

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

Die Rolle der Nekroptose für die ADAM10- und ADAM17-Aktivierung

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Hagen Claus Rövekamp

aus Troisdorf

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karina Reiß

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 02.12.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Die ADAM – <i>a disintegrin and metalloprotease</i> – Familie.....	1
1.1 Strukturaufbau von ADAM10 und ADAM17.....	3
1.2 Physiologische und pathophysiologische Funktion von ADAM10 und ADAM17	5
1.3 Aktivierung und Regulation von ADAM10 und ADAM17	8
1.4 Bedeutung der Zellmembranasymmetrie für die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17.....	10
1.5 Die Apoptose als ADAM-Aktivator	11
1.5.1 Die Apoptose	11
1.5.2 Signalweg der Apoptose.....	12
1.6 Die Nekroptose als programmierter Zelltod	14
1.6.1 Die Nekroptose.....	14
1.6.2 Signalweg der Nekroptose.....	16
2 Zielsetzung.....	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Geräte.....	21
3.2 Verbrauchsmaterialien	22
3.3 Chemikalien	24
3.4 Puffer und Lösungen.....	26
3.5 Kits	30
3.6 Software.....	31
3.7 Stimulantien	31
3.8 Inhibitoren	31
3.9 Plasmide	32

3.10	Antikörper.....	33
3.11	Zellkulturmedien	33
3.12	Zelllinien.....	34
3.13	Zellbiologische Methoden.....	34
3.13.1	Kultivierung von Zellen	34
3.13.2	Zellzählung.....	35
3.13.3	Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen	35
3.13.4	Auftauen von eukaryotischen Zellen	36
3.13.5	Inhibition und Stimulation von Zellen.....	36
3.13.6	Weiterverarbeitung von Zellkulturüberstand und Zelllysaten.....	37
3.14	Mikrobiologische Verfahren	37
3.14.1	Präparation von Plasmiden.....	37
3.14.2	Anlegen eines Glycerol-Stammes	38
3.14.3	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	38
3.15	Proteinbiochemische Verfahren.....	38
3.15.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
3.15.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.15.3	<i>Western Blot</i>	39
3.15.4	Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine	39
3.15.5	Erneutes Färben anderer Proteine auf derselben PVDF-Membran.....	40
3.15.6	Alkalische-Phosphatase-Assay (AP-Assay).....	40
3.15.7	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	41
3.15.8	Fluoreszenz-Peptid-Assay (FPA).....	42
3.15.9	Fluoreszenzfärbungen.....	42
3.15.10	Konfokales Fluoreszenzmikroskop	43
3.15.11	Impedanzmessung mit dem xCELLigence-System.....	43
3.15.12	Versuchsauswertung	46
4	Ergebnisse.....	47

4.1	Untersuchungen zur <i>Sheddingaktivität</i> der ADAMs unter nekroptotischen Bedingungen	47
4.1.1	Programmierter Zelltod in HaCaT- und U937-Zellen	47
4.1.2	Untersuchung der <i>Sheddingaktivität</i> in U937-Zellen.....	48
4.1.3	Freisetzung des II-6-Rezeptors in U937-Zellen während der Nekroptose.....	50
4.1.4	Stimulation und Überprüfung der Transfektionseffizienz von HT29-Zellen	51
4.1.5	Freisetzung von TGF- α -AP in HT29-Zellen während der Nekroptose	53
4.2	Untersuchungen zur Veränderung der enzymatischen ADAM-Aktivität während der Nekroptose.....	55
4.3	Phosphatidylserin-Externalisierung in HT29-Zellen während der Nekroptose.....	56
4.4	Bedeutung von Anoctamin-6 für die TGF- α -Freisetzung während der Nekroptose	58
4.5	Untersuchung zur Bedeutung der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung für die Nekroptose.....	59
4.6	Einfluss der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung auf die Proliferation von Nachbarzellen während der Nekroptose	63
4.6.1	Impedanzmessung nach Überstandstransfer	63
4.6.2	Vorversuche zur Impedanzmessung bei Nekroptosestimulation	64
4.6.3	Impedanzmessung bei HT29-Zellen mit „nekroptotischem“ Überstand	67
4.6.4	Impedanzmessung von HT29-Zellen mit „nekroptotischem“ Überstand und ADAM17-Überexpression	69
4.6.5	Rolle des EGF-Rezeptors für die Proliferation der Nachbarzellen von nekroptotischen Zellen.....	71
5	Diskussion	74
5.1	Nekroptose führt zu einer Erhöhung und einem Wechsel des ADAM17- zu ADAM10-vermittelten <i>Sheddings</i>	74
5.2	Nekroptotische HT29-Zellen externalisieren Phosphatidylserin vor Ruptur der Zellmembran	79
5.3	Die Aktivierung von ADAM17 bzw. ADAM10 kann den Zelltod nicht verhindern....	82
5.4	Das <i>Microenvironment</i> von nekroptotischen Zellen regt das Zellwachstum von HT29-Zellen unabhängig von ADAM10 und ADAM17 an	84

5.5	Der EGF-Rezeptor spielt keine Rolle für die Proliferation von HT29-Zellen in nekroptotischem Milieu.....	87
5.6	Ausblick	88
6	Zusammenfassung.....	90
7	Summary	92
	Literaturverzeichnis	A
	Eidesstattliche Erklärung	S

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammbaum zinkabhängiger Metalloproteasen.....	2
Abbildung 2: Vergleich Strukturaufbau ADAMs und ADAM10/17.....	3
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Apoptose.....	13
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Nekroptose.....	18
Abbildung 5: Prinzip der Impedanzmessung von Zellen.....	44
Abbildung 6: Fehlende Nekroptose in HaCaTs- und U937-Zellen.....	47
Abbildung 7: TNF-Rezeptor- und Il-6-Rezeptor-Freisetzung in U937-Zellen.....	49
Abbildung 8: IL-6-Rezeptor-Freisetzung in U937-Zellen.....	50
Abbildung 9: TGF- α -AP-Shedding in HT29-Zellen in DMEM ^{-/-} und RPMI ^{-/-}	52
Abbildung 10: Vergleich der Freisetzung von endogenem TGF- α in HT29 nach TNF- α - oder TRAIL-Stimulation.....	53
Abbildung 11: TGF- α -AP-Freisetzung in HT29 Zellen unter Apoptose- und Nekroptosestimulation.....	54
Abbildung 12: Veränderung der Enzymaktivität der ADAMs während der Nekroptose.....	55
Abbildung 13: Phosphatidylserin-Externalisierung unter nekroptotischen Bedingungen bei HT29-Zellen.....	57
Abbildung 14: ANO6-Überexpression in HT29-Zellen.....	59
Abbildung 15: Expressionslevel von ADAM17 in verschiedenen Zelllinien.....	60
Abbildung 16: ADAM17-Überexpression in HT29 Zellen.....	61
Abbildung 17: ADAM9-, -10- und -17-Überexpression und Stimulation über Nacht in HT29-Zellen.....	62
Abbildung 18: Inhibition von ADAM17 mit dem inhibitorischen Antikörper D1 in U937-Zellen.....	62
Abbildung 19: Impedanzmessung an HT29-Zellen.....	64
Abbildung 20: Zeitreihe für Nachweis der Nekroptose in HT29-Zellen.....	65
Abbildung 21: Freisetzung von endogenem TGF- α in HT29 Zellen nach Stimulation mit Mediumwechsel.....	66
Abbildung 22: Impedanzmessung bei HT29-Zellen nach Überstandtransfer.....	67
Abbildung 23: Steigung der Wachstumsrate von HT29-Zellen nach Überstandtransfer.....	68
Abbildung 24: Impedanzmessung bei ADAM17-transfizierten HT29-Zellen.....	70
Abbildung 25: EGF-Rezeptor-Aktivierung nach Überstandtransfer.....	71
Abbildung 26: MAP-Kinasen-Aktivierung bei Überstandtransfer von nekroptotischen HT29-Zellen.....	73
Abbildung 27: ADAM10-Aktivierung während der Nekroptose mit Beispiel des E-Cadherin-Sheddings.....	79

Abbildung 28: ADAM10-Aktivierung während der Nekroptose mit PtdSer-Flip.....	82
Abbildung 29: Flussdiagramm Überlebenssignal durch Erhöhung der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung.....	83
Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der Zellproliferation während der Nekroptose.....	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der ADAMs mit und ohne Metalloproteasen-Domäne	2
Tabelle 2: Auszug von ADAM10- und ADAM17-Substraten.....	7
Tabelle 3: Beispiele für Erkrankungen in denen die Nekroptose involviert ist.....	15
Tabelle 4: Inhibitoren und Stimulantien.....	36
Tabelle 5: Statistische Auswertung.....	46

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADAMTS	Thrombospondinmotiv-enthaltene ADAMs
AP-Assay	Alkalischer Phosphatase Assay
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca²⁺	Kalzium(II)-ion
CANDIS	<i>Conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence</i>
CD (z.B. CD95)	<i>Cluster of differentiation</i>
Cetux	Cetuximab
CHX	Cycloheximid
DABCO	<i>Diazabicyclooctane</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	<i>4,6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	epidermales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
EGF-R	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinases 1/2</i>
et al.	und andere (et alii)
FCS	<i>Fetal calf serum</i>

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPA	Fluoreszenz-Peptid-Assay
x g	Vielfache der Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde (<i>hour</i>)
H₂O	Wasser
HCl (37%)	Salzsäure (rauchend)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL-6 Rezeptor	Interleukin-6-Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kTRAIL	KillerTrail
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
Mg²⁺	Magnesium(II)-ion
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain like</i>
MM	Marimastat
mM	Millimolar
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MPD	membranproximale Domäne
n.s.	nicht signifikant
Na₂HPO₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nec-1	Necrostatin-1
Nec-1s	Necrostatin-1 <i>stable</i>
NSA	<i>necrosulfonamide</i>
ng	Nanogramm
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Phosphokinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
pMLKL	phosphorylierte <i>mixed lineage kinase domain like</i>
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PtdSer	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RIP1/3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SP	Spaltprodukt
TACE	<i>tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEN	Toxische Epidermale Nekrolyse
TGF-α	<i>transforming growth factor</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Zn²⁺	Zink(II)-Ion
ZnCl₂	Zinkchlorid
zVAD	zVAD-FMK (<i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>)

1 Die ADAM – *a disintegrin and metalloprotease* – Familie

Die Proteolyse stellt einen essentiellen irreversiblen Vorgang jeder Zelle dar. Hierbei handelt es sich um die Fähigkeit der Zelle, sich an äußere Einflüsse und Gegebenheiten anzupassen, indem sie kontrolliert posttranslationale Proteinveränderungen vornimmt, Enzyme in ihrer Aktivität steuert, Rezeptoren aktiviert und inaktiviert sowie die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen reguliert (Campbell und Reece, 2006). ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) sind Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen, die zur Gruppe der Transmembranproteasen gehören und weltweit erforscht werden (Reiss und Saftig, 2009). Die posttranslationale Veränderung durch proteolytische Spaltung und Freisetzung von Proteinen durch die ADAMs, kurz Ektodomänen-*Shedding* oder *Shedding* genannt, ist an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Der irreversible Prozess des *Sheddings* erfolgt bei den ADAMs, die zur Gruppe der Typ 1 Glykoproteine gehören, im zellmembrannahen Bereich. Dabei übernehmen die beiden namensgebenden Domänen der Proteasen verschiedene Funktionen. Während die Disintegrin-Domäne für die Fähigkeit der Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen steht, ist die Metalloprotease-Domäne für die proteolytische Spaltung von Zelloberflächenproteinen zuständig (Reiss und Saftig, 2009). Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität steht in dieser Arbeit im Fokus.

Die ADAMs gehören zu der Superfamilie der Metzinkine, die wiederum zu der Gruppe der zinkabhängigen Metalloproteasen gehören. Zur Gruppe der Metzinkine gehören die Matrixmetalloproteasen (MMPs), die Astacine, die Serralysine und die Adamalysine (Abbildung 1). Charakteristisch für alle Untergruppen der Metzinkine ist das Vorhandensein eines HExxHxxGxxH Motivs im katalytischen Zentrum. Dabei koordinieren die drei Histidinreste ein Zinkkation (Zn^{2+}) im katalytischen Zentrum. Ein weiteres Charakteristikum, welches als *Met-turn* bezeichnet wird, ist ein Methioninrest im Bereich des katalytischen Zentrums, das zur Stabilisierung beiträgt. Neben den Schlangengift-Metalloproteasen (SVMP) gehört die ADAM-Familie zu den Adamalysinen (Abbildung 1) (Bode 1993).

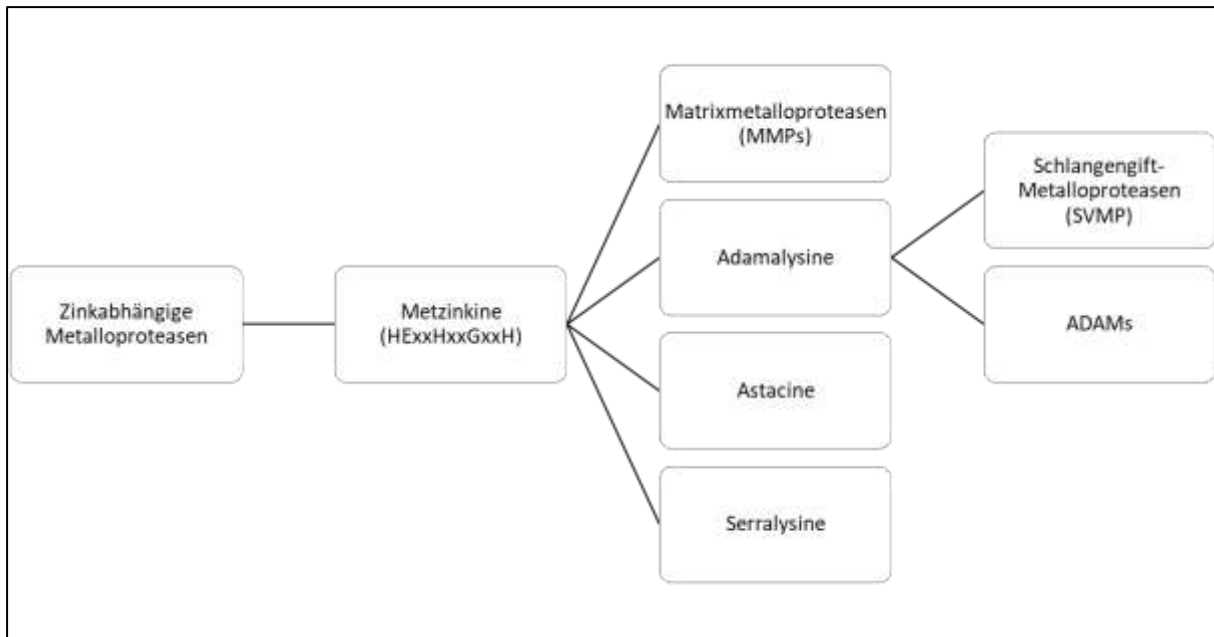


Abbildung 1: Stammbaum zinkabhängiger Metalloproteasen

Von den 21 humanen ADAMs sind 13 proteolytisch aktive ADAMs. Aufgrund der fehlenden funktionellen Metalloprotease-Domäne und Veränderungen in der Zink-Bindung fehlt diese Eigenschaft in den restlichen ADAMs (Tabelle 1). Deren Funktion wird vor allem der Protein-Protein-Interaktion zugeschrieben (Edwards et al., 2009). Außer in Pflanzen und Bakterien konnten ADAMs in vielen Organismen nachgewiesen werden (Stone et al., 1999). Die prominentesten Vertreter der proteolytisch aktiven ADAMs sind ADAM10 und ADAM17. Sie stehen auch in dieser Arbeit im Fokus. Beide sind schon während der Embryogenese in unverzichtbare Prozesse involviert und erfüllen ein weites Spektrum von Aufgaben in der Zellhomöostase.

Tabelle 1: Einteilung der ADAMs mit und ohne Metalloproteasen-Domäne

ADAMs <u>mit</u> funktioneller Metalloprotease-Domäne	ADAMs <u>ohne</u> funktionelle Metalloprotease-Domäne
ADAMDEC-1, ADAM8, -9, -10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 und -33	ADAM2, -7, -11, -18, -22, -23, -29 und -32

Substrate, die durch ADAMs *geshededet* werden, sind unter anderem Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren (Reiss und Saftig, 2009). Wachstumsfaktoren werden als inaktive membrangebundene Proteine synthetisiert. Erst durch die proteolytische Spaltung kann der freigesetzte Wachstumsfaktor auf auto- und parakrine Art und Weise wirken (Rose-John und Heinrich, 1994). Beispielsweise finden sich

unter den ADAM-Substraten mehrere Liganden des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR). Wird ein EGFR-Ligand, wie TGF- α (*Tumor Growth Factor alpha*) *gsheddet*, kann dies direkt zur Aktivierung von EGF-Rezeptoren auf der gleichen Zelle führen, welches der autokrinen Aktivierung entspricht. Im Falle des Interleukin-6-Rezeptors findet auch ein *trans-signalling* statt, sodass Zellen stimuliert werden, die nicht den Rezeptor exprimieren, sondern nur das Transmembranprotein gp130 (Maskos et al., 1998; Rose-John und Heinrich, 1994; Scheller et al., 2011a). Die weitere Prozessierung des in der Membran verbliebenen Fragments wird als RIPing (regulierte intramembranäre Proteolyse) bezeichnet und kann zur Aktivierung weiterer Signalwege innerhalb der Zelle führen (Giebeler und Zigrino, 2016).

1.1 Strukturaufbau von ADAM10 und ADAM17

Allen ADAMs ist die Synthese am rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) und die anschließende posttranslationale Modifikation (Maturierung) auf dem Weg vom ER durch das Trans-Golgi-Netzwerk bis zur Zellmembran gemeinsam. ADAMs sind Multidomänenproteine, die N-Terminal beginnend, wie folgt aufgebaut sind: Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, Cysteinreiche-, EGF (*Epidermal Growth Factor*)-ähnliche, Transmembran- und zytoplasmatische Domäne (Seals und Courtneidge, 2003). Eine schematische Abbildung der Struktur der ADAMs findet sich in Abbildung 2 wieder.

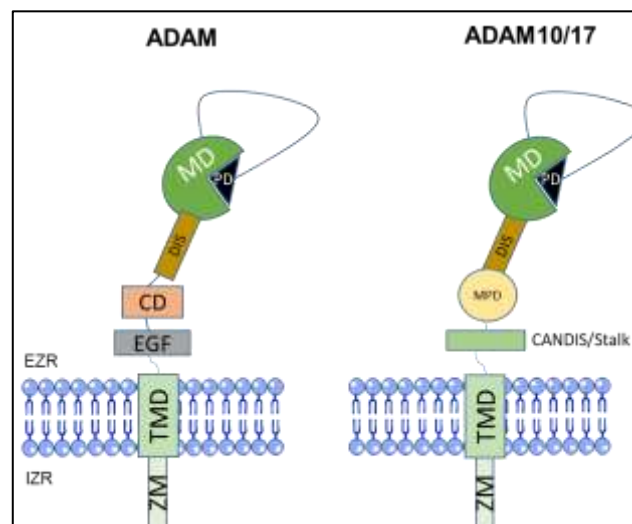


Abbildung 2: Vergleich Strukturaufbau ADAMs und ADAM10/17

PD=Pro-Domäne; MD=Metalloproteasen-Domäne; Dis=Disintegrin-Domäne; CD=Cystein-reiche-Domäne; EGF=EGF-ähnliche Domäne; MPD=Membran-proximale Domäne; Candis=Candisregion; TMD= Transmembran-Domäne; ZM=Zytosolische-Domäne; EZR=Extrazellulärraum; IZR=Intrazellulärraum

Am rER werden die ADAMs als inaktive Vorläuferproteine (Zymogene) synthetisiert (Schlöndorff et al., 2000). Der konservierte Cysteinrest der Pro-Domäne interagiert mit dem Zinkkation in der Metalloprotease-Domäne und lässt die Proteasen in einem inaktiven Zu-

stand. Neben der Inaktivierung der Protease werden der Prodomäne zwei weitere Funktionen zugeschrieben (Wong et al., 2015). Eine Rolle beim intrazellulären Transport und die Eigenschaft als Chaperon werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Ein Chaperon dient der Überprüfung der korrekten Proteinfaltung und schützt das Protein vor dem intrazellulären Abbau. Im Trans-Golgi-Netzwerk findet neben einer komplexen Glykolisierung auch die Abspaltung der Pro-Domäne statt. Der Pro-Domäne folgt die Metalloprotease-Domäne mit dem katalytischen Zentrum und dem charakteristischen HExxHxxGxxH-Motiv (Seals und Courtneidge, 2003). An die Metalloprotease-Domäne befindet sich anschließend die Disintegrin-Domäne. Diese ist über Integrin-Interaktionen an Zell-Zell-Kontakten beteiligt und beeinflusst somit die Zellmigration (White, 2003).

ADAM10 und ADAM17 sind im weiteren Aufbau atypisch und unterscheiden sich nach der Disintegrin-Domäne von den restlichen ADAMs. Statt einer Cystein- und EGF-ähnlichen Domäne verfügen ADAM10 und ADAM17 über eine Membran-proximale Domäne (MPD), die eine wichtige Rolle bei der Regulation der beiden Proteasen spielt (Grötzinger et al., 2017). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung von ADAM17 eine Phosphatidylserin (PtdSer)-Externalisierung nötig ist. Dieses Phospholipid befindet sich im Ruhezustand der Zelle fast ausschließlich auf der Innenseite der Membran. Ein polykationisches Muster in der MPD interagiert mit dem PtdSer durch elektrostatische Bindungen und ADAM17 nimmt die für das *Shedding* erforderliche Konformation an (Sommer et al., 2016). Innerhalb der MPD gibt es Disulfid-Brücken, die durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) verändert werden können. Werden die Disulfid-Brücken durch die PDI umgewandelt, geht die isolierte MPD von einer aktiven in eine inaktive Form über (Düsterhöft et al., 2013). Werden PDI extrazellulär dazugegeben, verringert dies die Aktivität von ADAM17 (Bennett et al., 2000; Willems et al., 2010). Der MPD folgenden CANDIS-Region (*conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence*) von ADAM17 werden Membraninteraktionen und Substratinteraktionen zugesagt (Grötzinger et al., 2017). Bei ADAM10 wird diese Region als flexible *stalk*-Region bezeichnet. Ähnlich zur CANDIS-Region von ADAM17 ist die *stalk*-Region von ADAM10 entscheidend an der Membraninteraktion bzw. der Interaktion mit PtdSer beteiligt und ist somit für das ADAM10-vermittelte *Shedding* von Bedeutung (Bleibaum et al., 2019).

Neben der Verankerung in der Zellmembran hat die α -helikale Transmembran-Domäne einen Einfluss bei der Substraterkennung und Regulation der Proteasen (Li et al., 2007). Die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 und ADAM17 spielt möglicherweise neben der Substraterkennung beim intrazellulären Transport eine Rolle (Schwarz et al., 2013). Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne hat jedoch keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivierbarkeit und Funktionalität beider Proteasen (Le Gall et al., 2010; Reddy, 2000). *Polo-*

like-Kinases 2 (PLK2s) können die zytoplasmatische Domäne phosphorylieren und modulieren und somit die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 steigern (Schwarz et al., 2014).

1.2 Physiologische und pathophysiologische Funktion von ADAM10 und ADAM17

Zurzeit sind über 80 Substrate von ADAM17 bekannt (Moss und Minond, 2017). Daher ist es verständlich, dass ADAM17 in viele physiologische und pathophysiologische Prozesse innerhalb des Organismus eingreift und das Verständnis von Aktivierung, Regulation und Funktion dieser Protease von entscheidender Bedeutung ist.

ADAM17 wurde 1997 als *TNF- α Converting Enzyme* (TACE), bedingt durch das nachgewiesene *Shedden* von dem *Tumor-Nekrose-Faktor- α* (TNF- α), beschrieben (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Das Zytokin TNF- α wirkt chemotaktisch und rekrutiert unter anderem weitere Immunzellen und spielt somit in der Immunantwort eine entscheidende Rolle. Die unkontrollierte und übermäßige Freisetzung von TNF- α kann wiederum zu einer zu starken Immunantwort und dadurch inflammatorischen Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis oder einer Sepsis, führen (Horiuchi et al., 2007; Leppkes et al., 2014).

