbildung 2** gezeigt, gelangt das aktive Zentrum des Enzyms so in die für das *Shedding* benötigte Position (Sommer et al. 2016). Dieser PS-vermittelte Effekt wird in der Diskussion näher erläutert und diskutiert.

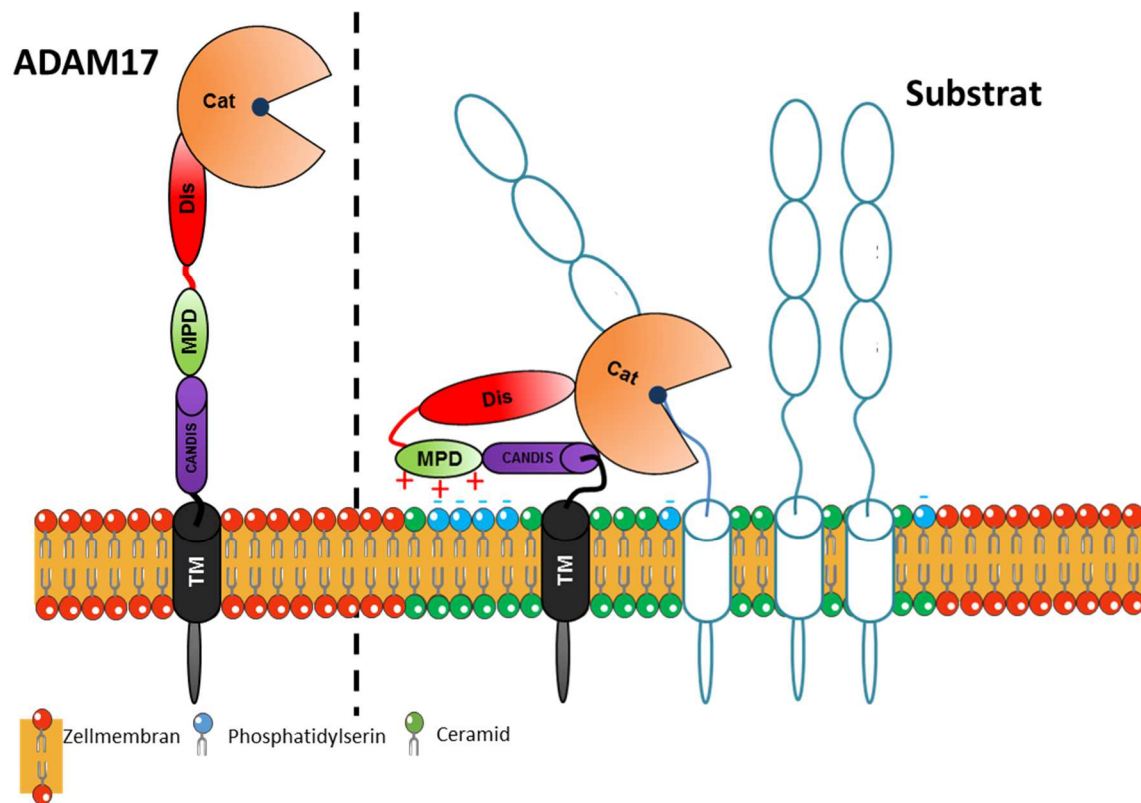


Abbildung 2: Shedding-Position von ADAM17

Durch die Aktivierung der Sphingomyelinase bilden sich Ceramid reiche Region in welchen ADAM 17 in unmittelbare räumliche Nähe zu seinen *Shedding*-Substraten gelangt. Negativ geladenes Phosphatidylserin verlagert sich auf die Außenseite der Membran und interagiert mit der positiv geladenen Membran-proximale Domäne (MPD) des ADAM 17. Das katalytische Zentrum des Enzyms kommt so in die benötigte *Shedding*-Position. Cat: katalytisches Zentrum, Dis: Disintegrin-ähnliche Domäne, MPD: Membran-proximale Domäne, CANDIS: Stalk-Region, TM: Transmembran Region

1.1.2. Physiologische Funktion von ADAM10 und ADAM17

ADAM10 und -17 spielen in vielen physiologischen, embryonalen sowie krankheitsbedingten Mechanismen eine bedeutende Rolle. Dieses lässt sich schon daran erkennen, dass in allen Geweben und Zelltypen ADAM10 und -17 zu finden sind. ADAM17-*Knockout*-Mäuse sterben kurz vor der Geburt an gravierenden Entwicklungsstörungen und zeigen damit ähnliche Beeinträchtigungen wie Mäuse, denen der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) oder dessen Liganden (z.B. HB-EGF oder TGF α) fehlt (Peschon et al. 1998).

Es sind mittlerweile über 70 Substrate für ADAM17 bekannt (Scheller et al. 2011). In **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** sind die für diese Arbeit wichtigen Substrate und ihre Funktion aufgelistet.

Tabelle 1: ADAM10 und -17-Substrate und der Funktion

ADAM10		
<u>Substrat</u>	<u>Funktion</u>	<u>Referenzen</u>
VE-Cadherin	Zell-Zell-Verbindung, Permeabilität	(Schulz et al. 2008)
BTC	Proliferation, Migration, Differenzierung, EGFR- Permeabilität, Ligand	(Anand-Apte et al. 2010; Sahin et al. 2004)
CXCL16	Transmigration	(Donners et al. 2010)
ADAM17		
TNF-α	Proinflammatorisches Zytokin	(Moss et al. 1997; Black et al. 1997)
TNF-Rezeptor I	Anti-Inflammatorisch	(Reddy et al. 2000)
TNF-Rezeptor II	Anti-Inflammatorisch	(Peschon et al. 1998)
TGF-α	Proliferation, EGFR- Ligand	(Sahin et al. 2004)
VEGF-Rezeptor II	Angiogenese, Vaskularisation	(Swendeman et al. 2008; Peschon et al. 1998)

1.2. Aktivierungsmechanismen von ADAMs

Obwohl bereits zahlreiche ADAM-Substrate identifiziert wurden, konnte bis jetzt kein eindeutiger Aktivierungsmechanismus der ADAM-Proteasen definiert werden. Doch gerade diese Frage scheint essentiell, da viele ADAM-Substrate bei einer Fehlregulation ihrer Freisetzung dramatische pathologische Auswirkungen haben. Ein

vermehrtes *Shedding* von TGF α fördert zum Beispiel den fortlaufenden Krankheitsprozess von Angiotensin-induzierten chronischen Nierenerkrankungen (Laouari et al. 2011; Lautrette et al. 2005), eine Fehlregulation der HB-EGF- und der Neuregulin-Konzentration spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Herzfehlern (Asakura et al. 2002; Yan und Morgan 2011) und ein erhöhtes Level von Amphiregulin fördert das Wachstum von Brustkrebs (Hynes und MacDonald 2009, 2009).

Die Regulation der ADAM-Aktivität scheint in mehreren Ebenen modifizierbar zu sein. Die transkriptionale Regulation wurde bisher wenig untersucht, jedoch wurden bereits mehrere Möglichkeiten der translationalen Modifikation identifiziert. Es ist bekannt, dass das Entfernen der inhibitorischen Prodomäne durch die Proprotein-Konvertase Furin während des Transports zum Golgiapparat Auswirkungen auf die Maturierung von ADAM17 hat (Roghani et al. 1999; Lum et al. 1998). Zudem ist bekannt, dass die inaktive Rhomboid-Protease iRhom2 Einfluss auf die Maturierung und den intrazellulären Transport von ADAM17 ausübt (Maretzky et al. 2013). Wie in 1.1.1 beschrieben hat die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) zumindest *in vitro* einen wichtigen Einfluss auf die Aktivität (Düsterhöft et al. 2013). Ob die zytoplasmatische Domäne eine Rolle bei der Aktivierung spielt, wurde bereits kontrovers diskutiert. So postulierten Xu und Derynck, dass es an der zytoplasmatischen Domäne phosphorylierbare Bereiche gibt, welche Einfluss auf die Aktivität von ADAM17 haben (Xu und Derynck 2010). Auf der anderen Seite zeigten mehrere Studien mit einem ADAM17-Konstrukt, dem die zytoplasmatische Domäne fehlt, dass eine Aktivierung durch unterschiedliche Stimuli trotzdem normal möglich war (Reddy et al. 2000; Doedens et al. 2003; Le Gall et al. 2010a). Dass die Transmembrandomäne anderer Transmembranproteasen einen wichtigen Einfluss auf die Substratspaltung hat, wurde zum Beispiel durch Anderson und Jacobson 2002 gezeigt (Anderson und Jacobson 2002). D'Alessio et al. zeigten, dass ADAM17 und sein *Shedding*-Substrat der TNF-Rezeptor (TNFR1) in *Lipid Rafts* lokalisiert sind (D'Alessio et al. 2012). *Lipid Rafts* werden bestimmte Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Bereiche in der Plasmamembran genannt.

Da die Interaktion zwischen Sphingolipid-reichen *Lipid Rafts*, der für ihre Entstehung wichtigen Sphingomyelinase und ADAM10 und ADAM17 Thema dieser Doktorarbeit ist, wird im Folgenden Bezug auf die Plasmamembran und auf ihre für diese Arbeit wichtigen Bestandteile genommen.

1.3. Die Plasmamembran

Auf Grund ihres amphiphilen Charakters bilden Lipide im Wasser Mizellen bzw. organisieren sich zu einer 7-10 nm dicken Doppelschicht. Säugetiermembranen bestehen grundsätzlich aus Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterin.

Das relativ kleine Steroid Cholesterin lagert sich zwischen die Fettsäuren der Membranlipide. Je nach Zusammensetzung der Membran beeinflusst das Cholesterin aufgrund seiner starren Ringstruktur die Fluidität. So kann es die Fluidität in festgepackten Membranen erhöhen, da es den semikristallinen Zustand stört. Es kann aber auch die Fluidität herabsetzen, da es in Membranen mit einem hohen Gehalt von ungesättigten Fettsäuren den Alkylresten eine geordnete feste Struktur aufzwingt.

Glykolipide leiten sich, wie die Sphingolipide, von Sphingosin ab. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt, die der Cerebroside und die der Ganglioside. Beide sind vorwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) zu finden und dienen durch ihren Kohlenhydratrest der Zellerkennung.

1.4. Sphingolipide und Phospholipide

In der Zellmembran sind Phospholipide und Sphingolipide wichtige Bestandteile, beide gehören zur Verbindungsklasse der polaren Membranlipide.

Die amphiphilen Phospholipide setzen sich aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffresten zusammen. In Wasser bilden Phospholipide Mizellen in dem sie sich zu einer Lipiddoppelschicht zusammen lagern. Die häufigsten Phospholipide, die in der Zellmembran auftreten, sind Phosphatidylcholin, auch Lecithin genannt, Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, auch Kephalin

genannt, Phosphatidylserin und Sphingomyelin. Aufgrund ihres chemischen Aufbaus gliedern sich Phospholipide in zwei Gruppen, die Phosphoglyceride und die Sphingolipide.

Die Biosynthese der Sphingolipide findet überwiegend im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat statt. Der Grundbaustein der Sphingolipide bildet der ungesättigte Aminoalkohol Sphingosin, dessen C₁₈-Verbindungen aus Serin und Palmityl-CoA besteht. Weiterhin bestehen Sphingolipide aus einer polaren Kopfgruppe und einer Acylgruppe, wie eine Fettsäure, die über eine Amid-Bindung mit dem C₂-Atom des Sphingosins verbunden ist. Sphingolipide fungieren unter anderem als *second messenger*, z.B. indem das Sphingosin die Proteinkinase C (PKC) hemmt (Hannun und Bell 1986).

Geladene Gruppen wie Serin, Ethanolamin und das polare Cholin sind durch eine Esterbindung an einem Phosphatrest am Sphingosinrückgrat befestigt. Bilden ein oder mehrere Zucker die Kopfbindung, erfolgt die Bildung ohne einen Phosphatrest direkt am Sphingosinrückgrat.

Das einfachste Sphingolipid ist das Ceramid. Ceramide entstehen durch die Verknüpfung einer Fettsäure mit der Aminogruppe des Sphingosins durch eine Säureamidbindung. Durch das Anhängen eines Phosphat- und eines Cholin-Restes, wird aus dem Ceramid ein Phosphosphingolipid. Letztere werden nach ihrem Vorkommen in der Myelinschicht von Nervenzellen auch Sphingomyelin genannt und sind die mengenmäßig wichtigsten Phospholipide (Koolman und Röhm 2009). Da einige Sphingolipide gesättigte und ungesättigte Fettsäuren enthalten, haben diese Sphingolipide eine bessere Voraussetzung sich in der Membran näher aneinander zu legen als Phospholipide.

1.5. Sphingomyelinasen und Ceramid

In dieser Arbeit spielt der Umbau der Sphingolipide zu Ceramid eine wichtige Rolle, weshalb er hier genauer erläutert werden soll.

Der Umbau des membrangebundenen Sphingomyelins zu Ceramid wird durch spezifische Enzyme katalysiert, welche Sphingomyelinasen (SMasen) genannt werden. Diese SMasen spaltet das Phosphorylcholin vom Sphingomyelin ab und bilden so C₁₆- bzw. C₁₈- Ceramid (Goñi und Alonso 2002).

1.5.1. Zelluläre Bedeutung der Ceramide

Die Produktion von Ceramid spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von extrazellulären Signalen, welche zur Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest und Apoptose führen können (Hannun 1996). Ceramide sind unter anderem an vielen Stressantworten der Zelle beteiligt. Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1, und PAF erhöhen die Ceramidproduktion (Göggel et al. 2004; Mathias et al. 1993; Lang et al. 2005).

1.5.2. Die Sphingomyelinase

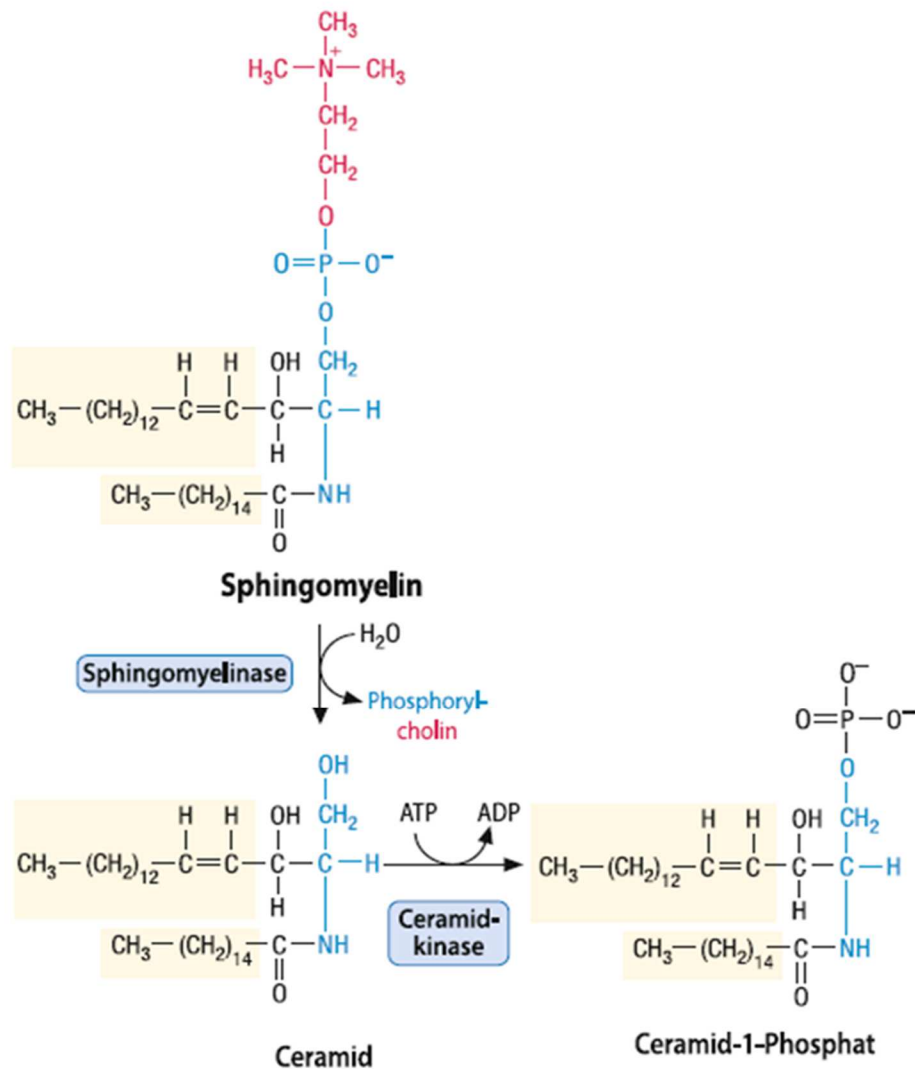


Abbildung 3: Sphingomyelinase hydrolysiert Ceramid

Die Sphingomyelinase bildet unter Abspaltung des Phosphatcholinsrestes aus dem Sphingomyelin Ceramid. (Modifiziert nach Biochemie und Pathobiochemie, Löffler 9. Auflage).

Die Enzymfamilie der SMasen ist nach dem Phospholipase-C-ähnlichen Hydrolysemechanismus des Sphingomyelins definiert worden (Goñi und Alonso 2002).

SMasen können nach ihren pH-Optima in neutrale, alkalische und saure Sphingomyelinase (*acid* (a-)SMasen) unterteilt werden. Eine weitere Aufteilung nach

ihrer Abhängigkeit von bestimmten Ionen, wie Mg^{2+} und Zn^{2+} , und ihrer Lokalisation, wie lysosomal oder membrangebunden, ist verbreitet.

Je nach Definition variieren die Angaben über die Anzahl der verschiedenen SMasen. Sie reichen von drei aSMase-Formen bis zu sieben (Levade und Jaffrézou 1999).

1.5.2.1. Neutrale Spingomyelinasen

Es wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass es im menschlichen Körper mindestens zwei neutrale SMasen geben muss. Eine neutrale Mg^{2+} -abhängige, membranassoziierte SMase wurde zuerst im Nervengewebe gefunden (Gatt 1976; Rao und Spence 1976), konnte aber auch in anderen Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden (Liu et al. 1997). Die zweite neutrale SMase ist Mg^{2+} -unabhängig und wurde in der Myelinschicht (Chakraborty et al. 1997) und im Cytosol von Leukämiezellen (Okazaki et al. 1994) nachgewiesen.

1.5.2.2. Alkalische Spingomyelinasen

Die Aktivität einer alkalischen SMase wurde in der Galle, also im alkalischen Medium bei einem pH von 9 nachgewiesen (Duan et al. 1995, 1995; Nyberg et al. 1996). Änderungen der alkalischen SMase-Aktivität stehen vermutlich in Verbindung mit der Tumorgenese (Hertervig et al. 1999).

1.5.2.3. Saure Spingomyelinasen

Die wohl am besten erforschten SMasen sind die sauren (*acid*) SMasen (aSMase). Sie kommen intrazellulär in Lysosomen und Endosomen vor. Die aSMasen können jedoch auch mittels des Golgi-Apparates über den sekretorischen Weg in den extrazellulären Raum bzw. zur Plasmamembran gelangen. Um beide Isoformen zu unterscheiden, wird die intrazelluläre Form als lysosomale aSMase (L-aSMase), die sekretorische als sezernierte aSMase (S-aSMase) bezeichnet (Schissel et al. 1998; Tardy et al. 2006). 1996 wurde das erste Mal durch Schissel beschrieben, dass beide

Einleitung

Isoformen auf demselben Gen kodiert sind (Schissel et al. 1996). Beide Isoformen unterscheiden sich durch ihre N-terminalen Aminosäuren, dem Vorkommen von komplexgebundenen Oligosacchariden und des auf Grund von posttranslationalen Modifikationen unterschiedlichen Molekulargewichts (Hurwitz et al. 1994b; Schissel et al. 1998).

Beide Isoformen sind Zn^{2+} -abhängig. Die L-aSMase braucht im biochemischen Assay kein weiteres Zink, da sie bereits intrazellulär gesättigt wird. Jedoch muss zur Messung der S-aSMase-Aktivität Zink hinzugegeben werden. Diese Isoform wurde das erste Mal 1989 beschrieben (Spence et al. 1989). Die soeben beschriebenen Unterschiede der Zink-Abhängigkeit und Unabhängigkeit, werden zur Unterscheidung von S-aSMase und L-aSMase in verschiedenen Verfahren genutzt.

Führt ein genetischer Defekt zu einem Defizit der aSMase, kommt es zur Sphingolipidose Morbus Niemann-Pick, welche eine Lipidspeichererkrankung ist. Sie wird in Typ A und B unterteilt. Typ A, die akute infantile neuropathische Form, tritt im zweiten bis dritten Lebensmonat auf. Zum Krankheitsbild gehören eine Hepatosplenomegalie sowie ein neurologischer Abbau ab dem zweiten Lebensjahr. Der Krankheitsverlauf ist infaust und endet letal in der Regel innerhalb des zweiten Lebensjahres. Typ B, auch als chronisch viszerale Form bezeichnet, beginnt im Kindesalter. Sie ist gekennzeichnet durch einen milden Verlauf mit einer Hepatomegalie und Lungeninfiltrationen. In den Alveolen, in den Lymphgefäßen und in der Pulmonalarterie sind Schaumzellen zu finden. Diese stellen Histiozyten dar, welche mit nicht abgebautem Sphingomyelin, Bis(monoglycero)phosphat und unverestertem Cholesterin angefüllt sind. Die Lebenserwartung betroffener Patienten ist nur geringfügig herabgesetzt.

Eine Erhöhung der aSMase-Aktivität wurde mit vielen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. So wurde eine Erhöhung der Plasmakonzentration u.a. bei Sepsis (Claus et al. 2005), kardiovaskulären, pulmonalen und neurologischen Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II (Smith und Schuchman 2008) und Artherosklerose (Marathe et al. 1999) beobachtet.

Im Mausmodell konnte der aSMase eine wichtige Rolle zugeschrieben werden u.a. für akute systemische Inflammationen (Wong et al. 2000) und zerebrale Ischämien (Yu et

al. 2000), Leberschäden (García-Ruiz et al. 2003) und Endotoxinschock (Claus et al. 2005).

1.5.2.4. Lipid Rafts

Nachdem die aSMase Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin verarbeitet hat, haben die Ceramidmoleküle das Bestreben sich zu sogenannten *Lipid Rafts* oder auch Mikrodomänen zusammen zu setzen, indem sie mit Phospholipiden und weiteren Ceramidmolekülen interagieren und andere Lipide verdrängen (Nurminen et al. 2002).

Ceramid-reiche Membrandomänen führen somit zu einer Umorganisation der Plasmamembran. Die in den *Rafts* verankerten Membranproteine werden mit den *Rafts* mitbewegt. Auch untereinander haben Ceramid-reiche Domänen das Bestreben sich zu verbinden und somit größere Areale zu bilden. Die verankerten Proteine werden dabei zusammengeführt. So lagern sich bestimmte Moleküle in *Clustern* zusammen. Auch Rezeptoren und ihre Substrate werden so zusammengeführt.

In Membrandomänen akkumulieren bestimmte Signalmoleküle (Gulbins und Li 2006). Dies konnte beispielsweise für CD95 (Grassme et al. 2001; Grassmé et al. 2001) , CD40(Grassmé et al. 2002), FcγRII (Abdel Shakor et al. 2004) und CD20 (Bezombes et al. 2004) gezeigt werden. Nur die Anhäufung von bestimmten Signalmolekülen in *Lipid Rafts* kann bereits einen bestimmten Schwellenwert überschreiten und Signalkaskaden auslösen. Dies wurde unter anderem für den Fas-Todesrezeptor (Kirschnek et al. 2000) gezeigt.

Ceramide interagieren aber auch mit intrazellulären *Targets* wie Phospholipase A₂ (Huwiler et al. 2001), einigen Isoformen der Proteinkinase C (Müller et al. 1995), sowie Ionenkanälen (Gulbins et al. 1997).

Eine weitere spezielle Form der *Lipid Rafts* stellen die Caveolae dar (Heinrich und Löffler 2011). Caveolae sind Einbuchtungen der Membran, die nach dem charakteristischen Protein Caveolin-1 benannt sind. Sie sind u.a. involviert in die Signalübertragung und in endozytotische Prozesse.

1.6. Phosphatidylserin

Phosphatidylserin (PS) ist in seiner Struktur dem Phosphatidylcholin ähnlich, jedoch ist das Cholin des Phosphatidylcholins durch ein Serin ersetzt. PS besitzt zwei negative und eine positive Ladung und gehört mit Phosphatidylinositol zu den anionischen (sauren) Phospholipiden. PS ist in der Innenseite der Membran lokalisiert, kann aber durch eine Scramblase zur äußeren Seite der Membran befördert werden. Z.B. externalisiert PS bei der Apoptose zur Außenseite der Membran. Außerhalb der Zelle lässt sich PS mittels Annexin V-FITC anfärben und damit sichtbar machen (Heinrich und Löffler 2011).

Es sind mittlerweile verschiedene Stimuli bekannt, welche die PS-Externalisierung hervorrufen, so aktiviert die Produktion von Ceramid durch die aSMase in einigen Zellen z.B. T-Lymphozyten die Externalisierung (Herz et al. 2009). Des Weiteren wurde PS auf der Außenseite von extrazellulären Vesikeln gefunden (Bianco et al. 2009). Für Erythrozyten wurde gezeigt, dass eine durch aSMase hervorgerufene PS-Exposition und der damit verbundene Verlust der Membranintegrität das Absterben von Erythrozyten beeinflusst (Dinkla et al. 2012).

2. Fragestellung

ADAM10 und ADAM17 spielen in vielen grundlegenden physiologischen und pathologischen Prozessen eine bedeutende Rolle. Trotz der vielen Jahre, in denen sich die Forschung mit diesen Enzymen beschäftigt, sind viele Mechanismen noch ungeklärt geblieben. So bleibt das Wissen über die Zusammenführung von ADAMs und deren Substraten, sowie der endgültige Aktivierungsmechanismus lückenhaft. Um unser Wissen über diese Fragen zu vervollständigen, wurde im Verlauf dieser Arbeit die Rolle der aSMase, *Lipid Rafts* und der PS- Externalisierung in Bezug auf ADAM10- und 17-Aktivität untersucht.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen den *Lipid Rafts* und ADAM17 wurde bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Ziel dieser Arbeit war anfänglich zu untersuchen, ob die exogene Zugabe von Ceramiden oder der aSMase das *Shedding* von bekannten ADAM-Substraten erhöht.

Weiterhin sollte mittels immunzytochemischer Anfärbungen in verschiedenen Zelllinien erforscht werden, ob eine Kolokalisierung von Ceramid-reichen-Regionen der Membran mit einer Ansammlung von ADAM-Enzymen nach aSMase-Stimulation zu beobachten ist.

Dass ADAMs unter anderem bei Entzündungsmechanismen die Permeabilität des Endothels regulieren, wurde bereits in der entsprechenden Literatur beschrieben. Deshalb sollte die Bildung von *Lipid Rafts*, induziert durch die aSMase, in Bezug auf ihren Einfluss auf die Permeabilität im Endothel untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte die Impedanz mittels des ICelligence-Geräts überprüft werden.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Phosphatidylserin-Externalisierung einen entscheidenden Mechanismus bei der ADAM17-Aktivierung darstellt. Deshalb sollte untersucht werden, ob die aSMase auch diesen Prozess beeinflusst.

Insgesamt war das Ziel, mehr über den Einfluss der Membranzusammensetzung und der potenziellen Bedeutung der SMase-Aktivität auf die Funktion der ADAMS zu lernen.