ADAM17-*knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig. Sie sterben perinatal. Während ihrer Embryogenese weisen sie neben Hautproblemen massive Herz-, Augen- und Darmentwicklungsdefizite auf (Jackson et al., 2003; Peschon et al., 1998). Zu erklären ist dies anhand der Funktion von ADAM17 als *Hauptsheddase* für die Liganden des EGF-Rezeptors. Der EGF-Rezeptor gehört zu der Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Aktivierung von dem EGF-Rezeptor sichert die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung der Zelle und spielt somit eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Reparatur verschiedener Gewebe. Eine unkontrollierte Stimulierung dieses Rezeptors führt zu einem unkontrollierten Zellwachstum und ist in verschiedenen Tumorarten zu beobachten (Dhomen et al., 2012). Aktiviert wird der EGF-Rezeptor durch verschiedene Liganden. Diese werden als in der Membranverankerte inaktive Vorläuferproteine synthetisiert und sind erst nach proteolytischer Freisetzung durch ADAM10 und ADAM17 in der Lage den EGF-Rezeptor zu stimulieren (Peschon et al., 1998). Während ADAM10 die *Hauptsheddase* für die Liganden EGF und Betacellulin ist, ist ADAM17 hauptsächlich für die Freisetzung von TGF- α , Amphiregulin (AREG), Epiregulin und HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) zuständig (Sahin et al., 2004). Ist der Rezeptor-Ligand-Komplex gebildet, dimerisiert der Rezeptor und eine intrazelluläre Signalkaskade wird ausgelöst (Ferguson et al., 2003). Ein wichtiger Zwischenschritt in dieser Signalkaskade ist die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 (*extracellular-signal regulated kinase*). ERK 1 und 2 gehören zu den MAP-Kinasen (*mitogen*

activated protein) und stimulieren verschiedene Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren, die zu den oben genannten Effekten in der Zelldifferenzierung und Zellproliferation führen (Yarden und Sliwkowski 2001). Der Phänotyp von EGF-Rezeptor- oder EGF-Rezeptor- Liganden- (TGF- α , HB-EGF oder AREG) *knockout*-Mäusen ist mit dem der ADAM17-*knockout*-Mäuse vergleichbar. Lebensfähig sind die ADAM17^{Ex/Ex}-Mäuse ab einem Expressionslevel von ADAM17 von fünf Prozent. Diese weisen, neben weiterhin starken Hautstörungen, eine Anfälligkeit für inflammatorische epitheliale Krankheiten auf (Chalaris et al., 2010).

Im Gegensatz zu den Mäusen scheint der Mensch das Fehlen von ADAM17 zum Teil kompensieren zu können. Es sind drei Patienten beschrieben, die eine *Loss-of-Function*-Mutation im ADAM17-Gen besitzen (Bandsma et al., 2015; Blaydon et al., 2011). Sie weisen als klinische Symptome eine gestörte Hautregeneration mit atypischen Nagel- und Haarstrukturen, ständige Darmreizungen und kardiale Probleme als klinische Symptome auf. Besonders auffällig ist die Anfälligkeit für Infektionen der Haut mit *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*. Diese Infektionen sind ebenfalls mit dem Fehlen von ADAM17 zu erklären. Eine Funktion des EGFR ist die Hochregulierung von antimikrobiellen Peptiden (AMP) auf der Haut. Fehlt ADAM17, kann sich die antimikrobielle Barriere auf der Haut nicht ausbilden, was dazu führt, dass die meist kationischen Peptide schädliche Mikroorganismen nicht mehr abtöten können (Simanski et al., 2016). Zwei der Patienten verstarben im jungen Alter von 10 Monaten bzw. 12 Jahren (Bandsma et al., 2015; Blaydon et al., 2011).

Das Spalten von Zell-Zell-Kontakten durch ADAM17 führt zu Veränderungen im Gewebeverbund. L-Selektin ist für die Interaktion des Endothels mit Leukozyten wichtig und JAM-A (*junctional adhesion molecule A*) beeinflusst die Permeabilität des Endothels für Leukozyten. Die Regulation beider Substrate ist bei Entzündungsprozessen von entscheidender Bedeutung (Dreymueller et al., 2012; Hafezi-Moghadam et al., 2001).

Untersuchungen zur Bedeutung von ADAM10 sind Teil der Erforschung der Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung. Hierbei stellt ADAM10 durch seine Funktion als α -Sekretase und der damit verbundenen Spaltung des zerebralen *amyloid-precursor-protein* (APP) einen protektiven Faktor dar (Saftig und Lichtenthaler, 2015). Wird die Expression von ADAM10 in Mäusen ausgeschaltet, ist wie bei ADAM17, eine intrauterine Sterblichkeit zu beobachten. Phänotypisch ähneln diese Mäuse den Mäusen, die über keinen Notch-Rezeptor verfügen. Der Notch-Signalweg ist unverzichtbar in der Zell-Zell-Kommunikation. Klinisch sind Entwicklungsdefizite des zentralen Nerven- und des kardiovaskulären Systems zu beobachten (Hartmann et al., 2002). Eine weitere wichtige Substratgruppe von ADAM10 sind die Cadherine verschiedener Gewebe, die zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle gehören. Dazu

zählen das neuronale (N)-Cadherin, das epitheliale (E)-Cadherin und das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin. Dysregulationen von ADAM10 führen in diesem Zusammenhang zu erheblichen Beeinträchtigungen von Zell-Zell-Kontakten und zu massiven Störungen im Zellverbund (Reiss et al., 2005).

Neben den aufgeführten Substraten, die spezifisch von einer der beiden Metalloproteasen *geshededet* werden, gibt es Substrate, die von beiden umgesetzt werden können. Ist eine der beiden Proteasen inhibiert oder in ihrer Funktion beeinträchtigt, kann unter Umständen die andere Protease die Funktion der ausfallenden Protease kompensieren (Saftig und Reiss, 2011). Ein Beispiel ist TGF- α , welches normalerweise von ADAM17 freigesetzt wird. Dieses aktiviert und signalisiert durch seine Bindung an seinen Rezeptor anti-apoptotische Signale und spielt in der Zellproliferation und Zellentwicklung eine wichtige Rolle. Ist ADAM17 nicht exprimiert oder kann seine Funktion nicht ausüben, übernimmt ADAM10 die proteolytische Spaltung von TGF- α (Sahin et al., 2004). In der Tabelle 2 sind einige der Substrate von ADAM10 und ADAM17 dargestellt.

Tabelle 2: Auszug von ADAM10- und ADAM17-Substraten

Substratgruppe	Substrat	Funktion	Referenz	Sheddase
Wachstumsfaktoren	TGF-α (<i>Transforming Growth Factor-α</i>)	EGF-R Ligand; Proliferation	(Arribas und Esselens, 2009)	ADAM17
	TNF (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)	Immunsystem	(Arribas und Esselens, 2009)	ADAM17
	EGF (<i>Epidermal Growth Factor</i>)	EGF-R Ligand; Proliferation	(Sahin et al., 2004)	ADAM10
Rezeptoren	TNF-R1 (<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>)	Immunsystem	(D.'Alessio et al., 2012)	ADAM17
	IL-6 Rezeptor (<i>Interleukin 6 Receptor</i>)	Immunsystem	(Arribas und Esselens, 2009)	ADAM10/17
Adhäsionsmoleküle	E-Cad (<i>Epheliales Cadherin</i>)	Zelladhäsion	(Arribas und Esselens, 2009)	ADAM17
Andere	APP (<i>Amyloid-Precursor-Protein</i>)	nicht-amyloider Signalweg (Alzheimer protektiv)	(Arribas und Esselens, 2009)	ADAM10/17

Zusammengefasst spiegelt die Fülle und Varianz der Substrate die Relevanz von ADAM10 und ADAM17 im Organismus wider. Wird der *Sheddingprozess* auf der einen Seite nicht genauestens reguliert und kontrolliert, kann dies zu schwerwiegenden Pathologien führen. Auf der anderen Seite kann die Modulierung der Aktivität als therapeutischer Ansatz diskutiert werden. Der Grundstein ist ein exaktes Verständnis dieser Proteasen.

1.3 Aktivierung und Regulation von ADAM10 und ADAM17

Genauso wie der *Sheddingprozess* an sich, ist auch die Regulation und Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 ein komplexer mehrstufiger Prozess, der bei weitem noch nicht vollständig aufgeschlüsselt ist. Von der Proteinbiosynthese bis hin zur Aktivierung auf der Zelloberfläche gibt es viele Möglichkeiten für die Zelle selbst oder von außen in die Reifung und Regulation der Proteasen einzugreifen.

Unterschieden wird zwischen dem konstitutiven und induzierten ADAM-vermittelten *Shedding*. Bei Letzterem wird die Aktivität der ADAMs durch unphysiologische oder physiologische Stimulantien induziert. Physiologische Stimulantien sind unter anderem Wachstumsfaktoren (*Fibroblast Growth Factor*) und Zytokine (TNF- α) (Le Gall et al., 2010; Huovila et al., 2005). Das Ca²⁺-Ionophor Ionomycin, der Phorbolster PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und das Bienengift Melittin sind dagegen unphysiologische Aktivatoren des ADAM17-vermittelten *Sheddings*. Ionomycin bewirkt einen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und steigert die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 (Le Gall et al., 2009). Während PMA über die Proteinkinase C für ADAM17 einen aktivierenden Signalweg auslöst, steigert Melittin über P2-Rezeptoren die ADAM10- und ADAM17-*Sheddingaktivität* (Sommer et al., 2012). Ein bekannter endogener Inhibitor ist TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteases 3*), der im aktiven Zentrum von ADAM17 eingreift (Amour et al., 1998). Die Hemmung erfolgt in Zellkultur durch synthetische Inhibitoren wie Marimastat, einem Breitband-Metalloproteasen-Inhibitor, GI254023X, ein präferentieller ADAM10 Inhibitor und GW280264X, ein ADAM10 und ADAM17 Inhibitor (Ludwig et al., 2005; Wisniewska et al., 2008).

Intrazellulär kann auf der Ebene der Transkription, dem Transport zur Zelloberfläche und der anschließenden Aktivierung an der Zellmembran an verschiedenen Stellen eingegriffen werden. Die Regulationsmechanismen auf Transkriptionsebene sind an vielen Stellen noch ungeklärt. Auf posttranslatonaler Ebene ist zur Regulierung von ADAM17 mehr bekannt.

Bei dem im Kapitel 1.1 beschriebenen Aufbau der ADAMs fungiert die Prodomäne durch Blockierung des katalytischen Zentrums als physiologischer Inhibitor. Erst durch die Furin-ähnlichen-Konvertasen im Trans-Golgi-Netzwerk wird die Prodomäne abgespalten. Erst jetzt sind die ADAMs proteolytisch aktiv (Peiretti et al., 2003). Zudem sind Mutationen in der

Prodomäne bekannt, die zu einer verminderten Aktivität von ADAM17 führen (Wong et al., 2015). Der Transport vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche ist ein weiterer Regulierungsschritt für die ADAMs. Eine wichtige Rolle dabei übernehmen für ADAM17 die katalytisch inaktiven iRhoms 1 und 2 (*inactive rhomboid*). Während iRhom 1 ubiquitär vorkommt, wird iRhom 2 von Immunzellen wie den Makrophagen exprimiert (Adrain et al., 2012; Christova et al., 2013). iRhom 1 und 2 interagieren dabei spezifisch mit ADAM17 und transportieren ADAM17 vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche. Der Schritt von dem intrazellulären Transport zur Verankerung in der Zellmembran benötigt dabei einen Phosphorylierungsschritt bei den iRhoms selbst. Es ist vorstellbar, dass hier aktiv eingegriffen werden kann (Grieve et al., 2017). Das Entfernen von iRhom 1 und 2 führt zu einem Verlust der proteolytischen Aktivität von ADAM17 (Christova et al., 2013). Diese Art von Transportproteinen übernehmen bei ADAM10 die Tetraspanine. Hier sind unter anderem die Tetraspanine 12 und 15 bekannt, die aktiv in die Reifung und Aktivität von ADAM10 eingreifen können (Prox et al., 2012; Xu et al., 2009). Die vorhandenen SH3-Bindungsmotive sowie die Phosphorylierungsstellen an der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 stellen eine weitere potentielle Regulierungsoption dar (Díaz-Rodríguez et al., 2002; Le Gall et al., 2010; Reddy, 2000).

An der Zellmembran selbst werden derzeit mehrere Regulierungsmechanismen diskutiert. Hierbei scheint eine kurzfristige und reversible Veränderung im Aufbau der Zellmembran von besonderer Bedeutung zu sein. Sommer et al. vermuten für ADAM17, dass die MPD mit der negativ geladenen Kopfgruppe von PtdSer interagiert und somit die proteolytische Spaltung der Substrate stattfinden kann. Voraussetzung ist, dass das PtdSer, welches sich normalerweise auf der inneren Seite der Zellmembran befindet, auf die äußere Seite verlagert wird (Sommer et al., 2016). Bei ADAM10 wird in der *stalk*-Region ein Abschnitt für diese wichtige Interaktion mit PtdSer vermutet. (Bleibaum et al., 2019). In beiden Fällen geschieht die PtdSer-Externalisierung unter anderem durch den Ca^{2+} -abhängigen Phospholipidtransporter Anoctamin 6 (ANO6). ANO6 gehört zu den Scramblasen, die Phospholipide bidirektional transportieren können. Eine Überexpression von ANO6 führt zu einer gesteigerten ADAM17-Aktivität bei Ca^{2+} -Influx oder einem erhöhtem *Shedding* von ADAM10 (Bleibaum et al., 2019; Veit et al., 2018). Die Bedeutung von Scramblasen wird anhand des Scott-Syndroms deutlich. Kann ANO6 durch eine Mutation seine Funktion nicht ausüben, kommt es zu einer fehlenden Blutkoagulation und dadurch zu einer Blutungsneigung (Suzuki et al., 2010; Weiss und Lages, 1997). Neben dem PtdSer sind weitere Mechanismen bekannt, die die Nanostruktur der Zellmembran verändern. Die Erhöhung der Membranfluidität durch den Abbau von Cholesterol-reichen Plattformen führt zu einem gesteigerten *Shedding* von mehreren ADAM-Substraten (L1, IL6-R, CD44, TNFR1). Passend dazu wird auch durch Hinzugabe von ungesättigten Fettsäuren oder Substanzen wie Phenylethanol, die die

Membranfluidität erhöhen, ein ansteigendes ADAM-vermitteltes *Shedding* beobachtet. Ein Umbau der Membran geschieht auch während des ADAM-abhängigen *Sheddings* durch die Sphingomyelinase (SMase). Diese generiert das Sphingolipid Ceramid und erhöht dadurch die Aktivität von ADAM17. Zusammengefasst kann die vorübergehende Aufhebung der Zellmembranasymmetrie und Nanodomänenstruktur die Protease-Substrat-Interaktion wesentlich beeinflussen (Reiss und Bhakdi, 2017).

1.4 Bedeutung der Zellmembranasymmetrie für die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17

Die Zell- oder Plasmamembran bildet eine Grenze zwischen zwei Kompartimenten innerhalb eines Organismus. Die von Charles Overton 1895 aufgestellte Hypothese, dass diese aus Phospholipiden besteht, wurde über die Jahre immer weiter aufgeschlüsselt. Heute ist das „Flüssig-Mosaik-Modell der Biomembran“ anerkannt. Die 7-8 nm dicke Zellmembran besteht aus einer Doppelschicht von amphiphilen Phospholipiden und einem kleineren Anteil an Glykolipiden. In ihrem Aufbau und ihrer Verteilung von Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen ist die Zellmembran asymmetrisch. Auf der extrazellulären Seite reichern sich unter anderem vermehrt Glykosphingolipide, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositole und auf der intrazellulären Seite Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamine an (Campbell und Reece, 2006; Lüllman-Rauch, 2012). Das Aufheben oder die Veränderung kann unter kontrollierten Bedingungen zur Aktivierung von Zellsignalen führen. Wird die Asymmetrie nicht kontrolliert verändert oder gestört, führt das zum Funktionsverlust der Zellmembran und zum Zusammenbrechen der Zellhomöostase. Lipidtransporter sind eine Möglichkeit der Umverteilung der Phospholipide. Während Flippasen und Floppasen ATP (Adenosintriphosphat)-abhängige unidirektionale Transporter darstellen, findet bei Scramblasen ein bidirektionaler ATP-unabhängiger und unspezifischer Lipidtransport statt (Clark, 2011; Hankins et al., 2015; Kodigepalli et al., 2015). In der TMEM16-Familie (Transmembranproteine 16), ursprünglich als Chlorid-Kanal-TMEM16-Familie bezeichnet, befinden sich wichtige Phospholipid-Scramblasen. TMEM16F (Anoctamin 6, siehe Kapitel 1.3) ist für die ADAM-Aktivierung von entscheidender Bedeutung (Veit et al., 2018). Bei der Apoptose, einer Form des kontrollierten Zelltodes, gilt die PtdSer-Externalisierung (auch: PtdSer-Flip) als Signal für Phagozyten, die absterbende apoptotische Zellen ohne inflammatorische Antwort aus dem Gewebe zu entfernen (Segawa und Nagata, 2015). Verantwortlich für den Transport des PtdSer zur äußeren Zellmembran während der Apoptose ist neben den Scramblasen XKR4 und XKR9, die Scramblase XKR8 (*Mammalian XK- Related Protein*) (Suzuki et al., 2014).

1.5 Die Apoptose als ADAM-Aktivator

Die Apoptose ist schon länger als Aktivator des ADAM-vermittelten *Sheddings* bekannt. Im Jahre 1999 konnte ein erhöhtes TNF-R1 *Shedding* unter apoptotischen Bedingungen gezeigt werden (Madge et al., 1999). Auch für den IL-6 Rezeptor wurde Apoptose als natürlicher Stimulator für ADAM17-vermitteltes *Shedding* beobachtet (Chalaris et al., 2007). Kürzlich konnten Sommer et al. nachweisen, dass der PtdSer-Flip von der inneren zur äußeren Zellmembran und nicht die Apoptose selbst das ADAM17-vermittelte *Shedding* erhöht (Sommer et al., 2016). Raji-Zellen, die die Scramblase XKR8 kaum exprimieren, zeigen keinen PtdSer-Flip unter Stimulation mit dem *Fas-Ligand* (FasL), der ein Todessignal induziert. Trotz Fehlen des PtdSer-Flips sterben die Zellen apoptotisch, zeigen dabei aber kein erhöhtes *Shedding* vom TNF-R1. Im Gegensatz dazu exprimieren Jurkats die XKR8 Scramblase und zeigen nachweislich den PtdSer-Flip sowie ein erhöhtes *Shedding* (Sommer et al., 2016). Neben der Bedeutung von PtdSer für ADAM17, konnte auch für ADAM10 eine erforderliche Membraninteraktion nachgewiesen werden (Bleibaum et al., 2019). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Apoptose durch den PtdSer-Flip einen starken ADAM-Aktivator darstellt. Welche physiologische Bedeutung die Aktivierung der ADAMs unter diesen Bedingungen für die Zelle hat, ist noch unklar.

1.5.1 Die Apoptose

Ist eine Zelle irreversibel beschädigt, versucht die Zelle biologischen Selbstmord zu begehen bzw. sich selbstständig abzubauen. Dieser Prozess wird Apoptose genannt (Campbell und Reece, 2006). Dabei greifen verschieden ausgelöste und genetisch vorprogrammierte Signalwege ineinander, die zum Sterben der Zelle und der anschließenden Phagozytose führen. Der entscheidende Unterschied zwischen der Apoptose und Nekrose, dem unkontrollierten Zelltod, ist das Ausbleiben einer inflammatorischen Antwort (Walsh, 2014). Die Apoptose ist in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert. Entscheidend ist sie unter anderem für die Embryogenese, dem Altern und der Krebstherapie (Renehan et al., 2001). Apoptotische Zellen sind durch eine Zellschrumpfung, einer Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhesis) mit einer vorrangegangener Zellkernpyknose und dem Verpacken der einzelnen Fragmente und zytoplasmatischen Bestandteile in kleine apoptotische Vakuolen (*engl. apoptotic bodies*) gekennzeichnet. Die Zelle wird aus dem Zellverbund herausgelöst und es werden keine Zytokine oder pro-inflammatorische Signale an die Umgebung abgegeben (Kerr et al., 1972). Ein weiteres Merkmal ist der frühe Verlust der Membranasymmetrie und die Externalisierung von PtdSer (Leventis und Grinstein, 2010). Phagozyten exprimieren PtdSer-Rezeptoren wie Tim4 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 4*), die direkt an das PtdSer auf den *apoptotic bodies* binden oder Rezeptoren, die PtdSer-

gebundene Adapterproteine wie zum Beispiel MFG-E8 (*milk fat globule EGF factor 8*) oder Gas6 (*growth arrest-specific 6*) erkennen (Miyaniishi et al., 2007; Miyasaka et al., 2004; Nakano et al., 1997). Die apoptotischen Vakuolen werden anschließend im Phagozyten im Lysosom degradiert (Fadok et al., 2001). Phagozytische Zellen sind dendritische Zellen, Makrophagen, epitheliale und mesenchymale Zellen (Segawa und Nagata, 2015). Auf molekularer Ebene werden bei der klassischen Apoptose der extrinsische und der intrinsische Signalweg unterschieden. Endpunkt beider Signalwege ist die Aktivierung von Caspasen. Diese Gruppe von Cysteinproteasen ist letztendlich für den typischen Ablauf der Apoptose verantwortlich. Dabei wird zwischen den Initiator-Caspasen (-8, -9, -10) und den Effektor-Caspasen (-3, -6, -7), die durch gegenseitige Proteolyse der Initiator-Caspase aktiviert werden, unterschieden (Elmore, 2007).

1.5.2 Signalweg der Apoptose

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Stimulation von Todesrezeptoren, die zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren gehören, induziert. Todesliganden, wie FasL, TNF- α und *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), aktivieren ihren jeweiligen Rezeptor und können die Apoptose initiieren (Locksley et al., 2001). Bindet beispielsweise TNF- α an den TNF-Rezeptor 1, trimerisiert dieser und es kommt intrazellulär zur Bindung des TRADD (*TNF-Receptor associated death domain*)-Adapterproteins. Daraufhin bindet der *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2), *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIP1), *cellular inhibitor of apoptosis 1* (cIAP1) und cIAP2 an diesem Komplex und vermittelt Signale über den NF- κ B-Signalweg. Durch Fehlen von cIAP1 oder Deubiquitinierung von RIP1 durch *Cylindromatosis* (CLYD) kommt es zur Destabilisierung des Komplexes und ein neuer Komplex mit RIP1, TRADD und FADD (*fas associated death domain*) wird gebildet. Durch Assoziation der Pro-Caspase 8 mit FADD entsteht der *death-inducing signaling complex* (DISC), der die Apoptose vermittelt (de Almagro und Vucic, 2015; Elmore, 2007; Micheau und Tschopp, 2003). Über die Aktivierung der Caspase-8 werden die Effektor-Caspasen rekrutiert, welche wiederum für den Abbau der Zelle zuständig sind (Elmore, 2007; Kischkel et al., 1995).

Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Veränderung der Permeabilität in der Mitochondrienmembran gesteuert. Durch äußere Stimuli wie Hypoxie, Strahlung oder Toxine kommt es zur Freisetzung verschiedener pro-apoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium (Elmore, 2007). Bekannte Proteine sind das Cytochrom c, *second mitochondria-derived activator of caspase / direct IAP binding protein with low pI* (SMAC/DIABLO) und die Serin-Protease HtrA2/Omi. Während SMAC/DIABLO und HtrA2/Omi anti-apoptotische Proteine binden und ihre Wirkung aufheben, bildet das Cytochrom c mit Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) ATP-abhängig das Apoptosom. Im Apoptosom ist die Pro-Caspase-9

rekrutiert, die in Anwesenheit des Apoptosoms dimerisiert und aktiviert wird. Über weitere Zwischenschritte werden die Effektor-Caspasen aktiviert (Du et al., 2000; Van Loo et al., 2002; Würstle et al., 2012).

Die im extrinsischen Signalweg aktivierte Caspase-8 und die am Ende der intrinsischen Apoptose durch das Apoptosom aktivierte Caspase-9 aktivieren auto-katalytisch weitere Effektor-Caspasen (-3, -6, -7). Unter den Effektorproteasen stellt die Caspase-3 den wohl wichtigsten Vertreter dar. Es werden weitere Proteasen und Endonukleasen aktiviert, die mit dem Verdau der DNS (Desoxyribonukleinsäure) und dem Abbau der restlichen intrazellulären Proteine, wie zum Beispiel der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), beginnen (Barnhart et al., 2003; Slee et al., 2001). Die Signalwege sind vereinfacht in Abbildung 3 dargestellt.