3. Material & Methoden

3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1. Geräte

Absaugpumpe, <i>BVC professional</i>	Vacuubrand GmbH & Co. KG, DE
Analysewaage	Sartorius AG, DE
Analysewaage, XS205 <i>DualRange</i>	Mettler-Toledo GmbH, CH
Brutschrank, HERA cell 150	Thermo Scientific Inc., US
Dispenser, Multipette®plus	Eppendorf AG, DE
Einkanalipetten, <i>Discovery comfort</i>	HTL lab solutions, PL
Gefrierschrank -20°C, <i>comfort</i>	Liebherr-International AG, CH
Gefrierschrank -80°C, Forma 9000 Series	Thermo Scientific Inc., US
Heizblock	Eppendorf AG, DE
Heizblock	HLC BioTech, DE
ICelligence System	ACEA Bioscience Inc. US
Inkubator, MaxQ™ 6000	Thermo Scientific Inc., US
Inkubator, Minitron	INFORS HT AG, CH
Kippschüttler, Roto-Shake Genie	Scientific Industries Inc., US
Kühlschrank, premium	Liebherr-International AG, CH
Lichtmikroskop, invers	Helmut Hund GmbH, DE
Magnetrührer, CB 162	Stuart, US

Material und Methoden

<i>Microplate-Fluorometer</i> , 96-well, Twinkle LB970	Berthold Technologies GmbH & CO. KG, DE
<i>Microplate-Reader</i> , 96-well, EL800™	BioTek Instruments GmbH, DE
<i>Microplate-Reader</i> , 96-well, FLx800™	BioTek Instruments GmbH, DE
<i>Microplate-Reader</i> , 96-well, Sunrise™	Tecan Group Ltd., CH
Multi-Funktions 3D Rotator, Grant bio PS-M3D	Grant Instruments, UK
Multi- <i>Imagingsystem</i> , Fusion FX7	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Multipipette, Transferpette® S-12	Brand GmbH & Co. KG, DE
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Netzgerät EV222	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Netzgerät EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
PerfectBlue™ <i>Semi Dry</i> Elektroblotter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
PerfectBlue™ <i>Tank</i> -Elektroblotter Web S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
pH-Meter pH211	HANNA Instruments Deutschland GmbH, DE
Rolltisch Stuart SRT6	Bibby Scientific Ltd, UK
Sterilwerkbank, Cytosafe-N 2004	Faster GmbH, IT
Sterilwerkbank	Köttermann GmbH & Co. KG, DE
<i>Tube Rotator</i> MACSmix™	Miltenyi Biotec GmbH, DE
Vac-Man® <i>Laboratory Vacuum Manifold</i>	Promega Corporation, US
Vortexer, Lab dancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE

Material und Methoden

Vortexer, Vortex <i>Genius</i> 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Wasseraufbereitungsanlage, TKA	TKA part of Thermo Fisher Scientific
Wasserbad, GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, DE
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, Centrifuge 5424	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, Heraeus™ Fresco™21	Thermo Scientific Inc., US
Zentrifuge, Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Scientific Inc., US
Mikroskop, Konfokales	Olympus K.K., JP

3.1.2. Chemikalien

1,10-Phenathrolin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Ac-DEVD-AMC	Enzo Life Sciences AG, DE
<i>ADAM fluorigenic substrate</i>	Enzo Life Sciences AG, DE
Amersham™ ECL Select™	GE Healthcare GmbH, US
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Annexin V-FITC, <i>human</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
BM <i>blue</i> POD <i>substrate</i>	F. Hoffmann-La Roche AG, CH
Bovines Serumalbumin (BSA)	GE Healthcare GmbH, US

Material und Methoden

Brij® 35, Polyoxyethylenlaurylether	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
BSA-Standard	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
CHAPS	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Complete, Protease-Inhibitor-Mix</i>	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
<i>Coomassie Plus™, Protein Assay Reagenz</i>	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Diazabicyclooctane (DABCO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Fetal calf serum (FCS)	GE Healthcare GmbH, US
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, DE

Material und Methoden

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck KGaA, DE
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Methanol (MeOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Mowiol® 4-88	Calbiochem part of Merck KGaA, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, DE
Para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Penicillin/Streptomycin, 100x	Life Technologies Co., US
Proteinmarker, <i>PageRuler™</i> , Plus/ Spectra LR	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Rotiphorese® Gel 30, Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Schwefelsäure, 2N Maßlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Triton X100	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Trypsin-EDTA, 10x	Life Technologies Co., US

Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
TurboFect™, Transfektionsreagenz	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

3.1.3. Stimulantien

Ionomycin	Calbiochem part of Merck KGaA, DE
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Sphingomyelinase von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Staurosporin, Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Thrombin	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
H ₂ O ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Imipramin	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Rekombinantes humanes TNF	PreproTech GmbH, DE

3.1.4. Inhibitoren

Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Marimastat	R&D Systems, Inc., US

3.1.5. Antikörper

E-Cadherin, <i>Clone</i> 36	BD Biosciences, US
N-Cadherin, <i>Clone</i> 32	BD Biosciences, US

3.1.6. Zellkulturmedien

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Life Technologies Co., US
HUVEC Endothelial Basal Medium	Promocell, DE

3.1.7. Kits

GeneJET plasmid Miniprep kit	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
ELISA TNFR1/TNFR1SF1A DuoSet, <i>human</i>	R&D Systems, Inc., US
Bradford Protein Assay	Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE

3.1.8. Software

Adobe Photoshop CS4 Extended	Adobe Systems GmbH, US
------------------------------	------------------------

Material und Methoden

Bio 1D v15.03b	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
Fusion v15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
Mendeley Desktop v1.11	Mendeley Ltd., UK
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2013	Microsoft Corp., US
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., US
FV10-ASW 2.1 <i>Viewer</i>	Olympus K.K., JP
VLC Media Player v2.15	VideoLan, FR
<i>Windows Media Player</i> v11	Microsoft Corp., US

3.1.9. Verbrauchsmaterialien

96- <i>well</i> -Platten (Flachboden)	Sarstedt AG & Co., DE
96- <i>well</i> -Platten (Rundboden)	Sarstedt AG & Co., DE
96- <i>well</i> -Platten (Schwarz)	Sarstedt AG & Co., DE
Autoklavierbeutel	BRAND GmbH AG & Co., DE
Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH, DE
<i>E-Plates</i>	ACEA Bioscience Inc. US
Einfrierbehälter, Nalgene <i>Mr. Frosty</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA GmbH, DE
Glaskolben, 1000 ml, 300 ml	Schott AG, DE
Injektionsnadeln, Sterican	B. Braun Melsung AG, DE
Injektionsspritzen, <i>inject</i>	B. Braun Melsung AG, DE
Mikroschraubröhre, 2 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Objektträger	Menzel-Gläser GmbH, DE
Parafilm	American National Can Company, USA
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Petrischale, Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Reaktionsgefäß, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Roti®-PVDF-Membran, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Spritzenfilter, 0,45 µm Porengröße	Sarstedt AG & Co., DE
Stickstofftank	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, DE

Material und Methoden

Whatmanpapier, 1,5 mm

Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

Zellkulturflaschen, 78 cm²

Sarstedt AG & Co., DE

Zellkulturplatten, 12-*well*

BD Bioscience GmbH (Falcon), DE

Zellkulturplatten, 6-*well*

Sarstedt AG & Co., DE

Zellkulturplatten, 96-*well*

BD Bioscience GmbH, DE

Zellkulturschalen, Ø 10 cm

Sarstedt AG & Co., DE

Zellschaber, 16 cm, 25 cm

Sarstedt AG & Co., DE

Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml

Sarstedt AG & Co., DE

3.2. Plasmide

Tabelle 2: verwendete Plasmide

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

3.3. Antikörper

Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Immunisierte Spezies	Verdünnung
Ceramid Antikörper	Enzo	Maus	1:50

Material und Methoden

<i>Human TACE/ADAM17 Ectodomain Antibody MAb9301</i>	R&D	Maus	1:50
Caveolin-1 N20	Santa Cruz	Kaninchen	1:50

Tabelle 4: verwendete sekundäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Kopplung	Verdünnung
Esel Anti-Maus Alexa Fluor 594	Invitrogen	Alexa Fluor® 594	1:800
Esel Anti-Maus Alexa Fluor 488	Invitrogen	Alexa Fluor® 488	1:800
Esel Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Invitrogen	Alexa Fluor® 594	1:800

Tabelle 5: weitere *Staining*-Verfahren

Bezeichnung	Firma	Isoliert aus	Verdünnung
Choleratoxin B <i>Alexa Red</i>	Zur Verfügung gestellt vom Kooperationspartner aus dem Uniklinikum Mainz	Vibrio cholerae	1:3000
Choleratoxin B 488	Zur Verfügung gestellt vom Kooperationspartner aus dem Uniklinikum Mainz	Vibrio cholerae	1:5000

3.5. Puffer und Lösungen

Kulturmedium COS7-Zellen	10 % <i>Fetal Calf Serum</i> (FCS) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in <i>Dulbeccos`s Modified Eagle Medium</i> (DMEM)
Kulturmedium <i>HUVEC</i>	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin Supplement Mix Promocell® In <i>Endothelial Cell Basal Medium</i> (ECBM)
<i>Only</i> -Medium COS7-Zellen	<i>Dulbeccos`s Modified Eagle Medium</i> (DMEM)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Einfriermedium <i>HUVEC</i>	Kulturmedium <i>HUVEC</i> + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) + 20 % FCS
Kollagen-Lösung Endkonzentration	20 µg/ml <i>Collagen (rat tail)</i> in 0,02 M HCl
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
10 x AP-Puffer pH 9,5	100 mM NaCl 100 mM Tris 20 mM MgCl ₂ steril filtriert
AP-Substrat	p-Nitrophenyl Phosphat Tabletten SIGMA FAST™

Material und Methoden

	1 mg/ml = 1 Tablette in 5 ml AP-Puffer
SDS-Probenpuffer	124 mM Tris 2% SDS 1,09 M Glycin 1 mM EDTA
Elektrophoresepuffer pH 8,8	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % SDS
Trenngelpuffer pH8,8	1,5 M Tris 0,4 % SDS
APS	10 % APS
SDS-Probenpuffer	10 % Glycerin 125 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau
Rothipherese Gel 30 Roth	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
Transfer-Puffer pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % Methanol
Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBST
TBS-Puffer pH 7,4	20 mM Tris 1,17 M NaCl 10 mM EDTA
TBST-Puffer	20 mM Tris 1,17 M NaCl 10 mM EDTA 0,1 % Tween-20

Material und Methoden

Transfektionsansatz	0,5 µg Plasmid 100 µl <i>Only</i> -Medium 1 µl <i>TurboFect</i> (Thermo Scientific®)
Stripping-Buffer pH 6,7	62,5 mM Tris 20 % SDS + 0,7 % 2- Mercaptoethanol
10 x Annexinpuffer pH 7,4	0,1 M HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂
Annexin V <i>from human placenta</i>	1:20 in 1x Annexinpuffer Sigma-Aldrich®
Bovines Serumalbumin (BSA)-Lösung	3 % BSA 1 x PBS
<i>Blocking</i> -Puffer AP-Assay	BSA-Lösung 0,12 % Glycin
Mowiol-Gemisch/Eindeck-Medium	1 ml Mowiol-Lösung 1 µl DAPI (1mg/ml) 100 µl DABCO (200 ng/ml in PBS)
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
Zell-Lyse-Puffer für Western Blots	5 mM Tris 1 mM EGTA 250 mM Saccharose 1 % TritonX 100 10 mM 1,10-Phenantrolin* 1x <i>Complete protease inhibitor mix</i> (Roche)* 1x <i>PhosStop phosphatase inhibitor mix</i> (Roche)*

Zell-Lyse-Puffer für AP-Assay	2,5 % TritonX 100 1 mM EDTA 10 mM 1-10 Phenanthrolin*
-------------------------------	---

3.6. Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank und mit autoklaviertem oder desinfiziertem Material durchgeführt.

3.6.1. Zelllinien

COS7-Zellen

Diese Zelllinie besteht aus adhärent wachsenden Fibroblasten der Niere aus der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die mit dem SV-40 Virus transformiert wurden.

HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*)

Diese adhärent wachsenden, primären Endothelzellen stammen aus der menschlichen Nabelschnurvene.

3.6.2. Kultivierung

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und bei 70-80 % Luftfeuchtigkeit im Standardinkubator mit Wachstumsmedium kultiviert. Dabei wurden COS7-Zellen in Zellkulturschalen und HUVECs in kollagenisierten Zellkulturflaschen, 75 cm² herangezogen.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-100 % wurde das Medium abgesogen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und vom Boden abgelöst. Hierzu wurden die Zellen mit 4-5 ml 1x Trypsin-EDTA für die HUVECs und 2 ml für die COS7-Zellen versetzt und für 3-4 Minuten im Standardinkubator bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde im Lichtmikroskop überprüft. Zum Beenden der Trypsinisierungsreaktion

wurden die Zellen mit Wachstumsmedium, welches FCS enthielt, resuspendiert und anschließend für weitere Versuche genutzt, oder im Verhältnis 1:2 oder 1:3 in neuen Kulturgefäßen kultiviert. Wenn mit den Zellen eine Annexin V-FITC- bzw. eine immunozytochemische Färbung durchgeführt werden sollte, wurden die *Well*-Platten mit *Cover Slips* versehen, welche vor dem Einbringen in die *Well*-Platte abgeflammt wurden. Bei *HUVECs* wurden auch die *Cover Slips*, wie im Abschnitt 3.6.6 beschrieben, kollagenisiert. Das Medium wurde 24 Stunden nach dem Splitten gewechselt. Alle 48 Stunden wurden weitere Medienwechsel durchgeführt.

3.6.3. Kryokonservierung

Zur Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) konserviert.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-100 % mit PBS gewaschen und durch Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst, nachfolgend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, in ein Falcon umgefüllt und bei 300 g für 5 Minuten sedimentiert. Zu dem entstandenen Pellet wurden 600 µl Kulturmedium mit 10 % DMSO und 20 % FCS gegeben und diese Zellsuspension dann in ein 1,5 ml Kryoröhrchen abgefüllt. Zum langsamen Einfrieren wurden die Zellen in einen Isopropanol-Behälter (Nalgene®, *Mr. Frosty*) gegeben und für 2 Tage bei -80°C gelagert. Zur endgültigen Lagerung wurden die Zellen schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

3.6.4. Auftauen von *HUVECS*

Nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff wurde das Kryoröhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Zellmedium wurde vor Verwendung bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Wachstumsflächen der Zellkulturflaschen wurden vor der Kultivierung der Zellen kollagenisiert, wie im Abschnitt 3.6.6 beschrieben. Sofort nach dem Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen mit 1 ml Zellsuspension mit 30 ml *Endothelial Cell Growth Medium* (ECGM) in einem 50 ml Röhrchen gemischt. Je die Hälfte dieser Vorverdünnung wurde auf eine Zellkulturflasche pipettiert und im Standardinkubator kultiviert.

3.6.5. Stimulationsversuche

<u>Stimulantien/Inhibitoren</u>	<u>Konzentration</u>
Saure Sphingomyelinase (aSMase)	0,76 U/ml bzw. 0,1 U/ml
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	10 mM
Marimastat (MM)	10 µM
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	200 ng/ml
Ionomycin	0,5 µM
Thrombin	5 U/ml
Imipramin	10 µM
H₂O₂	0,5 %
Basalmedium COS7-Zellen	DMEM Medium ohne weitere Zusätze

Kurz vor der Stimulation wurde bei den COS7-Zellen ein Mediumwechsel auf DMEM Basalmedium ohne weitere Zusätze vorgenommen. Bei den immunzytochemischen Färbungen der *HUVECs* wurde das Medium zum Kulturmedium gewechselt, da ein Wechsel auf das Basalmedium die Zellen stresst und damit die Bilder verfälscht.

Die Stimulantien wurden wie im Ergebnisteil angegeben für entsprechende Zeit auf die Zellen gegeben. Um die Beeinflussung der aSMase auf die ADAMs zu testen, wurde der Stimulus in der entsprechenden Vorverdünnung im Kulturmedium für *HUVECs* eingesetzt.

PMA ist ein Proteinkinase C-Aktivator, welcher u.a. die aSMase aktiviert und somit als Positivkontrolle genutzt wurde. PMA wurde zur gleichen Zeit wie die anderen Stimulantien auf die Zellen gegeben. Der Metalloproteinaseinhibitor Marimastat wurde 15 Minuten vor den Stimulantien eingesetzt, um die Wirkung der ADAMs zu inhibieren. Um die kalziumabhängigen Phosphatidylserin-Externalisierungen zu inhibieren, wurde

als weiterer Inhibitor ebenfalls 15 Minuten vor der Stimulation der Ca^{2+} -Chelator EGTA eingesetzt.

Außer bei den immunzytochemischen Färbungen der *HUVECs* wurde das Medium vor Einsatz der Inhibitoren, bzw. der Stimulantien, auf zusatzfreies Basalmedium gewechselt.

3.6.6. Kollagenisierung von Zellgefäßen

Vor der Kultivierung von *HUVECs* wurden die Wachstumsflächen der Zellkulturgefäße mit Kollagen beschichtet. Hierzu wurde Kollagen-Lösung im Verhältnis 1:100 mit PBS gemischt und für mindestens 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurde das Kollagen abgesaugt und die kollagenisierte Fläche konnte für 5-10 Minuten an der Luft trocknen. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Für immunzytochemische Färbungen von *HUVECs* wurden *Cover Slips*, wie beschrieben, ebenfalls kollagenisiert.

3.7. Herstellung von Zelllysaten

Nach der Stimulation wurde der Überstand abgenommen, in 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäße pipettiert und bei 400 g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reagenzgefäße überführt und im -20°C Gefrierschrank gelagert.

Auf das im Eppendorf-Reagenzgefäß verbliebene Zellpellet wurde 50 µl Lysepuffer gegeben, auf die Zellen in den *Wells* 150 µl Lysepuffer. Die Zellen, in den *Well*-Platten und in den mit Lysepuffer versehenen Eppendorf-Reagenzgefäßen, wurden 30 Minuten im Kühlschrank lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen anschließend von den *Well*-Platten abgeschabt und in die Eppendorf-Reagenzgefäße mit den schon enthaltenen Pellets pipettiert. Bei 12000 rpm, 4°C wurden die Eppendorf-Reagenzgefäße nun 5 Minuten lang zentrifugiert. Der neu entstandene Überstand wurde in neue Eppendorf-Reagenzgefäße überführt.

3.8. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Gesamtproteinkonzentration von Lysaten messen zu können, wurde eine Bestimmung nach Bradford genutzt. Dazu wurden in eine 96-*Well*-Platte pro *Well* 200 µl Bradford-Reagenz pipettiert. Zum Bradford-Reagenz wurden dann je 1 µl der Proben hinzugefügt. Ebenfalls in Doppelwerten wurden vier 96-*Wells* mit je 1 µl Lysepuffer versehen, der später als Leerwert genutzt wurde.

Schließlich wurden die *Well*-Platten bei einer Absorption von 595 nm gemessen.

Je nachdem wie hoch die Proteinmenge war, wurden 50 µg, 25 µg oder 20 µg in neue Eppendorf-Reagenzgefäße überführt und mit 1x SDS-Probenpuffer versehen. Die Menge des SDS-Probenpuffers richtete sich nach der höchsten gemessenen Proteinmenge und wurde im Verhältnis 1:5 zu den Proben gegeben. Um Disulfid-Brücken zu trennen, befand sich im SDS-Probenpuffer Dithiothreitol (DTT). Vor der Befüllung der Probentaschen wurden die Proben für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren.

3.9. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde das von Laemmli beschriebene System genutzt (Laemmli 1970).

Vor der Nutzung wurden die Glasplatten, sowie die *Spacer* und Kämme mit 70 % Ethanol gereinigt und in der Gelstation aufgebaut.

Kurz vor der Gelelektrophorese wurde das 7,5 %-ige Trenngel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und bis zur Auspolymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und das 4,5 %-ige Sammelgel auf das feste Trenngel pipettiert.

Die Kammern mit den unterschiedlichen Polen wurden mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die mit SDS-Probenpuffer versehenen Proben wurden 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und in die Geltaschen pipettiert. Um eine Proteinleiter zur Größenermittlung zu erhalten, wurde in die jeweils erste Spur 5 µl der Proteingrößenstandard *PageRuler™* Plus von Thermo Scientific aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 90 V über 2,5 Stunden vollführt.

Tabelle 6: Gelzusammensetzung (die Angaben beziehen sich auf ein Gel)

	Trenngel 7,5 %	Sammelgel 4,5 %
Rothiphoese Gel 30	2,33 ml	1,67 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	
Sammelgelpuffer		2,5 ml
H₂O	5,03 ml	5,79 ml
APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30µl

3.10. Western Blot

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine immunologisch zu quantifizieren, wurden die Proteine von dem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran mittels *Tank-Blot* übertragen.

Vor dem Transfer wurden das Filterpapier und die PVDF-Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde kurz vor dem Gebrauch in Methanol aktiviert und mit dem Gel zwischen vier Filterpapierblättern, die vorher in Transferpuffer äquilibriert wurden, und zwei Fasermatten in den *Tank-Blot* eingesetzt. Die Membran befand sich auf Seiten der Anode und das Gel auf der Seite der Kathode.

Der komplette Apparat wurde vollständig mit Transfer-Puffer gefüllt und die Proteine dann bei 150 mA für 2 Stunden transferiert.

3.10.1. Immunologische Detektion von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden mit Hilfe der Blockierlösung unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde oder bei 4°C über Nacht auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Tabelle 3), welcher in 5 % Milchpulver verdünnt wurde, inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Zur Detektion der Primärantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundär-Antikörper eingesetzt. Dieser wurde in TBST gelöst und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend wurde wiederholt dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die mit den Antikörpern verbundenen Proteine wurden mittels des Peroxidase-Substrates ECL *Advanced* und der Fusion FX Chemolumineszenzkamera detektiert. Zur Quantifizierung wurde das Programm Bio1D von PEQLAB verwendet.

3.10.2. Strippen von PVDF Membranen

Um auf einer PVDF-Membran mehrere Proteine mit verschiedenen Antikörpern detektieren zu können, wurden die primären und sekundären Antikörper entfernt. Diesen Vorgang nennt man *Strippen*. Die PVDF-Membran wurde für 30-45 Minuten im *Stripping*-Puffer bei 65°C inkubiert. Um den Ablöseprozess zu beenden wurde die PVDF-Membran gründlich mit TBST gewaschen und anschließend für ca. eine Stunde in 5 % *Blocking*-Lösung inkubiert.

3.11. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Zur Bestimmung der Konzentration spezieller ADAM-Substrate im Überstand wurden folgende ELISAs genutzt:

Human sTNF RI/TNFR1SF1A DuoSet R&D

Human sVEGF R2/KDR DuoSet R&D

Human Total VE-Cadherin DuoSet IC R&D

Human CXCL16 DuoSet R&D

Alle *Kits* in der oben aufgeführten Liste wurden mit der Hälfte des empfohlenen Volumens, wie vom Hersteller beschrieben, verwendet.

Dieses Verfahren wird zum Bestimmen der Proteinmengen genutzt. Im ersten Schritt wird die beschichtete Fläche mit einem monoklonalen Antikörper versehen. Dieser richtet sich gegen ein Epitop an dem zu detektierenden Protein. Im nächsten Schritt bindet ein mit Biotin verbundener polyklonaler Antikörper an verschiedene Epitope des bereits mit dem ersten monoklonalen Antikörper verbundenen Proteins. Die messbare Verfärbung entsteht durch die Zugabe von mit Meerrettichperoxidase konjugierten Streptavidin. Dieses Streptavidin bindet an Biotin und die daran gebundene Meerrettichperoxidase wandelt sein zusätzlich dazugegebenes farbloses Substrat in einen Farbstoff um. Die Extinktion kann nun ermittelt werden. Durch eine parallel durchgeführte Standardreihe konnte dann der Proteingehalt ermittelt werden.

3.12. Alkalische Phosphatase Assay

Beim AP-Assay wurde das ADAM17-Substrat TGF- α und das ADAM10-Substrat BTC in COS7-Zellen transfiziert. An das produzierte Substrat ist die alkalische Phosphatase gebunden. Wird das Substrat nun geschnitten, gelangt der mit der alkalischen Phosphatase verbundene Teil in den Überstand und kann durch Zugabe eines AP-Substrates detektiert werden.

Nach der Transfektion der COS7-Zellen wie im Abschnitt 3.12.1 beschrieben und der dreistündigen Stimulation wie im Abschnitt 3.6.5 erklärt, wurden die Zelllysate wie in 3.7 beschrieben, gewonnen, in einer 1:10 Verdünnung mit 1 x alkalische Phosphatase (AP)-Puffer gemischt und 100 µl davon, genauso wie 100 µl Überstände in Tripelwerten in eine 96-*Well*-Platten pipettiert.

100 µl AP-Substrat wurde nun zu jedem *Well* hinzugeführt. Die 96-*Well*-Platten wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt bis eine gelbe Verfärbung zu beobachten war.

Anschließend wurden die Proben bei 405 nm Extinktion gemessen.

3.12.1. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die COS7-Zellen wurden, wie im Abschnitt Kultivierung 3.6.2 beschrieben, gesplittet. 80 µl der Zellsuspension wurden pro *Well* in eine 12-*Well*-Platte mit 1 ml Kulturmedium pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden durch das Verfahren der Lipofektion die Transfektionsvektoren eingebracht. Die Zellen wurden mit BTC-AP oder TGFα-AP transfiziert. Hierzu wurde zunächst ein Transfektionsansatz hergestellt. 0,5 µg Plasmid wurde mit 100 µl *Only*-Medium pro *Well* gemixt und anschließend mit 1 µl TurboFect gründlich gemischt. Dieser Ansatz wurde für 20 Minuten ruhend gelassen.

Auf die Zellen in 500 µl *Only*-Medium wurde der Transfektionsansatz langsam getropft. Nach 6-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel mit Kulturmedium vollzogen.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen für die Stimulationsversuche genutzt.

3.13. Annexin V-FITC-Färbungen

Nach der Beendigung der Stimulationszeit wurden die *Cover Slips* für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Annexin V-FITC im Dunkeln gefärbt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Annexinpuffer gewaschen und für 15 Minuten im Dunkeln mit 3 % Paraformaldehyd fixiert. Vor dem Eindecken der *Cover Slips* auf Objektträger

mit 5 µl des Mowiol-Gemisches wurden die Zellen einmal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Nach einer Stunde Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Deckgläser abgedunkelt bei 4°C gelagert.

3.14. Immunozytochemische Färbung (ICC)

Die Zellen wurden auf *Cover Slips*, wie in 3.6.2 beschrieben, ausgesät.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden vor Licht geschützt, mit 3 % Paraformaldehyd 15 Minuten fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde mit dem *Blocking-Puffer* für 15 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die entsprechenden primären Antikörper aus Tabelle 3 wurden im entsprechenden Verhältnis mit der BSA-Lösung gemischt. Mit jeweils 30 µl pro *Cover Slip* wurden die Zellen abgedunkelt und auf Parafilm über Nacht bei 4 °C gefärbt. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden am Rand der Färbekammer feuchte Tücher platziert. Am folgenden Tag wurden die *Cover Slips* zweimal mit PBS gewaschen.

Die in Tabelle 4 aufgeführten Sekundärantikörper wurden mit der BSA-Lösung gemischt. Pro *Cover Slip* wurden 30 µl genutzt, um die Zellen eine Stunde lang bei Raumtemperatur abgedunkelt zu färben. Nach je einmaligem Waschen mit PBS und danach destilliertem Wasser wurden die *Cover Slips* mit 5 µl des Mowiol-Gemischs auf Objektträgern eingedeckt und nach einstündiger Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur zum Trocknen bei 4 °C aufbewahrt. Die auf den Objektträgern fixierten und gefärbten Zellen wurden mittels eines konfokalen Mikroskops der Firma Olympus K.K., JP beurteilt und fotografiert.

3.15. Impedanzmessung mit dem ICelligence System

Saure Sphingomyelinase (aSMase)	0,1 U/ml
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	10 mM
Marimastat (MM)	10 μ M
Thrombin	5 U/ml

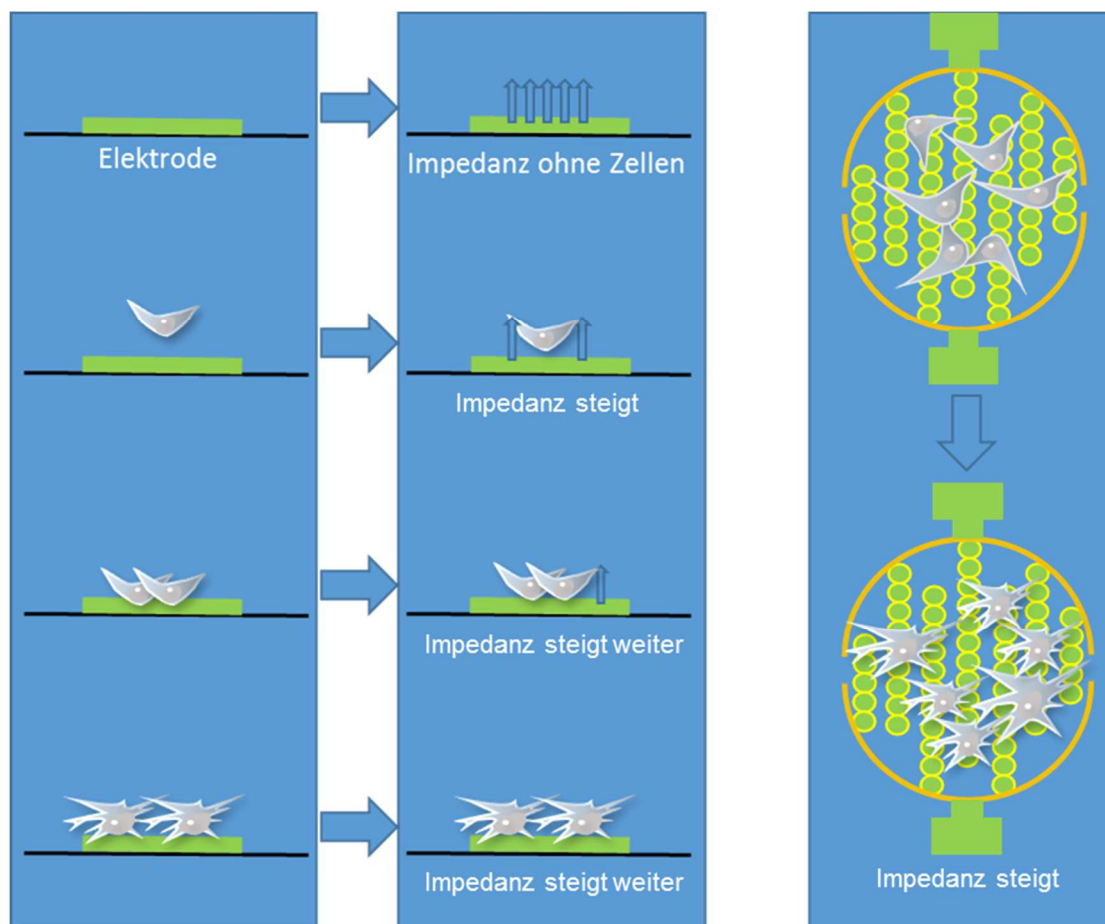


Abbildung 5: Schematisch Darstellung der Impedanzmessung

Die Impedanz, auch Wechselstromwiderstand genannt, gibt das Verhältnis von elektrischer Spannung zu aufgenommenem Strom an. Eine unbesetzte Elektrode hat eine geringe Impedanz. Je bedeckter die Elektrode ist, desto höher ist die Impedanz. Dies kann durch Erhöhung der Zellzahl oder bei sich ausbreitendem Verhalten der Zellen, wie zum Beispiel, wenn die Zellen sich abflachen oder neue Fortsätze bilden der Fall sein.

Das ICelligence System von ACEA Bioscience, Inc. ist ein mikroelektronisches Biosensor System, welches die Zellreaktionen misst, ohne die Zellen zu beeinflussen.

Die Kulturplatten bzw. *E-Plates* sind mit mikroelektronischen Goldelektroden versehen. Diese bilden, wie in Abbildung 3 gezeigt, ein elektronisches Netz. Die auf dem Boden wachsenden Zellen, in diesem Fall *HUVECs*, unterbrechen den Stromfluss. Reagieren die Zellen auf z.B. Stimuli, verändert sich der Stromfluss entsprechend. Die Impedanz steigt bei steigender Belegung der Elektroden. So können bestimmte Reaktionen wie Adhäsion oder das Abflachen der Zellen beobachtet und gemessen werden.

Die 8-Well *E-Plates* wurden wie im Abschnitt 3.6.6 beschrieben, kollagenisiert. Um einen Leerwert für den Versuch zu produzieren, wurde jedes *Well* mit 200 µl Kulturmedium versehen und anschließend mit dem ICelligence gemessen und gespeichert. Um genauere Aussagen treffen zu können wurden pro *Well* 40.000 Zellen, wie im Abschnitt 3.6.2 erklärt, ausgesät. Um den Zellen Zeit zum Absetzen auf dem Plattenboden zu geben, wurde 30 Minuten gewartet bevor die *Wells* in das System überführt wurden.

Nach einer 24-stündigen Ruhe- und Wachstumsphase wurden die entsprechenden Stimuli und Inhibitoren hinzugegeben. Das Volumen der *Wells* betrug nach dem Auftragen 400 µl.

3.16. Reaktive-Sauerstoffspezies-Detektion

2',7' –dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)	25 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Saure Sphingomyelinase (aSMase)	0,1 U/ml
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	10 mM
Marimastat (MM)	10 µM
Imipramin	10 µM
H₂O₂	0,5 %
Rh TNFα (rekombinantes humanes)	10 ng/ml

Als reaktive Sauerstoffspezies (*englisch: reactive oxygen species (ROS)*) werden schädliche Sauerstoffmoleküle bezeichnet, die bei Stressreaktionen eine Rolle spielen.