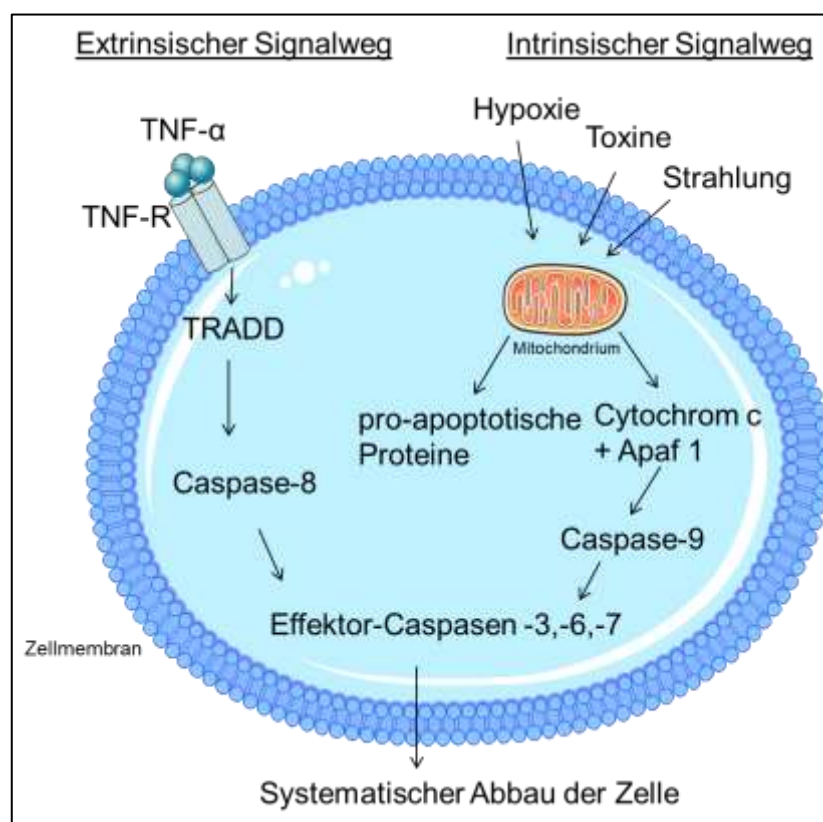


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Apoptose

Dargestellt sind der ex- und intrinsische Signalweg der Apoptose in vereinfachter Version. Über die Aktivierung des TNF-Rezeptors (TNF-R) durch TNF- α wird über die Bindung mehrerer intrazellulärer Faktoren wie dem *TNF-Receptor associated death domain* (TRADD) die Caspase-8 aktiviert, die zur Aktivierung der Effektor-Caspasen -3,-6,-7 führt. Diese und das Cytochrom c werden auch durch Permeabilitätsveränderung am Mitochondrium durch Hypoxie, Strahlung, etc. freigesetzt. Das Apoptosom bestehend aus Cytochrom c und Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) aktivieren die Caspase-9, die wiederum die Effektor-Caspasen aktiviert. Die Caspase-8 kann über die Spaltung von Bid (*truncated BH3-interacting domain death agonist*) zu tBid (*truncated BH3-interacting domain death agonist*) zusätzlich den intrinsischen Signalweg aktivieren. Anschließend beginnt der systematische Abbau der Zelle.

1.6 Die Nekroptose als programmierter Zelltod

1.6.1 Die Nekroptose

Früher galt die Apoptose als einziger programmierter Zelltod. Dass nekrotische Prozesse genetisch ablaufen könnten, schien unmöglich. Heute ist bekannt, dass es auch Nekrose-ähnliche Zelltode gibt, die einen genetisch vorprogrammierten molekularen Signalweg abspielen (Weinlich et al., 2017). Unter allen programmierten Nekrosen ist die Nekroptose die derzeit am besten untersuchte Form und steht auch in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der ADAM-Aktivierung im Fokus.

Die Nekroptose ist als Caspase-unabhängiger pro-inflammatorischer Zelltod beschrieben. Anders als bei der Apoptose gelangen bei der Nekroptose DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) ins extrazelluläre Gewebe und eine inflammatorische Antwort des Organismus findet statt. Bedingt ist dies durch eine Perforation und Ruptur der Zellmembran, die morphologisch der Nekrose ähnelt (Vanden Berghe et al., 2010; Kaczmarek et al., 2013). Weitere morphologische Ähnlichkeiten zur Nekrose sind das Fehlen von Kernpyknose und Karryohexis und das Anschwellen und „Platzen“ der Mitochondrien bzw. der gesamten Zelle (Pasparakis und Vandenabeele, 2015).

Die pathophysiologische Bedeutung der Nekroptose wird unter anderem anhand von FADD, FLIP (*Cellular FLICE-like inhibitory protein*), und Caspase-8 Knockout-Mäusen deutlich. Sie sterben intrauterin. Diese Proteine sind essentieller Bestandteil der Apoptose oder Transkriptionsfaktoren, die für das Überleben der Zelle unabdingbar sind (Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 2000, 1998). Sind diese Proteine inhibiert oder in ihrer Funktion eingeschränkt, kann keine Apoptose stattfinden. Die Caspase-unabhängige Nekroptose findet nun statt, da die Aktivierung von RIP1 und RIP3 durch die Caspasen nicht verhindert werden kann. Interessanterweise sind wiederum Caspase-8-defiziente Mäuse bei einem RIP3-Knockout und FADD-defiziente Mäuse bei einer RIP1-Deletion überlebensfähig (Kaiser et al. 2011; Oberst et al. 2011; Dillon et al. 2012). RIP1 und RIP3 stellen zwei essentielle Proteine für die Nekroptose dar. Inzwischen wurde die Nekroptose sowohl bei mehreren neurodegenerativen, inflammatorischen Krankheiten als auch bei Infektionen nachgewiesen (Grootjans et al., 2017; Weinlich et al., 2017; Zhou und Yuan, 2014). Eine Auswahl von unterschiedlichsten Erkrankungen, in denen der Nekroptose eine Bedeutung zugewiesen wird, ist in Tabelle 3 zu finden. Eine Besonderheit besteht darin, dass es auch Erkrankungen, wie das Ovarialkarzinom, gibt, bei denen das Gewebe eine geringe Expression von Nekroptose-Molekülen zeigt und gerade dies mit einer ungünstigeren Prognose für die Patienten einhergeht (He et al., 2013). Wieso eine geringe Expression von Nekroptoseproteinen in

einigen Tumorentitäten zu einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit führt, ist jedoch unklar.

Tabelle 3: Beispiele für Erkrankungen in denen die Nekroptose involviert ist (modifiziert nach Zhou et al. (2014) und Grootjans et al. (2017))

Erkrankung	Nachweis der Nekroptose	Referenz
Inflammatorische Erkrankungen		
Toxische epidermale Nekrolyse	Phosphoryliertes MLKL in Biopsien	(Kim et al., 2015)
Entzündliche Darmerkrankungen	Erhöhte RIP3- und MLKL- Expression in FADD-defizienten Darmzellen -> RIP3-Knockout verhindert Colitis	(Welz et al., 2011)
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	Erhöhte Level von RIP3 in Lungenepithelzellen	(Mizumura et al., 2014)
Tumorerkrankungen		
Ovarialkarzinom	Niedrige MLKL-Expression geht mit schlechter Prognose einher	(He et al., 2013)
Kolonkrebs	Niedrige Expression von RIP1 und RIP3 durch Hypoxie	(Moriwaki et al., 2015)
Malignes Melanom	Reduzierte Expression von RIP3 in Tumorzellen, wobei primäre Melanozyten RIP3 exprimieren	(Geserick et al., 2015)
Leukämie	Erniedrigtes RIP3	(Nugues et al., 2014)
Neurodegenerative Erkrankungen		
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	Nekroptoseinhibitor Nec-1 reduziert Motoneuronsterben	(Re et al., 2014)
Multiple Sklerose (MS)	Erhöhte Level von RIP1, RIP3 und Nekrosomnachweis in Läsionen	(Ofengeim et al., 2015)
Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R)		
Myokardischämie	RIP3-Expression erhöht in ischämischen Herzzellen	(Luedde et al., 2014)
Renaler I/R	Reduzierter Schaden bei RIP3- Mangel	(Linkermann et al., 2012, 2013)
Nierentransplantatabstoßung	RIP3-Mangel verlängert die Funktion von der Spenderniere	(Lau et al., 2013)

Die Nekroptose ist nicht nur von pathophysiologischer Bedeutung. Aufgrund des Caspasen-unabhängigen Zelltodes, gilt die Nekroptose als möglicher Therapieansatz von Apoptose-resistenten Krebszellen. Hier werden zurzeit mehrere Ansatzmöglichkeiten diskutiert. Probleme stellen unter anderem mögliche *Off-target* Effekte und das Triggern von inflammatorischen Krankheiten dar (Su et al., 2016). Eine weitere Erklärung, weshalb der Körper programmierte Nekrose durchführt und damit selbst eine inflammatorische Antwort

auslöst, ist das Eliminieren von Virus-infizierten Zellen. Über den *DNA-dependent activator of interferon regulatory factors* (DAI), der als RNA-Sensor von Viren gilt, kann in Virus-infizierten Zellen der Zelltod ausgelöst werden (Kaiser et al., 2013).

Neben der klassischen Nekroptose sind und werden neue programmierte Nekrosen wie die Ferroptose, Pyroptosis, Parthanatos und die Cyclophilin-D abhängige Nekrose beschrieben (Conrad et al., 2016). Aufgrund ihrer Bedeutung in pathophysiologischen Prozessen sind sie in der pharmakologischen Forschung derzeit von großem Interesse. Der *neutrophil extracellular-trap (NET)-associated cell death* (NETosis) und der autophagische Zelltod (*autophagic cell death*) sind weitere Formen des programmierten Zelltodes, die aber keinen Nekrose-ähnlichen Phänotyp zeigen.

1.6.2 Signalweg der Nekroptose

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, in denen der molekulare Mechanismus der Nekroptose weitestgehend aufgeschlüsselt wird. Dieser ist jedoch aufgrund seiner Komplexität und seines Umfangs Bestandteil weiterer aktueller Forschungen.

Wie bei der Apoptose, kann der Signalweg der Nekroptose durch verschiedene Todesrezeptoren, wie zum Beispiel dem TNF-Rezeptor, dem Fas-Rezeptor und den TRAIL-Rezeptoren, induziert werden (Feoktistova und Leverkus, 2015). Bei den TRAIL-Rezeptoren sind nur TRAIL-Rezeptor 1 (*Death Receptor 4*) und TRAIL-Rezeptor 2 (*Death Receptor 5*) in der Lage Apoptose bzw. Nekroptose zu vermitteln (Neumann et al., 2012). Unabhängig von den Todesliganden kommt es am Ende der molekularen Signalkette an ihren jeweiligen Todesrezeptoren zur Komplexbildung mit RIP1, RIP3 und der anschließenden Aktivierung der Pseudokinase *mixed-lineage-kinase-domain-like* (MLKL), welche das Effektorprotein der Nekroptose darstellt.

Im Folgenden ist zum Verständnis der TNF- α -induzierte Signalweg beschrieben. Nach der Stimulation vom TNF-Rezeptor 1 durch TNF- α wird wie bei der Apoptose der Komplex aus TRADD, TRAF 2, cIAP 1 und 2 und RIP1 gebildet (de Almagro und Vucic, 2015; Conrad et al., 2016). Eine an der Aminosäuresequenz K-63 verlinkte Ubiquitinierung durch cIAP1 und cIAP2 an RIP1 stabilisiert den Komplex, sodass die Apoptose verhindert und Zellüberlebenssignale über den NF- κ B- und MAP-Kinasen-Signalweg induziert werden. RIP1 spielt damit für das Zellüberleben und Zellsterben eine bedeutsame Rolle (Bertrand et al., 2008; Kelliher et al., 1998). Unter Abwesenheit von cIAP1, Deubiquitinierung von RIP1 durch das Deubiquitinierungsenzym *Cylindromatosis* oder durch Anwesenheit eines Proteinbiosynthesehemmers wie Cycloheximid entsteht aus FADD, Caspase-8, cFLIP und RIP1 ein neuer intrazellulärer Komplex-IIa. Dieser Komplex-IIa vermittelt erneut die Apoptose (Wang et

al., 2008). Ist jedoch an dieser Stelle die Caspase-8 durch synthetische, zelluläre oder virale Inhibitoren in ihrer Funktion gestört, bildet sich unter Rekrutierung von RIP3 das Nekrosom (Komplex-IIb). Das Nekrosom besteht aus RIP1 und RIP3 und beinhaltet zudem meistens die inaktive Caspase-8, FADD und cFLIP (de Almagro und Vucic, 2015; Grootjans et al., 2017). RIP1 ist nun für die Aktivierung von RIP3 zuständig, das sich durch die Aktivierung autophosphoryliert. RIP3 rekrutiert und aktiviert nachfolgend MLKL durch Phosphorylierung (Cai et al., 2013; Wu et al., 2014; Zhao et al., 2012) Die Phosphorylierung von MLKL führt zu einer Konformationsänderung und zur Oligomerisierung von MLKL an der Zellmembran (Murphy et al., 2013). Welche weiteren Signalmoleküle oder Prozesse danach aktiviert werden und wie es zur anschließenden Zellmembranperforation kommt, ist nicht bekannt. Zurzeit werden überwiegend zwei Hypothesen diskutiert. Möglicherweise ist das phosphorylierte MLKL (pMLKL) in der Lage direkt Ionen-Kanäle zu aktivieren oder bildet selbst einen Kanal in der Zellmembran durch Bindung an das negativ geladene Phosphatidylinositolphosphat. Am Ende ist ein Einstrom von Ca^{2+} - oder Na^{+} -Ionen zu beobachten. Der Einstrom der Ionen führt zum Wassereinstrom und zum Platzen der Zelle und somit zur Freisetzung von inflammatorischen Proteinen (Chen et al., 2014; Dondelinger et al., 2014; Su et al., 2014; Wang et al., 2014). Inzwischen wird vermutet, dass ähnlich zur Apoptose PtdSer-reiche Zellmembranvesikel, deren Membranen jedoch nicht intakt sind, freigesetzt werden und diese auch mit den Zellen in der Umgebung interagieren (Gong et al., 2017; Yoon et al., 2017)

RIP1 und RIP3 interagieren über das RHIM-Motiv (*rip-homotypic interacting motif* (RHIM)), indem Fibrillen eine amyloide Struktur ausbilden. Wird der amyloide Strukturaufbau unterbrochen, verhindert dies den nekroptotischen Zelltod (Li et al., 2013). Es sind bisher nur zwei weitere Proteine bekannt, die ebenfalls das RHIM-Motiv besitzen: TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) und DAI. *Toll-like*-Rezeptor 3 und 4 können unter anderem durch TRIF Nekroptose vermitteln (Kaiser et al., 2011). DAI erkennt virale RNA und vermittelt in Zellen, die das Virus aufgenommen haben, den nekroptotischen Zelltod (Kaiser et al., 2013). Abbildung 4 stellt den Signalweg der Nekroptose vereinfacht dar.

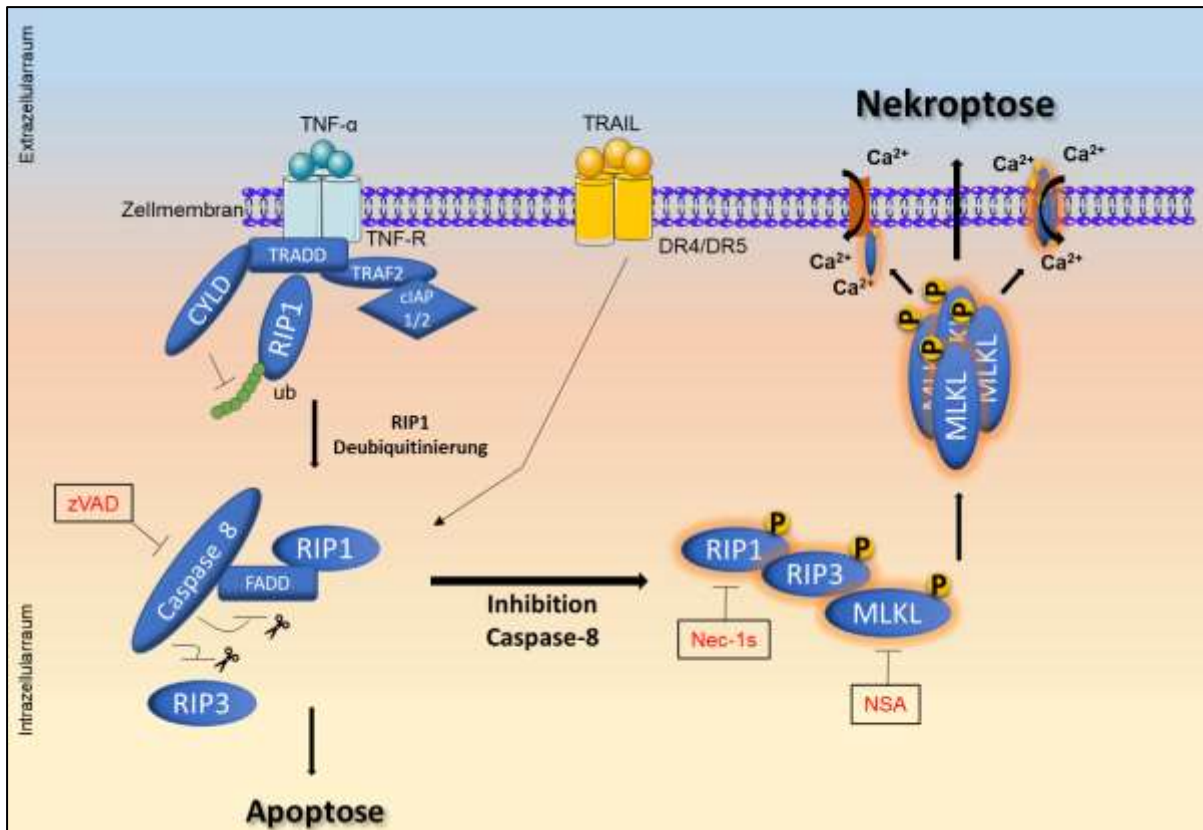


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Nekroptose

Die Nekroptose kann durch mehrere Stimuli induziert werden. Neben der viel untersuchten Stimulation des TNF-Rezeptors (TNF-R) (*tumor necrosis factor*) durch TNF- α , wird die Nekroptose beispielsweise auch durch TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) an den Todesrezeptoren (*death receptor*) 3 und 4 initiiert. Bindet TNF- α an seinen Rezeptor bildet sich ein Komplex aus TRADD (*TNF-associated death domain*), TRAF2 (*TNF-associated factor 2*), cIAP1/2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2*) und RIP1 (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*). RIP1 wird daraufhin ubiquitiniert (ub) und vermittelt Zellüberlebenssignale. Die Deubiquitinierung von RIP1 durch zum Beispiel Cylindramatosis (CLYD) führt zur Komplexbildung mit RIP1, FADD (*Fas-associated death domain*) und der Caspase-8. Die Caspase-8 verhindert die Aktivierung von RIP3 und inhibiert FADD. Unter Inhibition der Caspase-8 aktiviert RIP1 RIP3. RIP3 autophosphoryliert und aktiviert daraufhin MLKL (*mixed-lineage-kinase-domain-like*). Das phosphorylierte MLKL oligomerisiert und gelangt zur Zellmembran. Wie der Zelltod letztendlich herbeigeführt wird, ist noch unklar. Vermutet wird eine direkte Interaktion des pMLKL mit der Zellmembran oder Einbau des pMLKL als Ionenkanal für den unkontrollierten Einstrom von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen. In rot sind die häufigsten Nekroptoseinhibitoren dargestellt, die in der Arbeit verwendet worden sind: zVAD als Caspasen-Breitband-Inhibitor; Nec-1s (*Necrostatin-1 stable*) als RIP1-Inhibitor; NSA (Necrosulfonamid) als MLKL-Inhibitor.

2 Zielsetzung

Der Zelltod ist ein essentieller Mechanismus für die Aufrechterhaltung der Homöostase in unserem Körper. Täglich sterben 10-100 Billionen Zellen, die durch neue intakte Zellen ersetzt werden. Früher wurde nur zwischen zwei Zelltodwegen unterschieden. Auf der einen Seite stand die kontrollierte und programmierte Apoptose und auf der anderen Seite die unkontrollierte und mit einer Entzündungsreaktion einhergehende Nekrose. Dieses Modell wurde nun erweitert. Neben der Nekrose, die zufällig abläuft, sind nun andere programmierte Nekrose-ähnliche Zelltod-Formen wie die Nekroptose beschrieben. Die Nekroptose stellt hierbei einen Caspase-unabhängigen Tod der Zelle dar, der mit einer inflammatorischen Antwort einhergeht. Sie ist in inflammatorische Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, der Pankreatitis oder der Toxisch Epidermalen Nekrolyse und in zahlreiche Krebserkrankungen, wie zum Beispiel der Leukämie oder dem Kolonkrebs involviert. Inwiefern die Nekroptose für die Krankheitsbilder von Bedeutung ist, wird derzeit in der Forschung diskutiert. Eine Möglichkeit wäre die Aktivierung von einzelnen Proteinen oder ganzen Prozessen, die zur Pathologie der Erkrankung beitragen.

ADAMs sind Metalloproteasen, die an der Zelloberfläche zahlreiche Moleküle spalten und aktivieren können. ADAM10 und ADAM17 sind dabei die prominentesten Vertreter, die für die proteolytische Spaltung von Zelladhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren zuständig sind. Das Verständnis der Aktivierung und Regulierung ist daher von entscheidender Bedeutung. Die fehlende oder erhöhte Aktivität ist auch hier in inflammatorischen Prozessen und Krebserkrankungen beschrieben. Während bei der Apoptose die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 bekannt ist, ist die Rolle der beiden Proteasen während der Nekroptose gänzlich unklar.

Aufgrund der Bedeutung der beiden Proteasen während der Apoptose, war es das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob auch in der Nekroptose eine Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 zu beobachten ist, über welchen Mechanismus dies geschehen könnte und welche Relevanz diese Aktivierung hat. Dafür wurde im ersten Teil der Arbeit versucht die Nekroptose unter den gegebenen Laborbedingungen in verschiedenen Zelllinien zu induzieren. Anschließend wurde mittels funktioneller Analysen festgestellt, ob es während der Nekroptose zu einer Steigerung der proteolytischen Aktivität der ADAMs kommt. Hierbei sollte zusätzlich die mögliche Exposition von Phosphatidylserin (PtdSer) in der äußeren Schicht der Zellmembran mit Hilfe von Annexin V-Färbungen untersucht werden. Einerseits ist die Externalisierung des PtdSer und der einhergehende Verlust der Zellmembransymmetrie ein wichtiger Bestandteil der Apoptose und andererseits stellt dieser PtdSer-Flip den finalen Aktivierungsschritt von ADAM10- und ADAM17-induzierter proteolytischer Spaltung dar.

Abschließend wurde die Bedeutung der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 während der Nekroptose untersucht. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob die Aktivierung der Metalloproteasen einen protektiven Effekt durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren auf das Gewebe hat oder ob diese zum inflammatorischen Erscheinungsbild der Nekroptose beitragen. Ergebnisse dieser Untersuchung könnten für eine pharmakologisch gezielte Intervention genutzt werden, um die Zelle oder den gesamten Zellverbund vor dem Tod zu schützen oder die Entzündung im Gewebe zu begrenzen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe, <i>BVC professional</i>	Vacuubrand GmbH & Co. KG, DE
Analysewaage	Sartorius AG, DE
Analysewaage, <i>XS205 DualRange</i>	Mettler-Toledo GmbH, CH
Brutschrank, <i>HERA cell 150</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Cellometer [®] <i>Auto 1000</i>	Nexcelom Bioscience LLC, US
Dispenser, <i>Multipette[®] plus</i>	Eppendorf AG, DE
Fotodokumentationsanlage <i>BioDocII</i>	Biometra GmbH, DE
Gefrierschrank -20 °C, <i>comfort</i>	Liebherr-International AG, CH
Gefrierschrank -80 °C, <i>Forma 9000 series</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Heizblock	Eppendorf AG, DE
Heizblock	HLC BioTech, DE
Inkubator, <i>MaxQTM 6000</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Kippschüttler, <i>Roto-Shake Genie</i>	Scientific Industries Inc., US
Konfokales Fluoreszenzmikroskop, <i>FluoView FV1000</i>	Olympus K.K., JP
Kühlschrank, <i>premium</i>	Liebherr-International AG, CH
Lichtmikroskop, <i>invers</i>	Helmut Hund GmbH, DE
Magnetrührer, <i>CB 162</i>	Stuart, US
Microplate-Reader, <i>96-well, SunriseTM</i>	Tecan Group Ltd., CH
Multi-Imagingsystem, <i>Fusion FX7</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Multipipette, <i>Transferpette[®] S-12</i>	Brand GmbH & Co. KG, DE
Netzgerät <i>EV222</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Netzgerät <i>EV231</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
<i>PerfectBlueTM Doppelgelsystem Twin M/ ExW S</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
<i>PerfectBlueTM Tank-Elektroblotter Web S</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
pH-Meter, <i>pH211</i>	HANNA Instruments Deutschland GmbH, DE
Probenröhrchen-Rotator, <i>MACSmixTM Tube Rotator</i>	Miltenyl Biotec GmbH, DE
Rolltisch, <i>Stuart SRT6</i>	Bibby Scientific Ltd, UK
xCELLigence RTCA DP System	ACEA Biosciences, Inc., US

Schüttelinkubator, <i>Minitron</i>	Infors HT, CH
Spectralphotometer, <i>NanoDrop 1000</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Sterilwerkbank, <i>cytosafe-N 2004</i>	Faster GmbH, IT
Sterilwerkbank	Köttermann GmbH & Co. KG, DE
UV-Transilluminator, <i>Dual intensity Ultraviolet Transilluminator TM 20</i>	Ultraviolet-Products, US jetzt Analytic Jena AG, DE
Vakuum-Pumpe, <i>Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold</i>	Promega Corporation, US
Vortexer, <i>Heidolph Reax top test tube shaker</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Vortexer, <i>Lab dancer</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Vortexer, <i>Vortex genius 3</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Reinstwasseranlage, <i>TKA GenPure</i>	TKA part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Wasserbad, <i>GFL 1004</i>	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, DE
Zählkammer, <i>Neubauer</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, DE
Zentrifuge, <i>C1301B</i>	Labnet International, Inc., US
Zentrifuge, <i>Centrator 5301</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5424</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Heraeus™ Fresco™21</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Zentrifuge, <i>Heraeus™ Multifuge™ X3R</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE

3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-Well-Platten	Sarstedt AG & Co., DE
12-Well-Platten	Sarstedt AG & Co., DE
96-Well-ELISA-Platten	Sarstedt AG & Co., DE
96-Well-Platten, Flachboden	Sarstedt AG & Co., DE
96-Well-Platten, <i>MicroAmp^R Fast 96-Well Reaction Plate</i>	Life Technologies Co., US jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Alufolie, <i>Quickback</i>	Haushalt + Hygiene GmbH, DE
Autoklavenbeutel	Sarstedt AG & Co., DE

Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH, DE
Einfrier-Behälter <i>Nalgene® Mr. Frosty</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Einkanalpipetten, Mehrkanalpipetten	HTL lab solutions, PL
Einmalhandschuhe, <i>Mirco-Touch® Nitrile</i>	Ansell Healthcare GmbH, DE
Einmalkanülen, <i>BD Eclipse Needle – 20G</i>	Becton Dickson GmbH, DE
Einmalkanülen, <i>BD Microlance 3 - 26G</i>	Becton Dickson GmbH, DE
Entsorgungsbeutel	Brand GmbH + CO KG, DE
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA GmbH, DE
Glaskolben, 1000 ml; 300 ml	Schott AG, DE
Mikroschraubröhrchen, 2 ml; 1ml	Sarstedt AG & Co., DE
Objektträger	Menzel-Gläser GmbH, DE
Parafilm	American National Can Company, US
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Reaktionsgefäß, 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., DE
<i>Roti®</i>-PVDF-Membran, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>xCELLigence RTCA E-Platte</i>	ACEA Biosciences, Inc., US
Serologische Pipetten, 5 ml; 10 ml; 25 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Spritzenfilter, Porengröße 0,22 µm; 0,45 µm	Sarstedt AG & Co., DE
Stickstofftank	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, DE
<i>Whatman</i>-Papier, 1,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Zählkammer, <i>Cellometer Counting Chamber</i>	Nexcelom Bioscience LLC, US
Zellkultur-Flaschen, 75 cm²	Sarstedt AG & Co., DE
Zellkultur-Platten, 12-Well-Platten	Sarstedt AG & Co., DE
Zellkultur-Schalen, Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., DE

3.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,10-Phenanthrolin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
<i>ADAM-Substrat (fluorogen)</i>	Enzo Life Science GMBH, CH
Amersham™ ECL Select™	GE Healthcare GmbH, US
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Annexin V, <i>Alexa Fluor® 568 conjugate</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
BM <i>blue</i> HRP Substrat	F. Hoffmann-La Roche AG, CH
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)-Standard	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>cOmplete™</i> , Protease-Inhibitor-Mix	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
DEPC (Diethyl-Pyrokarbonat)- H ₂ O	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Diazabicyclooctane (DABCO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
DNA-Ladepuffer <i>6x Loading Dye</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare GmbH, US
Gelatine	SERVA Electrophoresis GmbH, DE
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
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
L-Glutamin	Arbeitsgruppe Prof. Dieter Adam, Kiel
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, DE
Magnesiumchloridhexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Methanol (MeOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Mowiol</i> [®] 4-88	Calbiochem part of Merck KGaA, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, DE
para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Penicillin/Streptomycin, 100x	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Pierce</i> [™] 660nm Protein Assay Reagent	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Propidiumiodid (PI)	Novus Biologicals, LLC, US
Proteinmarker, <i>PageRuler</i> [™] <i>Plus</i> , <i>Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Rotiphorese</i> [®] 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
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Trypanblau (0,5%ig)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Trypsin-EDTA, 10x	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

TurboFect™, Transfektionsreagenz	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Zinkchlorid (ZnCl₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Menge
Annexin Binding-Puffer	
HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM
AP-Lyse-Puffer	
EDTA	1 mM
Triton X-100	2,5 % (v/v)
1,10-Phenanthrolin	10 mM
In AP-Puffer	
AP-Puffer	
NaCl	100 mM
TRIS	100 mM
MgCl ₂	20 mM
pH	9,5
AP-Substratlösung	
1x Tablette pNPP	5 mg
In AP-Puffer	2,5 ml
Blockierlösung	
Milchpulver	5 % (w/v)
In TbST	
CLICKs-Medium	
FCS	5 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	0,2 %
2-Mercaptoethanol	0,1 %

DMEM^{+/+}-Vollmedium	
FCS	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
In DMEM	
Einfriermedium	
FCS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)
In DMEM	
ELISA Wasch-Puffer	
Tween® 20	0,05 % (v/v)
In PBS	
pH	7,4
Gelatine-Lösung	
Gelatine	0,25 % (w/v)
LB-Ampicillin-Platten	
LB-Medium	
Agar-Agar	1,5 % (w/v)
Ampicillin	0,1 mg/ml
Lysogeny Broth (LB)-Medium	
NaCl	10 g/l
Trypton/Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
pH	7,4
Mowiol	
Glycerin	6 g
Mowiol®	2,4 g
H ₂ O dest.	6 ml
TRIS-HCl, 0,2M	12 ml
pH	8,5
Mowiol^{+/+}	
Mowiol	1 ml
DABCO-Lsg. (200mg/ml in PBS)	100 µl
DAPI-Lsg. (1 mg/ml in H ₂ O)	1 µl

Phosphat-Puffer (PBS)	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH	7,4
Reagent Diluent (ELISA)	
BSA	1 %
In PBS	
pH	7,4
sterilfiltriert (Ø 0,2 µm)	
Sammelgel 4,5 %	
H ₂ O dest.	2,9 ml
Sammelgel-Puffer	1,25 ml
Acrylamid	0,835 ml
APS	30 µl
Temed	15 µl
Sammelgel-Puffer	
TRIS	500 mM
SDS	0,4%
pH	6,8
SDS Lauf-Puffer	
TRIS	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	3,5 mM
pH	8,8
SDS Proben-Puffer 6 x (reduzierend)	
TRIS	750 mM
SDS	416 mM
EDTA	6 mM
DTT	120 mM
Glycerin	47,5 %
Bromphenolblau	0,25 %
pH	6,8

Stripping-Puffer	
TRIS	62,5 mM
SDS	70 mM
2-Mercaptoethanol	0,7 %
pH	6,7
Transfer-Puffer	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10 %
pH	8,2-8,4
Transfektionsansatz pro <i>Well</i> eines <i>12-Wells</i> (Lipofektion)	
DMEM	100 μ l
Plasmid	
- <i>pAPtag-5 TGF-AP</i>	0,5 μ g
- <i>pcDNA3.1 ANO6 eGFP</i>	1 μ g
<i>pcDNA3.1 eGFP</i>	
<i>pcDNA3.1</i>	
- ADAM17	1 μ g
- ADAM10	1 μ g
- ADAM9	1 μ g
<i>TurboFect™ Transfection Reagent</i>	1,5 μ l/ μ g Plasmid
Hinzugegeben zu 500 μ l DMEM ^{-/-} -Medium	
Trenngel 7,5 %	
H ₂ O dest.	5,03 ml
Trenngel-Puffer	2,50 ml
Acrylamid-Lsg. (30 %)	2,33 ml
APS (10%)	60 μ l
Temed	30 μ l
Trenngel-Puffer	
TRIS	1500 mM
SDS	0,4 %
pH	8,8

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	
Tris	40 mM
Acetat	20 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0
Tris-buffered Saline (TbS)	
TRIS	20 mM
EDTA	50 mM
NaCl	150 mM
pH	7,4
Tris-buffered Saline and Tween® 20 (TBST)	
Tween® 20	0,1 %
In TBS	
Tris-Nonidet P-40-EDTA-Lyse-Puffer (TNE-Puffer)	
EDTA	2 mM
TRIS	50 mM
NP40	1 % v/v
pH	8
Western Blot Lyse-Puffer	
TNE-Lyse-Puffer	
<i>Complete™</i> Protease Inhibitor Mix	1x
<i>PhosStop™</i> Phosphatase Inhibitor Mix	1x
zVAD-fmk	20 µM

3.5 Kits

Kit	Hersteller
<i>Pierce™ 660nm Protein Assay</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Human IL-6R alpha DuoSet ELISA</i>	R&D Systems, Inc., US
<i>Human TGF-α Duo Set ELISA</i>	R&D Systems, Inc., US
<i>Human TNFRI/TNFRSF1A DuoSet ELISA</i>	R&D Systems, Inc., US
<i>PureYield™, Plasmid Midiprep System</i>	Promega Corporation, US
<i>SV Total RNA Isolation System</i>	Promega Corporation, US

3.6 Software

Programm	Hersteller
Adobe® Photoshop® CS4 Extended	Adobe Systems GmbH, US
Bio 1D v15.03b	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
Fusion v15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
FV10-ASW 2.1 Viewer	Olympus K.K., JP
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., US
Mendeley Desktop v1.11	Mendeley Ltd., UK
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2010 und 2016	Microsoft Corp., US
peqStarProtocolEditor v1.02	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
RTCA Software 2.0	ACEA Biosciences, Inc., US
StepOne™ Software	Thermo Fisher Scientific Inc., DE

3.7 Stimulantien

Stimulans	Konzentration	Bezug
Ionomycin (Io)	0,5-1 µM	Calbiochem, Merck KGaA, DE
KillerTRAIL™ (kTRAIL)	100 ng/ml	Enzo Life Science GMBH, CH
Staurosporin	1 µM	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Tumor-Necrosis-Factor-α (TNF-α)	100 ng/ml	Prof. Dieter Adam, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

3.8 Inhibitoren

Inhibitor	Zielmolekül	Konzentration	Bezug
Anti-ADAM17 (D1)	ADAM17	200 nM	Adipogen AG, DE
Cetuximab	EGF-Rezeptor	5 µg/ml	Merck KGaA, DE
Cycloheximid (CHX)	Proteinbiosynthese	5 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
GI254023X (GI)	ADAM10	3 µM	Tocris Bioscience, UK Jetzt R&D Systems, Inc., US

Genistein	Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren	10 µg/ml	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
GW280264X (GW)	ADAM10 und ADAM17	3 µM	Aobious, Inc., US
Marimastat (MM)	Metalloproteasen	10 µM	R&D Systems, Inc., US
Necrostatin-1	RIP-1	50 µM	Enzo Life Science GMBH, CH
Necrostatin-1 stable	RIP-1	50 µM	Calbiochem, Merck KGaA, DE
Necrosulfonamid (NSA)	MLKL	10 µM	Tocris Bioscience, UK
Z-Val-Ala-DL-Asp-fluormethylketone (zVAD)	Caspasen	20-50 µM	Santa Cruz Biotechnology, Inc., US; BACHEM, CH

3.9 Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Bezug
ANO6 eGFP K9	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Institut für Physiologie, Universität Regensburg
ADAM9	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Carl Blobel, <i>HSS Research Institute</i> , New York
ADAM10	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Carl Blobel, <i>HSS Research Institute</i> , New York
ADAM17	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Carl Blobel, <i>HSS Research Institute</i> , New York
eGFP Leervektor K1	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Institut für Physiologie, Universität Regensburg
pcDNA3.1. Leervektor	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Institut für Physiologie, Universität Regensburg
TGF-α-AP	pAP-Tag5	Prof. Dr. med. Carl Blobel, <i>HSS Research Institute</i> , New York

3.10 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Bezug	Produktnummer	Konzentration im WB
Anti-pMLKL	Kaninchen	Abcam plc, UK	ab187091	1:1000
Anti-PARP	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc, US	#9542s	1:1500
Anti-ADAM17 (D1)	Kaninchen	Merck KGaA, DE	AG-27B-6000PF-C100	1:2000
ERK	Kaninchen	Cell signaling Technology, Inc, US	4695p	1:1000
GAPDH	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., US	Sc-25778	1:500
Phospho-ERK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc, US	4370p	1:1000

Sekundäre Antikörper	Spezies	Bezug	Produktnummer	Konzentration
<i>Rabbit-POD</i>	Ziege	Dianova	111-035-144	1:10000

3.11 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
<i>CLICKs-Medium</i>	AG Prof. Dr. Dieter Adam
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Life Technologies Co., US
<i>RPMI-1640-Medium</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE

3.12 Zelllinien

HaCaT

HaCaT (*human adult low calcium high temperature keratinocytes*) sind immortalisierte humane Keratinozyten von einem primären Melanom eines 62-jährigen Patienten. Erstmals kultiviert wurden sie von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fusenig aus Heidelberg. Für die Versuche dieser Arbeit wurden sie in einer Ø10 cm Zellkultur-Schale in DMEM⁺⁺-Medium kultiviert. Sie wachsen adhärent.

HT29

HT29-Zellen sind humane kolorektale Adenokarzinomzellen von einer lebenden 44-jährigen Patientin aus dem Jahr 1998. Sie werden unter anderem für Studien von Transport, Absorption und Sekretion von Intestinalzellen benutzt. Für die Zwecke dieser Arbeit wurden sie in einer Ø10 cm Zellkultur-Schale in DMEM⁺⁺-Medium kultiviert. Sie wachsen adhärent.

U937

U937-Zellen sind humane Monozyten eines histozytären Lymphoms von einem 44-jährigen Patienten, die im Jahr 1976 das erste Mal beschrieben wurden. Sie werden genutzt, um das Verhalten und die Differenzierung von Monozyten zu untersuchen. Für die Untersuchung an Makrophagen können die Monozyten durch einen Stimulus zur Differenzierung angeregt werden. Für die Zwecke dieser Arbeit wurden sie in einer Ø10 cm Petrischalen in CLICKS-Medium kultiviert. U937-Zellen sind Suspensionszellen.

3.13 Zellbiologische Methoden

3.13.1 Kultivierung von Zellen

Die adhärenenten sowie die Suspensionszellen wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre von 70-80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Jegliche Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

HaCaT- und HT29-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-100% gesplittet. Dazu wurde das verbrauchte Vollmedium (DMEM⁺⁺) mit einer Vakuumpumpe entfernt und die Zellen wurden mit etwa 5 ml PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 2-6 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Zellschalenboden und aus dem Zellverbund wurde mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurde der Trypsinisierungsvorgang durch die Resuspendierung mit 5 ml Vollmedium beendet. Für Versuche wurde die entsprechende Zellzahl bestimmt und diese

anschließend im 6-Well, 12-Well oder 24-Well ausgesät. Für den Erhalt der Zellen wurden je nach gewünschter Zelldichte 0,5-1 ml der Resuspensionslösung in eine neue Ø10 cm Zellkultur-Schale mit 10 ml Vollmedium pipettiert. DMEM stellt ein standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur dar und wurde für das Zellwachstum mit FCS, Streptomycin und Penicillin ergänzt (DMEM^{+/+}). Ohne diese Zusätze wird DMEM in der Arbeit als DMEM^{-/-} bezeichnet.

Für Färbungsversuche (Annexin-FITC- oder PI-Färbung) wurden HT29 auf Deckgläsern ausgesät. Diese wurden vorher in der Flamme eines Bunsenbrenners abgeflammt und in eine 12-Well Platte platziert. Für ein besseres Anwachsen der HT29-Zellen auf den Deckgläsern wurden diese mit Gelatine beschichtet, bevor es zur Aussaat der Zellen kam. Nach etwa 20 Sekunden wurde die Gelatine-Lösung wieder abgesaugt und es wurde mit der Aussaat begonnen.

Die Zellzählung der U937-Zellen erfolgte direkt im Kultivierungsmedium. Dafür wurde das Medium mit den Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Zellen gezählt. Anschließend erfolgte die Aussaat in 12-Well Platten. Für den Erhalt der Zellen wurden 0,5-2 ml der Zelllösung mit den Zellen in eine neue Petrischale überführt und mit 10 ml frischem CLICKS-Medium aufgefüllt.

3.13.2 Zellzählung

Bevor die Zellen für die Versuche in definierter Zellzahl ausgesät wurden, wurden diese im *Cellometer*® ausgezählt. Dafür wurden die Zellsuspension (adhärente und Suspensionszellen) mit 20 µl 0,5 % Trypanblau im Verhältnis von 1:1 gemischt. Anschließend wurden 20 µl des Gemisches in die Zellzählkammer pipettiert und im *Cellometer*® ausgezählt. Nach Einstellung der Bildschärfe konnten die Zellen gezählt werden. Trypanblau gelangt durch perforierte Zellmembranen in die Zellen, färbt diese blau und ermöglicht das Anfärben von mortalen Zellen, die nicht mitgezählt werden.

3.13.3 Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen

Für die Konservierung von eukaryotischen Zellen wurden diese im -196 °C Stickstofftank eingefroren. Dafür wurden die adhärennten Zellen nach dem Abstoppen des Trypsinisierungsvorgangs und die U937-Zellen direkt aus dem Brutschrank in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 250 x g zentrifugiert und das gebildete Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Nach Überführung der Zellen in ein 2 ml-Mikroschraubenröhrchen, wurden diese mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälters für 24 Stunden im -80 °C Gefrierschrank aufbewahrt. Die Abkühlgeschwindigkeit ist durch das Isopropanol auf etwa -1 °C/Minute festgelegt. Nach 24 Stunden folgte die Überführung in den Stickstofftank.

3.13.4 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Das Mikroschraubenröhrchen mit der gewünschten Zelllinie wurde aus dem Stickstofftank entnommen. Nach Auftauen im 37 °C Wasserbad erfolgte die Aufnahme der Zellsuspension in 9 ml des gewünschten Zellkulturmediums. Nach Zentrifugation bei 250 x g in einem 50 ml Röhrchen wurde das Zellpellet erneut in 10 ml Vollmedium aufgenommen und auf Zellkulturplatten oder Petrischalen verteilt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen ein erstes Mal passagiert.

3.13.5 Inhibition und Stimulation von Zellen

Vor dem Hinzufügen der Inhibitoren und Stimulatoren zu den HaCaT- und HT29-Zellen wurde das Wachstumsmedium mit DMEM^{-/-} (ohne Zusatz von FCS, Penicillin und Streptomycin) ersetzt. Bei den U937-Zellen wurde als Versuchsmedium weiterhin das CLICKS-Medium verwendet. Konzentrationen und Anwendung der Stimulantien und Inhibitoren sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Sie gelten, wenn nicht anders angegeben, für alle durchgeführten Experimente. Die Zugabe von Inhibitoren erfolgte vor der Stimulation, um eine Blockierung des Zielmoleküls oder der Zielstruktur während des Versuches zu gewährleisten.

Tabelle 4: Inhibitoren und Stimulantien

	Anwendung	Konzentration
<u>Inhibitor</u>		
Cetuximab	15 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	10 µg/ml
Genistein	15 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	10 µg/ml
GI 254023X (GI)	15 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	2-3 µM
GW 280264X (GW)	15 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	2-3 µM
Marimastat (MM)	15 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	10 µM
Necrostatin-1 stable (Nec-1s)	2 Stunden vor Hinzugabe eines Stimulus	50 µM
Necrosulfonamide	30 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	10 µM
zVAD-fmk (zVAD)	30 Minuten vor Hinzugabe eines Stimulus	20-50 µM
<u>Stimulus</u>		
Ionomycin (Io)	30 min	1 µM
KillerTRAIL (kTRAIL)	4 Stunden	100 ng/ml
TNF-α	4 Stunden	100 ng/ml

3.13.6 Weiterverarbeitung von Zellkulturüberstand und Zelllysaten

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium der Zellen abgenommen und bei 4 °C für 5 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, um Zellen und Zellreste zu entfernen. Nach Überführung in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße konnte der Überstand für weitere Analysen genutzt werden. Überstände, die zu einem anderen Zeitpunkt gebraucht wurden, wurden bei -20 °C gelagert.

Für die übrig gebliebenen Zellen in der 12- oder 6-Well-Platte wurden abhängig der Analyse unterschiedliche Lysepuffer und Lysepuffermengen verwendet. Mit Ausnahme des Alkalische-Phosphatase-Assays (AP-Assay) (Kapitel 3.15.6) wurde der TNE-Lysepuffer benutzt. Kurz vor Verwendung wurde dem TNE-Puffer noch 20 µM zVAD, der Protease-Inhibitor-Mix *Complete* (25-fache Stammlösung) und der Phosphatase-Inhibitor-Mix *PhosStop* (10-fache Stammlösung) zum Lysepuffer hinzugefügt. 200 µl (6-Well) oder 100 µl (12-Well) Lysepuffer pro Well wurde auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten auf Eis geschüttelt und mit Hilfe eines 16 cm-Zellschabers in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Erneut wurden die Zelllysate unter mehrmaligem Vortexen 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C bei 12.000 rpm konnten die Zelllysate für die Analysen genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

3.14 Mikrobiologische Verfahren

3.14.1 Präparation von Plasmiden

Die Herstellung von Plasmiden erfolgte durch die Transformation von *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli*). 50 µl einer Suspension von chemisch kompetenten *E. coli* XL1 *blue*-Zellen wurden für 45 Minuten auf Eis mit 1 µl Plasmid inkubiert. Nach Ablauf der 45 Minuten erfolgte eine Erwärmung im Wärmeblock bei 42 °C für 45 Sekunden und erneut eine Abkühlung auf Eis für 5 Minuten. Die Bakterien wurden in 300 µl SOC-Medium aufgenommen und bei 37 °C eine Stunde bei 800 rpm geschüttelt. Anschließend wurden etwa 35 µl des Transformations-Ansatzes auf einer LB-Platte ausgestrichen und eine Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde eine gewachsene Kolonie gepickt, die in 200 ml LB-Medium mit dem Selektions-Antibiotikum Ampicillin überführt wurde und für etwa 20 Stunden in einem Brutschrank inkubierte. Die Isolierung der Plasmide und Kozenstrationsbestimmung wurde anschließend anhand der Herstellerangaben des *PureYield*TM Plasmid Midiprep-Systems (Promega) durchgeführt. Die Lagerung der gewonnenen Plasmide erfolgte bei -20 °C.

3.14.2 Anlegen eines Glycerol-Stammes

Für den Erhalt der transformierten Bakterien wurden 850 µl Bakterienkultur mit 150 µl Glycerol gemischt. Nach Schockfrostern in flüssigem Stickstoff wurden die Bakterien bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Um diese Bakterien erneut für die Plasmid-Herstellung zu nutzen, wurden sie mit Hilfe einer abgeflamten Impföse aus dem Glycerolstamm entnommen und in einen Kolben mit 200 ml LB-Medium überführt. Anschließend wurde wie in Kapitel 3.14.1 mit dem Hinzufügen von Ampicillin weiter verfahren.

3.14.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion der HT29-Zellen erfolgte 24 Stunden nach Aussaat von 350.000 HT29-Zellen in einer 12-Well-Platte mit Hilfe der Lipofektion. Gestartet wurde die Transfektion bei einer Konfluenz von 60-80 %. 100 µl/Well des Transfektionsansatzes wurde mit 500 µl/Well serumfreiem Medium aufgefüllt. Der Transfektionsansatz, bestehend aus serumfreiem Medium, TurboFect™ und dem Plasmid, inkubierte 20 Minuten vorher bei Raumtemperatur. Nach 6 Stunden Inkubation der 12-Well-Platte im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel auf 1 ml DMEM^{+/+}. Am nächsten Tag erfolgte bei gewünschter Konfluenz die Stimulation.

3.15 Proteinbiochemische Verfahren

3.15.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit Hilfe des *Pierce™ 660 nm* Protein Assays bestimmt. Jeweils 6 µl der Zelllysatlösungen wurde in ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt und mit 100 µl der *Pierce™ 660 nm* Protein Assay Reagentflüssigkeit aufgefüllt. Anschließend wurde die Extinktion bei 630 nm im Microplate-Reader, 96-Well, EL800™ gemessen und anhand der Proteinkonzentrationen das einzusetzende Volumen ermittelt.

3.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das 1970 beschriebene Prinzip der Proteinauftrennung im elektrischen Feld von Ulrich K. Laemmli dient auch in dieser Arbeit als Vorlage (Laemmli, 1970).