Der DCFDA-Farbstoff tritt durch die Zellmembran ohne weitere Hilfsmittel ein und kann so intrazellulär ROS aufzeigen.

Eine abgedunkelte 96-Well Platte wurde wie im Abschnitt 3.6.6 kollagenisiert und mit 15.000 Zellen pro Well wie im Abschnitt „Kultivierung“ aufgezeigt, besät. Die Zellen wurden 24 Stunden ruhen und wachsen gelassen.

Der DCFDA-Farbstoff wurde kurz vor seinem Einsatz in DMSO gelöst. Die Zellen wurden in 100 µl ECGM für 30 Minuten bei 37 °C mit dem DCFDA-Farbstoff beladen. Anschließend wurde ein Mediumwechsel zum Kulturmedium durchgeführt und die Stimulantien aufgetragen. Die Fluoreszenz wurde alle 30 Minuten bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm für 4 Stunden und nach 24 Stunden

gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Zellen abgedunkelt im Brutschrank aufbewahrt.

3.17. Statistische Auswertung

Alle angegebenen Werte wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Falls nicht anders angegeben, wurde der Standardfehler aus drei oder mehr unabhängigen Versuchen errechnet. Durch die Software GraphPad Prism 5 und 6 wurde eine *one-way ANOVA* und ein Bonferroni *multiple comparison test* für die Varianzanalyse errechnet. Als statistisch signifikant gilt ein P-Wert von $\leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Moduliert die Sphingomyelinase (SMase) die ADAM10 und ADAM17 *Shedding*-Aktivität?

Um diese Frage zu klären, wurden verschiedene Aspekte betrachtet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Reaktion von *HUVECs* auf die Stimulation mit verschiedenen Ceramiden und die damit möglicherweise veränderte *Shedding*-Aktivität von ADAMs untersucht. Im nächsten Abschnitt wurde die Reaktion verschiedener Zelltypen nach aSMase-Stimulation im AP-Assay und im ELISA überprüft. Um die Funktion der ADAM-Aktivierung über aSMase besser verstehen zu können, folgen im anschließenden Teil ICC-Färbungen und Bilder der Anfärbung von Phosphatidylserin (PS) mittels Annexin V-FITC. Im vorletzten Teil wurde die Veränderung der Permeabilität im Endothel nach aSMase-Zugabe gemessen. Als Abschluss wird durch das Anfärben von reaktiven Sauerstoffspezies ein Ausblick auf eine weitere Möglichkeit der ADAM-Aktivierung gezeigt.

4.2. Kurzkettige Ceramide haben keinen Einfluss auf die ADAM-Aktivität

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, lagert sich ADAM17 in Ceramid-reichen *Lipid Rafts* an. Um Veränderungen der *Shedding*-Aktivität von bekannten ADAM10- und -17-Substraten auf die Zugabe von *Lipid Raft*-ähnlichen Ceramiden zu testen, wurden *HUVECs* mit Ceramid-C6 (C6) und dem Enzym aSMase, welches aus Sphingomyelin Ceramid bildet, stimuliert. Unter physiologischen Bedingungen weisen Ceramide meist eine Länge von mindestens 18 Kohlenstoffatomen auf. Jedoch sind so lange Verbindungen durch exogene Zugabe schwierig oder selten in die Membran einzufügen. Deshalb wurden für erste Versuche das kürzere Ceramid C6 gewählt.

Ein bekanntes Substrat von ADAM17 ist der TNFR1 (Bell et al. 2007; Reddy et al. 2000). Wie der TNFR1-ELISA zeigt (Abbildung 3), erhöht exogenes C6-Ceramid nicht

Ergebnisse

das TNFR1-*Shedding*, wohingegen die Stimulation mit aSMase zu einer signifikanten Erhöhung der TNFR1 Freisetzung führte, welche durch den Metalloprotease-Inhibitor Marimastat geblockt werden konnte.

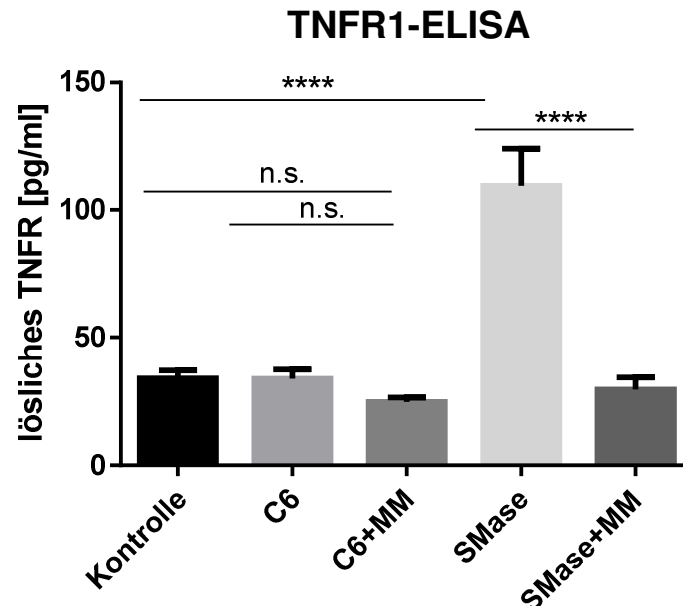


Abbildung 3: Ceramid C6 erhöht nicht das *Shedding* des TNF α -Rezeptors

HUVECs wurden nach einer Vorinkubation von 15 Minuten mit 10 μ M Marimastat (MM) für eine Stunde mit 0,76 U/ml aSMase bzw. 200 μ M C6-Ceramid in *Only-Medium* stimuliert. Die Überstände wurden für einen TNFR1-ELISA ($n = 4$) genutzt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Stimulation genutzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (gemäß ANOVA und Bonferroni *Multiple Comparison Test*).

Da das Ergebnis des TNFR1-ELISAs zeigt, dass exogen zugegebenes Ceramid-C6 nicht das *Shedding* des TNFR1 erhöht, wurde ein weiteres ADAM17-spezifisches Substrat, TGF α , durch AP-Assays in COS7-Zellen getestet. Gleichzeitig wurden Veränderungen am *Shedding* eines ADAM10-spezifischen Substrats, Betacellulin (BTC), untersucht. Auch diese Versuche zeigten, dass das Ceramid-C6 die *Shedding*-Aktivität von ADAM10 und -17 nicht beeinflusst. Wohingegen die exogen hinzugefügte aSMase das *Shedding* beider Substrate deutlich erhöhte (Abbildung 4). Dies ließ sich durch Marimastat blockieren.

Ergebnisse

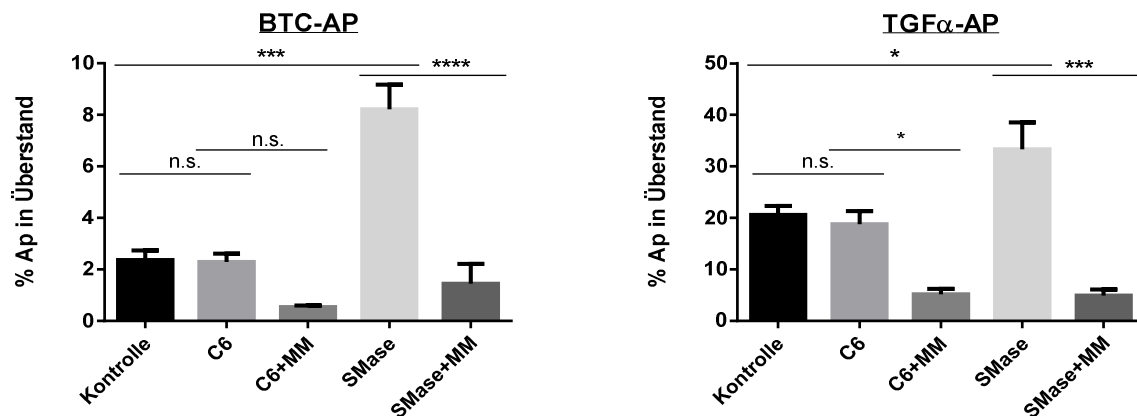


Abbildung 4: Ceramid-C6 erhöht im Gegensatz zur aSMase nicht das *Shedding* von endogenem BTC und TGF- α im AP-Assay

COS7-Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem TGF- α bzw. BTC für 24 Stunden transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für eine Stunde in *Only*-Medium mit 0,76 U/ml aSMase und 200 μ M C6-Ceramid stimuliert. Der allgemeine Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (10 μ M) wurde jeweils 15 Minuten vor der Stimulation hinzugegeben. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Aktivität wurde mittels alkalischem Phosphatase-Assay ermittelt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von TGF α $n = 3$ und BTC $n = 3$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant (gemäß ANOVA und Bonferroni *Multiple Comparison Test*).

Um ein zweites bekanntes ADAM10-Substrat zu testen, wurde ein VE-Cadherin-gefärbter Western Blot von Ceramid-C6 und aSMase-stimulierten *HUVECs* angefertigt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 5** dargestellt. Der VE-Cadherin-Antikörper bindet an den C-terminalen, also am membranständigen Teil des Proteins. Das ungeschnittene Protein zeigte in der Gelelektrophorese eine Größe von 130 kDa. Bekanntermaßen schneidet ADAM10 VE-Cadherin (Schulz et al. 2008), sodass ein C-terminales Fragment (CTF) entsteht, das ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa aufweist. **Abbildung 5** zeigt das durch ADAM10 geschnittene VE-Cadherin. Wie zu sehen, führte die Stimulation mit C6 nicht zu einem deutlich erhöhten *Shedding*, welches sich nicht durch Marimastat vermindern ließ. Die aSMase erhöhte das *Shedding* deutlicher, welches sich durch Marimastat inhibieren ließ.

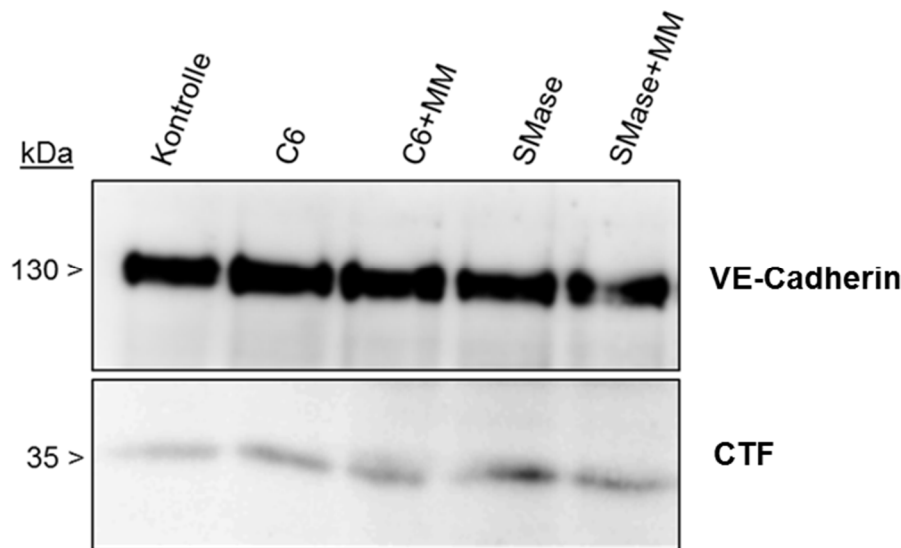


Abbildung 5: Ceramid-C6 erhöht nicht das VE-Cadherin-Shedding

Die *HUVECs* wurden für eine Stunde in *Only-Medium* mit 0,76 U/ml aSMase und 200 μ M C6 (C6-Ceramid) stimuliert. 15 Minuten vor der Stimulation wurden 10 μ M MM (Marimastat) zu den Zellen gegeben. Das Lysat wurde für die Western Blot-Analyse genutzt. Der obere Teil der Abbildung zeigt das Vollängenprotein mit 130 kDa, der untere Teil das C-terminale Fragment (CTF) nach dem *Shedding* durch ADAM10.

4.3. Langkettige Ceramide beeinflussen die Aktivität von ADAM10 und -17 nicht

Da die Versuche mit dem kurzen Ceramid-C6 keine gesteigerte Aktivität von ADAM10 und -17 bewirkten, wurden erneute VE-Cadherin Western Blots von *HUVECs* angefertigt, welche mit längerkettigen Ceramiden stimuliert wurden. Nervonic- (Nerv) und Lignoceric- (Ligno) Ceramide besitzen beide 24 Kohlenstoffatome und haben somit die Größe von Ceramiden, welche in physiologischen Ceramid-reichen *Lipid Rafts* zu finden sind.

Um zu verhindern, dass das C-terminale Fragment von VE-Cadherin durch die membranständige γ -Sekretase weiter prozessiert und somit nicht mehr detektierbar wäre, wurden die Zellen in der Nacht vor der Stimulation mit einem γ -Sekretase-Inhibitor vorinkubiert. Abbildung 6 zeigt, dass keines der genutzten Ceramide das *Shedding* von VE-Cadherin beeinflusst. Auch eine Inhibition mit Marimastat zeigte keine Effekte.

Ergebnisse

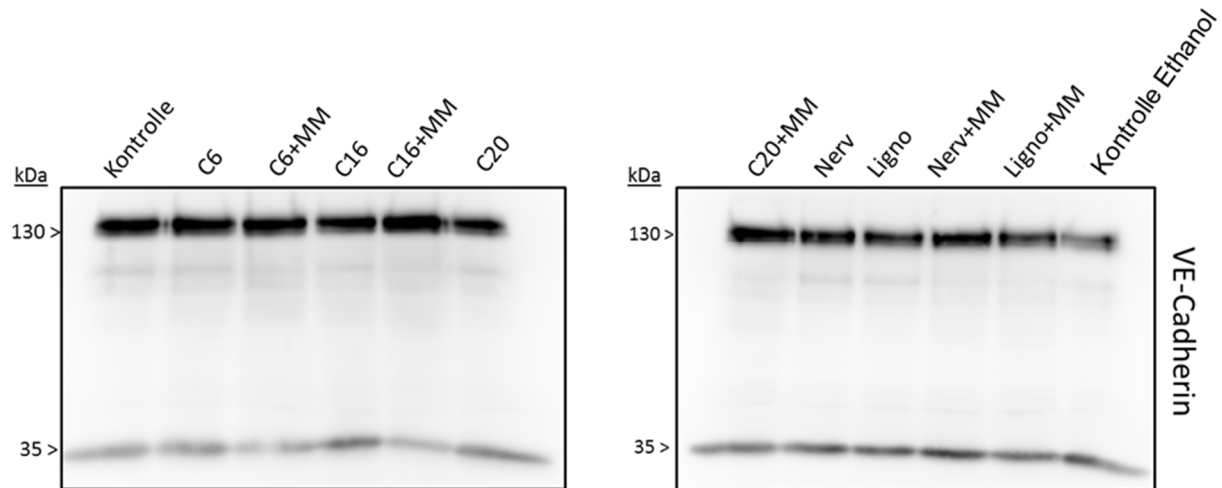


Abbildung 6: Exogene Ceramide erhöhen unabhängig von ihrer Länge nicht das VE-Cadherin-Shedding

Die HUVECs wurden über Nacht mit 1 μ M γ -Sekretase-Inhibitor vorinkubiert. Die Zellen wurden mit den Ceramiden für 3 Stunden in *Only-Medium* stimuliert. 15 Minuten vor der Stimulation wurden 10 μ M MM (Marimastat) zu den gekennzeichneten Proben gegeben. Die Stimulantien wurden in folgenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben. C6: C6-Ceramid 30 μ M, C16: C16-Ceramid 30 μ M, C20: C20-Ceramid: 30 μ M, Nerv: Nervonic-Ceramid 30 μ M, Ligno: 30 μ M. C16, C20, Nerv und Ligno waren in Ethanol gelöst, weshalb es als Kontrolle genutzt wurde. Das Lysat wurde für die *Western Blot*-Analyse genutzt. Für die in „Abbildung 6“ abgebildeten Western Blots wurde ein VE-Cadherin spezifischer Antikörper verwendet.

Die Reaktion von ADAM17 auf die exogen zugegebenen langkettigen Ceramide, wurde mittels TNFR1-ELISA überprüft. Auch hier konnte kein erhöhtes *Shedding* gefunden werden (Abbildung 7).

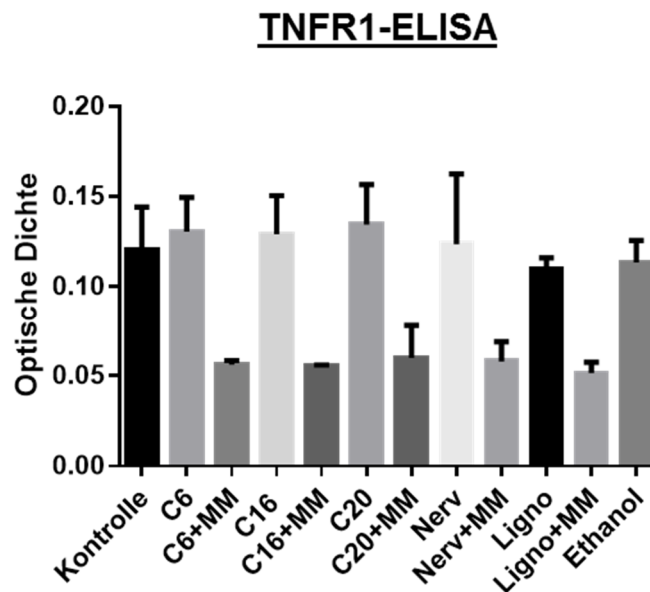


Abbildung 7: Exogene Ceramide erhöhen nicht das TNFR1-Shedding

Die HUVECs wurden mit den Ceramiden für 3 Stunden in *Only-Medium* inkubiert. 15 Minuten vor der Stimulation wurden 10 μ M MM zu den gekennzeichneten Proben gegeben. Die Stimulantien wurden in folgenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben. C6: C6-Ceramid 30 μ M, C16: C16-Ceramid 30 μ M, C20: C20-Ceramid: 30 μ M, Nerv: Nervonic-Ceramid 30 μ M, Ligno: 30 μ M. C16, C20, Nerv und Ligno waren in Ethanol gelöst, weshalb Ethanol als Kontrolle genutzt wurde. Für den ELISA wurden Überstände genutzt n= 3. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM. *p<0,05, **p<0.01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (gemäß ANOVA und Bonferroni *Multiple Comparision Test*).

Da durch die Stimulationsversuche mit den Ceramiden keine Erhöhung der *Shedding*-Aktivität von ADAM10 und-17 gezeigt werden konnte, jedoch aber mit der Ceramid-produzierenden aSMase eine Aktivitätssteigerung zu beobachten war, könnte man vermuten, dass die exogen hinzugefügten Ceramide nicht in die Zellmembran diffundiert sind. Auf Grund der bisher gezeigten Ergebnisse wurde von weiteren Versuchen mit den Ceramiden abgesehen und nur noch mit der aSMase in einer niedrigeren Konzentration von 0,1 U/ml anstelle von 0,76 U/ml stimuliert. Diese Konzentration von 0,1 U/ml wurde gewählt, da mehrere Publikationen, wie zum Beispiel (Rozenova et al. 2010), eine Aktivitätssteigerung von ADAMs bereits bei dieser Konzentration nachweisen konnten.

4.4. SMase induziert ADAM10 und -17 vermitteltes *Shedding*

Um eine Aktivitätssteigerung des *Sheddings* von ADAM10 und -17 Substraten durch die aSMase zu überprüfen, wurden COS7-Zellen mit den an alkalische Phosphatase-gekoppelten Substraten von ADAM17, TGF- α und für ADAM10, BTC, transfiziert. Beide sind Liganden des EGF-Rezeptors und tragen nach der transienten Transfektion extrazellulär die alkalische Phosphatase, deren Aktivität sich nach dem *Shedding* im Überstand photometrisch bestimmen lässt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, lässt sich ein deutlich erhöhtes *Shedding* nach aSMase-Stimulation beobachten. Diese Steigerung war durch den allgemeinen Metalloproteaseinhibitor Marimastat signifikant senkbar, ebenso wie die Zugabe des Kalziumchelator EGTA den erhöhten Effekt der aSMase minimierte. Vordaten zeigten, dass eine Ca^{2+} -abhängige PS-Externalisierung mit der ADAM-Aktivierung verbunden war. Da auch die Möglichkeit besteht, dass die aSMase zu PS-Externalisierung beiträgt, wurde mittels Zugabe des Kalziumchelators EGTA, ein potenzieller Einfluss überprüft.

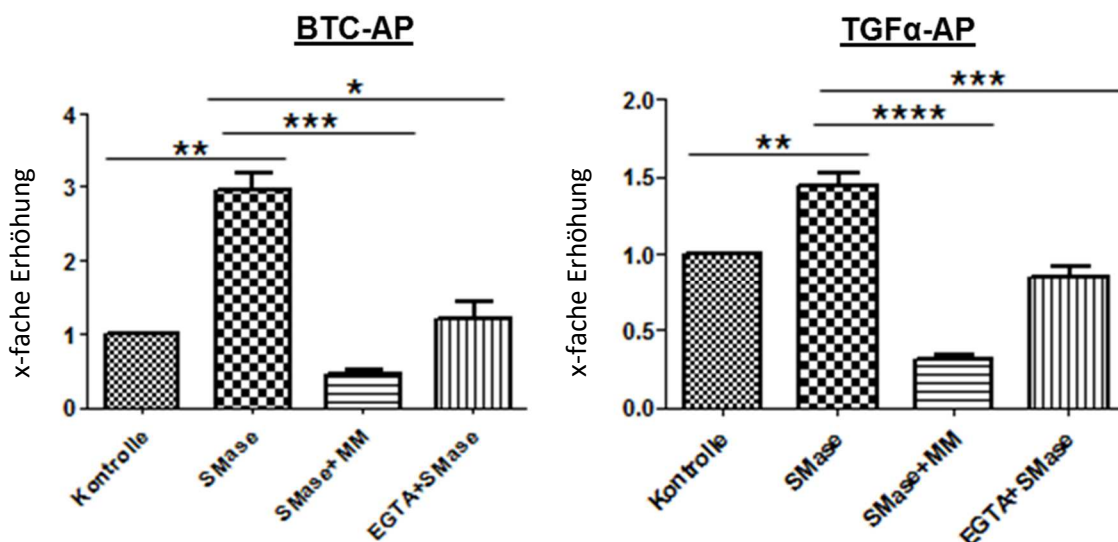


Abbildung 8: aSMase stimuliert das Shedding von TGF α und BTC in COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mit alkalische Phosphatase-gekoppeltem TGF- α bzw. BTC für 24 Stunden transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 Stunden in *Only-Medium* mit 0,1 U/ml aSMase stimuliert. Der allgemeine Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (10 μ M) und der Kalziumchelator EGTA (10mM) wurden jeweils 15 Minuten vor der Stimulation hinzugegeben. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Aktivität wurde mittels alkalische Phosphatase-Assay ermittelt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM relativ zur Kontrolle von TGF α n = 4 und BTC n = 7, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (gemäß ANOVA und Bonferroni *Multiple Comparison Test*).

4.5. Erhöhtes Transmembranrezeptor-*Shedding* nach aSMase-Stimulation

Um neben den beiden EGFR-Liganden, BTC und TGF α , das *Shedding* weiterer ADAM17-Substrate nach aSMase-Stimulation zu untersuchen, wurden die Überstände von *HUVECs* mittels ELISA-Analyse auf ihre TNF-Rezeptor-1- (TNFR1) und VEGF-Rezeptor-2- (VEGFR2) Konzentrationen überprüft

Wie in Abbildung 9 gezeigt, führt die aSMase-Stimulation zu einem erhöhten *Shedding* des TNF-Rezeptors. Die Zusammenfassung von sieben unabhängigen Experimenten zeigte eine erhöhte Konzentration im Überstand. Diese konnte durch den Einsatz von Marimastat und EGTA signifikant gesenkt werden. Als Positivkontrolle wurde PMA verwendet.

Einmalig wurde ein erhöhtes VEGFR2-*Shedding* nach aSMase-Stimulation nachgewiesen, dies konnte durch Marimastat und EGTA verringert werden. In weiteren Versuchen konnte weder durch aSMase- noch durch PMA-Stimulation eine Erhöhung der Konzentration des VEGFR2 im Überstand detektiert werden. PMA diente in diesen Versuchen als Positivkontrolle. Aufgrund der nicht reproduzierbaren Ergebnisse wurde von einer weiteren Analyse des VEGFR2 *Sheddings* abgesehen.

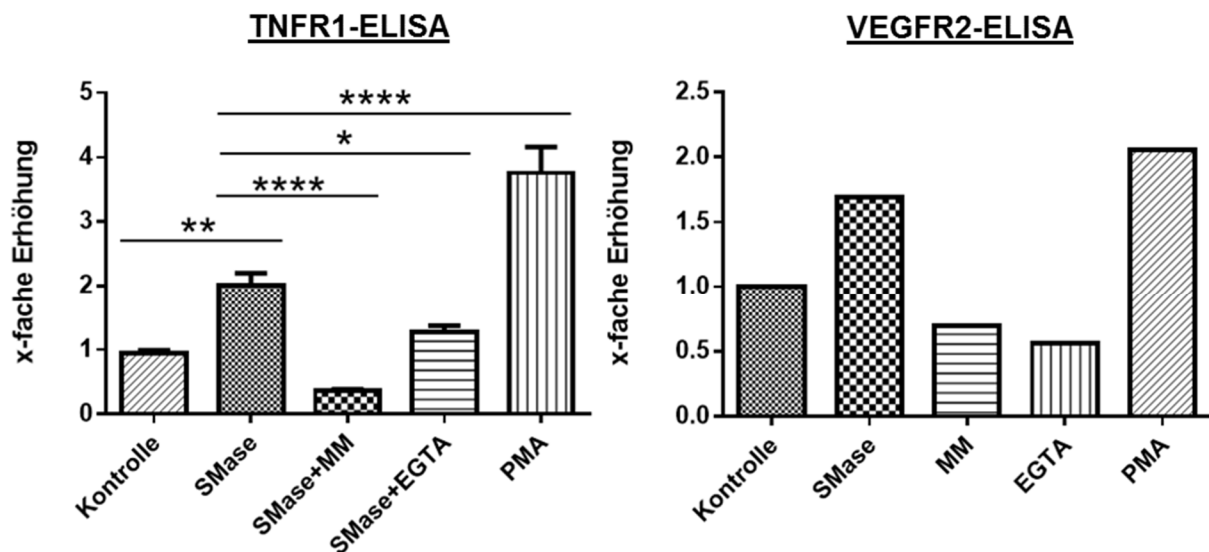


Abbildung 9: aSMase erhöht das Shedding von membranständigen Rezeptoren

HUVECs wurden nach einer Vorinkubation von 15 Minuten mit 10 μ M MM und 10 mM EGTA für zwei Stunden mit 0,1 U/ml aSMase in *Only-Medium* stimuliert. Die Überstände wurden für einen TNFR1- $n = 7$ bzw. VEGFR2- ELISA $n = 1$ genutzt. Als Positivkontrolle wurden 200 ng/ml PMA und als Kontrolle Zellen ohne Stimulation genutzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM relativ zur Kontrolle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (gemäß ANOVA und Bonferroni *Multiple Comparison Test*).

4.6. aSMase induziert die Bildung von Ceramidreichen Regionen

Durch die bisher abgebildeten Experimente konnte gezeigt werden, dass eine aSMase-Stimulation die *Shedding*-Aktivität von ADAM10 und -17 erhöht. Um den Mechanismus der Aktivierung weiter zu erforschen, wurden mittels immunozytochemischer Färbungen nach der Stimulation der Zellen mit aSMase, verschiedene Membranbestandteile angefärbt.

Es ist bekannt, dass sich ADAM17 in *Lipid Rafts* ansammeln kann (Gil et al. 2007). Ebenso wurde über einen Zusammenhang zwischen der Bildung von Ceramidreichen Regionen und der Aktivierung von ADAM10 und -17 spekuliert (Reiss und Bhakdi 2012). Um diese Ergebnisse weiter zu erforschen und einen eventuellen Zusammenhang zwischen der aSMase-Stimulation zu erkennen, wurde in COS7-Zellen und *HUVECs* Ceramid auf der extrazellulären Membran mittels immunozytochemischer Verfahren angefärbt. Wie in Abbildung 10 zu sehen, bilden sich

Ergebnisse

in COS7-Zellen nach 15 Minuten aSMase-Stimulation in *Only*-Medium erste Ceramid-Regionen, die nach 30 Minuten weniger werden, allerdings ab 60 Minuten verstärkt wieder auftreten.

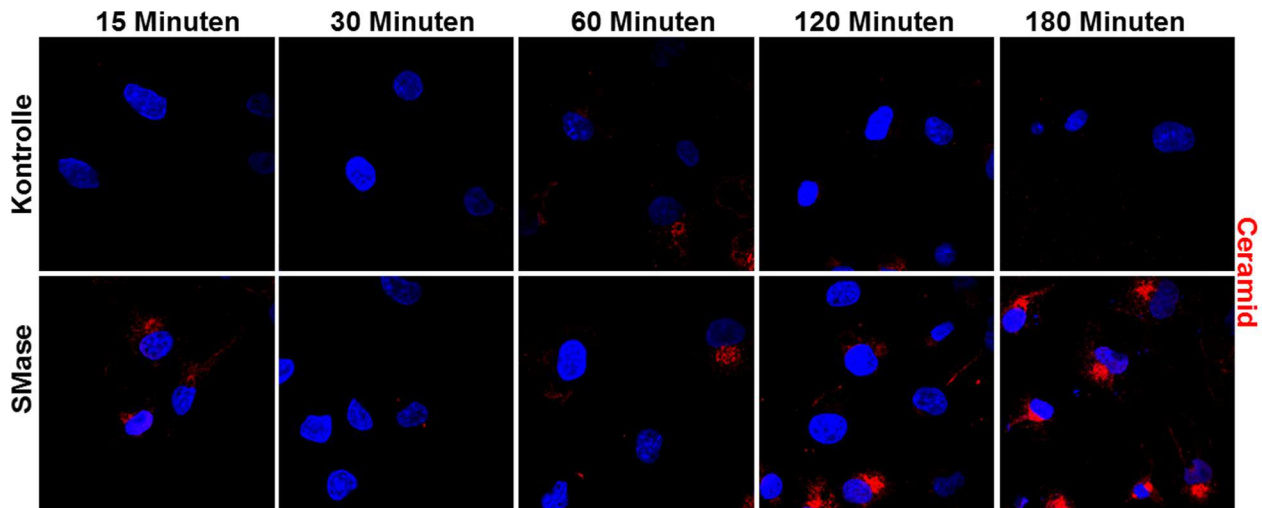


Abbildung 10: aSMase-Stimulation bewirkt eine zeitabhängige Bildung von Ceramid-reichen Regionen in COS-7 Zellen

Die COS7-Zellen wurden auf *Cover Slips* in 12-Well-Platten ausgesät und für unterschiedliche Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in *Only*-Medium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3% PFA in Dunkelheit für 15 Minuten fixiert. Ein gegen Ceramid gerichteter Erstantikörper von Enzo wurde in der Verdünnung 1:50 genutzt. In der Verdünnung 1:800 wurde ein aus dem Esel gewonnener Anti-Maus-Zweitantikörper genutzt, welcher an den Farbstoff Alexa Flour 594 (rot) gekoppelt ist. Für die Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

Um die Reaktion ebenfalls in humanen Endothelzellen zu beobachten, wurden ebenfalls in primären *HUVECs* Ceramide immunozytochemisch angefärbt. Um ähnliche Bedingungen wie bei den Färbungen der COS7-Zellen zu schaffen, wurden die *HUVECs* zunächst in *Only*-Medium stimuliert und anschließend gefärbt (Abbildung 11 A). Wie abgebildet, formieren sich nach 30-minütiger aSMase-Stimulation Ceramid-reiche Regionen, die sich mit fortlaufender Stimulationszeit in den proximalen Bereichen der Zellgrenzen anhäuften. Da die Ergebnisse jedoch uneinheitlich waren und die Zellen stressspezifische morphologische Veränderungen beim *Live-cell-Imaging* zeigten, wurden folgende Färbungen nach Stimulation in Kulturmedium angefertigt (Abbildung 11 B). Auch hier zeigten die Zellen eine mit der Stimulationszeit ansteigende Ceramid-Bildung. In einigen Abbildungen lässt sich beobachten, dass sich die mit Ceramid angereicherten Regionen mit der Zeit in die äußeren Bereiche der Zelle bewegen.