Vertikale Gelsysteme (45-1010-i, Peqlab) wurden mit Gradientengelen gefüllt. Vor Aufbau und Benutzung des Systems wurden Glasscheiben, Kämmen und *Spacer* mit Isopropanol gereinigt. Um die Füllhöhe für das Trenngel zu bestimmen, wurden die Kämmen vor dem Gießen zwischen die Glasscheiben gesteckt und eine Markierung etwa 1 cm unterhalb des unteren Randes der Kämmen gemacht. Anschließend konnte das 10 %-ige Trenngel bis zur Markierung und nach dessen Auspolymerisierung das 4,5 %-ige Sammelgel in das System gegossen werden. Während das Trenngel aushärtete, wurde das System oberhalb der Markierung mit

Isopropanol gefüllt, um Luftblasen zu entfernen und das Trenngel von Luft abzuschließen. Um die Taschen für die Proben zu bilden, wurden Käbme mit der gewünschten Probentaschenanzahl in das Sammelgel gesteckt und nach dem Aushärten entfernt. Anschließend konnte das System mit SDS-Laufpuffer befüllt werden. Die Taschen wurden mit einer Einmalinjektionsspritze, *Inject* 20 ml und einer Einmal-Kanüle von Gelresten befreit. Am unteren Rand der Glasscheiben wurden durch schnelle Bewegungen mit der Spritze Luftblasen entfernt. Die aus dem Protein-Assay bestimmte Volumina wurden dann in einem Verhältnis von 5:1 mit SDS (engl.: *sodium dodecyl sulfate*)-Proben-Puffer gemischt. Im Anschluss wurden die Proben 5 Minuten bei 700 rpm bei 95 °C erhitzt. Dies dient dem Aufbrechen von Disulfid-Brücken durch das beinhalten Dithiothreitol (DTT) und Beladen der Proteine mit negativ-geladenen Ionen. In die erste Tasche des Sammelgels wurden 5 µl des Proteinmarkers *PageRuler™ Plus, Prestained Protein Ladder* und in die restlichen Taschen die Proben hinzugegeben. Mit dem Anschließen der Elektroden wanderten die negativ-geladenen Proteine vom Sammelgel in Richtung Trenngel (positiv geladener Pol, Anode). Die Spannung betrug für die ersten 30 Minuten 75 Volt. Nach einer halben Stunde wurde die Spannung auf 90 Volt erhöht. Je nach gewünschter Auftrennung der Proteine wurde die Spannung für etwa 2-3 Stunden aufrechtgehalten. Hier gilt: „große und schwere“ laufen langsamer als „kleine und leichte“ Proteine.

3.15.3 Western Blot

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel (Kapitel 3.15.2) auf eine Membran erfolgte mit Hilfe des *PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S Systems*. Dabei wurden die Proteine in einem Tank-Blot auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) mit einer Porendichte von 0,45 µm übertragen. Bevor diese zwischen zwei Fasermatten und zwei auf jeder Seite mit Transfer-Puffer befeuchteten *Whatman*-Papieren gelegt wurde, wurde sie in Methanol aktiviert und anschließend in Transfer-Puffer äquilibriert. Das SDS-Gel wurde zur Kathode und die zugeschnittene PVDF-Membran zur Anode hin ausgerichtet. Anschließend wurde die aufgebauete Kassette in den Tankblot eingeschoben und der Tankblot mit Transfer-Puffer gefüllt. Bei einer Stromstärke von 150 mA wurde der Transfer für 2 Stunden durchgeführt.

3.15.4 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine

Um frei verbliebene Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren, wurde im Anschluss des Transfers im Tankblot die Membran für eine Stunde mit TbST gelöstem Milchpulver (5 %) für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Der primäre Antikörper wurde je nach Herstellerangaben in TbST gelöstem Milchpulver (5 %) in einem 50 ml Röhrchen verdünnt und die Membran für eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C gedreht. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Seite mit den transferierten Proteinen der Membran zur Innenseite des

50 ml-Röhrchen gedreht ist. Nach Ablauf der Zeit wurden unspezifische Bindungen und überschüssiger Antikörper auf der Membran durch 3-maliges Waschen für je 10 Minuten mit TbST auf dem Schüttler entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde in TbST in einem Verhältnis von 1:10.000 verdünnt und mit der Membran in einem neuen 50 ml-Röhrchen für 45 Minuten bei Raumtemperatur gedreht. Abschließend erfolgte wieder ein 3-maliges Waschen für je 10 Minuten mit TbST auf dem Schüttler. Die Detektion der geblotteten Proteine erfolgte mit Hilfe einer Chemolumineszenzreaktion mit *AmershamTM ECL SelectTM Luminol*. Diese wurde nach Herstellerangaben auf die Membran geträufelt und anschließend die abgegebene Chemolumineszenz im Imagesystems des Fusion FX7-Instruments (Peqlab) aufgenommen. Dabei handelt sich um ein vollautomatisches Multi-Gerät, dass auch die Belichtungszeit vorschlagen kann.

Für den Nachweis der Nekroptose wurde das phosphorylierte MLKL, welches Bestandteil des Nekrosoms ist, gefärbt. Das durch die Caspase-3 entstehende PARP-Spaltprodukt dient als Nachweis für die Apoptose und pERK als nachgeschaltetes Protein in der Signalkaskade des EGF-Rezeptors zur Kontrolle der Stimulation des Rezeptors.

3.15.5 Erneutes Färben anderer Proteine auf derselben PVDF-Membran

Um weitere Proteine auf der PVDF-Membran anfärben zu können, musste der zuvor verwendete Antikörper entfernt werden. Dafür wurde die PVDF-Membran in 25 ml Stripping-Puffer bei 65 °C für 30 Minuten erwärmt. Das beinhaltet Mercaptoethanol konnte 15 Minuten im Anschluss unter einem Abzug abdampfen. Anschließend wurde die PVDF-Membran zunächst wieder eine Stunde in 5 %-igem Milchpulver in TbST blockiert, ehe wie in Kapitel 3.2.8 mit dem neuen primären Antikörper weiterverfahren werden konnte. Diese Technik konnte zwei bis drei Mal mit der gleichen PVDF-Membran angewendet werden, bevor keine Proteine mehr zu detektieren waren.

3.15.6 Alkalische-Phosphatase-Assay (AP-Assay)

Mit Hilfe des AP-Assays kann die proteolytische Freisetzung von Substraten untersucht werden. In dieser Arbeit wurde TGF- α , das an der extrazellulären Domäne mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt ist, in die HT29-Zellen transient transfiziert (Kapitel 3.2.2.3.). Unter späterer Zugabe von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) kann die Aktivität der alkalischen Phosphatase anhand der gemessenen Extinktion des dabei entstandenen Farbumschlages bestimmt werden. Der Vergleich zwischen der AP-Aktivität im Zellkulturüberstand und der im Zelllysate lässt auf die Freisetzung von TGF- α -AP und somit auf die *Sheddingaktivität* von ADAM17 schließen.

Im Anschluss der Stimulation wurde der Zellkulturüberstand bei 4 °C mit 12.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in Dreifachwerten in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Lyse der Zellen wurden 300 µl AP-Lyse-Puffer pro *Well* (12-Well) hinzugegeben und 15 Minuten lang geschüttelt. Nach Übertragung in Reaktionsgefäße und anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 12.000 rpm wurden je 10 µl der Zelllysate mit 90 µl AP-Puffer in Dreifachwerten auf die 96-Mikrotiterplatte übertragen. Zu jeder Probe der Überstände und der Zelllysate wurden 100 µl AP-Substratlösung hinzugegeben. Die Umsetzung von pNPP zu p-Nitrophenol und der dabei entstandene Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen (*Microplate-Reader, 96-well, SunriseTM*). Die Reaktionszeiten betragen 40-80 Minuten und wurden bei einer Extinktion von maximal 1,5 abgestoppt. Zum Schluss erfolgte die graphische und statistische Auswertung.

3.15.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA kann unter anderem für den Nachweis von Proteinkonzentrationen genutzt werden. In dieser Arbeit wurde das Prinzip des *Sandwich*-ELISAs durchgeführt. Das Prinzip basiert auf einem Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Im Anschluss an die 4-stündigen Stimulationen unter Nekroptosebedingungen wurden die Konzentrationen der endogenen ADAM17-Substrate TGF- α , TNF-Rezeptors 1 und IL-6 Rezeptors- α im Überstand bestimmt.

Über Nacht wurde bei Raumtemperatur eine 96-*Well*-ELISA-Flachbodenplatte mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet. Dieser setzt sich am Boden der Platte fest, erkennt und bindet das gesuchte Protein im Überstand. Bevor die Proben am nächsten Tag auf die Platte gegeben wurden, wurden diese drei Mal mit dem ELISA-Waschpuffer gewaschen und zum Trocknen ausgeklopft (Waschschritt). 100 µl Probe wurden pro *Well* in Doppelwerten auf die Flachbodenplatte pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Neben den Proben wurde eine Standardreihe, die eine Verdünnungsreihe bekannter Antigenkonzentrationen beinhaltet, auf die Flachbodenplatte aufgetragen. Sie dient zur Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Überständen und wurde im weiteren Verlauf identisch zu den Proben behandelt. Nach Ablauf der zwei Stunden erfolgte ein erneuter Waschschritt. Ein Biotin-gekoppelter polyklonaler *Detection*-Antikörper wurde für zwei Stunden zur Flachbodenplatte hinzugegeben und band an das gesuchte Protein an einem anderen Epitop als der *Capture*-Antikörper. Der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entstand. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte für 20 Minuten die Zugabe von Streptavidin, das mit einer Meerrettichperoxidase (*engl. horseradish-peroxidase*) gekoppelt ist und das Biotin bindet. Nach einem finalen Waschschritt kann unter Zugabe eines chromogenen Substrates, welches durch die Peroxidase umgesetzt wird, ein Farbumschlag beobachtet werden. Unter Sichtkontrolle zur Standardreihe wurde nach etwa 20 Minuten die Reaktion mit (2N)1molarer

Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im *Microplate-Reader, 96-well, Sunrise™* gemessen. Anschließend erfolgte die statistische und graphische Auswertung.

3.15.8 Fluoreszenz-Peptid-Assay (FPA)

Der FPA stellt eine Möglichkeit dar, die proteolytische Aktivität von Proteasen zu messen. Hierfür wird den Versuchsansätzen ein lösliches fluorgenes-ADAM-Peptid von *Enzo Lifesciences GmbH* zugegeben. Die Intensität des gemessenen Lichts ist ein Maß für die Aktivität von ADAMs. Unter Verwendung von Inhibitoren können Rückschlüsse auf die Aktivität von ADAM17 geschlossen werden.

Hierzu wurden 350.000 HT29-Zellen im *24-Well* ausgesät und am nächsten Tag für 4 Stunden unter nekroptotischen Bedingungen stimuliert. Im Anschluss wurde das ADAM-Substrat in einer Konzentration von 10 µl hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurden die Zellkulturüberstände in Dreifachausführung auf eine schwarze Flachbodenplatte übertragen. Es folgte im *Biotek Reader EL800* eine Anregung bei 485 nm und die Emissionsmessung bei 530 nm bei einer Sensitivität von 35. Anschließend erfolgte die statistische und graphische Auswertung der Werte abzüglich dem Leerwert. Der Leerwert bildete sich aus der Messung von DMEM^{-/-} und dem ADAM17-Substrat.

3.15.9 Fluoreszenzfärbungen

Die Darstellung spezifischer Bestandteile der Zellmembran erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen. *Annexin V Alexa Fluor 488®* dient dabei als grüner nicht-membrangängiger PtdSer-Marker. Für die Darstellung von sterbenden Zellen, deren Zellmembran beschädigt ist, dient Propidiumiodid (PI) als roter DNS-Farbstoff. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gelangt währenddessen ohne Zellschädigung in die Zelle und färbt die DNS blau an. DAPI befindet sich im Mowiol^{+/+}.

Für die Annexin V- und PI-Bilder in Kapitel 4.3 wurden 150.000 HT29-Zellen auf Gelatinebeschichteten Deckgläsern im *12-Well* ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde die Nekroptose für den angegebenen Zeitraum induziert. Die Deckgläser wurden im Anschluss auf einem 10 µl-Tropfen einer 1:20 *Annexin V Alexa Fluor®*- und 1:200 PI-Verdünnung platziert und 5 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser zwei Mal mit *Annexin-Binding-Buffer* gewaschen und für mindestens 25 Minuten in 3 %-igem PFA für die Fixierung der Zellen inkubiert. Es folgte jeweils ein einmaliges Waschen der Deckgläser mit PBS und destilliertem Wasser. Ein 10 µl-Tropfen Mowiol^{+/+} wurde auf den Objektträger gegeben und die Deckgläser darauf platziert. Die Lagerung der Objektträger erfolgte im

Dunkeln bei 4 °C. Nach Aushärtung des Mowiol^{+/+} für mindestens eine Stunde, konnte die Probe unter dem Mikroskop analysiert werden.

Für die ADAM9-, ADAM10- und ADAM17- Überexpression in HT29 in Kapitel 4.5 wurden 100.000 HT29-Zellen auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern im 12-Well ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde transfiziert und einen weiteren Tag später stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung ausschließlich mit Propidiumiodid in einer Verdünnung von 1:200, wie oben beschrieben.

3.15.10 Konfokales Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop *FluoView F1000* von Olympus aufgenommen. Angeschaut wurden die Zellen durch ein UPLSAPO 60x Öl-Immersions-Objektiv. Die Anregung von Annexin V beträgt 488 nm, von PI 488 nm und von DAPI 358 nm bei einer Emissionswellenlänge von 558 nm, 671 nm und 461 nm.

3.15.11 Impedanzmessung mit dem xCELLigence-System

Das xCELLigence-*Real Time Cell Analyzing-System* der Firma ACEA Biosciences, Inc. beruht auf der Messung der Impedanz zwischen mikroelektronischen Goldelektroden. Diese Methode stellt ein Biosensor-System für Zelluntersuchungen dar, das in Echtzeit und ohne Zell-*Labelling* Zellaktivitäten untersucht. Die Goldelektroden sind fingerförmig (*Interdigitated Electrodes, IDE*) angeordnet und befinden sich im Boden eines *Wells* auf einer vom Hersteller sogenannten *E-Plate*. Die elektronische Messung der *E-Plates* findet in der RTCA SP-Station statt. Mit Hilfe des xCELLigence wurde in dieser Arbeit die Proliferation von HT29-Zellen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. Außerdem wurden morphologische Zellveränderungen nach Stimulation von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren betrachtet. Die Proliferation und die Zellveränderungen werden durch die Messung der Impedanz an den Elektroden in einem *Well* detektiert.

Die Impedanz (Z) ist definiert als Quotient der Spannungs-Zeit Funktion $u(t)$ und der resultierenden Strom-Zeit-Funktion $i(t)$:

$$Z = \frac{u(t)}{i(t)}$$

Dabei gibt die Impedanz den imaginären Widerstand einer Wechselspannung an. Durch das Anlegen einer Wechselstromspannung an die Elektroden kann durch den resultierenden Strom die Impedanz bestimmt werden. Die Impedanz ist neben der angelegten Wechselspannung von der Zellanzahl- und Morphologie auf den Elektroden und der Ionen-

konzentration im *Well* abhängig. Aufgrund der isolierenden Zellmembran einer Zelle, ist die Impedanz umso höher, je dichter der Plattenboden mit Zellen bewachsen ist (Abbildung 5).

Die Erhöhung oder der Verlust der Impedanz wird mit Hilfe des Zellindex (*engl. CI*), einer dimensionslosen Größe, dargestellt. Die Messungen der Impedanz erfolgten bei drei Frequenzen (10 kHz, 25 kHz, 50 kHz), wobei der größte Effekt im Zellindex aufgrund zellulärer Eigenschaften bei 10 kHz zu beobachten ist. Je nach Fragestellung sind die Messzeitpunkte verschieden festgelegt. Der CI ist dabei abhängig von Z_0 , der Impedanz zum Beginn des Experimentes und Z_i , der Impedanz zu einem beliebigen Zeitpunkt. Die Berechnung des Zellindex wird in folgender Formel zusammengefasst:

$$CI = (Z_i - Z_0) / 15$$

Durch die in Echtzeit mögliche Beobachtung der Veränderungen des Zellindex bei HT29-Zellen lassen sich Aussagen über Veränderungen der Zellzahl, Zellstruktur und Morphologie der Zellen unter Zelltodbedingungen treffen.

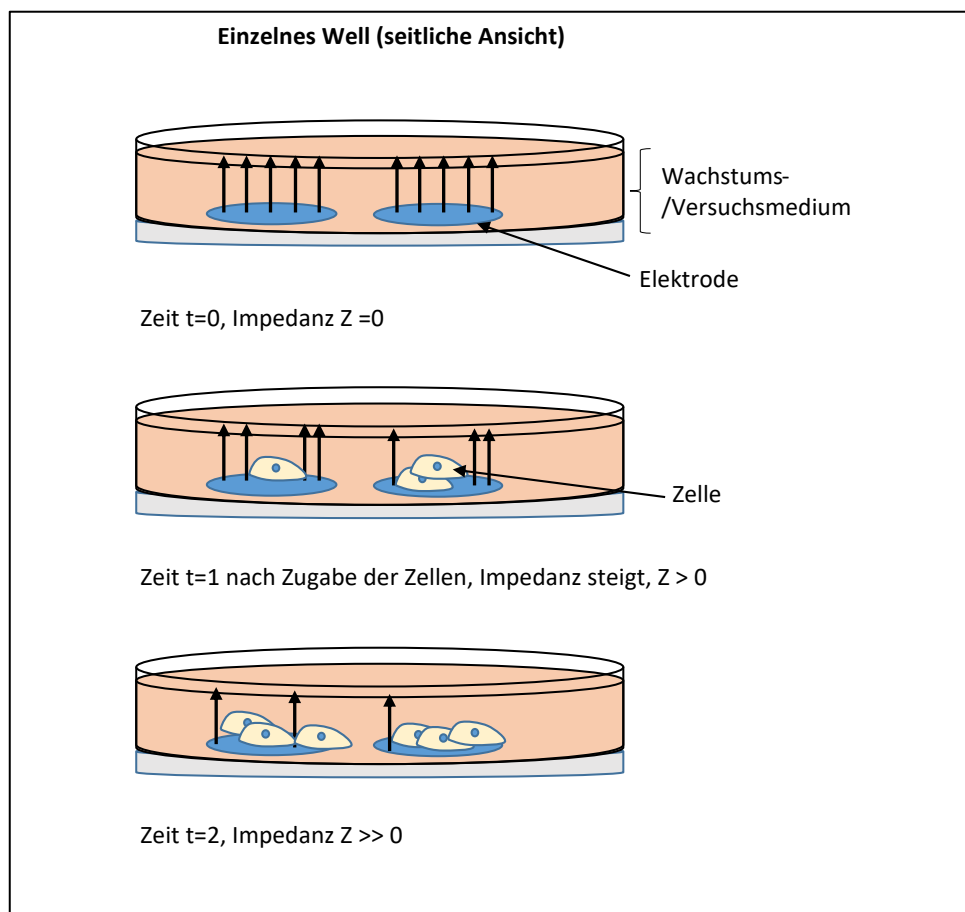


Abbildung 5: Prinzip der Impedanzmessung von Zellen

Vor Hinzugabe der Zellen beträgt die Impedanz $Z=0$. Werden Zellen, die elektrisch isolierend sind, hinzugegeben adhären diese auf den Elektroden. Die Impedanz steigt in Abhängigkeit der Zellmorphologie und Zellzahl.

Zunächst erfolgte eine Hintergrundmessung mit 100 μl /Well des Wachstumsmediums (DMEM^{+/+}) ohne Zellen, um die Grundimpedanz zu messen und um mögliche Verunreinigungen und Beschädigungen der Wells auf der E-Platte auszuschließen. Die Grundimpedanz zum Zeitpunkt $t=0$ ist wichtig für die Berechnung des Zellindex. Im Anschluss wurden 10.000 HT29-Zellen in 200 μl DMEM^{+/+} auf der E-Platte ausgesät. Diese konnten nach einer Ruhephase von 30 Minuten für 24 Stunden in der RTCA SP-Station im Brutschrank wachsen. Am darauffolgenden Tag wurden vorbereitete HT29-Zellen in 12-Well-Platten unter nekroptotischen Bedingungen stimuliert und nach Ablauf der gewünschten Zeit 150 μl des Überstands nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm auf die Zellen im xCELLigence gegeben, um den Wachstumseffekt der freigesetzten Substrate während der Nekroptose auf intakte HT29-Zellen zu beobachten. Das Wachstumsmedium aus den E-Platten wurde vorher vollständig entfernt. Die Positivkontrolle EGF wurde in 150 μl DMEM^{-/-} verdünnt. Anschließend wurde über den gewünschten Zeitraum der Zellindex beobachtet und alle 15 Minuten gemessen. Der Wechsel von DMEM^{+/+} zu dem Überstand vom Nekroptoseversuch verursachte starke Artefakte innerhalb der Messung, die sich in einem Abfall des Zellindex äußerten. Einerseits ist hierfür der Mediumwechsel selbst und andererseits der Transfer der E-Platte von der RTCA SP-Station zur Sterilbank verantwortlich, da alle Arbeiten mit der E-Platte außerhalb des Brutschranks durchgeführt wurden. Um das Wachstum der HT29-Zellen unter den verschiedenen Bedingungen in den Wells vergleichen zu können, wurden alle Wells auf den letzten Messpunkt vor dem Mediumwechsel auf 1 normalisiert.

Veränderungen im Zellindex können morphologische Veränderungen der Zelle widerspiegeln, die zum Beispiel aufgrund der Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren hervorgerufen werden. Der Betrachtungszeitraum im xCELLigence wurde auf 30 Minuten gesetzt und eine Zellindexmessung alle 30 Sekunden durchgeführt. Betrachtet wurde die Stimulation des Tyrosinkinase-Rezeptors EGF-Rezeptors. Zuerst erfolgte eine erneute Grundimpedanzmessung. Anschließend wurden 10.000 HT29-Zellen auf einer E-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurde das Wachstumsmedium durch 100 μl DMEM^{-/-} ersetzt und die E-Platte für weitere 4 Stunden in die RTCA SP-Station zurückgestellt. Dies dient der Erholung der Zellen und dem Ausgleichen der Zellindexartefakte und ist dementsprechend lang gewählt. Nach Ablauf der 4 Stunden wurden 100 μl Überstand von unterschiedlich stimulierten nekroptotischen Zellen zu den 100 μl DMEM^{-/-} hinzugegeben. 10 Minuten zuvor erfolgte gegebenenfalls die Zugabe der beiden Rezeptor-Inhibitoren Cetuximab und Genistein zu den 100 μl DMEM^{-/-}.

Die graphische Auswertung der Wachstumskurven erfolgte nach der Übertragung der Werte aus der xCELLigence-Software mit GraphPad Prism5. Die Steigung der Zellindexkurven

wurde mit Hilfe der xCELLigence-Software berechnet und anschließend mit GraphPad Prism 5 dargestellt.

3.15.12 Versuchsauswertung

Die statistische und graphische Auswertung aller Versuche erfolgte mit der Software *GraphPad Prism5*. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) als Fehlerbalken bei einer Versuchsanzahl (n) größer als 1, dargestellt. Voneinander unabhängige Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Die Darstellung der Signifikanz-Grade sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Statistische Auswertung

Symbol	Bedeutung
n.s. (nicht signifikant)	$p > 0,05$
* (Erhöhung)	$p \leq 0,001$
# (Reduktion)	

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur *Sheddingaktivität* der ADAMs unter nekroptotischen Bedingungen

4.1.1 Programmierter Zelltod in HaCaT- und U937-Zellen

Um zu untersuchen welche Bedeutung die Nekroptose für die ADAM10- und ADAM17-Aktivierung hat, musste aufgrund fehlender Erfahrung im Labor zuerst ein System etabliert werden, mit dem Nekroptose in HaCaTs oder anderen Zellen zu induzieren ist. Dafür wurden HaCaT-Zellen mit TNF- α , zVAD und Cycloheximid stimuliert. TNF- α induziert unter Unterstützung des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid, den Zelltod, der durch den Caspase-Inhibitor zVAD zur Bildung des Nekrosoms führt. CHX ist für die Induzierung der Nekroptose nicht erforderlich, erleichtert jedoch laut Empfehlung von Prof. Dr. Dieter Adam (Institut für Immunologie, UKSH Kiel) die Bildung des Nekrosoms. Die anschließenden *Western Blot*-Kontrollen für phosphoryliertes MLKL (Ser358) (pMLKL) und für gespaltenes PARP dient dabei als Zelltodkontrolle. Dabei diente der Nachweis des pMLKL mit einem Molekulargewicht von 54 Kilodalton (kDa) als Kontrolle für die Nekroptose und das Spaltprodukt von PARP (PARP SP) als Nachweis für die Apoptose (Abbildung 6).