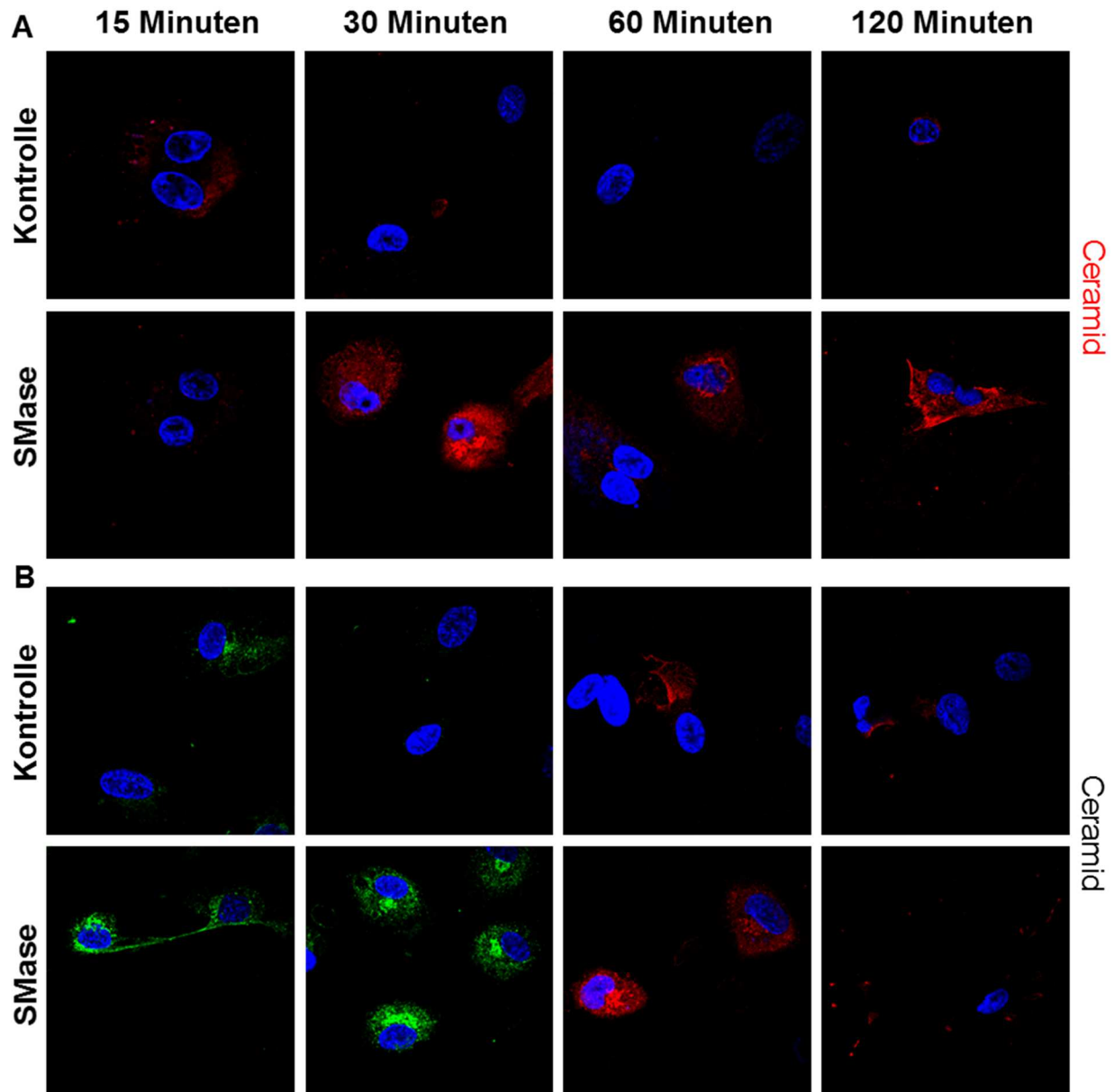


Abbildung 11: aSMase induziert die Bildung von Ceramid in der Membran von HUVECs

Die HUVECs wurden auf kollagenisierten *Cover Slips* in 12-Well-Platten ausgesät und für unterschiedliche Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in A *Only*-Medium oder in B erneuertem Kulturmedium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3% PFA in Dunkelheit für 15 Minuten fixiert wurden. Als Erstantikörper wurde Anti-Ceramid von Enzo in der Verdünnung 1:50 genutzt, als Zweitantikörper Anti-Maus aus dem Esel Alexa, Fluor 488 (grün)/ 594 (rot) gekoppelt, in der Verdünnung 1:800. Die Abbildungen B sind nach einer Stimulationszeit von 15 und 30 Minuten mit Alexa Fluor 488 (grün) gekoppeltem Antikörper angefärbt, weshalb die Ceramid-reichen-Regionen grün abgebildet sind. Für die Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

Um diesen Effekt zu verdeutlichen, wurde in Abbildung 12 eine einzelne HUVEC nach 120 Minuten aSMase-Stimulation in Kulturmedium mit Durchlicht im DIC-Kontrast abgebildet. Die Zelle bildet weite Fortsätze in denen sich Ceramid abgegrenzt anfärben ließ

120 Minuten

SMase

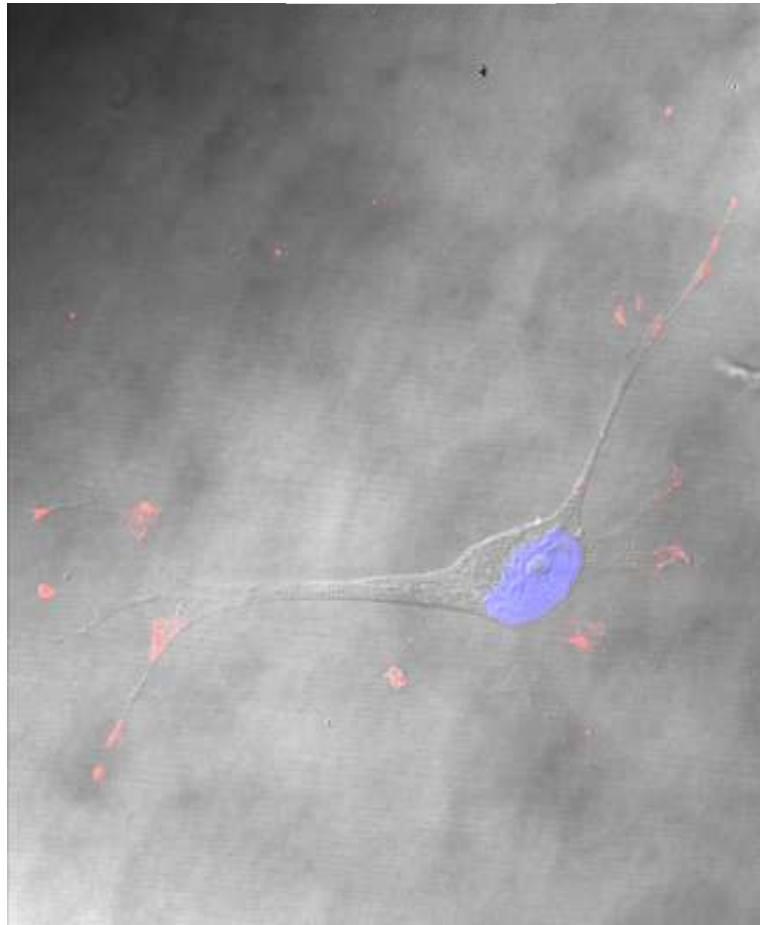


Abbildung 12: aSMase-Stimulation führt zur Verteilung des Ceramids in die Zellausläufer der HUVECs

Die *HUVECs* wurden auf kollagenisierten *Cover Slips* in 12-Well-Platten ausgesät und mit 0,1 U/ml aSMase in erneuertem Kulturmedium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3 % PFA in Dunkelheit für 15 Minuten fixiert. Als Erstantikörper wurde Anti-Ceramid von Enzo in der Verdünnung 1:50 genutzt, als Zweitantikörper Esel Anti-Maus, Alexa Fluor 594 (rot) gekoppelt, in der Verdünnung 1:800. Für die Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet. Dieses Bild ist mit Durchlicht im DIC-Kontrast abgebildet, um die Zellgrenzen besser darzustellen.

Die Farbverteilung der bisher gezeigten Bilder erscheinen eher untypisch für eine Färbung von Ceramiden der äußeren Zellmembran, obwohl die Färbemethode mittels Antikörper und die Fixierung durch PFA dem Antikörper nicht erlauben sollten in die Zelle zu gelangen. Trotzdem glich die Färbung eher der Färbung von Ceramid in intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat.

4.7. ADAM17 und Caveolin-1 sind nicht kolokalisiert

Eine weitere spezielle Form der *Lipid Rafts* stellen die Caveolae dar. In Abbildung 13 und Abbildung 14 wurde in COS7- bzw. *HUVECs* Caveolin-1 mittels Antikörperfärbung dargestellt. Abbildung 13 zeigt eine Verschiebung der Caveolin-1-Lokalisation von einer diffusen Färbung in den unstimulierten Kontrollen zu angehäuften Bereichen in der Zellmembran nach aSMase-Stimulation, allerdings nur bis 120 Minuten.

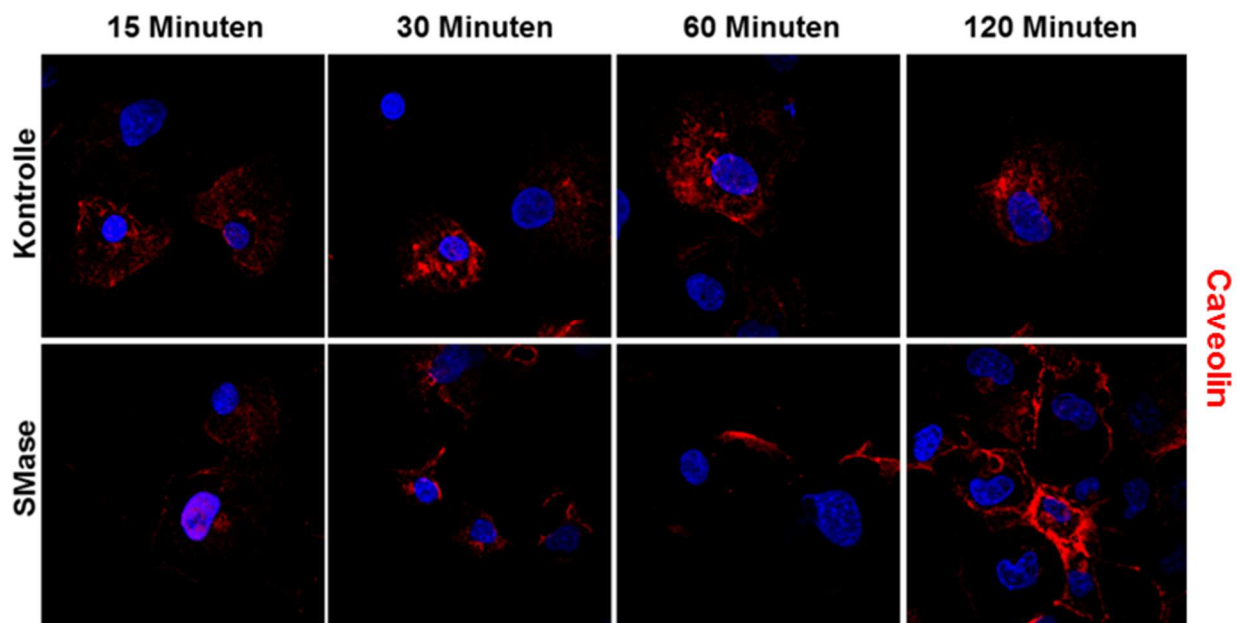


Abbildung 13: Immunzytochemische Färbung von Caveolin-1 in COS7-Zellen

Die COS7-Zellen wurden auf *Cover Slips* in 12-Well-Platten ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in *Only-Medium* stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3 % PFA für 15 Minuten fixiert. Als Erstantikörper wurde Anti-Caveolin-1 von Santa Cruz 1:50 genutzt, als Zweitantikörper Esel Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594 (rot) gekoppelt 1:800. Für die Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

In Abbildung 14 sind Bilder von Caveolin-1- und ADAM17-gefärbten *HUVECs* zu sehen. Eine spezifische Verschiebung des Caveolin-1 konnte im Vergleich zu den COS7-Zellen nicht beobachtet werden, allerdings ein vermehrtes Auftreten von ADAM17 in der Zellmembran. Wobei im Gegensatz zu dem durch Choleratoxin B angefärbten Ceramid in *HUVECs* keine Kolokalisation mit ADAM17 zu beobachten ist.

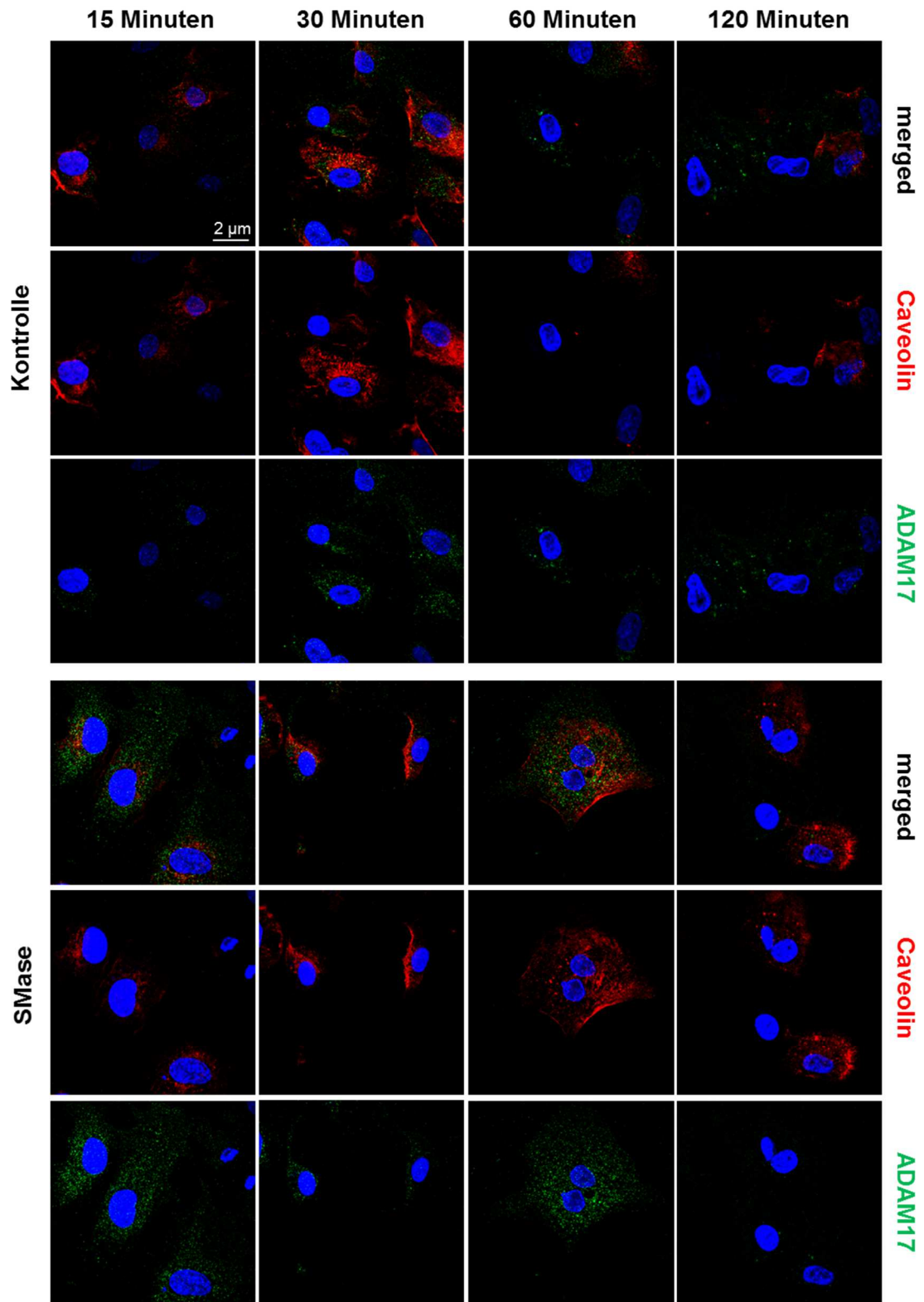


Abbildung 14: aSMase-Stimulation führt nicht zur Kolokalisation von Caveolin und ADAM17

Die HUVECs wurden auf kollagenisierten *Cover Slips* in 12-Well-Platten ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in erneuertem Kulturmedium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3 % PFA für 15 Minuten fixiert. Als Erstantikörper wurde entweder Caveolin-1 von Santa Cruz in der Verdünnung 1:50 genutzt, als Zweitantikörper Esel Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594 (rot) gekoppelt in der Verdünnung 1:800, oder der humane TACE/ADAM17-Erstantikörper MAB9301 1:50 mit dem Zweitantikörper Affe Anti-Maus 488 (grün) 1:800. Für die Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

4.8. ADAM17 ist mit Ceramid-reichen Regionen kolokalisiert

Das Choleratoxin ist normalerweise in eine A- und eine B-Untereinheit unterteilt. Die Untereinheit B ist für das Eindringen in die Zelle verantwortlich. Es bindet an das Gangliosid GM1 an der äußeren Zellmembran. GM1 ist ein Ceramid mit einer Oligosaccharidkette. Diese Bindungseigenschaft der Untereinheit B kann somit als indirekter Ceramid-Nachweis genutzt werden. Zum Zwecke der Anfärbung wurde das Choleratoxin B an einen Farbstoff gekoppelt.

Um nach den atypischen Ceramid-Färbungen eine weitere Methode der Ceramid-Anfärbung zu nutzen, wurden COS7-Zellen und *HUVECs* nach der Stimulation mit aSMase mit dem Farbstoff gekoppelten Choleratoxin B gefärbt. Wie in den Bildern der Abbildung 15 zu sehen, bilden die COS7-Zellen mit voranschreitender Stimulationszeit Ceramid-Spots im Vergleich zu flächigen und ausgebreiteten Färbungen der unstimulierten Kontrolle.

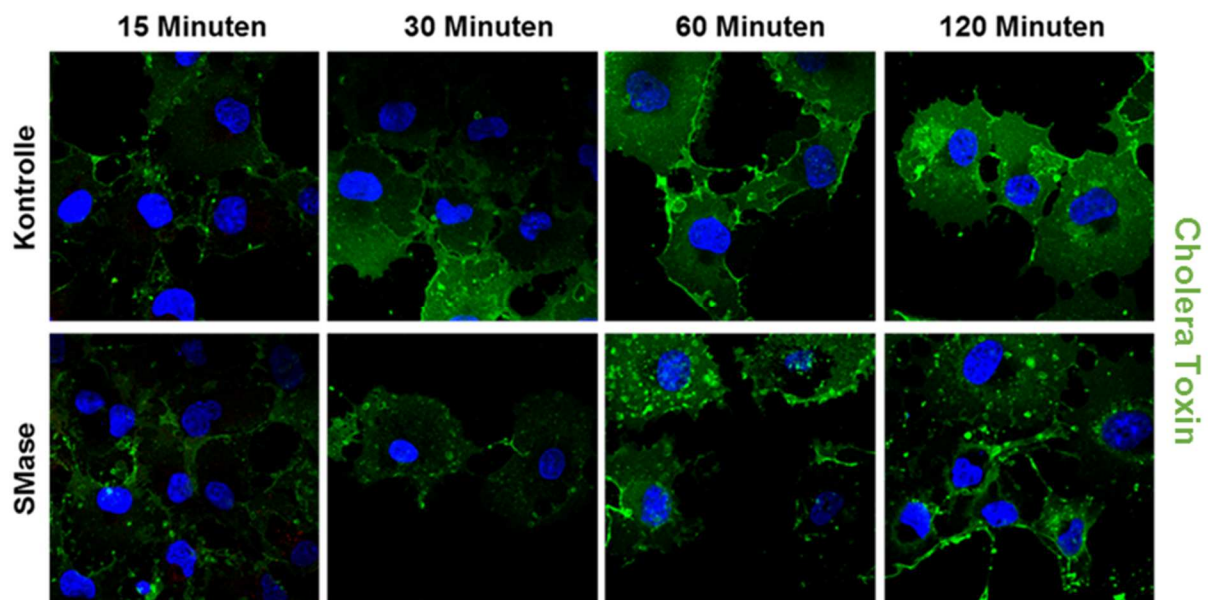


Abbildung 15: Stimulation von COS7-Zellen mit aSMase führt zur Bildung von Ceramid-reichen Spots

Die COS7-Zellen wurden auf Cover Slips in 12-Well-Platten ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in Only-Medium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3 % PFA für 15 Minuten fixiert. Zur Anfärbung wurde das mit FITC gekoppelte Choleratoxin B (grün) in der Verdünnung 1:5000 genutzt. Zur Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

Ergebnisse

Um die Reaktion bezüglich der Ceramid-Bildung von menschlichen Endothelzellen auf aSMase-Stimulation zu überprüfen, wurden *HUVECs* ebenfalls mit dem Farbstoffgekoppelten Choleratoxin gefärbt. Wie in Abbildung 16 zu sehen, bilden auch *HUVECs* nach aSMase-Stimulation vermehrt Ceramid-Spots, allerdings nicht so ausgeprägt wie die COS7-Zellen in Abbildung 15.

Um eine eventuelle Kollokalisierung zu erforschen, wurde zusätzlich zum gefärbten Ceramid ADAM17 angefärbt. Wie in Abbildung 16 zu sehen, steigt das ADAM17-Vorkommen auf der Zellmembran im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach aSMase-Stimulation an. Die Kollokalisierung von ADAM17 und Ceramid lässt sich jedoch sowohl nach Stimulation wie auch ohne beobachten.

Ergebnisse

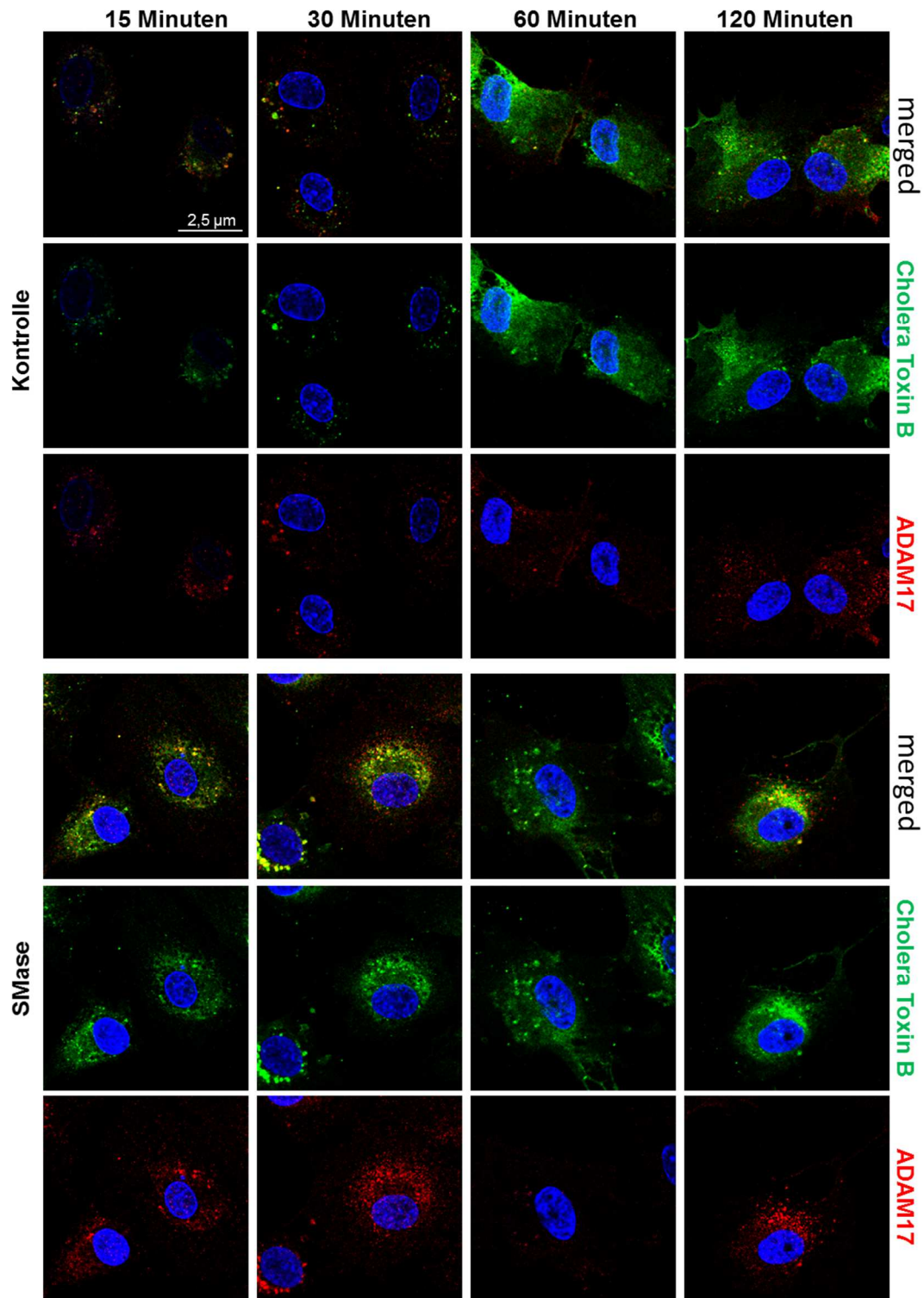


Abbildung 16: aSMase-Stimulation in *HUVECs* führt zur Anreicherung von ADAM17 in Ceramid-reichen Regionen

Die *HUVECs* wurden auf kollagenisierten *Cover Slips* in 12-Well-Platten ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in gewechseltem Kulturmedium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit 3 % PFA für 15 Minuten fixiert. Zur Anfärbung wurde das mit FITC gekoppelte Cholera Toxin B (grün) in der Verdünnung 1:5000, der Anti-ADAM17 Antikörper MAB9301 (rot) in der Verdünnung 1:50 für die ADAM17-Färbung genutzt. Zur Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

4.9. aSMase induziert zeitabhängig die Phosphatidylserin-Externalisierung

Wie in Sommer et al. 2016 gezeigt, führt die Phosphatidylserin-Externalisierung von der inneren Seite der Membran zur äußeren Seite zu einer Aktivierung von ADAM17. Um zu überprüfen, ob die aSMase-Stimulation einen direkten Effekt auf die PS-Externalisierung und damit auf die ADAM-Aktivierung hat, wurden COS7- und *HUVECs* nach aSMase-Stimulation mit Annexin V-FITC gefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Zellmembran, ist aber nicht in der Lage, in die Zelle einzudringen. Dadurch kann man die PS- Externalisierung nachvollziehen.

Abbildung 17 zeigt, dass sich auf COS7-Zellen nach 15- und 30-minütiger aSMase-Stimulation PS anfärben lässt. Wie in der Literatur beschrieben, ist die PS-Externalisierung Kalzium-abhängig (Suzuki et al. 2013; Bucki et al. 2001). Auch hier konnte gezeigt werden, dass nach der Zugabe vom Kalzium-Chelator EGTA ein verringerter PS-Nachweis durch Annexin V-FITC-Färbung zu beobachten war. Nach 60 Minuten konnte keine PS-Externalisierung nachgewiesen werden, jedoch tritt dieser nach 90 und 120 Minuten sowohl in der Kontrolle als auch nach Stimulation wieder auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die COS7-Zellen zunächst eine Stressreaktion aufgrund der fehlenden Nährstoffe im *Only*-Medium zeigen. Somit lässt sich unter Laborbedingungen die durch aSMase-Stimulation induzierte PS-Externalisierung nur in den ersten 30 Minuten beobachten.