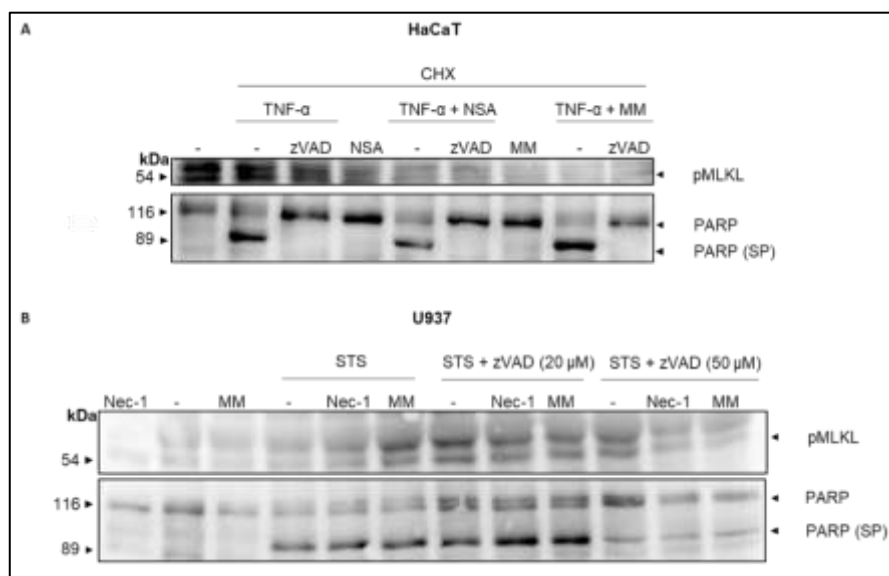


Abbildung 6 : Fehlende Nekroptose in HaCaTs- und U937- Zellen

A: *Western Blot*-Analysen von HaCaT-Zellen, die in An- oder Abwesenheit von 50 ng/ml TNF- α , 5 μ g/ml Cycloheximid (CHX), 20 μ M zVAD, 10 μ M Marimastat (MM), 2 μ M NSA und 50 μ M Necrostatin-1 (Nec-1) für 4 h inkubiert wurden. Die Vorinkubation mit dem Breitband Metalloproteaseinhibitor MM erfolgte 15 min, mit NSA 30 min und mit Nec-1 2 h zuvor. (n=3) **B:** *Western Blot*-Analysen von U937-Zellen, die mit 1 μ M Staurosporin (STS) in An- oder Abwesenheit von 20 μ M bzw. 50 μ M zVAD stimuliert wurden. Die Zellen wurden ggf. 2 h mit 50 μ M Necrostatin-1 (Nec-1) und 15 min mit 10 μ M MM vorbehandelt (n=1). SP=Spaltprodukt

Zu erkennen war, dass die HaCaT-Zellen unter Stimulation mit TNF- α PARP gespalten haben (Abbildung 6A). Unter Zugabe von zVAD konnte durch Inhibierung der Apoptose keine Spaltung von PARP mehr nachgewiesen werden. Allerdings war durch das Fehlen von spezifischen pMLKL-Banden in diesen Zellen davon auszugehen, dass in den HaCaT-Zellen unter diesen Bedingungen keine Nekroptose ausgelöst worden ist. Der Breitband-Metalloproteaseninhibitor Marimastat wurde genutzt, um auf eventuelle Effekte der Metalloproteasen zu schließen. Auch unter Inhibition dieser und der Nekroptose durch Necrostatin-1 (Nec-1) und Necrosulfonamid (NSA) ließen sich keine Effekte darstellen. Dazu kam, dass in den unstimulierten Zellen unspezifische Banden auf Höhe des pMLKLs auftraten (Abbildung 6A). Auch das Anpassen und Verändern von verschiedenen Parametern konnte in Folgestimulationen keinen nekroptotischen Zelltod in HaCaT-Zellen auslösen. Als Konsequenz wurde auf die monozytäre Zelllinie U937 gewechselt, da diese in der Literatur als Nekroptose-sensitiv beschrieben wird (Dunai et al., 2012).

Die U937-Zellen wurden daraufhin mit Staurosporin (STS) stimuliert, um den nekroptotischen Zelltod zu induzieren (Abbildung 6B). Bei den unstimulierten U937-Zellen konnte PARP nachgewiesen werden, während die Banden auf Höhe des Spaltproduktes und des pMLKLs fehlten. Dennoch waren im *Western Blot* erneut unter Zugabe von zVAD keine pMLKL-Banden zu erkennen. Zudem waren in jedem Versuchsansatz mit Ausnahme der Kontrollen Spaltprodukte von PARP zu beobachten, die durch die aktivierten Caspasen während der Apoptose entstehen. Trotz der unsicheren Aussage fiel auf, dass unter 50 μ M zVAD die Bande auf Höhe des PARP-Spaltproduktes deutlich schwächer als bei 20 μ M zVAD ausfiel. Die Konzentration von 50 μ M zVAD wurde daraufhin für alle weiteren Versuche beibehalten.

Erst durch den Wechsel von STS auf den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) konnten pMLKL-Banden detektiert werden (Kapitel 4.1.2, Abbildung 7). Die TNF- α Stimulation in U937-Zellen diente neben der Untersuchung von HT29-Zellen im Folgenden als System, um die Rolle der Nekroptose für die ADAM10- und ADAM17-Aktivierung zu analysieren.

4.1.2 Untersuchung der *Sheddingaktivität* in U937-Zellen

Um die Rolle der Nekroptose für die *Sheddingaktivität* zu untersuchen, wurden U937 Zellen in An- oder Abwesenheit von TNF- α , zVAD, Necrostatin-1 für 4 Stunden stimuliert. Zusätzlich wurde Marimastat als Breitband-Metalloprotease-Inhibitor hinzugegeben, um zu beobachten wie hoch der *Sheddinganteil* der Metalloproteasen wie ADAM10 und ADAM17 ist (Abbildung 7).

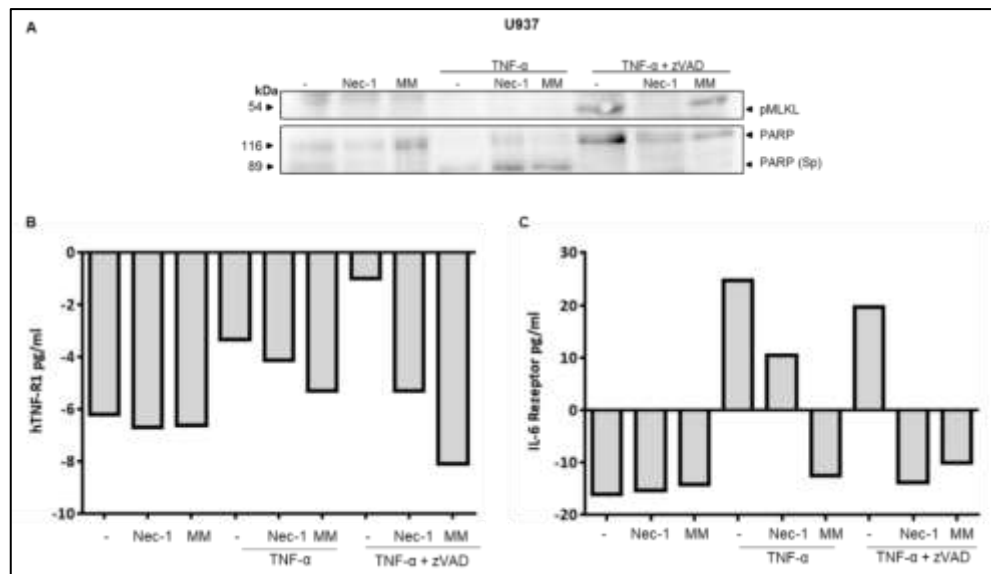


Abbildung 7: TNF-Rezeptor- und IL-6-Rezeptor-Freisetzung in U937-Zellen

A: *Western Blot*-Analyse zum Nachweis des Nekroptose- (pMLKL) und Apoptosesignalweges. (PARP/PARP SP), Sp= Spaltprodukt. **B und C:** U937-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml TNF α , 50 μ M zVAD, 50 μ M Nec-1 und 10 μ M MM für vier 4 h stimuliert. Die Vorinkubation mit MM erfolgte 10 min, mit zVAD 30 min und mit Nec-1 2 h zuvor. Anschließend wurden die Überstände **B:** mittels humanen Tumornekrosefaktor-Rezeptor (hTNF-R1)-ELISA (n=1) oder **C:** im humanen Interleukin-6-Rezeptor-ELISA analysiert (n=1).

In Abbildung 7A konnte erneut beobachtet werden, dass unter Stimulation mit TNF- α und zVAD pMLKL und somit die Nekroptose im *Western Blot* nachzuweisen war. Auch die Kontrolle der Apoptose durch die Stimulation durch TNF- α ohne zVAD anhand des PARP-Spaltproduktes war erfolgreich. Daraufhin konnten mittels ELISA Analysen der Überstände stattfinden. Als *Readout* wurde der endogen exprimierte humane Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (hTNF-R1) gewählt, der ein ADAM17-Substrat darstellt. Wie in Abbildung 7B zu sehen, war die Konzentration unterhalb des Detektionsminimums für den hTNF-R1. Verantwortlich hierfür war vermutlich, dass bei Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor der Rezeptor-Ligand-Komplex in die Zelle internalisierte, um den weiteren Signalweg zu initialisieren (Schneider-Brachert et al., 2004). Die Antikörper bei einem hTNF-R1-ELISA erkennen nur den löslichen Rezeptor, der von ADAM17 *gesheded* und in den Überstand freigesetzt wird.

Der IL-6-Rezeptor ist ein weiteres Substrat, welches durch ADAM17 *gesheded* wird (Abbildung 7C) (Reiss und Saftig, 2009). Doch auch im IL-6-Rezeptor-ELISA befand sich erneut die gemessene Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze. Dennoch war zu erkennen, dass unter TNF- α -Stimulation U937-Zellen ein erhöhtes *Shedding* des IL-6-Rezeptors während der Apoptose zeigten. Der gleiche Effekt ließ sich auch unter Zugabe von zVAD beobachten. Ohne MM stieg die Konzentration auf einen Wert von 20 pg/ml. Dieser Effekt war durch MM inhibierbar. Hinzu kam, dass die erhöhte Konzentration an

IL-6-Rezeptoren durch Hinzugabe des Nekroptoseinhibitors Nec-1 reduziert wurde. Das erhöhte *Shedding* des IL-6-Rezeptors war somit der nekroptosebedingten Aktivierung von ADAM17 geschuldet.

Um eine höhere Konzentration des IL-6-Rezeptors im ELISA zu erreichen, wurde in den weiteren Versuchen eine höhere Zellzahl und ein geringeres Endvolumen verwendet. Zudem fand aufgrund von persönlichen Mitteilungen von Prof. Dr. Dieter Adam (Institut für Immunologie, UKSH Kiel) zur Spezifität des Nekroptoseinhibitor Nec-1 ein Wechsel zu Nec-1s (Necrostatin-1 *stable*) statt.

4.1.3 Freisetzung des IL-6-Rezeptors in U937-Zellen während der Nekroptose

Nachdem die Bedingungen für die Stimulation der U937-Zellen optimiert waren, konnten nun verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden, um das Ergebnis der erhöhten Freisetzung des IL-6-Rezeptors während der Nekroptose zu verifizieren (Abbildung 8).

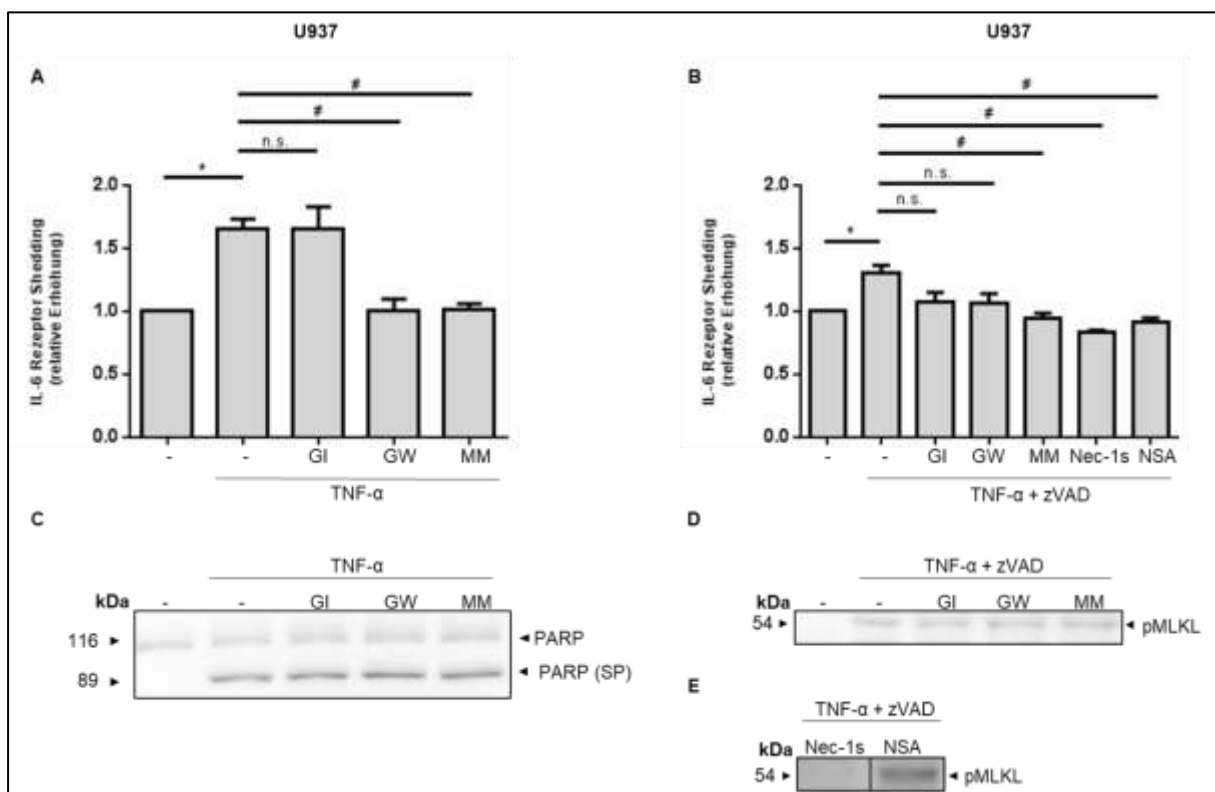


Abbildung 8: IL-6-Rezeptor-Freisetzung in U937-Zellen

A und B: U937-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml TNF- α , 50 μ M zVAD, 3 μ M GI oder GW, 10 μ M MM, 50 μ M Nec-1s und 2 μ M NSA für 4 h stimuliert. Die Vorinkubation mit zVAD und Necrosulfonamid (NSA) erfolgte 30 min, mit GI, GW, MM 15 min und Necrostatin-1stable (Nec-1s) 2 h vor Hinzugabe von TNF- α . Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Freisetzung des IL-6-Rezeptors (hIL6-Rezeptor) ermittelt mittels ELISA aus n=3 (TNF- α + GI oder GW; TNF- α + zVAD + GI oder GW) und n=5 (Rest). ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: *= signifikante Zunahme des IL-6 Rezeptor-*Sheddings* im Vergleich zur unstimulierten oder Positivkontrolle; #= signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus; n.s.= nicht signifikant. **C, D und E:** Repräsentative *Western Blot*-Analysen (1/5) als Nachweis für die Nekroptose (pMLKL) und Apoptose (PARP/PARP SP). SP=Spaltprodukt

Im Rahmen der Apoptose (TNF- α -Stimulation) (Abbildung 8A und 8C) und der Nekroptose (Stimulation mit TNF- α + zVAD) (Abbildung 8B und 8D) fand eine signifikante Steigerung der Freisetzung des IL-6-Rezeptors statt, wobei diese während der Nekroptose etwas geringer ausfiel. Die Inhibition von ADAM10 unter apoptotischen Bedingungen durch den präferentiellen ADAM10-Inhibitor GI bewirkte keine signifikante Reduzierung der Freisetzung. Wurde zusätzlich ADAM17 durch den ADAM10- und ADAM17-Inhibitor GW gehemmt, war das Konzentrationslevel vom IL6-Rezeptor im Überstand auf das des Kontrollniveaus reduziert und somit ähnlich zur Inhibition mit MM. In der Nekroptose war, bis auf die Inhibition mit GI und GW, eine signifikante Inhibition mit MM sowie den Nekroptoseinhibitoren Nec-1s und NSA zu verzeichnen. Auch wenn die Inhibitionen mit GI und GW nicht signifikant waren, unterschieden sie sich in ihrer Tendenz in der Freisetzung des IL6-Rezeptors nur um wenige Prozentpunkte im Vergleich zu MM. Daher darf vermutet werden, dass die Nekroptose die ADAMs aktiviert. Interessanterweise kommt es dabei offensichtlich zu einer Verlagerung von ADAM17- zu ADAM10-vermittelten *Shedding* des IL6-Rezeptors.

Bei der Inhibition mit NSA konnte weiterhin eine schwache pMLKL-Bande im *Western Blot* detektiert werden (Abbildung 8E). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde NSA daher nicht weiter als Nekroptoseinhibitor verwendet.

4.1.4 Stimulation und Überprüfung der Transfektionseffizienz von HT29-Zellen

Um die bisher erzielten Ergebnisse zu validieren, wurde mit Hilfe einer neuen Zelllinie ein TGF- α -AP-Konstrukt in HT29-Zellen transfiziert. HT29-Zellen sind eine häufig verwendete Zelllinie zur Untersuchung von Zelltodmechanismen. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob HT29-Zellen das TGF- α -AP-Konstrukt aufnehmen und in welchem Stimulationsmedium sie stimulierbar sind. Als *Readout* wurde der AP-Assay gewählt, der durch das freigesetzte AP-Konstrukt im Überstand und Zellysate im Verhältnis zum Gesamt-AP ein Maß für die ADAM-Aktivität darstellt. Hierfür wurden zwei verschiedene Plasmidmengen des TGF- α -AP-Konstrukts in die HT29-Zellen transfiziert und in zwei verschiedenen Zellkulturmedien, DMEM^{-/-} oder RPMI^{-/-}, getestet (Abbildung 9).

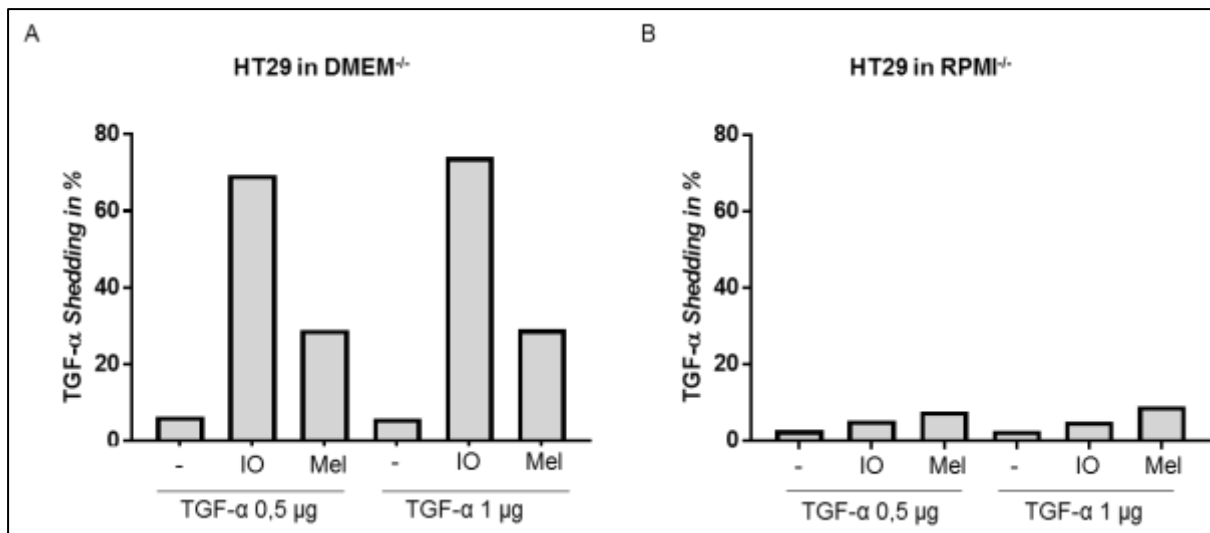


Abbildung 9: TGF-α-AP-Shedding in HT29-Zellen in DMEM^{-/-} und RPMI^{-/-}

HT29-Zellen wurden einen Tag nach Aussaat entweder mit 0,5 µg oder 1 µg TGF-α-AP-Konstrukt transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurde für 30 min mit 1 µM Ionomycin (IO) oder 1 µM Melittin (Mel) stimuliert und im AP-Assay analysiert. **A:** Transfektion und Stimulation erfolgte in DMEM^{-/-}-Zellkulturmedium (n=1) oder **B:** in RPMI^{-/-}-Zellkulturmedium (n=1).

Ionomycin (IO) als Kalzium-Ionophor und Melittin (Mel) als Hauptbestandteil von Bienengift sind bekannte Stimulantien zur Erhöhung des ADAM10- und ADAM17-vermittelten *Sheddings* (Sommer et al., 2012). Wie in Abbildung 9A zu sehen, führte die Stimulation mit IO in DMEM^{-/-} zu einem *Shedding* von etwa 70 Prozent. In RPMI^{-/-} konnte nur eine sehr geringe Freisetzung von TGF-α nachgewiesen werden (Abbildung 9B). Bei den unterschiedlichen Plasmidmengen von 0,5 µg bzw. 1 µg konnte kein Unterschied beobachtet werden, sodass im weiteren Verlauf eine Plasmidmenge von 0,5 µg als ausreichend betrachtet wurde. Das freigesetzte TGF-α der HT29-Zellen in DMEM^{-/-} diente als Bestätigung dafür, dass eine Untersuchung der möglichen Freisetzung während der Nekroptose mit Hilfe des AP-Assays möglich ist. Die HT29-Zellen wurden für die folgenden Experimente daher in DMEM^{+/+} kultiviert und in DMEM^{-/-} stimuliert.

Im nächsten Schritt sollte verglichen werden, welcher der beiden Todesliganden TNF-α oder kTRAIL den Zelltod effizienter in HT29-Zellen auslösen kann (Abbildung 10).

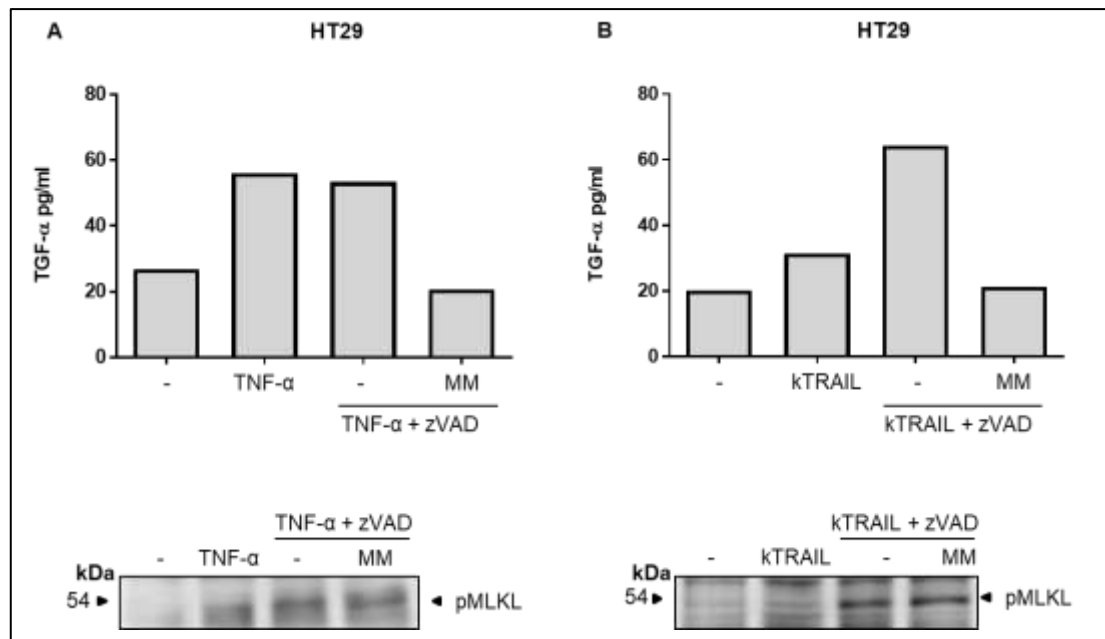


Abbildung 10: Vergleich der Freisetzung von endogenem TGF- α in HT29 nach TNF- α - oder TRAIL-Stimulation

HT29-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml TNF- α (**A**) bzw. 100 ng/ml kTRAIL (**B**), 50 μ M zVAD und 10 μ M Marimastat (MM) für 4 h stimuliert. Die Vorinkubation mit zVAD und MM erfolgte 30 bzw. 15 min zuvor. Anschließend wurden die Überstände mittels humanem TGF- α ELISA analysiert. Zusätzlich sind die *Western Blot*-Analysen zum Nachweis der Nekroptose (pMLKL) abgebildet. (n=1).

Werden die hTGF- α -ELISA-Ergebnisse in Anwesenheit von 100 ng/ml TNF- α (Abbildung 10A) und 100 ng/ml kTRAIL (Abbildung 10B) verglichen, war bei der Stimulation mit TNF- α die freigesetzte Menge an endogenem TGF- α um etwa 20 pg/ml größer als bei der Stimulation mit kTRAIL. Erfolgte die Zugabe von 50 μ M zVAD war ein ähnliches Konzentrationslevel von TGF- α zu messen. Im Versuchsansatz mit kTRAIL stieg das gemessene TGF- α daraufhin um fast das Doppelte auf etwa 60 pg/ml an. In beiden Versuchsansätzen konnte der gemessene Anstieg durch MM wieder gesenkt werden. Wurden nun die unter den ELISA-Ergebnissen aufgeführten *Western Blot*-Analysen betrachtet, befanden sich pMLKL-Banden sowohl bei der Stimulation mit kTRAIL, als auch mit TNF- α . Jedoch ließen sich bei der Stimulation mit TNF- α ohne der Hinzugabe von zVAD Banden auf Höhe des pMLKLs beobachten. Im Falle von kTRAIL waren nur mit zVAD deutliche und eindeutige pMLKL-Banden zu sehen, sodass im Folgenden diese Kombination für die Stimulation der Nekroptose in den HT29-Zellen verwendet wurde.

4.1.5 Freisetzung von TGF- α -AP in HT29-Zellen während der Nekroptose

Wurde nun in HT29-Zellen durch Hinzugabe von kTRAIL und CHX Apoptose ausgelöst, waren die HT29-Zellen in der Lage das dreifache an TGF- α -AP im Vergleich zur Kontrolle zu

prozessieren (Abbildung 11A). Der AP-Assay wurde neben dem ELISA gewählt, um mit einer weiteren Methode die Freisetzung von TGF- α während der Nekroptose zu untersuchen.

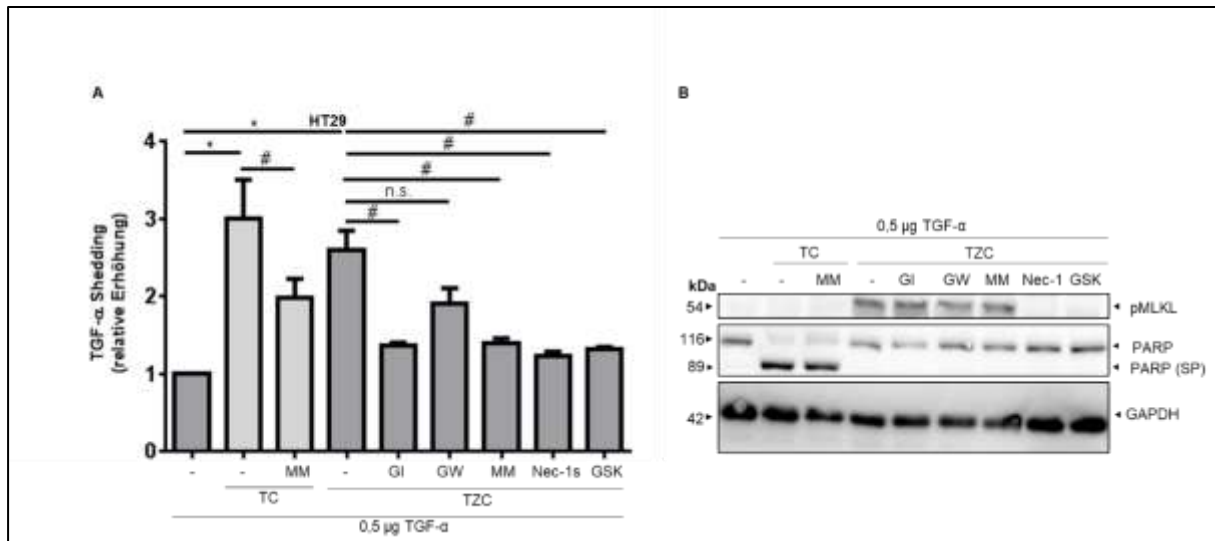


Abbildung 11: TGF- α -AP-Freisetzung in HT29 Zellen unter Apoptose- und Nekroptosestimulation

A: Mit 0,5 μ g TGF- α -AP-Konstrukt transfizierte HT29-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z), 5 μ g/ml Cycloheximid (C), 3 μ M GI oder GW, 10 μ M Marimastat (MM), 50 μ M Necrostatin-1s (Nec-1s) und 25 μ M GSK für 4 h stimuliert. Die Vorinkubation mit Nec1-s und GSK erfolgte 2 h, mit zVAD 30 min und mit GI, GW und MM 15 min zuvor. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der proteolytischen Freisetzung des TGF- α -AP aus n=3. ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: * = signifikante Zunahme des IL-6-Rezeptor-*Sheddings* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; # = signifikante Inhibition im Bezug auf den zugehörigen Stimulus; n.s. = nicht signifikant **B:** Repräsentative *Western Blot*-Analysen (1/3) als Nachweis für die Nekroptose (pMLKL) und Apoptose (PARP/PARP (SP)). GAPDH dient als Proteinladekontrolle. SP=Spaltprodukt

Bei Hinzugabe von MM sank die freigesetzte Menge an TGF- α -AP wieder signifikant ab. Im Vergleich zur Apoptose war unter Addition von zVAD und somit während der Nekroptose, das TGF- α -AP-*Shedding* im AP-Assay etwas geringer. Die Hinzugabe von MM hatte eine signifikante Reduktion des TGF- α -*Sheddings* in beiden Ansätzen zur Folge. Gleichzeitig erfolgte unter nekroptotischen Bedingungen eine Inhibition von ADAM10 und ADAM17 durch GW, was zu einer nicht signifikanten Abnahme der Konzentration von TGF- α führte. Die spezifische Hemmung von ADAM10 durch GI bewirkte auch eine signifikante Reduzierung des prozessierten TGF- α , fiel aber zudem, wie bei der Inhibition aller Metalloproteasen durch MM, von einer 2-fachen auf eine 1,5-fache Erhöhung weiter ab. Wurde die Nekroptose durch die beiden Nekroptoseinhibitoren Nec-1s und GSK verhindert, sank das *Shedding* signifikant annähernd auf das Niveau der Leerkontrolle zurück. Kontrolliert wurde die Inhibition durch *Western Blot*-Analysen, die die Inhibition der Nekroptose durch Nec-1s und GSK und die Induzierung der Nekroptose durch kTRAIL + zVAD bzw. der Apoptose durch kTRAIL bestätigten (Abbildung 11B).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist weiterhin davon auszugehen, dass die Nekroptose ADAMs aktiviert und ADAM10 hierbei eine besondere Rolle einnimmt.

4.2 Untersuchungen zur Veränderung der enzymatischen ADAM-Aktivität während der Nekroptose

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse konnte angenommen werden, dass das ADAM-vermittelte *Shedding* während der Nekroptose erhöht ist. Demnach stellte sich die entscheidende Frage, welche Ursache diese Erhöhung hatte. Grundsätzlich muss neben dem induzierbaren *Shedding*, welches der Interaktion mit PtdSer und der anschließenden Substratspaltung auf der Zelloberfläche entspricht und der enzymatischen Aktivität, die auch für lösliche Substrate bedeutsam ist, von ADAM10 und ADAM17 unterschieden werden (Saftig und Reiss, 2011). Es gilt daher zu klären, ob die erhöhte Freisetzung von ADAM-Substraten während der Nekroptose dementsprechend nur eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität der ADAMs oder es sich um eine Aktivierung des membrangebundenen *Sheddings* handelt. Dafür wurde ein lösliches ADAM-Substrat im Anschluss einer Stimulation unter nekroptotischen Bedingungen zu HT29-Zellen hinzugegeben. Durch die Spaltung des Peptids fängt dieses an zu fluoreszieren. Eine erhöhte Fluoreszenz liefert entsprechend einen Hinweis für die Erhöhung der enzymatischen Aktivität der Proteasen (Abbildung 12).

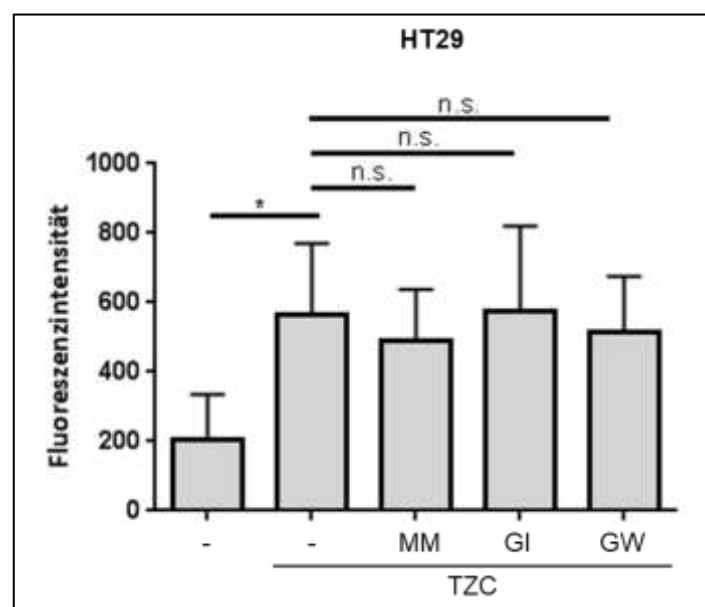


Abbildung 12: Veränderung der Enzymaktivität der ADAMs während der Nekroptose

HT29-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z), 5 μ g/ml Cycloheximid (C), 10 μ M Marimastat (MM), 3 μ M GI und 3 μ M GW für 4 h stimuliert. Die Vorinkubation mit MM, GI und GW erfolgte 15 min zuvor. Anschließend wurde für 30 min 10 μ l ADAM-Substrat hinzugegeben und nach 30 min die Emission gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen die mittels des Fluoreszenz-Peptid-Assays aus n=3 ermittelt wurden. ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: *= signifikante Zunahme des IL-6 Rezeptor-*Sheddings*; n.s.= nicht signifikant

Die Nekroptose führte zu einem signifikanten Anstieg um etwa das dreifache des umgesetzten ADAM-Substrats in HT29-Zellen. Dieser Anstieg war durch die Zugabe von MM, GW und GI nicht signifikant reduzierbar und blieb annähernd auf dem gleichen Niveau bei einer Fluoreszenzintensität von etwa 600.

Normalerweise führt die Stimulation des *Sheddings* von ADAM10- oder ADAM17-Substraten zu keiner erhöhten enzymatischen Aktivität. Da jedoch die Intensitätssteigerung in diesem Fall nicht durch MM inhibiert war, spricht dies für eine Umsetzung des ADAM-Substrats durch weitere Proteasen, die nicht aus der Familie der Metalloproteasen stammen. Dementsprechend scheint es zu keiner gesteigerten enzymatischen Aktivität der ADAMs während der Nekroptose zu kommen.

4.3 Phosphatidylserin-Externalisierung in HT29-Zellen während der Nekroptose

Die Nekroptose geht im Gegensatz zur Apoptose mit einer inflammatorischen Antwort einher. Entscheidend für die Apoptose ist hierbei die PtdSer-Externalisierung. PtdSer stellt unter physiologischen Bedingungen ein Phospholipid in der inneren Membranseite dar. Phagozyten erkennen das PtdSer auf den apoptotischen Vakuolen und phagozytieren diese (Segawa und Nagata, 2015). Aber auch für die ADAM10- und ADAM17-Aktivierung spielt PtdSer eine wichtige Rolle (Bleibaum et al., 2019; Sommer et al., 2016). Aufgrund der Interaktion von ADAM10 und ADAM17 mit PtdSer sollte im nächsten Schritt die PtdSer-Externalisierung während der Nekroptose mit Hilfe des konfokalen Mikroskops untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob auch während der Nekroptose eine PtdSer-Externalisierung stattfindet, die damit eine mögliche ADAM10- und ADAM17-Aktivierung erklärt.

Um eine mögliche PtdSer-Translokation während der Nekroptose zu beobachten, wurden HT29-Zellen mit kTRAIL, zVAD und CHX behandelt und anschließend zu verschiedenen Zeiten (1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 Stunden) mit AnnexinV-FITC (grünes Signal) gefärbt und unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet. PI (rotes Signal) wurde verwendet, um Zellen darzustellen, deren Membran defekt sind, da der Farbstoff die intakte Membran nicht durchqueren kann (Abbildung 13).

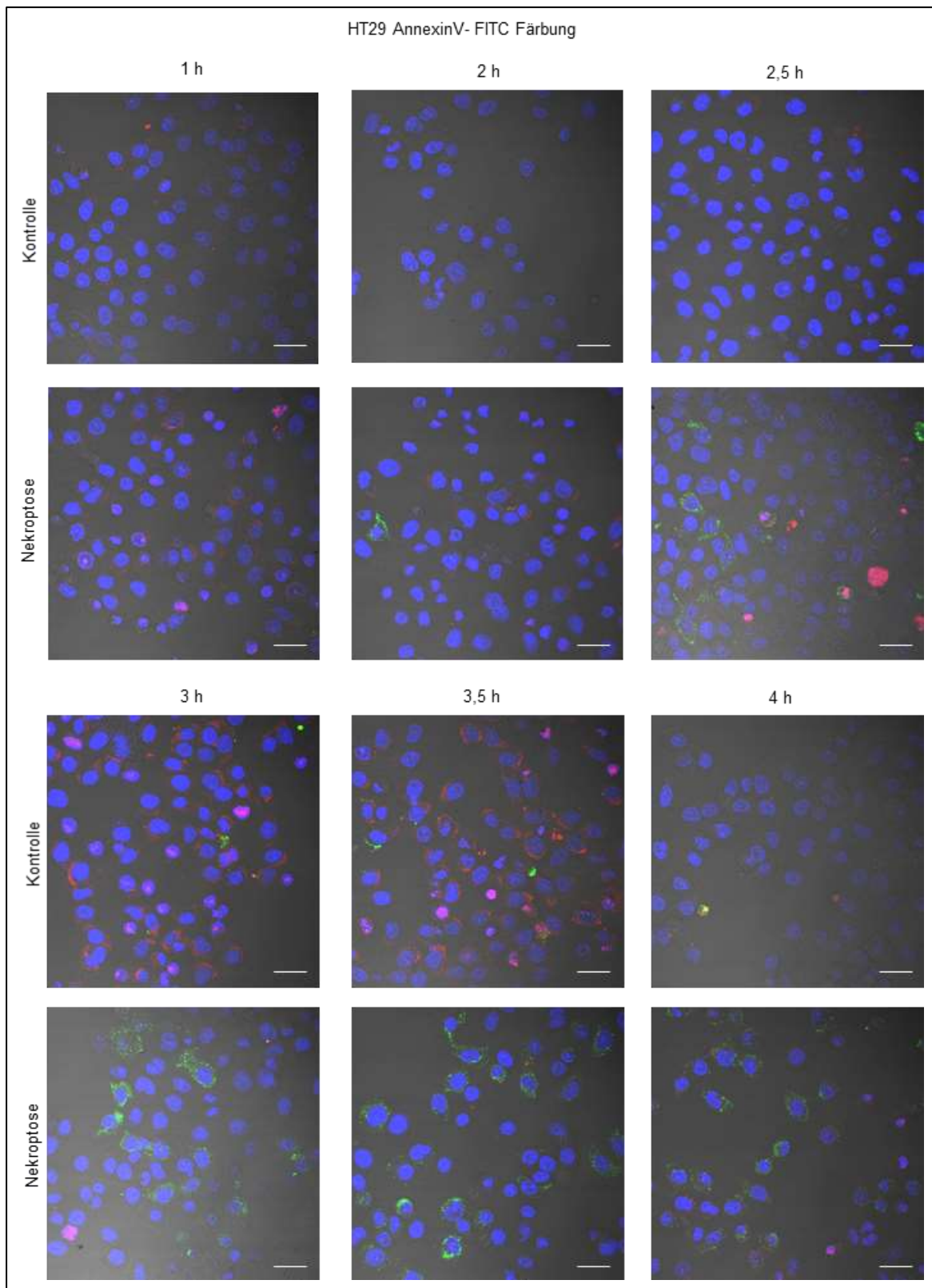


Abbildung 13: Phosphatidylserin-Externalisierung unter nekroptotischen Bedingungen bei HT29-Zellen
 HT29-Zellen wurden mit 100 ng/ml kTRAIL 50 μ M zVAD und 5 μ g/ml Cycloheximid (CHX) für 4 h stimuliert (Nekroptose). Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min zuvor. Nach den angegebenen Zeiten wurde mit AnnexinV-FITC (grün) für den Nachweis der PtdSer- Externalisierung, PI für die Zellmembranintegrität (rot) und DAPI (blau) für die Darstellung der Zellkerne, gefärbt. Als Kontrolle dienen unstimulierte mit AnnexinV-FITC, PI und DAPI gefärbte HT29-Zellen. Abgebildet ist eine repräsentative Zeitreihe aus n=3 Versuchen. Maßstabsbalken 20 μ M

In den ersten zwei Stunden waren mit Ausnahme einer AnnexinV-positiven Zelle keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und den stimulierten HT29-Zellen zu erkennen. Die ersten erkennbaren Unterschiede ließen sich nach zweieinhalb Stunden beobachten. Während die Kontrollfärbung weiterhin keine AnnexinV- und PI-Signale zeigte, waren unter Nekroptosebedingungen die ersten Zellen mit positivem AnnexinV-Signal zu erkennen. Mehrere Zellen fingen nun an PI aufzunehmen, wobei mit einer Ausnahme die AnnexinV-positiven Zellen PI-negativ blieben. Dementsprechend verstarben zu diesem Zeitpunkt die ersten Zellen. Im Laufe der Zeit nahm die Anzahl von AnnexinV-positiven und PI-negativen Zellen immer weiter zu. Auch in der Kontrolle waren jetzt vereinzelt rot gefärbte Zellen und unspezifische Anfärbungen des Annexins zu beobachten. Zusammengefasst ließ sich feststellen, dass nach zwei bis zweieinhalb Stunden Stimulation die ersten Zellen unter nekroptotischen Bedingungen anfangen erste Annexin-Signale zu zeigen. Interessanterweise blieben diese Zellen dabei PI-negativ, während andere Annexin-negative Zellen zu diesen Zeitpunkten PI-positiv wurden.

Aufgrund der aufgezeigten Beobachtungen ist davon auszugehen, dass nekroptotische HT29-Zellen vor Verlust der Membranintegrität PtdSer externalisieren.

4.4 Bedeutung von Anoctamin-6 für die TGF- α -Freisetzung während der Nekroptose

In Bezug auf die bisher erlangten Ergebnisse sollte im folgenden Versuch die potentielle Rolle von Anoctamin-6 (ANO6) und dessen Eigenschaft als Ca^{2+} -abhängige Scramblase für die ADAM-Aktivierung während der Nekroptose untersucht werden. Zu klären ist, ob durch eine erhöhte ANO6-Expression vermehrt ADAM17- bzw. ADAM10-*Shedding* beobachtet werden kann.

Dafür wurde in HT29-Zellen ein ANO6-Plasmid und ein TGF- α -AP-Konstrukt kotransfiziert. Die Sicherstellung der Transfektion erfolgte durch den eGFP-Tag an ANO6 bzw. der Kotransfizierung von eGFP, die beide optisch kontrolliert wurden. Anschließend erfolgte mit kTRAIL, zVAD und CHX die Stimulation für die Nekroptose. Das freigesetzte TGF- α wurde im AP-Assay gemessen, um ein möglicherweise vermehrtes ADAM17- bzw. ADAM10-*Shedding* zu beobachten (Abbildung 14).

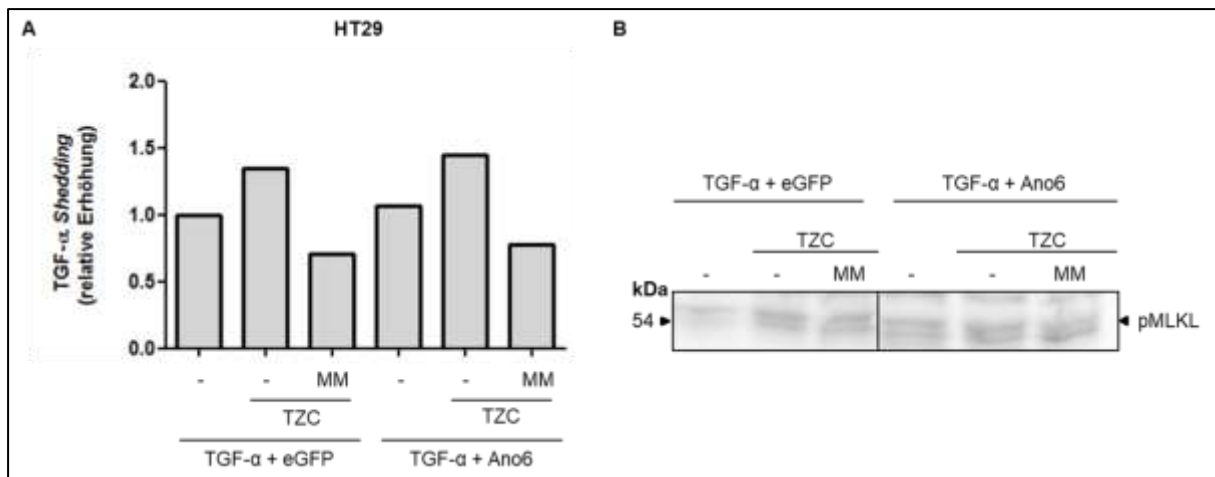


Abbildung 14: ANO6-Überexpression in HT29-Zellen

A: HT29-Zellen wurden mit TGF- α -AP und je 0,5 μ g eGFP-Plasmid oder 0,5 μ g ANO6-Plasmid transient kotransfiziert. Nach 24 h erfolgte die Stimulation in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z), 10 μ g/ml Cycloheximid (C) und 10 μ M Marimastat (MM) für 4 h. Die Vorinkubation mit zVAD und MM erfolgte 30 min bzw. 15 min zuvor. Die Mittelwerte der proteolytischen Freisetzung des TGF- α -AP sind dargestellt (n=1). **B:** Western Blot-Analyse zum Nachweis der Nekroptose (pMLKL).

Ein Unterschied der Freisetzung von TGF- α zwischen ANO6-transfizierten und -untransfizierten Zellen war nicht festzustellen (Abbildung 14A). Beide Stimulationen hatten einen Anstieg auf etwa 1,5 nach Nekroptoseinduktion gemeinsam. Wie in den vorherigen Versuchen, konnte die Freisetzung durch MM wieder gesenkt werden. In den Western Blot-Kontrollen fielen zudem in allen Ansätzen unspezifische Doppelbanden beim pMLKL auf (Abbildung 14B). Diese Ergebnisse decken sich mit neuen veröffentlichten Ergebnissen kurz nach der Erhebung dieser Daten, die besagen, dass ANO6 keinen Einfluss auf den Zelltod während der Nekroptose hat (Ousingsawat et al., 2016). Daher wurden weitere Ansätze zur Untersuchung der potentiellen Rolle von ANO6 für die ADAM-Aktivierung während der Nekroptose nicht weiterverfolgt.

4.5 Untersuchung zur Bedeutung der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung für die Nekroptose

Bisher deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Nekroptose zu einer ADAM10- und ADAM17-Aktivierung führt. Als nächstes sollte die Frage untersucht werden, welche Bedeutung die beiden Metalloproteasen für die Nekroptose haben könnten.

Eine Möglichkeit dies zu untersuchen, war die Expression von ADAM17 mit Hilfe von siRNA zu vermindern. Ziel war es, die Nekroptose in Abwesenheit von ADAM17 zu betrachten. Sinnvoll wäre dies nur bei einer hohen Expression von ADAM17 in der verwendeten Zelllinie.

Verschiedene Zelllinien wurden dafür auf ihr ADAM17-Expressionlevel getestet und im *Western Blot* aufgetragen.

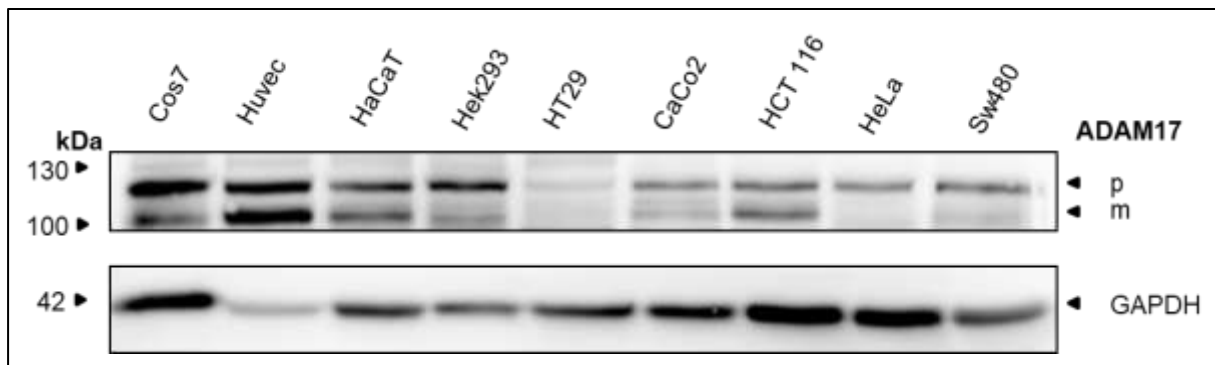


Abbildung 15: Expressionslevel von ADAM17 in verschiedenen Zelllinien

Zellysate von verschiedenen unbehandelten Zelllinien wurden im *Western Blot* analysiert und mit dem ADAM17- Antikörper gefärbt. GAPDH diente als Proteinladekontrolle. m=mature Form; p=pro-Form

Dabei fiel auf, dass die bisher verwendeten HT29-Zellen im Vergleich zu den anderen aufgetragenen Zelllinien eine schwächere Bande, sowohl bei der pro-, als auch bei der murenen Form von ADAM17, zeigten (Abbildung 15). Eine weitere Auffälligkeit bestand darin, dass bei den Zelllinien, die von Darmtumoren abstammen (HT29; CaCo2; HCT 116), bei der pro-Form von ADAM17 eine schwächere Bande im Vergleich zu den anderen Zelllinien (Cos7; HUVEC; Sw480; HaCaT; HeLa und Hek293) zu beobachten war. Die stärkste Expression von ADAM17 befand sich in Huvec-Zellen.

Bedingt durch das niedrige Expressionslevel von ADAM17 in HT29-Zellen sind keine siRNA-Versuche mit diesen Zellen durchgeführt worden. Im Umkehrschluss wurde ADAM17 in die HT29-Zellen transfiziert, um eine künstliche Überexpression zu erschaffen. Dadurch kann die Bedeutung von ADAM17 auf die Nekroptose untersucht werden.