Ergebnisse

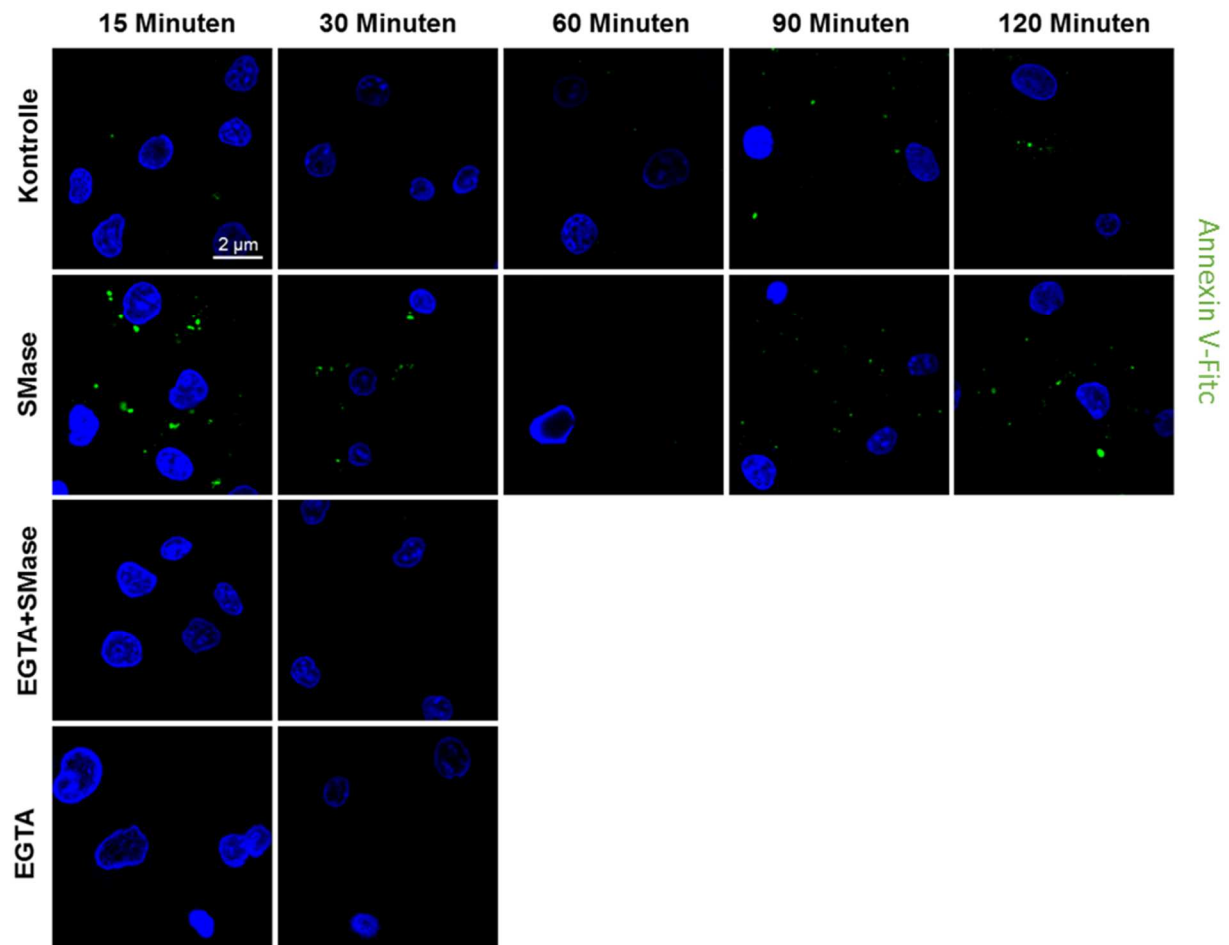


Abbildung 17: aSMase-Stimulation führt in COS7-Zellen zur vermehrten PS-Externalisierung

Die COS7-Zellen wurden auf Cover Slips in 12-Well-Platten ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in Only-Medium stimuliert. Als Inhibitor wurde EGTA 15 Minuten vor der Stimulation auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Deckgläser für 5 Minuten mit Annexin V-FITC (grün) in der Verdünnung 1:20 in Dunkelheit gefärbt, bevor sie mit 3% PFA in Dunkelheit für 15 Minuten fixiert wurden. Zur Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

In *HUVECs* lässt sich wie in COS7-Zellen die PS-Externalisierung zur äußeren Seite der Membran nach 30 Minuten ebenfalls feststellen. Dieser Effekt war durch EGTA inhibierbar.

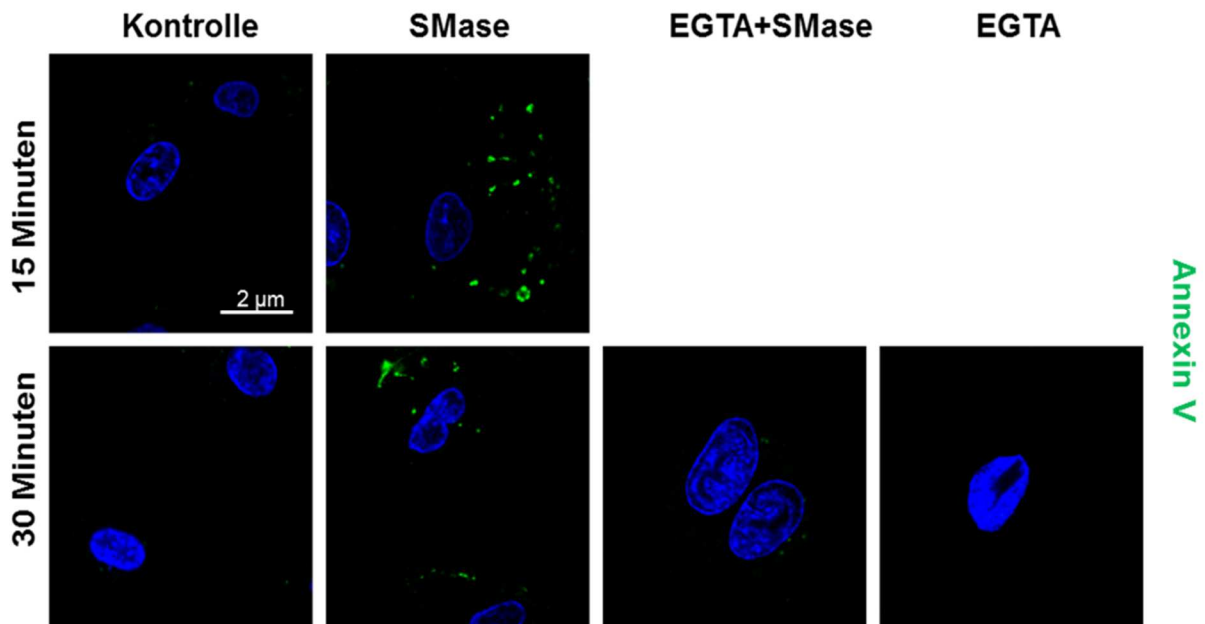


Abbildung 18: aSMase-Stimulation führt in HUVECs zur vermehrten PS- Externalisierung

Die HUVECs wurden auf kollagenisierten Deckgläsern in 12-Well-Platten ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 U/ml aSMase in frisch gewechseltem Kulturmedium stimuliert. Als Inhibitor wurde EGTA 15 Minuten vor der Stimulation auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Deckgläser für 5 Minuten mit Annexin V-FITC (grün) in der Verdünnung 1:20 in Dunkelheit gefärbt, bevor sie mit 3 % PFA in Dunkelheit für 15 Minuten fixiert wurden. Zur Anfärbung der DNS wurde DAPI (blau) verwendet.

4.10. aSMase Stimulation führt zu keiner ADAM-abhängigen Erhöhung der Permeabilität im Endothel

Um genauer zu untersuchen, welchen Effekt die aSMase auf Endothelzellen hat, wurde das Verfahren der Impedanzmessung mit dem ICelligence-Gerät von ACEA Biosciences genutzt. Das Gerät erlaubt eine Echtzeitmessung von unmarkierten bzw. durch das Verfahren unbeeinflussten zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation, Adhäsion, Zytotoxizität, morphologische Veränderungen, Permeabilität und Barrierefunktion.

Es ist bekannt, dass Thrombin ADAM10 aktiviert (Beate Schulz et al. 2008). ADAM10-Substrate sind größtenteils Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel VE-Cadherin oder E-Cadherin, wohingegen ADAM17 eher membrangebundene Liganden, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und pro- bzw. antiinflammatorisch wirkende Substrate schneidet.

Ergebnisse

Deshalb diente Thrombin als Positivkontrolle. Wie in Abbildung 19 zu sehen, führt dessen Zugabe zu einer 50-minütigen Impedanzsenkung. Ein Anstieg ergab sich nach 5 Stunden und 15 Minuten nach der Stimulationszugabe. In der folgenden Zeit, bis zum Ende des Versuches, sank die Impedanz der mit Thrombin stimulierten Zellen stetig. Die Impedanz-Senkung, bzw. Steigerung bis zu 5 Stunden und 15 Minuten nach der Stimuluszugabe, ließ sich durch Marimastat leicht abschwächen. Anschließend wurde die stetige Impedanzsenkung durch Marimastat fast vollständig gehemmt.

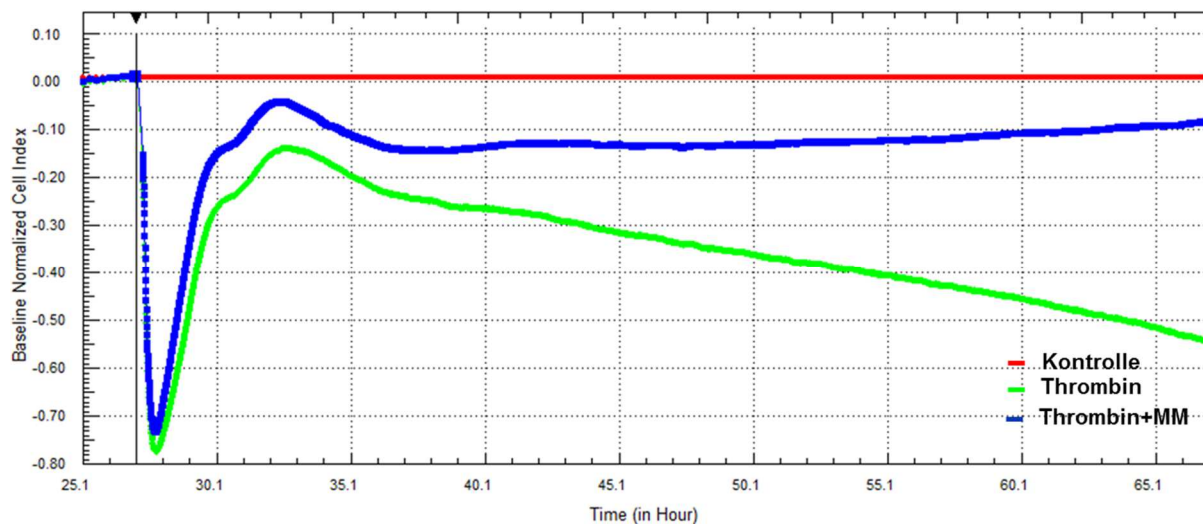


Abbildung 19: Thrombin als ADAM10-Stimulus führt zur Reduktion der Impedanz in *HUVECs*

24 Stunden vor dem Versuch wurden *HUVECs* in einer Konzentration von 40.000 Zellen/Well ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit oder ohne 10 μ M Marimastat vorinkubiert und dann mit 5 U/ml Thrombin stimuliert. Die Zugabe der Stimulantien ist durch den schwarzen durchgehenden Strich gekennzeichnet. Die Impedanz wurde mittels ICelligence gemessen. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen genutzt. Dargestellt sind die zur Kontrolle normalisierten Messwerte. $n = 1$

Um zu untersuchen, ob auch die aSMase einen Effekt auf die Impedanz und damit auf eine vermutete Permeabilitätserhöhung der *HUVECs* hat, wurden die Zellen mit aSMase stimuliert. Wie in Abbildung 20 zu sehen, führte die Stimualtion zu einer kurzfristigen 20-minütigen Steigerung der Impedanz, was auf eine starke Abflachung der Zellen hindeutet. Anschließend sinkt die Impedanz innerhalb von 20 Minuten bis weit unter die Kontrolle und regeneriert sich nach 60 Minuten langsam wieder nach oben, bis sie das Niveau der Kontrolle erreicht hat. Dies könnte als Stressreaktion interpretiert werden. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt ADAM- bzw. Metalloprotease-abhängig ist, wurde der allgemeine Metalloproteaseinhibitor Marimastat in Kombination mit aSMase bzw. alleine zu den Zellen gegeben. Wie zu

Ergebnisse

sehen, hat Marimstat allein kaum einen Effekt. In Verbindung mit der aSMase sieht man einen ähnlichen Kurvenverlauf wie mit der aSMase-Stimulation ohne Marimastat, jedoch unterhalb des Impedanzniveaus der Kontrolle.

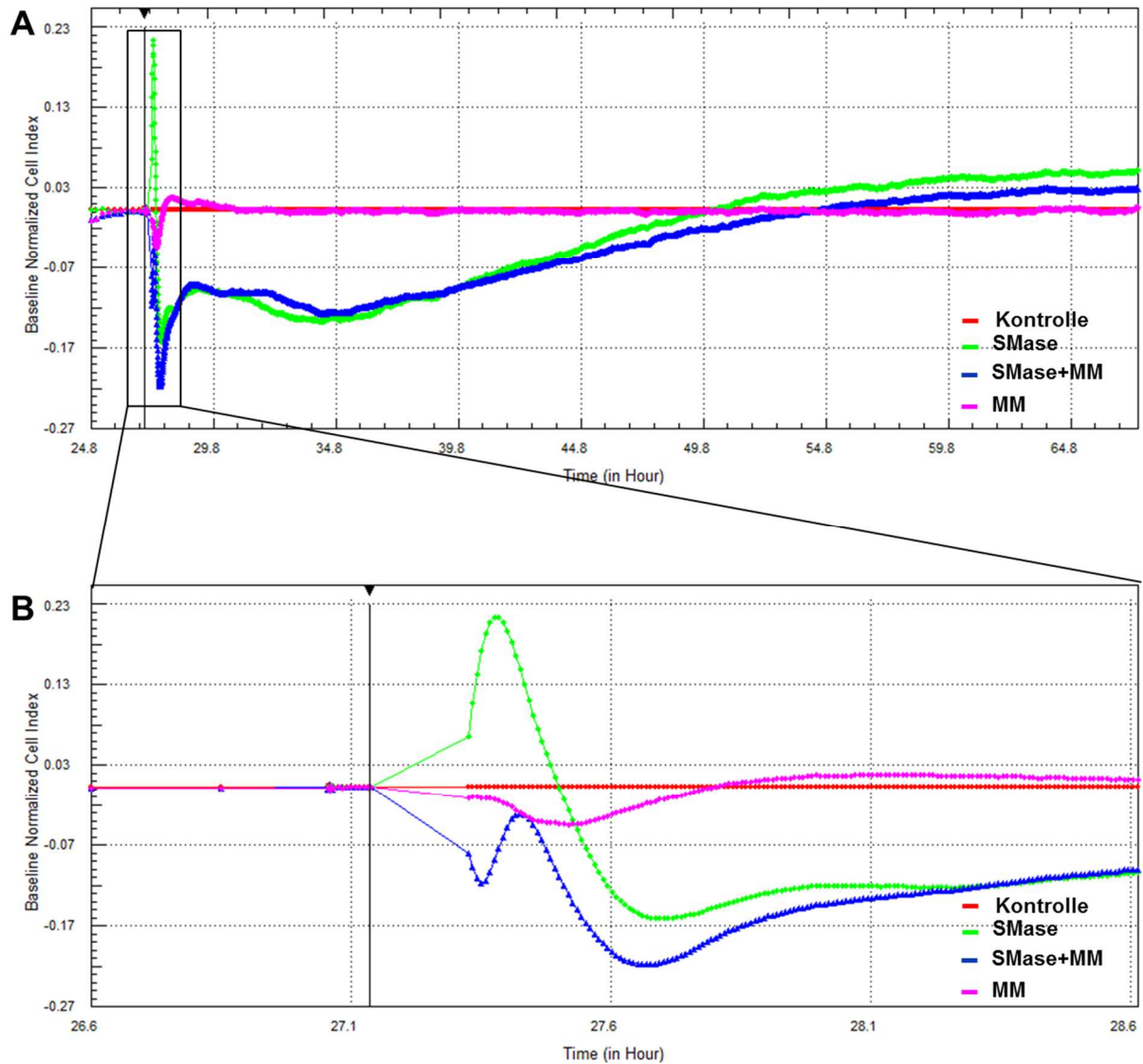


Abbildung 20: SMase-Stimulation führt zur kurzzeitigen Impedanz-Steigerung

24 Stunden vor dem Versuch wurden *HUVECs* in einer Konzentration von 40.000 Zellen/*Well* ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit oder ohne 10 μ M Marimastat vorinkubiert und dann mit 0,1 U/ml aSMase stimuliert. Die Zugabe der Stimulanzien ist durch den schwarzen durchgehenden Strich gekennzeichnet. Die Impedanz wurde mittels ICelligence gemessen. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen genutzt. **B** stellt einen vergrößerten Ausschnitt von der gekennzeichneten Position **A** dar. Dargestellt sind die zur Kontrolle normalisierten Messwerte ($n = 1$).

Um die Kalziumabhängigkeit des aSMase-Effektes nachvollziehen zu können, wurden die Zellen mit aSMase und dem Kalziumchelator EGTA behandelt, sowie nur mit EGTA. Wie in Abbildung 21 zu sehen, führt EGTA allein zu einer starken

Ergebnisse

Impedanzsenkung. Die gleichzeitige Stimulation von EGTA mit aSMase führte zum gleichen Kurvenverlauf wie bei den Zellen, welche nur mit EGTA inkubiert wurden.

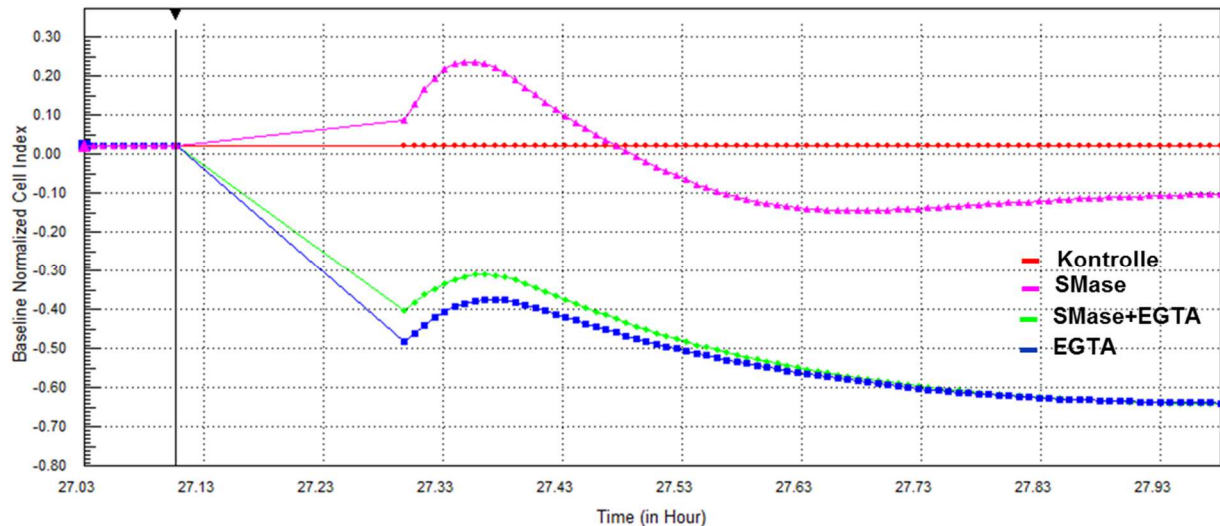


Abbildung 21: EGTA führt zur starken Verminderung der Impedanz

24 Stunden vor dem Versuch wurden HUVECs in einer Konzentration von 40.000 Zellen/Well ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit oder ohne 10 mM EGTA vorinkubiert und dann mit 0,1 U/ml aSMase stimuliert. Die Zugabe der Stimulantien ist durch den schwarzen durchgehenden Strich gekennzeichnet. Die Impedanz wurde mittels ICelligence gemessen. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen genutzt. Dargestellt sind die zur Kontrolle normalisierten Messwerte ($n = 1$).

4.11. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch aSMase erhöht

Es ist bekannt, dass aSMase zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Corda et al. 2001). Um einen Ausblick auf weitere mögliche Einflussbereiche der aSMase und ihren Effekt auf die ADAMs zu erhalten, wurden in COS7-Zellen und HUVECs reaktive Sauerstoffspezies angefärbt. Zu diesem Zweck wurde der membrangängige Farbstoff DCFDA zu den Zellen gegeben, welche anschließend mit den entsprechenden Stimulantien bzw. Inhibitoren behandelt wurden. Der fluoreszierende Farbstoff wurde anschließend in verschiedenen Zeitabschnitten in einem Plattenlesegerät gemessen.

Ergebnisse

Mit Hilfe des Metalloproteaseinhibitor Marimastat sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der aSMase-vermittelten Produktion von ROS und den ADAMs hergestellt werden. Der Kalziumchelator EGTA wurde zur Untersuchung der Kalzium-abhängigen PS-Externalisation als Inhibitor genutzt.

Wie in Abbildung 22 gezeigt, führt die Stimulation mit aSMase und Marimastat in COS7-Zellen zur erhöhten Produktion von ROS. Der Effekt der aSMase lässt sich durch EGTA fast auf das Niveau der Proben senken, welche ausschließlich mit EGTA behandelt wurden. Der Effekt der endogenen aSMase kann ebenfalls durch den SMase-Inhibitor Imipramin gehemmt werden. Als Positivkontrolle wurde H_2O_2 verwendet.

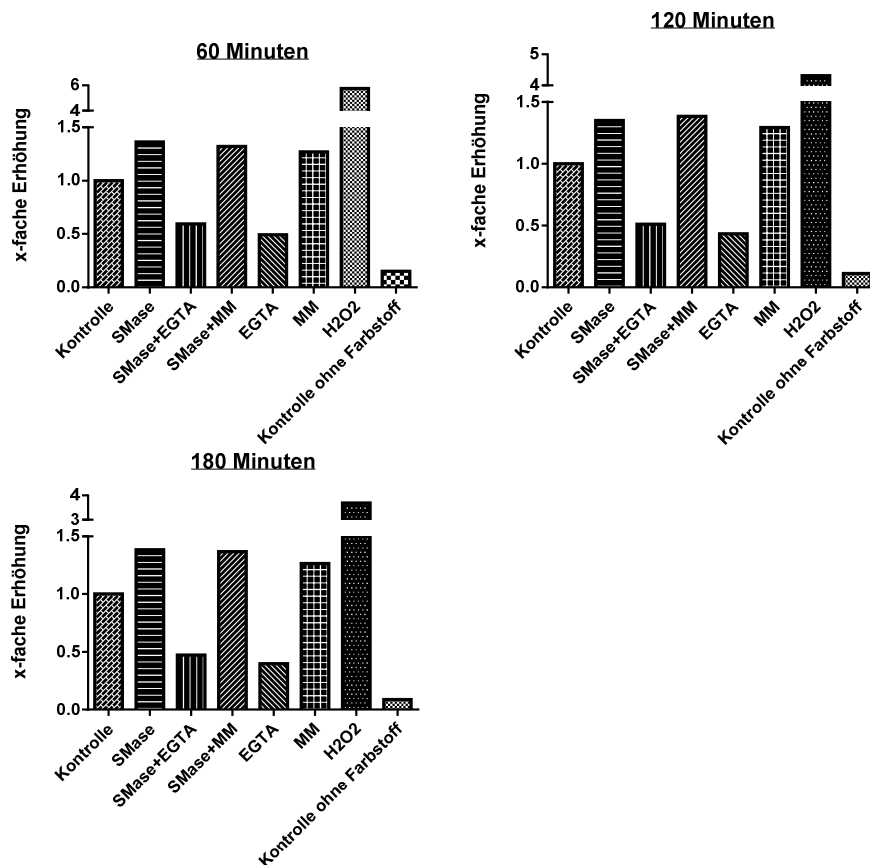


Abbildung 22: aSMase-Stimulation führt zur vermehrten ROS-Produktion in COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde auf die Zellen 25 mM DCFDA (Reaktive Sauerstoffspezies-Farbstoff) gegeben, nach einer Stunde Vorinkubationszeit wurde ein Mediumwechsel auf *Only*-Medium mit den entsprechenden Stimulantien bzw. Inhibitoren gegeben. Es wurde als Positivkontrolle 0,5 % H_2O_2 genutzt, als Stimulantien 0,1 U/ml aSMase, sowie als Inhibitoren 10 μM MM (Marimastat) 10 mM EGTA und 10 μM Imi (Imipramin). Die Kontrolle zeigt unstimulierte Zellen. Die Werte wurden zur unstimulierten Kontrolle normalisiert ($n = 1$).

Ergebnisse

Um die Produktion von ROS im Endothel weiter zu erforschen, wurden *HUVECs* genauso wie die COS7-Zellen stimuliert. Zusätzlich wurden die *HUVECs* mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. *HUVECs* besitzen im Gegensatz zu COS7-Zellen einen TNF-Rezeptor. Es wurde bereits gezeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ über die aSMase zur Produktion von ROS führt (Corda et al. 2001).

In Abbildung 23 kann man, wie bereits in der vorangegangenen Abbildung erkennen, dass die Stimulation mit aSMase zur vermehrten Produktion von ROS führt. Anders als bei den COS7-Zellen lässt sich dieser Effekt allerdings durch Marimastat vermindern. EGTA und Imipramin zeigten die gleiche Wirkung, sie senkten die ROS-Produktion deutlich unter das Niveau der mit aSMase-stimulierten Probe. $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation führte zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration, allerdings erreichte diese Stimulation nicht die Werte der aSMase stimulierten Proben. Die erhöhte Konzentration von ROS nach der $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation ließ sich durch MM nicht mindern. Nach 120 Minuten stieg die ROS-Konzentration der Zellen, welche mit MM und $\text{TNF}\alpha$ stimuliert wurden, über das Niveau der Zellen, welche ausschließlich mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten wurden. Die kombinierte Anwendung von Imipramin und $\text{TNF}\alpha$ senkte die zuvor erhöhten Werte, die durch die alleinige Anwendung von $\text{TNF}\alpha$ entstanden waren.

Ergebnisse

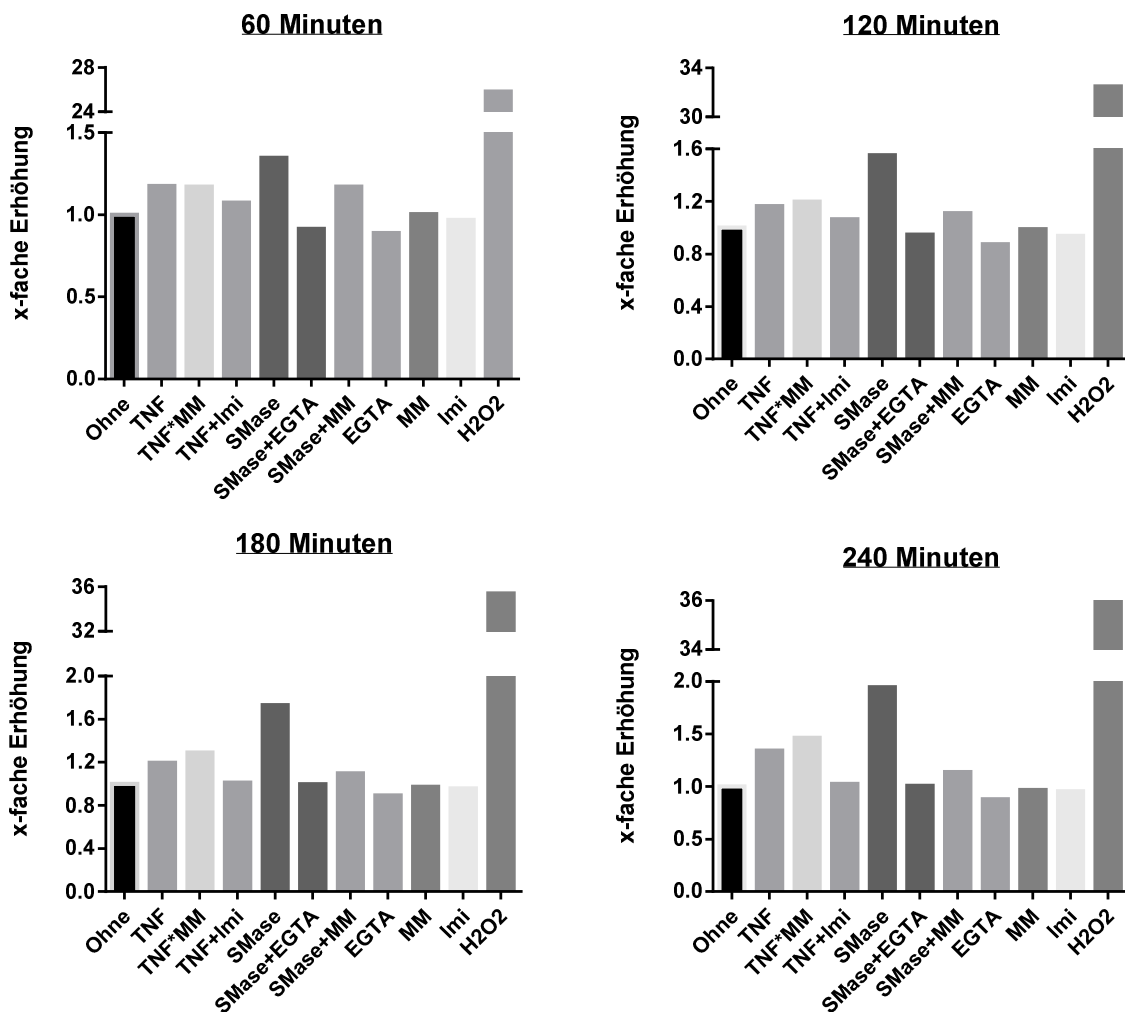


Abbildung 23: TNF- und aSMase-Stimulation führt zur leicht erhöhten Produktion von ROS in HUVECs

HUVECs wurden in kollagenisierte 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde auf die Zellen 25 mM DCFDA (Reaktive Sauerstoffspezies-Farbstoff) gegeben, nach einer Stunde Vorinkubationszeit wurde ein Mediumwechsel auf frisches Kulturmedium mit den entsprechenden Stimulantien bzw. Inhibitoren gegeben. Es wurde als Positivkontrolle 0,5 % H₂O₂ genutzt, als Stimulantien 0,1 U/ml aSMase, TNF 10 ng/ml, sowie als Inhibitoren 10 µM MM (Marimastat) 10 mM EGTA und 10 µM Imi (Imipramin). Die Kontrolle zeigt unstimulierte Zellen. Die Werte wurden zur unstimulierten Kontrolle normalisiert (n = 1).

5. Diskussion

ADAM10 und ADAM17 haben sich in den letzten Jahren als wichtige Vertreter der ADAM-Familie herausgestellt. Trotz intensiver Forschung konnte bis jetzt der vollständige Aktivierungsmechanismus nicht genau geklärt werden. Über ein Mitwirken der Sphingomyelinasen und der damit verbundenen Bildung von Ceramid-reichen Regionen wurde bereits spekuliert, jedoch blieb der genaue Mechanismus ungeklärt (Reiss und Bhakdi 2012).

Diese Arbeit beschäftigt sich im Speziellen mit dem Einfluss der sauren Sphingomyelinase (aSMase) und der Stimulation mit Ceramiden auf das ADAM10 und -17 vermittelte *Shedding* in COS7-Zellen sowie in Endothelzellen. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine aSMase-Stimulation Einfluss auf den Phosphatidylserin-Externalisation hat. Dieser ist bekannt dafür, eine wichtige Rolle bei der ADAM-Aktivierung zu haben.

5.1. Führt die aSMase durch die Bildung von Ceramid-reichen Regionen ADAMs und ihre Substrate zusammen?

Wie in der Einleitung bereits erläutert, spielen ADAM10 und ADAM17 eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen. Bisher sind über 70 ADAM17-Substrate und zahlreiche ADAM10-Substrate bekannt (Ebsen et al. 2013). Trotz dieses breiten Spektrums an Substraten und intensiver Forschung bleibt der genaue Mechanismus des ADAM10- und ADAM17-vermittelten *Sheddings* in Teilbereichen ungeklärt. Die Struktur der Membran scheint einen wichtigen Einfluss auf die Aktivität der ADAM-Enzyme zu haben.

Die Lipidverteilung innerhalb der Membran hat einen bedeutenden Einfluss auf die Funktion der Zelle. Ihre Verteilung wird durch verschiedene Prozesse reguliert und ständig verändert. Die Cholesterol-Verteilung ist gemeinsam mit den Sphingolipiden an der Bildung von abgegrenzten Bereichen beteiligt. Diese nennt man *Lipid Rafts*

(Brown 1998; Simons und Vaz 2004). Eine wichtige Eigenschaft der *Lipid Rafts* besteht darin, dass sie spezielle Proteine zusammenführen, bzw. voneinander abgrenzen können (Simons und Toomre 2000; Pike 2004). Bei dieser Neuorganisation der Proteinlokalisation entstehen Plattformen, welche die Interaktion und Funktion der Proteine beeinflussen (Golub et al. 2004) und zu einer Anhäufung von Signalmolekülen führen. Wie bereits 2006 von Tellier et al. gezeigt, ist das *Shedding* von TNF α , TNFR1 und -2 in *Lipid Rafts* erhöht (Tellier et al. 2006). Tellier et al. zeigten 2008 außerdem, dass eine exogene Zugabe von *High-density lipoproteins* (HDLs) zu der TNF α -überexprimierenden humanen endothelialen Zelllinie ECV-304 zu einer Veränderung der *Lipid Raft*-Zusammensetzung führt (Tellier et al. 2008). HDL ist als Lipoprotein für den Cholesterin-Transport von peripheren Zellen zur Leber verantwortlich. Somit verändert es, bei exogener Zugabe, die Zusammensetzung der *Lipid Rafts* indem es die Cholesterin-Konzentration reduziert. Dies bewirkte ein erhöhtes *Shedding* von TNF α durch ADAM17 (Tellier et al. 2008). Somit scheint die Zusammensetzung der *Lipid Rafts* und die damit veränderte Fluidität der Membran einen wichtigen Einfluss auf das *Shedding*-Verhalten von ADAM17 zu haben.

Neben Cholesterin sind jedoch auch Sphingolipide wichtige, regulierende Bestandteile von *Lipid Rafts*. So entstand die Frage, ob die Beeinflussung der Sphingolipide, Einfluss auf das ADAM-vermittelte *Shedding* hat. Der einfachste Vertreter der Sphingolipide ist das Ceramid, welches durch die Sphingomyelinase aus Sphingomyelin gebildet wird. In der Publikation von Uhlig & Gulbins wurde bereits beschrieben, dass es nach der SMase-vermittelten Bildung von Ceramid-reichen Regionen in der Membran zu einer Permeabilitätserhöhung im Endothel kommt (Uhlig und Gulbins 2008). Auch die ADAM-vermittelte Beeinflussung der Permeabilität wurde häufiger postuliert. So zeigten Walev et al., dass eine Stimulation mit bakterieller SMase zu einem erhöhten *Shedding* vom ADAM17-Substrat L-Selektin führt (Walev et al. 2000).

Reiss und Bhakdi formulierten darauf in ihrer Publikation 2012 einen Zusammenhang zwischen der SMase-Stimulation und der ADAM10 und -17-Aktivierung (Reiss und Bhakdi 2012). Aufgrund dieser Erkenntnisse entstand die Hypothese, dass sich nach der Stimulation mit aSMase Ceramid-reiche Regionen bilden, durch die ADAM-

Enzyme in räumliche Nähe mit ihren Substraten gelangen, und das *Shedding* begünstigt wird.

Analog zur Publikation von Tellier et al. wurde in dieser Arbeit Ceramid-C6 exogen zur humanen endothelialen Zelllinie *HUVEC* gegeben (Tellier et al. 2008). Durch verschiedene Methoden zur Messung der Freisetzung von ADAM-Substraten, wie dem TNFR1-ELISA, dem BTC-, dem TGF α -AP-Assay und dem VE-Cadherin-Western Blot ergab sich, dass die exogene Zugabe keinen Einfluss auf die ADAM-Aktivität hatte. Auch konnte kein erhöhtes *Shedding* nach der Behandlung mit physiologisch vorkommenden längeren Ceramiden nachgewiesen werden. Dies führte zu der Vermutung, dass exogen hinzugefügte Ceramide nicht in die Membran gelangen. Mittels verschiedener Versuche, wie zum Beispiel einer Membranfraktionierung, einer Lipidbestimmung oder einer Ceramidanfärbung mittels ICC, könnte man überprüfen, ob die Ceramide wirklich nicht in die Membran eindringen. Da die Zeit dieser Arbeit zeitlich begrenzt war, konnten diese Versuche leider nicht durchgeführt werden.

Eine Stimulation mit 0,76 U/ml der Ceramid-bildenden aSMase bewirkte allerdings bei diesen Versuchen einen signifikanten Anstieg des *Sheddings* von ADAM10 und -17-Substraten, was die Hypothese stützt, dass die Bildung von Ceramid einen wichtigen Effekt auf die ADAM-Aktivierung hat.

In der Literatur beschriebene Stimulationsversuche mit der aSMase wurden meistens mit einer Konzentration von 0,1 U/ml durchgeführt (Rozenova et al. 2010). Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche ebenfalls diese Konzentration gewählt. Um einen direkten Zusammenhang zu ADAM10 und -17 herzustellen, wurde einerseits der allgemeine Metalloproteinase-Inhibitor Marimastat genutzt, andererseits der Einfluss der aSMase auf das *Shedding* von spezifischen ADAM10 und -17-Substraten getestet. Durch die TGF α -AP-Assays in COS7-Zellen und die TNFR1-ELISAs in *HUVECs*, konnte ermittelt werden, dass die aSMase das *Shedding* von ADAM17 spezifischen Substraten erhöht. Dieser Effekt lässt auf eine Aktivierung von ADAM17 schließen, da auch Marimastat das induzierte *Shedding* inhibierte. AP-Assays mit BTC bewirkten den gleichen Effekt auch in COS7-Zellen, den ADAM10 vermittelte. Allerdings konnte dieses Ergebnis nur einmal in *HUVECs* durch einen VEGFR2-ELISA gezeigt werden, obwohl VEGFR2 von ADAM10 (Donners et al. 2010) als auch von ADAM17

(Swendeman et al. 2008) geschnitten wird. Weitere Versuche dieses Ergebnis zu reproduzieren, scheiterten an einer zu geringen VEGFR2-Expression der *HUVECs*. Um weitere Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob die aSMase das *Shedding* von ADAM10-Substraten erhöht, sollten andere ADAM10-spezifische Substrate, wie zum Beispiel der Wachstumsfaktor EGF, getestet werden.

Mit den vorangegangenen Versuchen konnte ein signifikant erhöhtes *Shedding* von ADAM10 und -17-Substraten durch exogene Stimulation mit der aSMase gezeigt werden. Somit wird ein Zusammenhang zwischen der Bildung von Ceramid-reichen Regionen und der ADAM10 und -17-Aktivität immer wahrscheinlicher. Um dies weiter zu entschlüsseln und die Hypothese, dass sich in Ceramid-reichen *Lipid Rafts* ADAM17 ansammelt, zu überprüfen, wurden des Weiteren COS7-Zellen und *HUVECs* nach aSMase-Stimulation immunozytochemisch untersucht. Die Anfärbungen mit einem gegen Ceramid gerichteten Antikörper, welcher nicht membrangängig sein sollte, machten ein untypisches Muster sichtbar. Die Bilder von COS7-Zellen zeigten ein vermehrtes Auftreten von Ceramid nach den ersten 15 Minuten und wieder nach 120 Minuten. Diese Ceramid-reichen Regionen ähneln allerdings eher einer Golgi-Färbung als einer Anfärbung der äußeren Membran. Zwar waren die Färbungen in *HUVECs* in *Only-Medium* randbetonter, jedoch zeigten die in Kulturmedium stimulierten Zellen eine ähnliche Ceramid-Verteilung wie die COS7-Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere Anfärbungen mit der Untereinheit B des Choleratoxins durchgeführt. Diese bindet an das Ceramid GM1 der äußeren Zellmembran (Petr et al. 2010). Diese Versuche zeigten, dass aSMase-Stimulation zu einer deutlich erhöhten Bildung von Ceramid-reichen Spots führt, sowohl in COS7-Zellen als auch in *HUVECs*. Das *Co-Staining* von Ceramid und ADAM17 zeigte eine Kolokalisation. Dies stützt die Hypothese, dass in Ceramid-reichen Regionen ADAM17-Enzyme in *Shedding*-Reichweite zu ihren Substraten gelangen. Um die Hypothese einwandfrei beweisen zu können, müssten weitere Färbungen von Ceramid, ADAMs und ihren spezifischen Substraten angefertigt werden. Die in dieser Untersuchung gezeigten Ergebnisse könnten ein weiteres Bindeglied der bereits bekannten Ceramid-vermittelten Funktion darstellen.

Die Sphingolipide sind in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Krebsforschung gerückt. (Schiffmann et al. 2009) zeigen, dass das Ceramid-Level in

Brustkrebszellen um das vier- bis zwölfwache höher ist, als im normalen Gewebe. Interessanterweise zeigen unter anderem die Ergebnisse von (Kenny und Bissell 2007) sowohl eine erhöhte Aktivität als auch ein vermehrtes Vorkommen von ADAM17 in Brustkrebszellen. Diese Ergebnisse in Kombination mit den in dieser Arbeit gezeigten Kollokalisierungen von Cholera-toxin-gefärbten Ceramid und ADAM17 lassen den Schluss zu, dass die vermehrte Bildung von Ceramid in Verbindung mit der erhöhten Aktivität von ADAM17 steht. Dies wiederum hätte eine Erhöhung des *Sheddings* von sich positiv auf Krebszellen auswirkenden Wachstumsfaktoren zur Folge.

Um zu überprüfen, ob es ebenfalls eine Kollokalisierung von ADAM17 in anderen Formen von *Lipid Rafts* gibt, die vergesellschaftet mit anderen Sphingolipiden sind, wurde Caveolin-1 angefärbt. Die Ergebnisse zeigten, dass die aSMase-Stimulation zur Bildung von Caveolin-1-reichen Regionen und zur Ansammlung von ADAM17 auf der Zelloberfläche führte, allerdings zu keiner Kollokalisierung. Moreno-Càceres et al. zeigten 2014, dass in Hepatozyten Caveolin-1- und eine ADAM17-Ansammlung in Lipid Rafts für eine TGF- β -induzierte EGFR-Transaktivierung benötigt werden, allerdings reproduzierten die hier gezeigten immunzytochemischen Bilder dies nicht (Moreno-Càceres et al. 2014). Caveolae dienen intrazellulären Aufgaben. Man könnte somit spekulieren, dass ADAM17 sich nicht in diesen Caveolin-reichen Regionen anreichert. Allerdings würde dies bedeuten, dass es einen Mechanismus geben muss, der die Lokalisation von ADAM17 in *Lipid Rafts* spezifischer kontrolliert. Um dazu weitere Aussagen treffen zu können, sind weitere Versuche notwendig.

Auch eine Verbindung zwischen der Aktivierung der aSMase, der damit verbundenen Bildung von Ceramid-reichen Regionen und ADAMs lässt sich durch weitere Beispiele belegen. So steigert zum Beispiel CD95 die Aktivität der aSMase (Grassmé et al. 2001). Dieses ist essenziell für die Clusterung des FAS-Liganden in der Membran. Des Weiteren ist CD95 ein weiteres Substrat von ADAM10 (Schulte et al. 2007).

Auch andere Vertreter der ADAM-Familie konnten in Verbindung mit *Lipid Rafts* gebracht werden. Wakatsuki et al. zeigten, dass sich ADAM19, auch Meltin β genannt, in *Lipid Rafts* anreichert und dies Einfluss auf die Enzymaktivität (Wakatsuki et al. 2004).

ADAM17

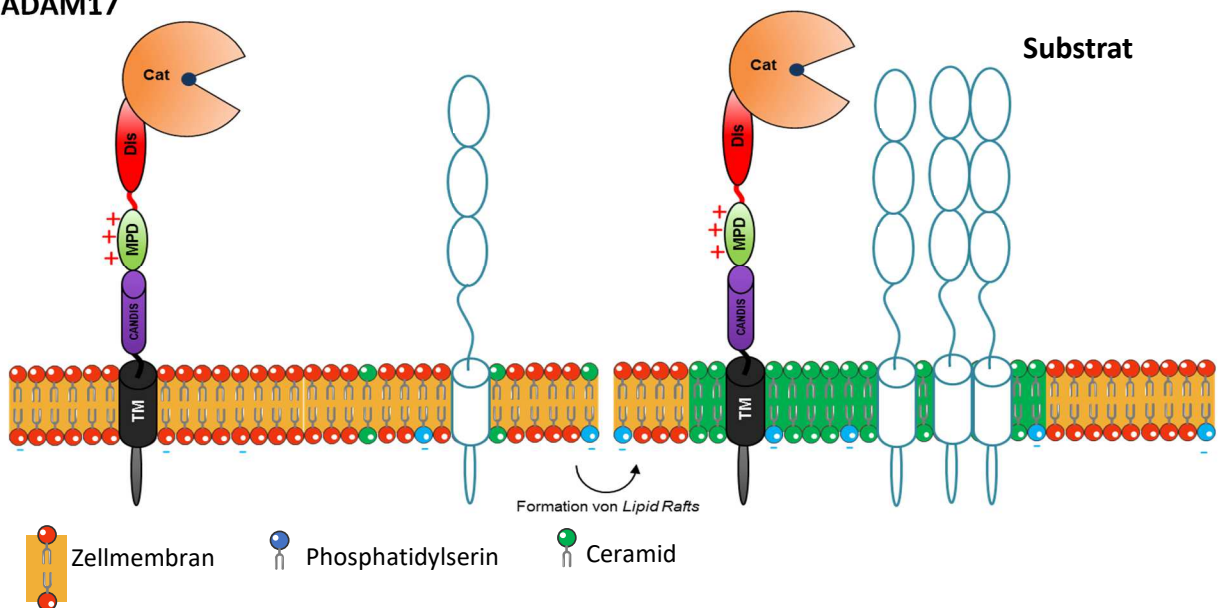


Abbildung 24: Hypothese: Ceramid-reiche Regionen bringen ADAM17 in räumliche Beziehung zu ihren Substraten

Die aSMase führt zur Ceramidbildung aus Spingomyelin. Die neu gebildeten Ceramid-Moleküle schließen sich zu Ceramid-reichen Regionen, so genannten *Lipid Rafts*, zusammen. Durch diese Neuformierung der Ceramidmoleküle in der Zellmembran werden ADAMs und ihre Substrate zueinander hinbewegen. So gelangen die ADAMs in räumliche Nähe zu Ihren Substraten und können im nächsten Schritt ihre *Shedding*-Aktivität aufnehmen. Cat: katalytisches Zentrum, Dis: Disintegrin-ähnliche Domäne, MPD: Membran-proximale Domäne, CANDIS: Stalk-Region, TM: Transmembran Region

5.2. Die aSMase führt zur Phosphatidylserin-Externalisation und damit zur ADAM-Aktivierung

Wie unsere AG zeigen konnte, führte die aSMase Behandlung zur Externalisierung von PS. Somit spielt die aSMase eine entscheidende Rolle bei der ADAM-Aktivierung (Sommer et al. 2016b). PS wird nach Stimulation mittels einer Scramblase von der Innenseite der Membran zur Außenseite transportiert. Hier zieht die negative Ladung des PS die positiv geladene MPD von ADAM17 nach unten, so dass das Enzym in die entscheidende Position für das *Shedding-Event* gebracht wird.

Sun et al. zeigten 2002, dass sich in *Lipid Rafts* eine Anhäufung von EGF-Rezeptoren und der Phospholipid-Scramblase 1 nach EGF-Stimulation beobachten lässt (Sun et al. 2002). Dies zeigt, dass sich in *Lipid Rafts* ADAM-Substrate befinden sowie einen

Mechanismus, der die PS-Externalisierung initialisiert. Die in dieser Arbeit gezeigten Annexin V-FITC gefärbten Bilder festigen diese Hypothese.

Durch die Anfärbung mittels FITC-gekoppeltem Annexin V konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Stimulation mit aSMase zu einer zeitabhängigen PS-Externalisation führt, sondern auch dass sich das PS in abgegrenzten Bereichen der äußeren Membran in Spots ansammelt. Dies wiederum stimmt mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen der indirekten Ceramid-Färbungen durch Cholera toxin B überein.

In dieser Arbeit konnte ein indirekter funktioneller Nachweis der Aktivitätssteigerung der Scramblase durch die aSMase durch den Ca^{2+} -Chelatoren EGTA in ELISAs gezeigt werden. So verringerte EGTA bei Annexin V gefärbten HUVECs und COS7-Zellen die PS-Externalisierung. Die Aktivität der Scramblase ist abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration. Der Kalziumchelator EGTA hemmte signifikant das *Shedding* des TNF α -Rezeptors wahrscheinlich durch die Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen PS-Externalisation. Dies wurde auch im VEGF-Rezeptor-ELISA beobachtet. In der Publikation Sommer et al. 2017, in der auch Ergebnisse dieser Arbeit mit einfließen, konnte durch den Einsatz von Ortho-Phospho-L-Serin (OPLS), der mit PS konkurrierenden Kopfgruppe von PS, bewiesen werden, dass die aSMase die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 PS-abhängig induziert.

Des Weiteren bestanden ebenfalls Zusammenhänge zwischen der PS-Externalisation und der Bildung von Ceramid-reichen Regionen. So wurde interessanterweise bereits eine Kollokalisierung von dem Gangliosid GM1 und damit Ceramid und Phosphatidylserin auf der äußeren Membran von B-Zellen beobachtet (Dillon et al. 2000).

Ebenso wie das *Shedding* vieler ADAM17-Substrate wird auch die PS-Externalisation in der Literatur häufig im Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen genannt. So konnte zum Beispiel Chalaris et al. zeigen, dass das *Shedding* von IL6R während der Apoptose zunimmt (Chalaris et al. 2007). Gleiches gilt für das *Shedding* von TNFR1 und L-Selectin (Madge et al. 1999; Steinhilber et al. 2001).

Die Freisetzung von ADAM10-Substraten steht ebenfalls in Verbindung mit apoptotischen Vorgängen. Das *Shedding* von CD46 durch ADAM10 wurde in apoptotischen Zellen nachgewiesen (Hakulinen und Keski-Oja 2006). Nach Reiss et

al. 2005 war das E-Cadherin-*Shedding* durch die Behandlung mit Staurosporin, welches Apoptose induziert, aktivierbar (Maretzky et al. 2005).

Unsere AG konnte erfolgreich publizieren, dass die Behandlung mit 0,1 U/ml SMase zur Freisetzung von ADAM10- und vor allem von ADAM17-Substraten führt. Die folgende Abbildung zeigt wie durch die Bildung der Ceramid-reichen Regionen und der damit verbundenen räumlichen Annäherung der ADAMs mit ihren Substraten der Shedding-Prozess durch die PS-Externalisierung initialisiert wird.

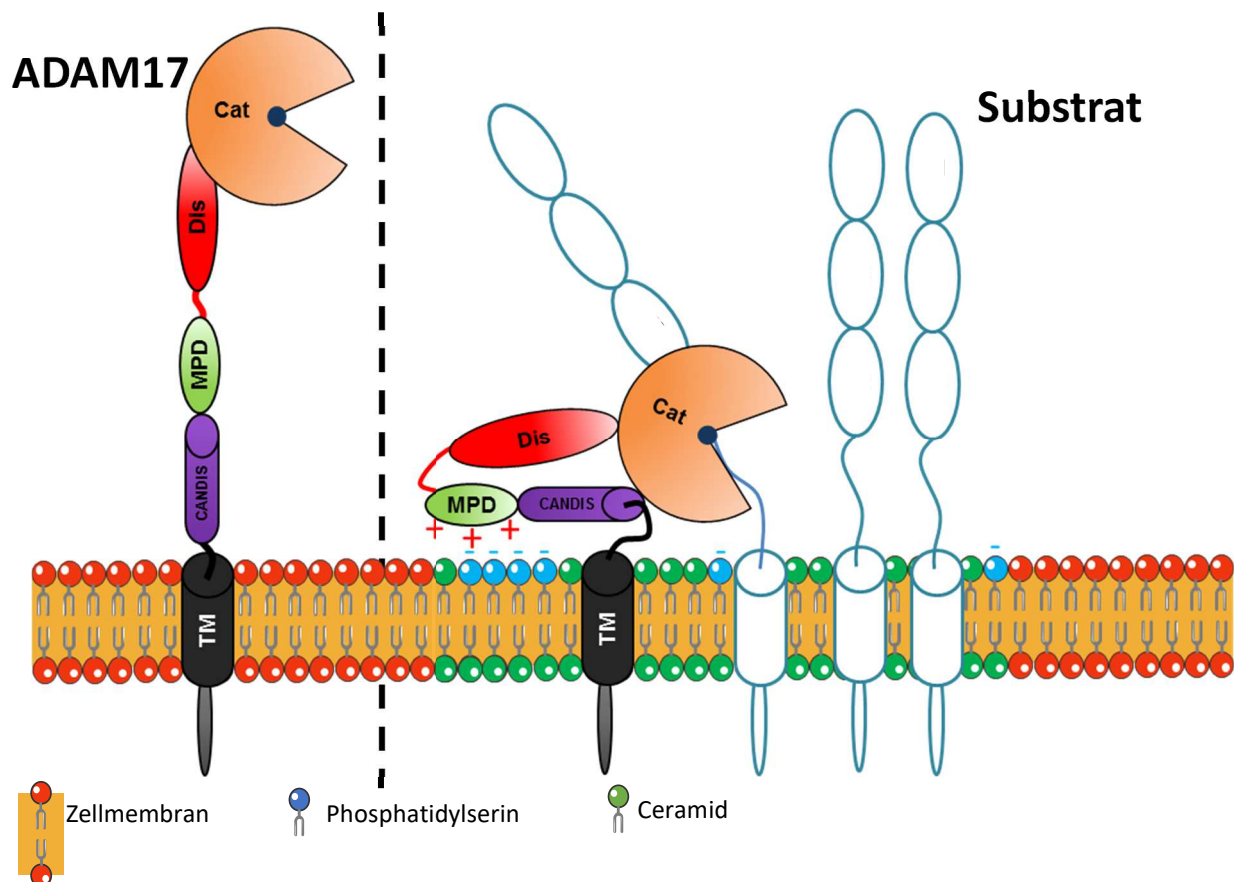


Abbildung 25: Die PS- Externalisierung bringt die ADAM-Enzyme in Shedding-Position

Durch die Aktivierung der Sphingomyelinase bilden sich Ceramid-reiche Region in welchen ADAM 17 in unmittelbare räumliche Nähe zu seinen *Shedding*-Substraten gelangt. Negativ geladenes Phosphatidylserin verlagert sich auf die Außenseite der Membran und interagiert mit der positiv geladenen Membran-proximale Domäne (MPD) des ADAM17. Das katalytische Zentrum des Enzyms kommt so in die benötigte *Shedding*-Position. Cat: katalytisches Zentrum, Dis: Disintegrin-ähnliche Domäne, MPD: Membran-proximale Domäne, CANDIS: Stalk-Region, TM: Transmembran Region

5.3. aSMase erhöht nur bedingt die Metalloprotease-abhängige Permeabilität

Das Endothel bildet eine selektive Barriere zwischen dem Lumen der Blutgefäße und dem umgebenden Gewebe. Die Selektivität des Endothels wird durch unterschiedliche Cytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Adhäsionsmoleküle gewährleistet und reguliert. Eine Reaktion der Endothelzellen wäre zum Beispiel das Abrunden während der Leukozytentransmigration und das Ausbilden von endothelialen Lücken.

ADAM10 und ADAM17 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Permeabilität im Endothel. VE-Cadherin, CD44, CD99 und JAMs sind nur einige Transmembranproteine die durch ADAMs geschnitten werden und anschließend als lösliche Form ins umliegende Gewebe oder ins Blut entlassen werden (Dreymueller et al. 2012a).

Samapati et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die Stimulation mit dem Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) über aSMase-Aktivierung die Permeabilität im Lungenendothel erhöht, indem der *Transient Receptor Potential Channel C6* (TRPC6) aktiviert wird und es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt (Samapati et al. 2012). PAF aktiviert den Gq-gekoppelten PAF-Rezeptor (PAF-R), welcher wiederum die aSMase aktiviert. Das so gebildete Ceramid führt zum Beispiel zur erhöhten Permeabilität im Lungenendothel (Göggel et al. 2004) und außerdem zu einer Bindung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) an Caveolin-1 und damit zu einer verringerten Bildung von Stickstoffoxid (NO) (Yang et al. 2010).

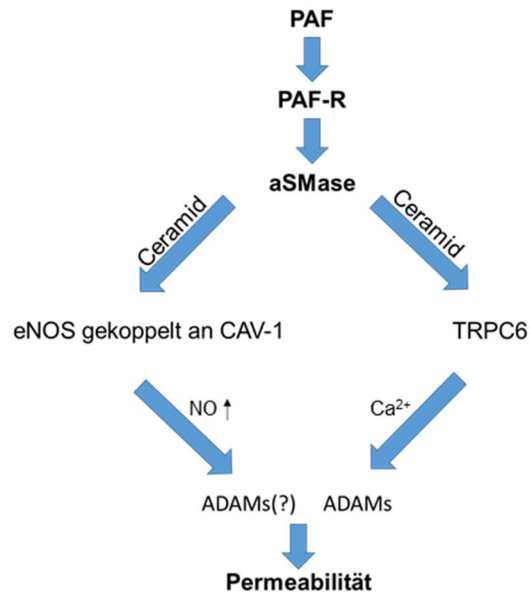


Abbildung 26: Mechanismus der PAF-vermittelten Permeabilitätserhöhung

Die proteolytisch-aktiven Vertreter der ADAMs bestehen aus einer Signalsequenz, einer Prodomäne, einer Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, der EGF-ähnlichen Domäne, einer Transmembran-Region und einer zytoplasmatischen Region. Anstelle der Cystein-reichen Domäne besitzt ADAM17 eine membran-proximale Domäne und anstelle einer EGF-ähnlichen Domäne eine Stalk- oder auch CANDIS- genannte Region.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die Reaktion von *HUVECs* in Bezug auf die Beeinflussung der Permeabilität nach SMase-Stimulation untersucht. Durch die Impedanzmessung lassen sich zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Adhäsion, Zytotoxizität, morphologische Veränderungen, Permeabilität und Barrierefunktion beobachten.

Die durch aSMase stimulierten *HUVECs* zeigten nach einer ca. 20-minütigen Inkubationszeit eine starke Steigerung der Impedanz. Vermutlich ist diese Steigerung ein Indiz für die Abflachung der Zellen als Stressreaktion. Alternativ könnte es auch eine noch nicht beschriebene Reaktion der Endothelzellen auf die aSMase sein. Abbildung 12 zeigt, dass sich die Zellen nach der Stimulation abflachen und Fortsätze ausbilden, in welchen sich Ceramid mittels Antikörperfärbung nachweisen lässt. Diese Beobachtung wurde während der Aufnahmen der Abbildungen im Ergebnisteil häufiger gemacht. Einzelne *HUVECs* bilden lange Fortsätze in Richtung näher liegender Zellen, bzw. es ließ sich beobachten, dass sich Zellen durch die Fortsätze verbinden und es in diesen Regionen zu einer Ceramid-Anhäufung kommt. Diese Verbindung zweier Zellen nach 15-minütiger aSMase-Stimulation lässt sich in Abbildung 11 beobachten.

Nach der gezeigten kurzzeitigen Erhöhung der Impedanz kommt es zu einem 20-minütigen Abfall. Man könnte vermuten, dass die *HUVECs* ihre Fortsätze wieder einziehen und eventuell neu ausgebildete Zell-Zell-Verbindungen wieder getrennt werden. Nach 60 Minuten regeneriert sich das Impedanzniveau wieder auf ein stetiges Level unterhalb der Kontrolle. Verfolgt man die soeben aufgestellte Hypothese, könnte dies darauf schließen lassen, dass sich die Zellen wieder in eine normale Wachstumsphase begeben, die Zell-Zell Verbindungen aber nicht auf das alte Niveau wie vor der Stimulation gelangen. Um diese Ergebnisse und Spekulationen weiter zu vertiefen und eventuell zu bestätigen, bedarf es weiterer Versuche mittels des Verfahrens der Impedanzmessung. Auffallend ist, dass die gezeigten Effekte vermutlich ADAM-unabhängig sind, da die Inhibition mittels Marimastat einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigt. Auch diese Ergebnisse müssen reproduziert werden, um qualitative Aussagen treffen zu können. Allgemein ist der bisher entscheidendere Vertreter der ADAM-Familie der Einfluss auf die Vorgänge der Permeabilität zeigt eher ADAM10. ADAM17 hingegen scheint sich durch die aSMase eher aktivieren zu lassen als ADAM10.

Die Serin-Protease Thrombin katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und ist damit der letzte Schritt der Gerinnungskaskade. Es erhöht durch einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} die Permeabilität im Endothel. Thrombin ist unter anderem auch an Entzündungsmechanismen beteiligt und ein allgemein bekannter ADAM10-Aktivator (Schulz et al. 2008). ADAM10 spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Permeabilität im Endothel (Dreymueller et al. 2012b). Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde Thrombin als Positiv-Kontrolle genutzt. Die Impedanzmessung nach Thrombin-Stimulation bewirkte eine Senkung der voran gegangenen Werte. Ein weiteres Absinken der Werte ließ sich durch die Behandlung mit Marimastat bewirken. Dies lässt vermuten, dass weitere entscheidende Mechanismen an der Thrombin-vermittelten Erhöhung der Permeabilität im Endothel beteiligt sind, die von der Metalloproteaseaktivität unabhängig sind. Dies widerspricht dem in der Literatur beschriebenen Effekt der Erhöhung des ADAM10-vermittelten *Shedding* von zum Beispiel VE-Cadherin, welches durch Schulz et al. gezeigt werden konnte (Schulz et al. 2008). Ein möglicher Grund könnte die Wahl der *HUVECs* in diesem Versuch sein. Im Verlauf der für diese Arbeit durchgeführten Versuche ließ sich immer wieder

beobachten, dass *HUVECs* eine relativ anspruchsvolle Zelllinie darstellen, die schon bei geringsten negativen Beeinflussungen des umgebenen Milieus Stressreaktionen zeigten, bzw. in Apoptose gingen. Somit könnte die hier gezeigte Behandlung mit Thrombin und Marimastat die Zellen zu stark gestresst haben.

Weiterhin wurden die *HUVECs* mit EGTA allein und aSMase mit EGTA stimuliert, um die Hypothese der PS-vermittelten Aktivierung von ADAMs und eine damit verbundene Erhöhung der Permeabilität weiter zu erforschen. Dies bewirkte eine starke Abnahme der Impedanz nach EGTA-Behandlung. Der Verlauf bei gleichzeitiger Stimulation mit aSMase war gleichwertig. Diese Reaktion lässt sich dadurch erklären, dass die alleinige Zugabe von EGTA schon so starke Effekte hervorruft, dass diese vermutlich die Reaktion der Zellen auf die aSMase überlagern. EGTA als Ca^{2+} -Chelator verhindert die Zell-Adhäsion. Um über diese Ergebnisse valide Aussagen geben zu können, müsste der Versuch mit unterschiedlichen niedrigeren EGTA-Konzentrationen und gleichzeitiger aSMase-Stimulation wiederholt werden.

5.4. Einfluss der aSMase auf ADAM10

Ein potenter Aktivator für ADAM17 ist der Proteinkinase-C(PKC)–Aktivator PMA (Horiuchi et al. 2007; Le Gall et al. 2010b; Sahin et al. 2004). PMA ist ein Strukturanalog des Diacylglycerols, welcher einen natürlichen Aktivator der PKC-Isoformen darstellt. Nach Yusuf A Hannun et al. 2008 führt die Produktion von Ceramid durch SMasen zu einer gesteigerten Aktivität der PKC (Hannun und Obeid 2008). Fox et al. beobachteten, dass in Ceramid-reiche Regionen die Aktivität der PKC ebenfalls gesteigert ist (Fox et al. 2007).

Es ist also wahrscheinlich, dass es zu einer Aktivitätssteigerung der PKC in Ceramid-reichen Regionen kommt und diese die ADAM17-Aktivität positiv beeinflusst. Somit ist denkbar, dass die entscheidenden Reaktionen in *Lipid Rafts*, vermittelt durch die PKC, wenigstens in einigen Fällen stattfinden. ADAM10 scheint unbeeinflusst von der Aktivität der PKC (Carey et al. 2011; Sahin et al. 2004; Horiuchi et al. 2007).

Die ADAM10-Aktivierung hingegen wird durch eine Kalzium-Erhöhung gesteigert (Maretzky et al. 2005). In den in dieser Arbeit abgebildeten AP-Assays im Abschnitt

4.4 konnte eine deutliche Steigerung des *Sheddings* des ADAM10-Substrates BTC durch die aSMase abgelesen werden. Diese erhöhte Aktivität kann durch den Ca^{2+} -Chelator EGTA deutlich herabgesetzt werden. Es wäre interessant herauszufinden, ob die alleinige Stimulation der Zellen mit der aSMase zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom führt. Kato et al. fanden 2007 heraus, dass ein erhöhter extrazellulärer Kalziumspiegel die aSMase und die Metalloproteinase-9 aktiviert (Kato et al. 2007). Die neutrale SMase hingegen blieb unbeeinflusst. Sie spekulierten, dass ein möglicher Sensor des äußeren pH-Wertes die aSMase aktiviert und zu einem vermehrten Kalzium-Einstrom führt (Kato et al. 2007).

Durch die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 durch die Stimulation mit der aSMase in ihrer Aktivität gesteigert werden können. Es ist denkbar, dass diese Aktivierung durch die Bildung von *Lipid Rafts* hervorgerufen wird, indem beide Enzyme in räumliche Verbindung zu ihren Substraten treten. Die aSMase scheint aber auch auf anderen Wegen sowohl ADAM10 als auch ADAM17 zu beeinflussen, ADAM17 durch die zusätzliche Stimulation der PKC im Sinne einer doppelten Aktivierung, ADAM10 durch einen erhöhten Kalziumeinstrom ins Zytosol. Ob der Einfluss auf den Effekt der aSMase PKC-abhängig ist, könnte durch den Einsatz von PKC-Inhibitoren überprüft werden. Entscheidend für die Aktivierung beider Enzyme ist jedoch die PS-Externalisierung (Bleibaum et al. 2019; Sommer et al. 2016b).

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht alle Vermutungen ausreichend belegt werden konnten, müssten weitere Versuche vorgenommen werden. Das *Shedding* weiterer Substrate nach der Stimulation mit der aSMase wäre dabei zu beobachten. Auch ein *Costaining* von ADAM10 mit einem oder mehreren seiner Substrate nach der Stimulation durch aSMase könnte für weitere Erkenntnisse hilfreich sein.

5.5. ROS als Ausblick auf weitere Aktivierungswege

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind hochreaktive Moleküle, die im Organismus als Nebenprodukt der Atmungskette in Mitochondrien entstehen und von Immunzellen

produziert werden, um so Viren, Parasiten und Bakterien abzuwehren. Zu den ROS zählen unter anderem Hyperoxid-Anionen, aber auch das stabile Wasserstoffperoxid (H_2O_2). H_2O_2 entsteht physiologisch in mehreren biochemischen Prozessen, unter anderem wird es durch die Glukose-Oxidase (GOD) bei der sauerstoffabhängigen Oxidation des C₁-Kohlenstoffatoms des Zuckers produziert. Es wird intrazellulär in Peroxisomen durch das Enzym Katalase inaktiviert.

Nach Corda et al. führt die Aktivierung der aSMase durch $\text{TNF}\alpha$ und der damit verbundenen Bildung von Ceramid zur Produktion von mitochondrialen ROS (Corda et al. 2001). Experimente an Hepatozyten zeigten, dass die Inhibition der aSMase eine verminderte Freisetzung von ROS bewirkt (Reinehr et al. 2005). Dies konnte ebenfalls in Splenozyten nachgewiesen werden (Dumitru und Gulbins 2006). Li et al. zeigten 2012, dass oxidativer Stress zur Ca^{2+} -abhängigen Membranexpression der aSMase führt und somit zur Bildung von Ceramid-reichen Regionen (Li et al. 2012).

Letztendlich weisen all diese Studien eine gegenseitige Beeinflussung der SMase und ROS auf. Um Näheres über die Rolle der aSMase und der damit vermuteten Aktivierung der ADAM-Enzyme in Bezug auf die bereits veröffentlichten Erkenntnisse zu erfahren, wurde in COS7-Zellen und *HUVECs* die ROS-Produktion nachgewiesen.

In *HUVECs* führte die Stimulation mit aSMase zur erhöhten Produktion von ROS, die auch nach 4 Stunden nicht absank. Dieser Effekt konnte durch MM und EGTA inhibiert werden. Eine mögliche Erklärung könnte in einer zyklischen Aktivierungskaskade liegen (siehe Abbildung 27).

Wie in Abbildung 27 schematisch dargestellt, könnte die aSMase durch die Aktivierung von ADAM17 zur verstärkten Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ führen, welches bekanntermaßen wiederum unter anderem die Aktivität der aSMase steigern könnte. Die aSMase schneidet Sphingomyelin und führt damit zur erneut verstärkten Bildung von ROS. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, dass auch nach 4 Stunden die ROS-Produktion nach aSMase-Stimulation nicht abnimmt, was auf einen verstärkten Rückkopplungseffekt hinweist. Hingegen führt die alleinige Behandlung der Zellen mit EGTA und MM zu keiner vermehrten ROS-Produktion.

$\text{TNF}\alpha$ führte zwar zur erhöhten Produktion von ROS, allerdings blieben die Ergebnisse deutlich unter dem Niveau der aSMase-stimulierten Proben. Zu hinterfragen ist,

weshalb MM nicht den Effekt von $\text{TNF}\alpha$ inhibierte. Eventuell überlagert der deutliche Effekt der $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation den Effekt der aSMase. Die in Abbildung 27 gezeigte Rückkopplung käme somit nicht zum Tragen. Um genauere Aussagen über die durch aSMase vermittelte ADAM-Aktivierung und der damit vermuteten Produktion von ROS machen zu können, müsste der Versuch wiederholt werden.

Imipramin ist für seine SMase-inhibierende Wirkung bekannt (Albouz et al. 1981; Hurwitz et al. 1994a; Hurwitz et al. 1994b) und inhibiert in den hier gezeigten Versuchen die Wirkung der aSMase, aber auch die von $\text{TNF}\alpha$.

Wie oben bereits erklärt, zählt H_2O_2 zu den ROS, weshalb es hier als Positivkontrolle genutzt wurde.

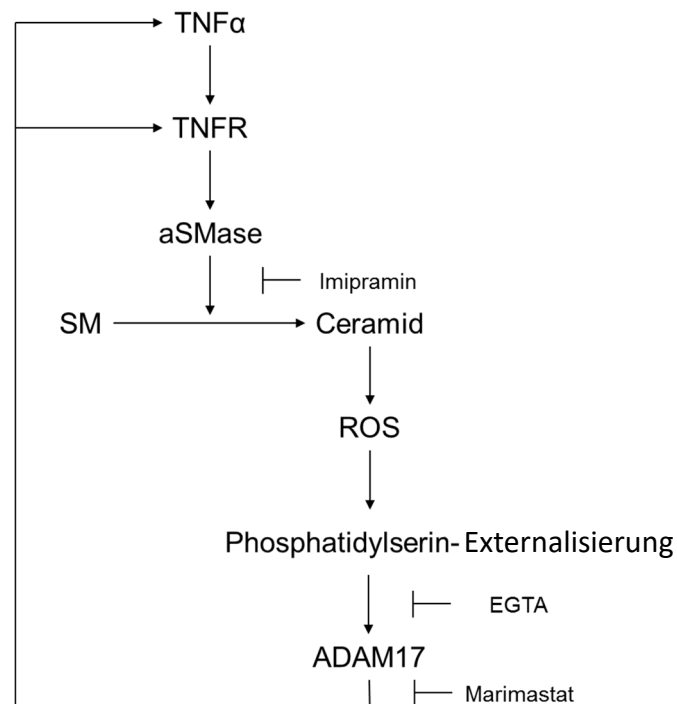


Abbildung 27: Hypothetische Darstellung der Interaktion von aSMase, ROS und ADAM17

$\text{TNF}\alpha$ führt über den membranständigen Rezeptor TNFR1 zur Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (aSMase). Die dadurch vermehrte Bildung von Ceramid aus Sphingomyelin (SM) führt zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die durch ROS hervorgerufene Phosphatidylserin-Externalisierung aktiviert ADAM17, welches wiederum pro- $\text{TNF}\alpha$ und den TNF-Rezeptor (TNFR1) schneidet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der COS7-Zellen unterscheiden sich von denen der *HUVECs* nur durch den Effekt von Marimastat. Da COS7-Zellen keinen TNF-Rezeptor besitzen, wurde nicht mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Auch hier führt die aSMase-Stimulation zur deutlich erhöhten Bildung von ROS. Diese lässt sich allerdings nicht

durch MM inhibieren. Die leicht abgeschwächte ROS-Bildung im Vergleich zu den *HUVECs* lässt sich durch die fehlende Rückkopplung des TNF-Rezeptors erklären. Um die starke Inhibition durch MM in *HUVECs* zu erklären, werden allerdings weitere Untersuchungen nötig sein.

Wie in Kapitel 5.4 beschrieben, aktiviert die PKC ADAM17. Inoguchi et al. zeigten weiterhin, dass die PKC über die NAD(P)H-Oxidase vermittelt zu einer gesteigerten Produktion von ROS führt (Inoguchi et al. 2003).

Auch wurde in der Literatur bereits häufiger eine Aktivierung der PKC durch die aSMase beschrieben (Zeidan und Hannun 2007; Fox et al. 2007).

Führt man alle hier vorgetragenen Erkenntnisse zusammen, ergibt sich folgende Möglichkeit einer Aktivierungskaskade von ADAM17 wie in Abbildung 28 aufgezeigt. Diese Reihenfolge zeigt gleichzeitig einen Weg, bei dem ADAM17 durch unterschiedliche Faktoren feiner in seiner Aktivität reguliert werden könnte.

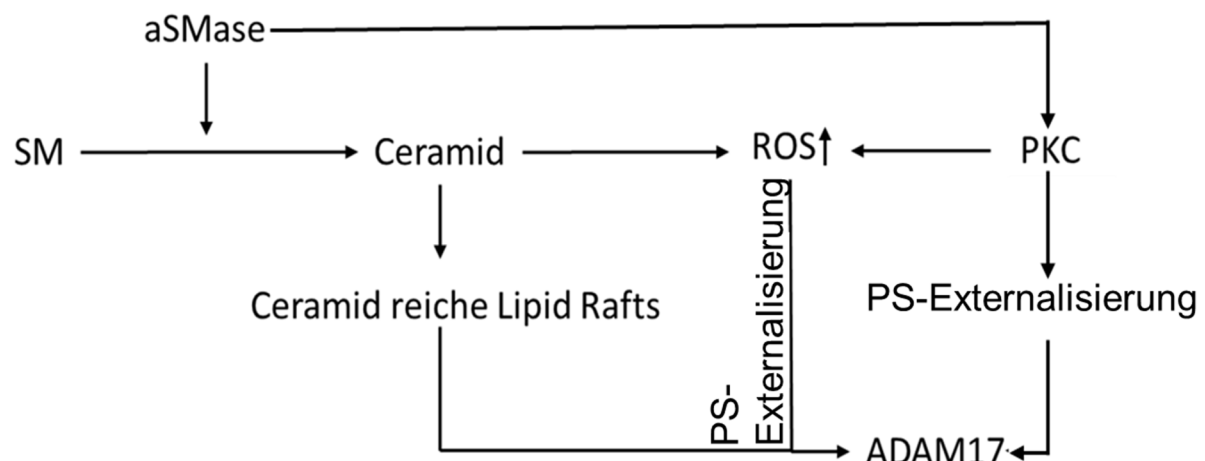


Abbildung 28: Mögliche Aktivierungskaskade von ADAM17

Abbildung 26: Mögliche Aktivierungskaskade von ADAM17
Das durch die aSMase produzierte Ceramid bildet *Lipid Rafts*. In diesen kommen ADAM17 und seine Substrate in räumliche Beziehung. Gleichzeitig aktiviert Ceramid die Produktion von ROS, ebenso wie die der PKC. ROS führt über die PS- Externalisierung zur ADAM-Aktivierung. Ebenso wie durch die PKC.

Choo et al. konnten bereits beobachten, dass nach erhöhten Werten von ROS in Thrombozyten eine PS-Externalisation folgt (Choo et al. 2012). Informativ wäre es eine gegenseitige Beeinflussung zwischen ROS, der PS-Externasierung und der ADAM-vermittelten Shedding-Aktivität zu überprüfen. Zum Beispiel könnte man testen, ob es vor der PS-Externalisierung zu erhöhten ROS-Werten kommt und gleichzeitig eine höhere Produktion ADAM-spezifischen Substraten folgt.

Da ADAMs viele bedeutende Prozesse in unserem Organismus maßgeblich beeinflussen, ist ihre feine und spezifische Aktivierung ungemein bedeutend. Viele weitere beeinflussende Faktoren sind deshalb sicherlich noch nicht aufgedeckt, weshalb weitere Untersuchungen benötigt werden, um die vielen einzelnen und kleinen Prozesse zu einem komplexen Bild zusammenführen zu können.

5.6. Neuere Erkenntnisse

In den Jahren, in denen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit verarbeitet wurden, konnten neue Publikationen weiter die These bestätigen, nach der die PS-Externalisierung der entscheidende Schritt bei der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung darstellt. So zeigte die Veröffentlichung von Sommer et al. den Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -abhängigen PS-Externalisation und der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 und erklärt, wie die MPD-Region mit PS interagiert (Sommer et al. 2016). Nach Sommer et al. ist die Aktivierung von ADAM17 in zwei Schritte aufgeteilt. Einer schnellen Protein-Lipid Interaktion zur Bildung einer amphipathischen Helix, die sich in die Doppelschicht einlagert und so die Membranbindung stabilisiert, folgt die Interaktion der MPD von ADAM17 mit dem externalisierten PS (Sommer et al. 2016). So macht der PS-Externalisation den Schneideprozess von ADAM17 erst möglich.

Veit et al. konnten zeigen, dass der Aktivierung von Anoctamin-6, welches eine Ca^{2+} -abhängige Scramblase ist, eine PS-Externalisierung folgt, sowie ein vermehrtes *Shedding* der ADAM17-Substrate Amphiregulin (AREG) und TGF- α . Transformierte Zellen mit permanent aktiviertem Anoctamin-6 zeigten spontane PS-Externalisierung und Freisetzung von ADAM17-Substraten ohne weitere Stimuli (Veit et al. 2018).

Desweiteren konnte durch Bleibaum et al. gezeigt werden, dass sehr ähnliche Mechanismen welche zur Aktivierung von ADAM17 führen auch für die Aktivierung von ADAM10 verantwortlich sind (Bleibaum et al. 2019).

6. Zusammenfassung

ADAM10 („*A Disintegrin and Metalloprotease*“) und ADAM17 spielen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Durch das *Shedding* unterschiedlicher Substrate wie zum Beispiel VE-Cadherin, TNF α -Rezeptor oder den VEGF-Rezeptor-1 wirken sie mit bei der Regulierung von zum Beispiel Adhäsionsprozessen und Entzündungsmechanismen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen *Lipid Rafts* und ADAM17 wurde bereits in der Literatur beschrieben. Da die saure Sphingomyelinase (*acid* (a-)SMase) Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin spaltet und sich die Ceramidmoleküle zu *Lipid Rafts* formieren, sollte in dieser Arbeit die Rolle der aSMase beim *Shedding* von ADAM10- und ADAM17-Substraten untersucht werden, sowie eine mögliche Kolokalisierung von Ceramidreichen Regionen und ADAM17 überprüft werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass ADAMs bei Entzündungsprozessen die Permeabilität im Endothel beeinflussen. Deshalb wurde die Bildung von *Lipid Rafts*, induziert durch die aSMase, auf ihren Einfluss auf die Permeabilität überprüft. Des Weiteren wurde getestet, ob die aSMase die Phosphatidylserin-Externalisierung (PS-Externalisierung) beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte durch TNFR1-ELISAs, TNF α -AP-Assays, BTC-AP-Assays und Western Blots in COS7-Zellen und *HUVECs* gezeigt werden, dass eine exogene Zugabe von kurzkettigen und langkettigen Ceramiden das *Shedding* von ADAM10- und -17-Substraten nicht beeinflusst. Allerdings stellte sich bei den eben genannten Versuchen heraus, dass die Stimulation mit der aSMase zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung beider Enzyme führte.

Mittels ICC-Färbungen zeigte sich, dass eine Stimulation mit aSMase zur Bildung von Ceramidreichen Region in COS7-Zellen und *HUVECs* führte. Die Anfärbung mit dem Choleratoxin B zeigte die Bildung von Ceramidreichen *Lipid Rafts* in der Zellmembran und eine gleichzeitige Kolokalisation mit ADAM17 nach 15, 30 und 120 Minuten. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die mit aSMase stimulierten *HUVECs* lange Ausläufer bilden, in denen sich Ceramid anhäufte. Annexin V-FITC-Färbungen zeigten eine PS-Externalisierung nach der Stimulation von COS7-Zellen und *HUVECs* mit der aSMase nach 15 und 30 Minuten, die durch EGTA inhibiert werden konnte.

Zusammenfassung

Durch BTC- AP-Assays konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von COS7-Zellen mit aSMase zum erhöhten *Shedding* von ADAM10 – Substraten führt. Dies konnte durch TGF α -AP-Assays auch für ADAM17 bestätigt werden. TNFR1-ELISAs ergaben eine erhöhte Freisetzung des ADAM17-Substrats. Für VEGFR2 konnte dies im gleichen Verfahren nur einmal nachgewiesen werden.

Mittels der Impedanzmessung mit einem ICelligence-Gerät wurde der Effekt der aSMase in *HUVECs* auf die Permeabilität im Endothel untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die aSMase nur bedingten Einfluss hat. Die gezeigten Ergebnisse lassen sich eher als Stressreaktion der Zellen deuten.

Um den Einfluss von Stressfaktoren auf die Aktivität von ADAM17 genauer zu untersuchen, wurden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in COS7-Zellen und *HUVECs* durch den membrangängigen Farbstoff DCFDA nach aSMase-Stimulation angefärbt. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte ROS-Produktion in beiden Zelllinien. Eventuell aktiviert die vermehrte Ceramidproduktion die Produktion von ROS, welche zur PS-Externalisierung führt und so ADAM17 aktiviert. Die aSMase könnte auch direkt die Proteinkinase C (PKC) aktivieren welche wiederum über die PS- Externalisierung ADAM17 aktiviert.

Die aus dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass es durch die aSMase in den Ceramid-reichen Regionen zu einer räumlichen Zusammenführung von ADAM10 und ADAM17 mit ihren Substraten kommt. Die anschließende PS-Externalisierung bringt das aktive Zentrum der Enzyme in *Shedding*- Position.

7. Summary

The „Disintegrin and Metalloproteases“ ADAM10 and ADAM17 play decisive roles in many physiological and pathologic processes. ADAMs cleave transmembrane proteins, for example VE-Cadherin, TNF α -receptors or VEGF-receptor-1, thereby releasing the extracellular part, a process referred to as shedding. This activity regulates for example cell adhesion and inflammatory processes.

A potential relation between ADAM17 and lipid rafts has already been described in the literature. The acid sphingomyelinase (aSMase) breaks sphingomyelin down into phosphorylcholine and ceramide. Afterwards, the ceramide molecules form lipid rafts.

In this work, the importance of the aSMase for ADAM10- and ADAM17-mediated shedding was investigated. Additionally, potential colocalization of ceramide rich areas and ADAM17 was evaluated. Recent studies showed that the activity of ADAMs in inflammatory processes increases the permeability of endothelial tissues. This work investigated the role from aSMase induced lipid rafts on ADAM10- and -17- mediated permeability changes and furthermore the importance of phosphatidylserine (PS) exposure for ADAM17-activity.

TNFR1-ELISAs, TNF α -AP-Assays, BTC-AP-Assays and Western Blots showed that exogenous applied ceramides do not influence the shedding-activity of ADAM10 and -17 in COS7-cells and HUVECs. In contrast, the addition of aSMase to these cells provoked an increase of substrate release mediated by both enzymes.

ICC-staining showed the formation of ceramide rich lipid rafts in COS7-cells and HUVECs. Staining with Cholera toxin B presented a colocalisation of this lipid rafts and ADAM17 after 15, 30 and 120 minutes. The microscopic images showed that HUVECs formed long branches which contained ceramide rich areas upon aSMase-stimulation. COS7-cells and HUVECs stained with Annexin V-FITC showed PS-exposure after 15 and 30 minutes upon stimulation.

BTC-AP-Assays and TNF α -AP-Assays in COS7-cells revealed an increase of ADAM10 and -17 substrate shedding upon aSMase stimulation. TNFR1-ELISAs

Summary

showed an increase of TNFR1 release in the supernatant after aSMase treatment, in contrast another ADAM17 substrate VEGFR2 was not cleaved.

The ICelligence system was used to analyse the influence of aSMase on endothelial permeability. However, the results obtained were largely inconclusive. leading to the supposition that we only detected cellular stress reactions.

In order to analyse the involvement of stress factors in the ADAM17 activation process, reactive oxygen species (ROS) were stained with DCFDA after stimulation with aSMase in COS7-cells and HUVECs. The results showed an increase of ROS-production in both cell lines. High presence of ceramides may activate ROS-production, this could lead to PS-exposure and ADAM17-activation. Furthermore, the aSMase could directly activate the protein kinase C which induces the activation of ADAM17.

In summery, the results lead to the hypothesis, that in the aSMase-induced ceramide-rich lipid rafts, ADAM10 and ADAM17 and their substrates could come in close proximity. Upon PS scrambling the protease can electrostatically interact with PS, which drives a conformational change of the protein, enabling the cleavage of the substrate.

8. Abkürzungsverzeichnis

A

ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ADAMTS	Thrombospondinmotiv-enthaltenen ADAMs
AP-(Assay)	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
aSMase	Saure Sphingomyelinase (engl.: <i>Acid Sphingomyelinase</i>)

B

BSA	Bovines Serumalbumin
BTC	Betacellulin
bzw	Beziehungsweise

C

Ca ²⁺	Kalziumion
CANDIS	<i>Conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence</i>
CAV-1	Caveolin-1
CD (z.B. CD95)	<i>Cluster of differentiation</i>
CoA	<i>Coenzyme A</i>

Abkürzungsverzeichnis

CXCL16 *CXC-Motiv-Chemokin 16*

D

DABCO Diazabicyclooctane

DAPI 4,6-Diamidin-2-phenylindol

DCFDA 2',7' –dichlorofluorescein diacetate

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimethylsulfoxid

DNS Desoxyribonukleinsäure

DTT Dithiothreitol

E

E-Cadherin Epitheliales Cadherin (engl.: *epithelial cadherin*)

ECBM *Endothelial Cell Basal Medium*

EGF *epidermal growth factor*

ECGM *Endothelial Cell Growth Medium*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: *Ethylendiamintetraacetat*)

EGF Epidermale Wachstumsfaktor (engl. *epidermal growth factor*)

EGFR Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
(engl. *epidermal growth factor receptor*)

EGTA Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (engl.: *Ethylene glycol tetraacetic acid*)

Abkürzungsverzeichnis

ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

F

FCS	<i>Fetal calve serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G

GOD	Glukose-Oxidase
-----	-----------------

H

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	<i>Heparin binding EGF-like growth factor</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperaziny) - ethansulfonsäure
<i>HUVEC</i>	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl.: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)

I

ICC	<i>Immunzytochemisch</i>
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
Imi	Imipramin

J

K

KCl	Kaliumchlorid
-----	---------------

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
<u>L</u>	
L-aSMase	lysosomale Sphingomyelinase
Ligno	Lignoceric
<u>M</u>	
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium
MgCl_2	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MM	Marimastat
mM	Millimolar
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MPD	membranproximale Domäne
<u>N</u>	
n.s.	nicht signifikant
Na_2HPO_4	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nerv	Nervonic
nm	Newtonmeter

Abkürzungsverzeichnis

NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
<u>O</u>	
<u>P</u>	
PAF	Plättchen aktivierender Faktor (engl.: <i>Platelet activating factor</i>)
PAF-R	Plättchen-aktivierender Faktor Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Protein-Disulfid Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Phosphokinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rh	Recombinant human
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>Rapid reactive oxygen specie</i>)
<u>Q</u>	
<u>R</u>	
<u>S</u>	
S-aSMase	sezernierte saure Sphingomyelinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate

Abkürzungsverzeichnis

SDS-PAGE SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SEM Standard error of the mean

SMase Sphingomyelinase

SVMPs *snake venom metalloproteases*

I

TACE *tumor necrosis factor- α -converting enzyme*

TEMED Tetramethylethyldiamin

TNF- α *transforming growth factor*

TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TRPC6 *Transient Receptor Potential Channel C6*

U

V

V Volt

VE-Cadherin *Vascular endothelial Cadherin*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

z.B. Zum Beispiel

W

X

Y

Z

Zn²⁺ Zinkion

ZnCl₂ Zinkchlorid

ZNS Zentrales Nervensystem

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ADAM10 und -17-Substrate und der Funktion	5
Tabelle 2: verwendete Plasmide.....	25
Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper	25
Tabelle 4: verwendete sekundäre Antikörper	26
Tabelle 5: weitere <i>Staining</i> -Verfahren	26
Tabelle 6: Gelzusammensetzung (die Angaben beziehen sich auf ein Gel).....	35

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Domänenstruktur von ADAM10 und -17 und ADAMs allgemein.....	2
Abbildung 2: <i>Shedding</i> -Position von ADAM17.....	4
Abbildung 3: Ceramid C6 erhöht nicht das <i>Shedding</i> des TNF α -Rezeptors.....	45
Abbildung 4: Ceramid-C6 erhöht im Gegensatz zur aSMase nicht das <i>Shedding</i> von endogenem BTC und TGF- α im AP-Assay.....	46
Abbildung 5: Ceramid-C6 erhöht nicht das VE-Cadherin- <i>Shedding</i>	47
Abbildung 6: Exogene Ceramide erhöhen unabhängig von ihrer Länge nicht das VE-Cadherin- <i>Shedding</i>	48
Abbildung 7: Exogene Ceramide erhöhen nicht das TNFR1- <i>Shedding</i>	49
Abbildung 8: aSMase stimuliert das Shedding von TGF α und BTC in COS7-Zellen	50
Abbildung 9: aSMase erhöht das <i>Shedding</i> von membranständigen Rezeptoren....	52
Abbildung 10: aSMase-Stimulation bewirkt eine zeitabhängige Bildung von Ceramidreichen Regionen in COS-7 Zellen.....	53
Abbildung 11: aSMase induziert die Bildung von Ceramid in der Membran von HUVECs.....	54
Abbildung 12: aSMase-Stimulation führt zur Verteilung des Ceramids in die Zellausläufer der HUVECs.....	55
Abbildung 13: Immunzytochemische Färbung von Caveolin-1 in COS7-Zellen.....	56
Abbildung 14: aSMase-Stimulation führt nicht zur Koloalisation von Caveolin und ADAM17.....	57
Abbildung 15: Stimulation von COS7-Zellen mit aSMase führt zur Bildung von Ceramidreichen Spots.....	58
Abbildung 16: aSMase-Stimulation in HUVECs führt zur Anreicherung von ADAM17 in Ceramidreichen Regionen.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17: aSMase-Stimulation führt in COS7-Zellen zur vermehrten PS-Externalisierung.....	62
Abbildung 18: aSMase-Stimulation führt in <i>HUVECs</i> zur vermehrten PS-Externalisierung.....	63
Abbildung 19: Thrombin als ADAM10-Stimulus führt zur Reduktion der Impedanz in <i>HUVECs</i>	64
Abbildung 20: SMase-Stimulation führt zur kurzzeitigen Impedanz-Steigerung	65
Abbildung 21: EGTA führt zur starken Verminderung der Impedanz.....	66
Abbildung 22: aSMase-Stimulation führt zur vermehrten ROS-Produktion in COS7-Zellen.....	67
Abbildung 23: TNF- und aSMase-Stimulation führt zur leicht erhöhten Produktion von ROS in <i>HUVECs</i>	69
Abbildung 24: Hypothese: Ceramid-reiche Regionen bringen ADAM17 in räumliche Beziehung zu ihren Substraten.....	75
Abbildung 25: Die PS- Externalisierung bringt die ADAM-Enzyme in Shedding-Position	77
Abbildung 26: Mechanismus der PAF-vermittelten Permeabilitätserhöhung	79
Abbildung 27: Hypothetische Darstellung der Interaktion von aSMase, ROS und ADAM17	84
Abbildung 28: Mögliche Aktivierungskaskade von ADAM17.....	85

11.Literaturverzeichnis

- Abdel Shakor, Abo Bakr; Kwiatkowska, Katarzyna; Sobota, Andrzej (2004): Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (35), S. 36778–36787. DOI: 10.1074/jbc.M402170200.
- Albouz, S.; Hauw, J. J.; Berwald-Netter, Y.; Boutry, J. M.; Bourdon, R.; Baumann, N. (1981): Tricyclic antidepressants induce sphingomyelinase deficiency in fibroblast and neuroblastoma cell cultures. In: *Biomedicine / [publiee pour l'A.A.I.C.I.G.]* 35 (7-8), S. 218–220.
- Anand-Apte, Bela; Ebrahim, Quteba; Cutler, Alecia; Farage, Eric; Sugimoto, Masahiko; Hollyfield, Joe; Folkman, Judah (2010): Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice. In: *PloS one* 5 (10), e13444. DOI: 10.1371/journal.pone.0013444.
- Anderson, Richard G. W.; Jacobson, Ken (2002): A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5574), S. 1821–1825. DOI: 10.1126/science.1068886.
- Asakura, Masanori; Kitakaze, Masafumi; Takashima, Seiji; Liao, Yulin; Ishikura, Fuminobu; Yoshinaka, Tsuyoshi et al. (2002): Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF. Metalloproteinase inhibitors as a new therapy. In: *Nature medicine* 8 (1), S. 35–40. DOI: 10.1038/nm0102-35.
- Bell, Jessica H.; Herrera, Amy H.; Li, Ying; Walcheck, Bruce (2007): Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF-α and its receptors by neutrophils and macrophages. In: *Journal of leukocyte biology* 82 (1), S. 173–176. DOI: 10.1189/jlb.0307193.
- Bezombes, Christine; Grazide, Solène; Garret, Céline; Fabre, Claire; Quillet-Mary, Anne; Müller, Sabina et al. (2004): Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. In: *Blood* 104 (4), S. 1166–1173. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0277.

- Bianco, Fabio; Perrotta, Cristiana; Novellino, Luisa; Francolini, Maura; Riganti, Loredana; Menna, Elisabetta et al. (2009): Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. In: *The EMBO journal* 28 (8), S. 1043–1054. DOI: 10.1038/emboj.2009.45.
- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F. et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. In: *Nature* 385 (6618), S. 729–733. DOI: 10.1038/385729a0.
- Bleibaum, Florian; Sommer, Anselm; Veit, Martin; Rabe, Bjorn; Andra, Jorg; Kunzelmann, Karl et al. (2019): ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. In: *Journal of molecular cell biology*. DOI: 10.1093/jmcb/mjz008.
- Brown, R. E. (1998): Sphingolipid organization in biomembranes. What physical studies of model membranes reveal. In: *Journal of cell science* 111 (Pt 1), S. 1–9.
- Bucki, R.; Janmey, P. A.; Vegners, R.; Giraud, F.; Sulpice, J. C. (2001): Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in phosphatidylserine exposure in platelets. Use of a permeant phosphoinositide-binding peptide. In: *Biochemistry* 40 (51), S. 15752–15761.
- Carey, Robyn M.; Blusztajn, Jan K.; Slack, Barbara E. (2011): Surface expression and limited proteolysis of ADAM10 are increased by a dominant negative inhibitor of dynamin. In: *BMC cell biology* 12, S. 20. DOI: 10.1186/1471-2121-12-20.
- Chakraborty, G.; Ziemba, S.; Drivas, A.; Ledeen, R. W. (1997): Myelin contains neutral sphingomyelinase activity that is stimulated by tumor necrosis factor-alpha. In: *Journal of neuroscience research* 50 (3), S. 466–476. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19971101)50:3<466:AID-JNR13>3.0.CO;2-4.
- Chalaris, Athena; Rabe, Björn; Paliga, Krzysztof; Lange, Hans; Laskay, Tamas; Fielding, Ceri A. et al. (2007): Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. In: *Blood* 110 (6), S. 1748–1755. DOI: 10.1182/blood-2007-01-067918.

- Choo, Hyo-Jung; Saafir, Talib B.; Mkumba, Laura; Wagner, Mary B.; Jobe, Shawn M. (2012): Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (12), S. 2946–2955. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300433.
- Claus, Ralf A.; Bunck, Alexander C.; Bockmeyer, Clemens L.; Brunkhorst, Frank M.; Lösche, Wolfgang; Kinscherf, Ralf; Deigner, Hans-Peter (2005): Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (12), S. 1719–1721. DOI: 10.1096/fj.04-2842fje.
- Corde, S.; Laplace, C.; Vicaut, E.; Duranteau, J. (2001): Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 24 (6), S. 762–768. DOI: 10.1165/ajrcmb.24.6.4228.
- D'Alessio, Alessio; Esposito, Bianca; Giampietri, Claudia; Ziparo, Elio; Pober, Jordan S.; Filippini, Antonio (2012): Plasma membrane microdomains regulate TACE-dependent TNFR1 shedding in human endothelial cells. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 16 (3), S. 627–636. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01353.x.
- Dillon, S. R.; Mancini, M.; Rosen, A.; Schlissel, M. S. (2000): Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. In: *The Journal of Immunology* 164 (3), S. 1322–1332.
- Dinkla, S.; Wessels, K.; Verdurmen, W. P. R.; Tomelleri, C.; Cluitmans, J. C. A.; Fransen, J. et al. (2012): Functional consequences of sphingomyelinase-induced changes in erythrocyte membrane structure. In: *Cell death & disease* 3, e410. DOI: 10.1038/cddis.2012.143.
- Doedens, John R.; Mahimkar, Rajeev M.; Black, Roy A. (2003): TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 308 (2), S. 331–338.

- Donners, Marjo M. P. C.; Wolfs, Ine M. J.; Olieslagers, Servé; Mohammadi-Motahhari, Zeynab; Tchaikovski, Vadim; Heeneman, Sylvia 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. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (11), S. 2188–2195. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.213124.
- Dreymueller, Daniela; Martin, Christian; Kogel, Tanja; Pruessmeyer, Jessica; Hess, Franz M.; Horiuchi, Keisuke et al. (2012a): Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. In: *EMBO molecular medicine* 4 (5), S. 412–423. DOI: 10.1002/emmm.201200217.
- Dreymueller, Daniela; Pruessmeyer, Jessica; Groth, Ester; Ludwig, Andreas (2012b): The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. In: *European journal of cell biology* 91 (6-7), S. 472–485. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.09.003.
- Duan, R. D.; Nyberg, L.; Nilsson, A. (1995): Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract. Distribution and characteristics. In: *Biochimica et biophysica acta* 1259 (1), S. 49–55.
- Dumitru, C. A.; Gulbins, E. (2006): TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. In: *Oncogene* 25 (41), S. 5612–5625. DOI: 10.1038/sj.onc.1209568.
- Düsterhöft, Stefan; Höbel, Katharina; Oldefest, Mirja; Lokau, Juliane; Waetzig, Georg H.; Chalaris, Athena et al. (2014): A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (23), S. 16336–16348. DOI: 10.1074/jbc.M114.557322.
- Düsterhöft, Stefan; Jung, Sascha; Hung, Chien-Wen; Tholey, Andreas; Sönnichsen, Frank D.; Grötzinger, Joachim; Lorenzen, Inken (2013): Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. In: *Journal of the American Chemical Society* 135 (15), S. 5776–5781. DOI: 10.1021/ja400340u.

- Ebsen, Henriette; Schröder, Alexandra; Kabelitz, Dieter; Janssen, Ottmar (2013): Differential surface expression of ADAM10 and ADAM17 on human T lymphocytes and tumor cells. In: *PloS one* 8 (10), e76853. DOI: 10.1371/journal.pone.0076853.
- Endres, Kristina; Anders, Andreas; Kojro, Elzbieta; Gilbert, Sandra; Fahrenholz, Falk; Postina, Rolf (2003): Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. In: *European journal of biochemistry* 270 (11), S. 2386–2393.
- Fox, Todd E.; Houck, Kristy L.; O'Neill, Sean M.; Nagarajan, Murali; Stover, Thomas C.; Pomianowski, Pawel T. et al. (2007): Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (17), S. 12450–12457. DOI: 10.1074/jbc.M700082200.
- García-Ruiz, Carmen; Colell, Anna; Marí, Montserrat; Morales, Albert; Calvo, María; Enrich, Carlos; Fernández-Checa, José C. (2003): Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. In: *The Journal of clinical investigation* 111 (2), S. 197–208. DOI: 10.1172/JCI16010.
- Gatt, S. (1976): Magnesium-dependent sphingomyelinase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 68 (1), S. 235–241.
- Gil, Carles; Cubí, Roger; Aguilera, José (2007): Shedding of the p75NTR neurotrophin receptor is modulated by lipid rafts. In: *FEBS letters* 581 (9), S. 1851–1858. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.080.
- Göggel, Rolf; Winoto-Morbach, Supandi; Vielhaber, Gabriele; Imai, Yumiko; Lindner, Karsten; Brade, Lore et al. (2004): PAF-mediated pulmonary edema. A new role for acid sphingomyelinase and ceramide. In: *Nature medicine* 10 (2), S. 155–160. DOI: 10.1038/nm977.
- Golub, Tamara; Wacha, Stefan; Caroni, Pico (2004): Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. In: *Current opinion in neurobiology* 14 (5), S. 542–550. DOI: 10.1016/j.conb.2004.08.003.

- Goñi, Félix M.; Alonso, Alicia (2002): Sphingomyelinases. Enzymology and membrane activity. In: *FEBS letters* 531 (1), S. 38–46.
- Grassme, H.; Jekle, A.; Riehle, A.; Schwarz, H.; Berger, J.; Sandhoff, K. et al. (2001): CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (23), S. 20589–20596. DOI: 10.1074/jbc.M101207200.
- Grassmé, H.; Schwarz, H.; Gulbins, E. (2001): Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. In: *Biochemical and biophysical research communications* 284 (4), S. 1016–1030. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5045.
- Grassmé, Heike; Jendrossek, Verena; Bock, Jürgen; Riehle, Andrea; Gulbins, Erich (2002): Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. In: *The Journal of Immunology* 168 (1), S. 298–307.
- Gulbins, E.; Szabo, I.; Baltzer, K.; Lang, F. (1997): Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14), S. 7661–7666.
- Gulbins, Erich; Li, Pin Lan (2006): Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290 (1), R11–26. DOI: 10.1152/ajpregu.00416.2005.
- Hakulinen, Juha; Keski-Oja, Jorma (2006): ADAM10-mediated release of complement membrane cofactor protein during apoptosis of epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (30), S. 21369–21376. DOI: 10.1074/jbc.M602053200.
- Hannun, Y. A. (1996): Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5294), S. 1855–1859.
- Hannun, Y. A.; Bell, R. M. (1986): Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (20), S. 9341–9347.
- Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2008): Principles of bioactive lipid signalling. Lessons from sphingolipids. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2), S. 139–150. DOI: 10.1038/nrm2329.

- Heinrich, Peter C.; Löffler, Georg (2011): Biochemie und Pathobiochemie. In: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*.
- Hertervig, E.; Nilsson, A.; Björk, J.; Hultkrantz, R.; Duan, R. D. (1999): Familial adenomatous polyposis is associated with a marked decrease in alkaline sphingomyelinase activity. A key factor to the unrestrained cell proliferation? In: *British journal of cancer* 81 (2), S. 232–236. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690682.
- Herz, Jasmin; Pardo, Julian; Kashkar, Hamid; Schramm, Michael; Kuzmenkina, Elza; Bos, Erik et al. (2009): Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. In: *Nature immunology* 10 (7), S. 761–768. DOI: 10.1038/ni.1757.
- Horiuchi, Keisuke; Le Gall, Sylvain; Schulte, Marc; Yamaguchi, Takafumi; Reiss, Karina; Murphy, Gillian et al. (2007): Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. In: *Molecular biology of the cell* 18 (1), S. 176–188. DOI: 10.1091/mbc.e06-01-0014.
- Hurwitz, R.; Ferlinz, K.; Sandhoff, K. (1994a): The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. In: *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 375 (7), S. 447–450.
- Hurwitz, R.; Ferlinz, K.; Vielhaber, G.; Moczał, H.; Sandhoff, K. (1994b): Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (7), S. 5440–5445.
- Huwiler, A.; Johansen, B.; Skarstad, A.; Pfeilschifter, J. (2001): Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (1), S. 7–9. DOI: 10.1096/fj.00-0370fje.
- Hynes, Nancy E.; MacDonald, Gwen (2009): ErbB receptors and signaling pathways in cancer. In: *Current opinion in cell biology* 21 (2), S. 177–184. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.12.010.
- Inoguchi, Toyoshi; Sonta, Toshiyo; Tsubouchi, Hirotaka; Etoh, Takashi; Kakimoto, Maiko; Sonoda, Noriyuki et al. (2003): Protein kinase C-dependent increase in

- reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes. Role of vascular NAD(P)H oxidase. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (8 Suppl 3), S227-32.
- Kato, Yasumasa; Ozawa, Shigeyuki; Tsukuda, Mamoru; Kubota, Eiro; Miyazaki, Kaoru; St-Pierre, Yves; Hata, Ryu-Ichiro (2007): Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. In: *The FEBS journal* 274 (12), S. 3171–3183. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05848.x.
- Kenny, Paraic A.; Bissell, Mina J. (2007): Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (2), S. 337–345. DOI: 10.1172/JCI29518.
- Kirschnek, S.; Paris, F.; Weller, M.; Grassme, H.; Ferlinz, K.; Riehle, A. et al. (2000): CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (35), S. 27316–27323. DOI: 10.1074/jbc.M002957200.
- Koolman, Jan; Röhm, Klaus-Heinrich (2009): Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lang, Philipp A.; Kempe, Daniela S.; Tanneur, Valerie; Eisele, Kerstin; Klarl, Barbara A.; Myssina, Svetlana et al. (2005): Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 6), S. 1233–1243. DOI: 10.1242/jcs.01730.
- Laouari, Denise; Burtin, Martine; Phelep, Aurélie; Martino, Carla; Pillebout, Evangeline; Montagutelli, Xavier et al. (2011): TGF- α mediates genetic susceptibility to chronic kidney disease. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22 (2), S. 327–335. DOI: 10.1681/ASN.2010040356.
- Lautrette, Alexandre; Li, Shunqiang; Alili, Rohia; Sunnarborg, Susan W.; Burtin, Martine; Lee, David C. et al. (2005): Angiotensin II and EGF receptor cross-

- talk in chronic kidney diseases. A new therapeutic approach. In: *Nature medicine* 11 (8), S. 867–874. DOI: 10.1038/nm1275.
- Le Gall, Sylvain M.; Maretzky, Thorsten; Issuree, Priya D. A.; Niu, Xiao-Da; Reiss, Karina; Saftig, Paul et al. (2010a): ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 22), S. 3913–3922. DOI: 10.1242/jcs.069997.
- Le Gall, Sylvain M.; Maretzky, Thorsten; Issuree, Priya D. A.; Niu, Xiao-Da; Reiss, Karina; Saftig, Paul et al. (2010b): ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 22), S. 3913–3922. DOI: 10.1242/jcs.069997.
- Levade, T.; Jaffrézou, J. P. (1999): Signalling sphingomyelinases. Which, where, how and why? In: *Biochimica et biophysica acta* 1438 (1), S. 1–17.
- Li, Xiang; Gulbins, Erich; Zhang, Yang (2012): Oxidative stress triggers Ca-dependent lysosome trafficking and activation of acid sphingomyelinase. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30 (4), S. 815–826. DOI: 10.1159/000341460.
- Lisi, Sabrina; D'Amore, Massimo; Sisto, Margherita (2014): ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity. In: *Immunology letters* 162 (1 Pt A), S. 159–169. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.08.008.
- Liu; Obeid; Hannun (1997): Sphingomyelinases in cell regulation. In: *Seminars in cell & developmental biology* 8 (3), S. 311–322. DOI: 10.1006/scdb.1997.0153.
- Lum, L.; Reid, M. S.; Blobel, C. P. (1998): Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (40), S. 26236–26247.
- Madge, L. A.; Sierra-Honigsmann, M. R.; Pober, J. S. (1999): Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (19), S. 13643–13649.
- Marathe, S.; Kuriakose, G.; Williams, K. J.; Tabas, I. (1999): Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and

- binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (11), S. 2648–2658.
- Maretzky, Thorsten; McIlwain, David R.; Issuree, Priya Darshinee A.; Li, Xue; Malapeira, Jordi; Amin, Sadaf et al. (2013): iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (28), S. 11433–11438. DOI: 10.1073/pnas.1302553110.
- Maretzky, Thorsten; Reiss, Karina; Ludwig, Andreas; Buchholz, Julian; Scholz, Felix; Proksch, Erhardt et al. (2005): ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (26), S. 9182–9187. DOI: 10.1073/pnas.0500918102.
- Mathias, S.; Younes, A.; Kan, C. C.; Orlow, I.; Joseph, C.; Kolesnick, R. N. (1993): Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5094), S. 519–522.
- Moreno-Càceres, J.; Caja, L.; Mainez, J.; Mayoral, R.; Martín-Sanz, P.; Moreno-Vicente, R. et al. (2014): Caveolin-1 is required for TGF- β -induced transactivation of the EGF receptor pathway in hepatocytes through the activation of the metalloprotease TACE/ADAM17. In: *Cell death & disease* 5, e1326. DOI: 10.1038/cddis.2014.294.
- Moss, M. L.; Jin, S. L.; Milla, M. E.; Bickett, D. M.; Burkhart, W.; Carter, H. L. et al. (1997): Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. In: *Nature* 385 (6618), S. 733–736. DOI: 10.1038/385733a0.
- Müller, G.; Ayoub, M.; Storz, P.; Rennecke, J.; Fabbro, D.; Pfizenmaier, K. (1995): PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. In: *The EMBO journal* 14 (9), S. 1961–1969.

- Nurminen, Tuula A.; Holopainen, Juha M.; Zhao, Hongxia; Kinnunen, Paavo K. J. (2002): Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (41), S. 12129–12134.
- Nyberg, L.; Duan, R. D.; Axelson, J.; Nilsson, A. (1996): Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. In: *Biochimica et biophysica acta* 1300 (1), S. 42–48.
- Okazaki, T.; Bielawska, A.; Domae, N.; Bell, R. M.; Hannun, Y. A. (1994): Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (6), S. 4070–4077.
- Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Reddy, P.; Stocking, K. L.; Sunnarborg, S. W.; Lee, D. C. et al. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5392), S. 1281–1284.
- Petr, T.; Smíd, V.; Smídová, J.; Hůlková, H.; Jirkovská, M.; Elleder, M. et al. (2010): Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction. In: *European journal of histochemistry : EJH* 54 (2), e23.
- Pike, Linda J. (2004): Lipid rafts. Heterogeneity on the high seas. In: *The Biochemical journal* 378 (Pt 2), S. 281–292. DOI: 10.1042/BJ20031672.
- Rao, B. G.; Spence, M. W. (1976): Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. In: *Journal of lipid research* 17 (5), S. 506–515.
- Reddy, P.; Slack, J. L.; Davis, R.; Cerretti, D. P.; Kozlosky, C. J.; Blanton, R. A. et al. (2000): Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (19), S. 14608–14614.
- Reinehr, Roland; Becker, Stephan; Eberle, Andrea; Grether-Beck, Susanne; Häussinger, Dieter (2005): Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src

- family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (29), S. 27179–27194. DOI: 10.1074/jbc.M414361200.
- Reiss, Karina; Bhakdi, Sucharit (2012): Pore-forming bacterial toxins and antimicrobial peptides as modulators of ADAM function. In: *Medical microbiology and immunology* 201 (4), S. 419–426. DOI: 10.1007/s00430-012-0260-3.
- Reiss, Karina; Maretzky, Thorsten; Ludwig, Andreas; Tousseyn, Thomas; Strooper, Bart de; Hartmann, Dieter; Saftig, Paul (2005): ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. In: *The EMBO journal* 24 (4), S. 742–752. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600548.
- Reiss, Karina; Saftig, Paul (2009): The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases. Physiological and cellular functions. In: *Seminars in cell & developmental biology* 20 (2), S. 126–137. DOI: 10.1016/j.semcd.2008.11.002.
- Roghani, M.; Becherer, J. D.; Moss, M. L.; Atherton, R. E.; Erdjument-Bromage, H.; Arribas, J. et al. (1999): Metalloprotease-disintegrin MDC9. Intracellular maturation and catalytic activity. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (6), S. 3531–3540.
- Rozenova, Krasimira A.; Deevska, Gergana M.; Karakashian, Alexander A.; Nikolova-Karakashian, Mariana N. (2010): Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-converting enzyme activity and TNFalpha secretion in macrophages. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (27), S. 21103–21113. DOI: 10.1074/jbc.M109.080671.
- Sahin, Umut; Weskamp, Gisela; Kelly, Kristine; Zhou, Hong-Ming; Higashiyama, Shigeki; Peschon, Jacques et al. (2004): Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. In: *The Journal of cell biology* 164 (5), S. 769–779. DOI: 10.1083/jcb.200307137.

- Samapati, Rudi; Yang, Yang; Yin, Jun; Stoerger, Christof; Arenz, Christoph; Dietrich, Alexander et al. (2012): Lung endothelial Ca²⁺ and permeability response to platelet-activating factor is mediated by acid sphingomyelinase and transient receptor potential classical 6. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 185 (2), S. 160–170. DOI: 10.1164/rccm.201104-0717OC.
- Scheller, Jürgen; Chalaris, Athena; Garbers, Christoph; Rose-John, Stefan (2011): ADAM17. A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. In: *Trends in immunology* 32 (8), S. 380–387. DOI: 10.1016/j.it.2011.05.005.
- Schiffmann, Susanne; Sandner, Jessica; Birod, Kerstin; Wobst, Ivonne; Angioni, Carlo; Ruckhäberle, Eugen et al. (2009): Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. In: *Carcinogenesis* 30 (5), S. 745–752. DOI: 10.1093/carcin/bgp061.
- Schissel, S. L.; Keesler, G. A.; Schuchman, E. H.; Williams, K. J.; Tabas, I. (1998): The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (29), S. 18250–18259.
- Schissel, S. L.; Schuchman, E. H.; Williams, K. J.; Tabas, I. (1996): Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (31), S. 18431–18436.
- Schulte, M.; Reiss, K.; Lettau, M.; Maretzky, T.; Ludwig, A.; Hartmann, D. et al. (2007): ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. In: *Cell death and differentiation* 14 (5), S. 1040–1049. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402101.
- Schulz, Beate; Pruessmeyer, Jessica; Maretzky, Thorsten; Ludwig, Andreas; Blobel, Carl P.; Saftig, Paul; Reiss, Karina (2008): ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. In: *Circulation research* 102 (10), S. 1192–1201. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.169805.

- Seals, Darren F.; Courtneidge, Sara A. (2003): The ADAMs family of metalloproteases. Multidomain proteins with multiple functions. In: *Genes & development* 17 (1), S. 7–30. DOI: 10.1101/gad.1039703.
- Simons, K.; Toomre, D. (2000): Lipid rafts and signal transduction. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 1 (1), S. 31–39. DOI: 10.1038/35036052.
- Simons, Kai; Vaz, Winchil L. C. (2004): Model systems, lipid rafts, and cell membranes. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 33, S. 269–295. DOI: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803.
- Smith, Eric L.; Schuchman, Edward H. (2008): The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (10), S. 3419–3431. DOI: 10.1096/fj.08-108043.
- Sommer, Anselm; Bhakdi, Sucharit; Reiss, Karina (2016a): How membrane asymmetry regulates ADAM17 sheddase function. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (22), S. 2995–2996. DOI: 10.1080/15384101.2016.1211449.
- Sommer, Anselm; Düppe, Marie; Baumecker, Lena; Kordowski, Felix; Büch, Joscha; Chico, Johaiber Fuchslocher et al. (2017): Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF- α -induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding. In: *Oncotarget* 8 (42), S. 72584–72596. DOI: 10.18632/oncotarget.19983.
- Sommer, Anselm; Kordowski, Felix; Büch, Joscha; Maretzky, Thorsten; Evers, Astrid; Andrä, Jörg et al. (2016b): Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. In: *Nature communications* 7, S. 11523. DOI: 10.1038/ncomms11523.
- Spence, M. W.; Byers, D. M.; Palmer, F. B.; Cook, H. W. (1989): A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (10), S. 5358–5363.
- Steinhusen, U.; Weiske, J.; Badock, V.; Tauber, R.; Bommert, K.; Huber, O. (2001): Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (7), S. 4972–4980. DOI: 10.1074/jbc.M006102200.

- Sun, Jun; Nanjundan, Meera; Pike, Linda J.; Wiedmer, Therese; Sims, Peter J. (2002): Plasma membrane phospholipid scramblase 1 is enriched in lipid rafts and interacts with the epidermal growth factor receptor. In: *Biochemistry* 41 (20), S. 6338–6345.
- Suzuki, Jun; Fujii, Toshihiro; Imao, Takeshi; Ishihara, Kenji; Kuba, Hiroshi; Nagata, Shigekazu (2013): Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (19), S. 13305–13316. DOI: 10.1074/jbc.M113.457937.
- Swendeman, Steven; Mendelson, Karen; Weskamp, Gisela; Horiuchi, Keisuke; Deutsch, Urban; Scherle, Peggy et al. (2008): VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. In: *Circulation research* 103 (9), S. 916–918. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184416.
- Tardy, Claudine; Codogno, Patrice; Autefage, Hélène; Levade, Thierry; Andrieu-Abadie, Nathalie (2006): Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). In: *Biochimica et biophysica acta* 1765 (2), S. 101–125. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.11.003.
- Tellier, Edwige; Canault, Matthias; Poggi, Marjorie; Bonardo, Bernadette; Nicolay, Alain; Alessi, Marie-Christine et al. (2008): HDLs activate ADAM17-dependent shedding. In: *Journal of cellular physiology* 214 (3), S. 687–693. DOI: 10.1002/jcp.21265.
- Tellier, Edwige; Canault, Matthias; Rebsomen, Laure; Bonardo, Bernadette; Juhan-Vague, Irène; Nalbone, Gilles; Peiretti, Franck (2006): The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. In: *Experimental cell research* 312 (20), S. 3969–3980. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.08.027.
- Uhlig, Stefan; Gulbins, Erich (2008): Sphingolipids in the lungs. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 178 (11), S. 1100–1114. DOI: 10.1164/rccm.200804-595SO.
- van Wart, H. E.; Birkedal-Hansen, H. (1990): The cysteine switch. A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire

- matrix metalloproteinase gene family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (14), S. 5578–5582.
- Veit, Martin; Koyro, Katharina Isabelle; Ahrens, Björn; Bleibaum, Florian; Munz, Martin; Rövekamp, Hagen et al. (2018): Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1865 (11 Pt A), S. 1598–1610. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.011.
- Wakatsuki, Shuji; Kurisaki, Tomohiro; Sehara-Fujisawa, Atsuko (2004): Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19. In: *Journal of neurochemistry* 89 (1), S. 119–123. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.02303.x.
- Walev, I.; Tappe, D.; Gulbins, E.; Bhakdi, S. (2000): Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. In: *Journal of leukocyte biology* 68 (6), S. 865–872.
- Wong, M. L.; Xie, B.; Beatini, N.; Phu, P.; Marathe, S.; Johns, A. et al. (2000): Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo. A possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (15), S. 8681–8686. DOI: 10.1073/pnas.150098097.
- Xu, Pinglong; Derynck, Rik (2010): Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. In: *Molecular cell* 37 (4), S. 551–566. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.01.034.
- Yan, Xinhua; Morgan, James P. (2011): Neuregulin1 as novel therapy for heart failure. In: *Current pharmaceutical design* 17 (18), S. 1808–1817.
- Yang, Y.; Yin, J.; Baumgartner, W.; Samapati, R.; Solymosi, E. A.; Reppien, E. et al. (2010): Platelet-activating factor reduces endothelial nitric oxide production. Role of acid sphingomyelinase. In: *The European respiratory journal* 36 (2), S. 417–427. DOI: 10.1183/09031936.00095609.
- Yu, Z. F.; Nikolova-Karakashian, M.; Zhou, D.; Cheng, G.; Schuchman, E. H.; Mattson, M. P. (2000): Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis.

Literaturverzeichnis

In: *Journal of molecular neuroscience* : MN 15 (2), S. 85–97. DOI: 10.1385/JMN:15:2:85.

Zeidan, Youssef H.; Hannun, Yusuf A. (2007): Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (15), S. 11549–11561. DOI: 10.1074/jbc.M609424200.

12.Danksagung

An diese Stelle möchte ich besonders **Frau Prof. Dr. Karina Reiss** danken, nicht nur für die Vergabe dieses spannenden Promotionsthemas, sondern auch für die freundliche Betreuung. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und erklärte mir mit reichlich Geduld auch komplexere Themen. Durch sie konnte ich erste wissenschaftliche Erfahrungen sammeln.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Reiss-AG für die spannende Zeit und das oft fröhliche Beisammensein danken. Ihr habt so einige Mittagspausen amüsant und abwechslungsreich gestaltet. Danke, **Felix Kordowski, Nancy Speck, Joscha Büch, Anselm Sommer, Maria Sperrhacke** und **Björn Ahrens**.

Insbesondere möchte ich meinem Betreuer, **Anselm Sommer** für seine zahlreichen Hilfestellungen und seine Geduld danken. Ebenso danke ich **Maria Sperrhacke** für ihre „rechte Hand in der Not“ und Hilfestellungen, sowie ihrer mentalen Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin **Bianca Baumann** dafür, dass sie mir immer den Rücken gestärkt hat, ebenso wie **Maya Lüdemann**, die zusätzlich diese Arbeit auf Rechtschreib- und Kommafehlern durchsuchte.

Großer Dank gilt meiner **Familie**, die mich den gesamte Studien- und Promotionszeitraum unterstützt hat und ohne die ich niemals so weit gekommen wäre. Danke dafür, dass ich immer weiß, wo mein zu Hause ist.

14. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marie Düppe, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen akademischen Betreuer, selbst und selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ich habe zu dem Thema noch keine Zulassung zur Promotion an anderer Stelle beantragt oder und in noch keiner anderen Universität eine Dissertation 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.

Teile dieser Arbeit wurden in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Sommer, Anselm; Düppe, Marie; Baumecker, Lena; Kordowski, Felix; Büch, Joscha; Chico, Johaiber Fuchslocher et al. (2017b): Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF- α -induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding. In: *Oncotarget* 8 (42), S. 72584–72596. DOI: 10.18632/oncotarget.19983.

Kiel,

Marie Düppe

Erklärung