Es erfolgte die Stimulation der Nekroptose in ADAM17-überexprimierten und Leervektor-transfizierten HT29-Zellen. Anschließend wurden die Zellysate im *Western Blot* mit dem pMLKL-Antikörper gefärbt und die quantitative Stärke dieser Bande verglichen. Auffällig dabei war, dass die pMLKL-Bande im *Western Blot* in den ADAM17-transfizierten HT29-Zellen schwächer ausfiel als bei der Stimulation in pcDNA-transfizierten HT29-Zellen (Abbildung 16).

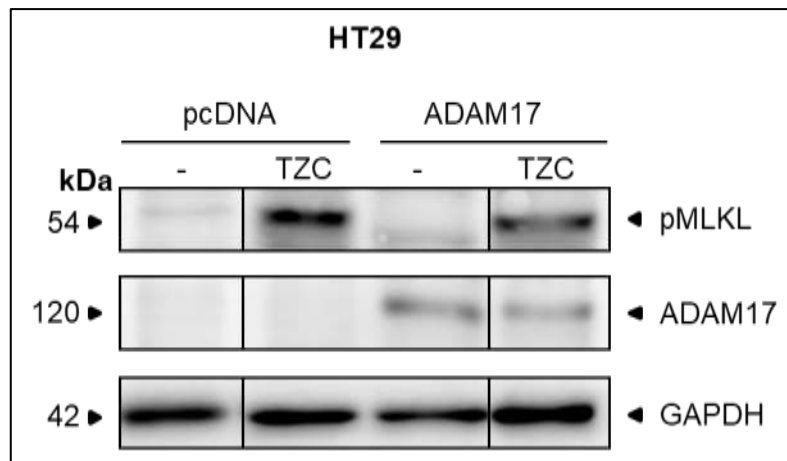


Abbildung 16: ADAM17-Überexpression in HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden mit 0,5 μg Leervektor (pcDNA) oder 0,5 μg ADAM17-Plasmid transient transfiziert und anschließend mit 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μM zVAD (Z) und 5 μg/ml Cycloheximid (C) für 4 h stimuliert und im *Western Blot* analysiert. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation. pMLKL diente zum Nachweis der Nekroptose- und GAPDH als Proteinladekontrolle. ADAM17 ist als Transfektionskontrolle gefärbt. Abgebildet ist ein repräsentativer *Western Blot* (n=3).

Der beobachtete Effekt, dass unter ADAM17-Überexpression das pMLKL-Signal schwächer ausfällt, sollte anschließend auch morphologisch überprüft werden. Dafür wird angenommen, dass in Korrelation zu einem schwächeren pMLKL-Signal weniger Zellen den nekroptotischen Zelltod sterben. Dafür wurden HT29-Zellen mit ADAM17-, ADAM10- und ADAM9-Plasmiden transfiziert. Anschließend erfolgte eine Stimulation über 16 Stunden unter nekroptotischen Bedingungen. Zum Schluss erfolgte eine PI- und DAPI-Färbung, um im Fluoreszenzmikroskop die Zellzahl quantitativ nachzuvollziehen (Abbildung 17).

Die Stimulation mit kTRAIL, zVAD und CHX führte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mit dem Leervektor in allen Proben zur Abnahme der Zelldichte. Beim Vergleich zwischen den stimulierten pcDNA-, ADAM9- und ADAM10-transfizierten Zellen waren nach 16 Stunden keine Unterschiede zu erkennen. Vereinzelt PI-positive Zellgruppen konnten beobachtet werden. Unter der ADAM17-Überexpression erschienen die Zellkolonien überwiegend ausschließlich DAPI-positiv und die Gesamtzellzahl war im Vergleich zur ADAM9- und ADAM10-Überexpression leicht erhöht. Auch wenn im unteren Bild der ADAM17-transfizierten Zellen ebenfalls DAPI- und PI-positive Zellen zu erkennen waren, war das PI-Signal insgesamt deutlich reduziert. Dies bedeutet, dass weniger Zellen defekte Membranen aufwiesen.

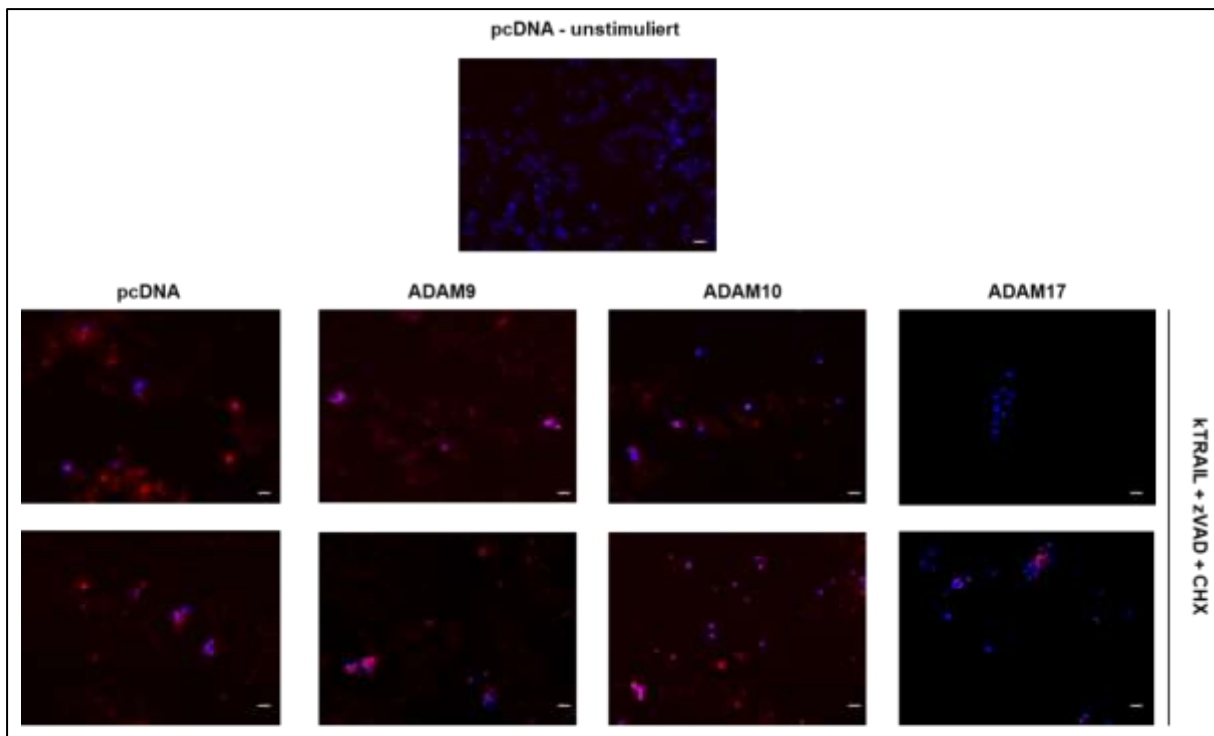


Abbildung 17: ADAM9-, -10- und -17-Überexpression und Stimulation über Nacht in HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden auf Deckgläsern im 12-Well ausgesät und einen Tag später mit 1 µg Leervektor (pcDNA), ADAM9, ADAM10 oder ADAM17 transfiziert. Zusätzlich wurde 0,5 µg eGFP in die Zellen transfiziert, um eine Transfektionskontrolle am Fluoreszenzmikroskop durchzuführen. Nach weiteren 24 h wurden bis auf die Kontrolle mit 100 ng/ml kTRAIL, 50 µM zVAD und 5 µg/ml Cycloheximid für 16 h stimuliert. Anschließend erfolgte eine DAPI- und PI-Färbung (Verdünnung 1:200) in 3 % PFA-Fixierung. Dargestellt sind zwei Bilder pro Transfektionsansatz aus n=2. Maßstabsbalken 20 µM

Zeitgleich zu den Überexpressionsversuchen wurde in einer anderen Zelllinie als den HT29-Zellen versucht, ADAM17 während der Nekroptose mit dem inhibitorischen Antikörper D1 zu inhibieren. Ziel war es, einen gleichen oder ähnlichen Effekt der Inhibition von ADAM17 auf die pMLKL-Bande, wie bei den HT29-Zellen, zu beobachten, auch wenn das Expressionslevel von ADAM17 in U937 unbekannt war (Abbildung 18).

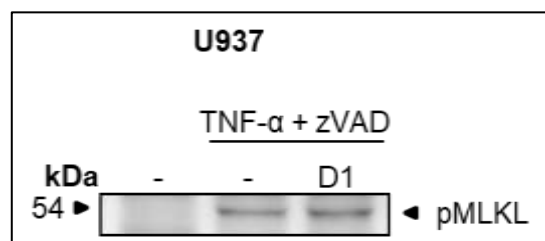


Abbildung 18: Inhibition von ADAM17 mit dem inhibitorischen Antikörper D1 in U937-Zellen

Western Blot-Analyse von U937-Zellen, die mit 100 ng/ml TNF- α , 50 µM zVAD für 4 h stimuliert wurden. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min und mit 200 mM D1-Antikörper (ADAM17 Antikörper) 15 min zuvor. Das pMLKL-Signal dient zum Nachweis der Nekroptose.

Hierbei konnte aber in U937-Zellen kein sichtbarer Effekt erzielt werden. Bei der pMLKL-Bande im *Western Blot* nach Stimulation war kein Unterschied zwischen den stimulierten und den ADAM17-inhibierten U937-Zellen zu sehen.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Nekroptose-bedingte Aktivierung von ADAM17 bzw. ADAM10 für das Überleben der Zelle eine Bedeutung haben könnte. Da aber die Ergebnisse in HT29- und U937-Zellen widersprüchlich waren, sind weitere Vermutungen für die Rolle der beiden Proteasen während der Nekroptose aufzustellen.

4.6 Einfluss der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung auf die Proliferation von Nachbarzellen während der Nekroptose

Nekroptose in apoptoseresistenten Tumorzellen auszulösen gilt als vielversprechende Alternative für die Krebstherapie und steht im Mittelpunkt aktueller Forschung (Philipp et al., 2016; Su et al., 2016).

Die nächsten Versuche sollten daher zeigen, welche Effekte freigesetzte Substrate durch ADAM10 und ADAM17 während der Nekroptose auf umliegende Zellen haben. Die Frage, ob freigesetzte Wachstumsfaktoren, wie das TGF- α und das EGF, zu einer Aktivierung von Zellproliferationssignalen bei Nachbarzellen führen, war zu klären. Durch eine Zellproliferation könnte es, anstatt des gewünschten Tumorzelltodes, zu einem Wachstum von Tumorzellen im umliegenden Gewebe kommen. Die Bestimmung von morphologischen und quantitativen Zellveränderungen wurde mit Hilfe des xCELLigence-Systems von *ACEA Biosciences* durchgeführt. Im xCELLigence wurden ausschließlich HT29-Zellen verwendet.

4.6.1 Impedanzmessung nach Überstandtransfer

Ein xCELLigence-Versuch ist über die gesamte Experimentdauer in Abbildung 19 exemplarisch dargestellt. Das xCELLigence ist ein Gerät mit dem der Widerstand (Impedanz) mittels Goldelektroden gemessen werden kann, um Rückschlüsse auf das Zellwachstum zu ziehen. Ein erhöhter Zellindex führt zu einer erhöhten Impedanz. Abbildung 19 zeigt HT29-Zellen 24 Stunden nach Aussaat auf der E-Platte (Zeitpunkt 1), die zum Zeitpunkt 2 den Überstand von zuvor stimulierten HT29-Zellen erhalten haben.

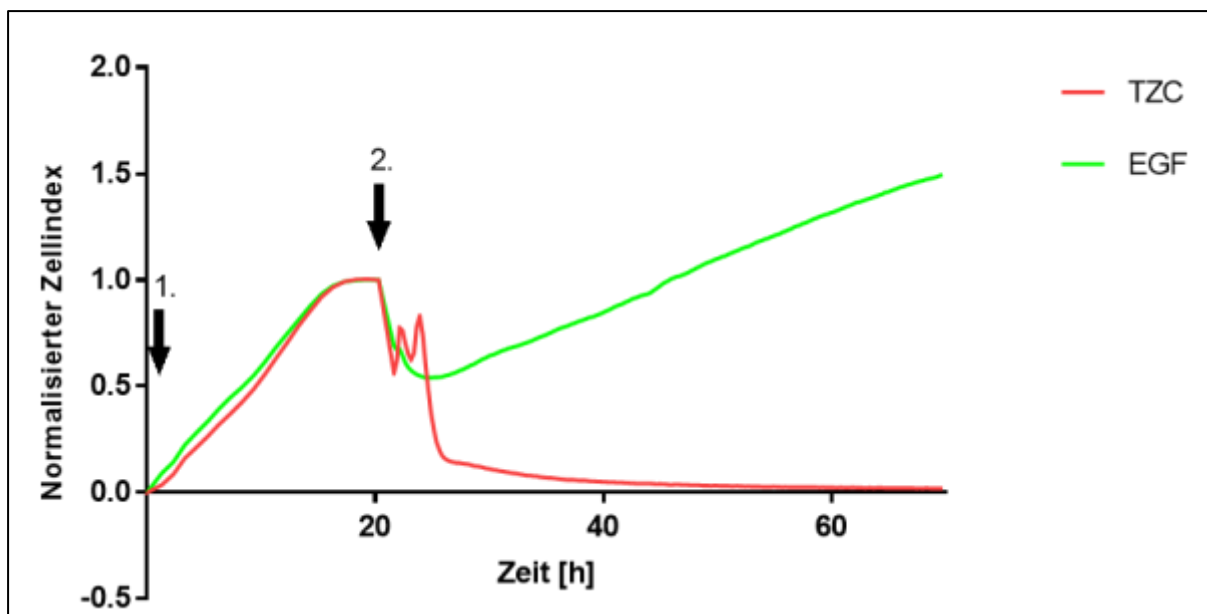


Abbildung 19: Impedanzmessung an HT29-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellindizes eines repräsentativen Versuches über 70 h normalisiert auf den letzten Messpunkt vor dem Medium-/ Überstandwechsel auf der E-Platte (2.), beginnend mit Aussaat der Zellen (1.) und des Überstandstransfers in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren (2.). Der Überstand von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z) und 5 μ g Cycloheximid (C) ohne Mediumwechsel behandelten HT29-Zellen ist als Negativ- und die Zugabe von Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) in DMEM⁺ im xCELLigence System als Positivkontrolle zu betrachten. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation.

Durch die Strömungsturbulenzen bei dem Transfer der E-Platte aus der *DP Docking Station* zur Sterilbank sowie bei der Zugabe des Überstands fiel der Zellindex im Anschluss dieser Maßnahmen zunächst ab. Bedingt war dies vermutlich durch morphologische Veränderungen der Zellen und durch das Ablösen weniger Zellen von der E-Platte. Im Falle der Positivkontrolle mit dem Wachstumsfaktor EGF erholten sich die Zellen nach zwei bis drei Stunden wieder und der Zellindex stieg mit der Zeit weiter an. Bei der Übertragung von dem Überstand von kTRAIL, zVAD und CHX-behandelten HT29-Zellen fiel der Zellindex zunächst ähnlich wie bei der Positivkontrolle ab und unterlag für etwa drei Stunden Zellindexschwankungen. Im Anschluss fiel dieser dann komplett ab, da der Überstand das kTRAIL noch enthielt. Der Zelltod wurde ausgelöst und die Zellen lösen sich von der E-Platte.

4.6.2 Vorversuche zur Impedanzmessung bei Nekroptosestimulation

Für die Untersuchung im xCELLigence-System sollte der Überstand von nekroptotischen Zellen auf die E-Platte mit unbehandelten Zellen im xCELLigence transferiert werden. Um zum Beispiel den Effekt freigesetzter Wachstumsfaktoren oder Zytokine zu beobachten, mussten daher die Nekroptose-Stimulantien vorher aus dem Überstandsmedium entfernt werden. Das transferierte kTRAIL würde auch in den Zellen in der xCELLigence-Kammer den Zelltod induzieren (Abbildung 19). Zunächst musste daher die Frage geklärt werden, nach welcher Zeit

die Nekroptose nachgewiesen und das Medium gewechselt werden kann, damit die Stimulantien und Inhibitoren aus dem Überstand entfernt werden können. Wie in Abbildung 20 zu sehen, war unter nekroptotischen Bedingungen nach drei Stunden eine pMLKL-Bande nachzuweisen. Beim Mediumwechsel nach einer, eineinhalb und zwei Stunden war jeweils die Bande des Spaltproduktes von PARP zu erkennen. Dieser Effekt verschwand ebenfalls erst nach drei Stunden.

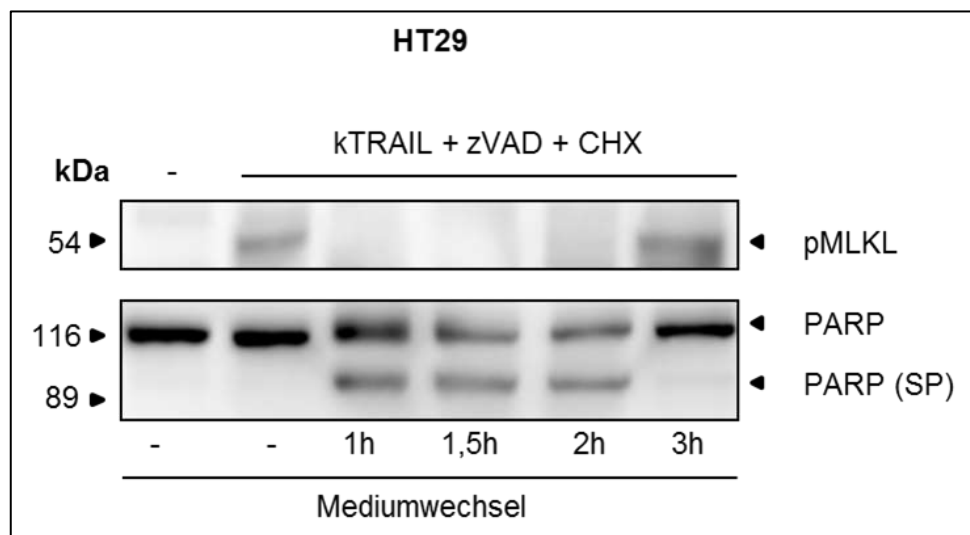


Abbildung 20: Zeitreihe für Nachweis der Nekroptose in HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden mit 100 ng/ml kTRAIL, 50 μ M zVAD und 5 μ g Cycloheximid (CHX) stimuliert. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation. Nach 1 h, 1,5 h, 2 h und 3 h ist das Versuchsmedium abgenommen worden und es erfolgte jeweils ein Mediumwechsel auf DMEM^{-/-}. Die unstimulierte und die stimulierte Langzeitkontrolle wurden für 4 h ohne Mediumwechsel stimuliert. Dargestellt sind die *Western Blot*-Analysen. Die pMLKL-Bande dient als Nekroptose- und PARP/PARP (SP) als Apoptosenachweis. SP=Spaltprodukt

Dementsprechend wurde der Überstand nach 3-stündiger Stimulation abgenommen und vollständig ersetzt, um sicher zu gehen, dass die Zellen den nekroptotischen Zelltod sterben. Durch den Mediumwechsel (MW) wurden bis dahin freigesetzte Wachstumsfaktoren und andere Substrate komplett verworfen. Damit diese erneut in den Überstand abgegeben werden konnten, wurde der Überstand erst nach zwei weiteren Stunden nach dem Mediumwechsel abgenommen (Abbildung 21A).

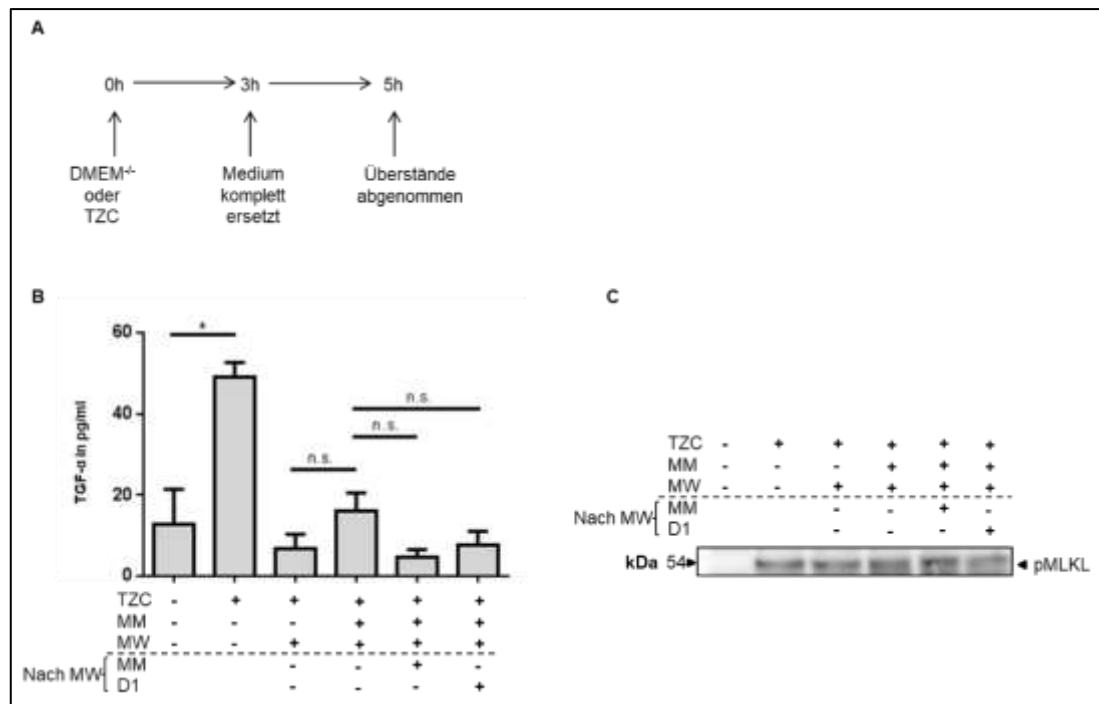


Abbildung 21: Freisetzung von endogenem TGF- α in HT29 Zellen nach Stimulation mit Mediumwechsel
A: Flussdiagramm für die Überstandsgenerierung in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z) und 5 μ g Cycloheximid (C) oder DMEM⁻ behandelten HT29-Zellen. **B:** HT29-Zellen wurden für 3 h mit TZC stimuliert. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min und mit 10 μ M Marimastat (MM) 15 min zuvor. Nach 3 h erfolgte ein Mediumwechsel (MW) und ggf. eine Hinzugabe von 200 mM D1 oder erneut 10 μ M MM. Nach 2 weiteren Stunden erfolgte die Durchführung des TGF- α -ELISAs. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der proteolytischen Freisetzung des TGF- α im ELISA (n=3). ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: *= signifikante Zunahme des TGF- α Sheddings; n.s.= nicht signifikant. **C:** Ein repräsentativer *Western Blot* (1 von 3) ist als Nachweis für die Nekroptose (pMLKL) dargestellt.

Die TGF- α -Freisetzung diente zur Überprüfung, ob die zwei Stunden nach dem Mediumwechsel genug Zeit ermöglichen, um erneut ausreichend Wachstumsfaktoren im Überstand zu detektieren, bevor alle HT29-Zellen verstorben waren. Zunächst konnte erneut gezeigt werden, dass es unter nekroptotischen Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg von TGF- α im Überstand kommt (Abbildung 21B). Wurde das Medium nach drei Stunden vollständig ersetzt und für zwei weitere Stunden ein neues Medium auf die Zellen gegeben, nahm die Konzentration an TGF- α im Überstand um fast das Zehnfache ab. Die Zugabe von MM vor dem Mediumwechsel ging mit einer Abnahme der TGF- α Konzentration von etwa zwei Drittel einher. Jedoch konnte hier unter allen Ansätzen mit Mediumwechsel der höchste Wert an TGF- α im Überstand nachgewiesen werden. Wurde MM zusätzlich nach dem Mediumwechsel hinzugegeben, war das Konzentrationsniveau von TGF- α am niedrigsten. Der Austausch von MM mit dem D1-Inhibitor erzielte ein ähnliches Ergebnis wie bei der Stimulation ausschließlich mit Mediumwechsel. TGF- α stellt einen repräsentativen Wachstumsfaktor dar und wird routinemäßig in unserem Labor (AG Reiß, UKSH Kiel) gemessen. Obwohl die gemessene Konzentration von TGF- α im Überstand gering ausfiel, wurden mittels dieser

Methode Überstände für das xCELLigence-System hergestellt (Abbildung 21A). Die HT29-Zellen, die für die Überstandsgenerierung genutzt wurden, wurden im *Western Blot* zum Nachweis der stattgefundenen Nekroptose analysiert (Abbildung 21C).

Letztendlich konnten nun die generierten Überstände auf semikonfluente HT29-Zellen im xCELLigence transferiert und die Auswirkungen von freigesetzten Substraten während der Nekroptose auf das Wachstum von Zellen untersucht werden.

4.6.3 Impedanzmessung bei HT29-Zellen mit „nekroptotischem“ Überstand

Zu diesem Zeitpunkt konnte der Transfer von weiteren Überständen in An- und Abwesenheit von MM während der Nekroptose erfolgen (Abbildung 22).

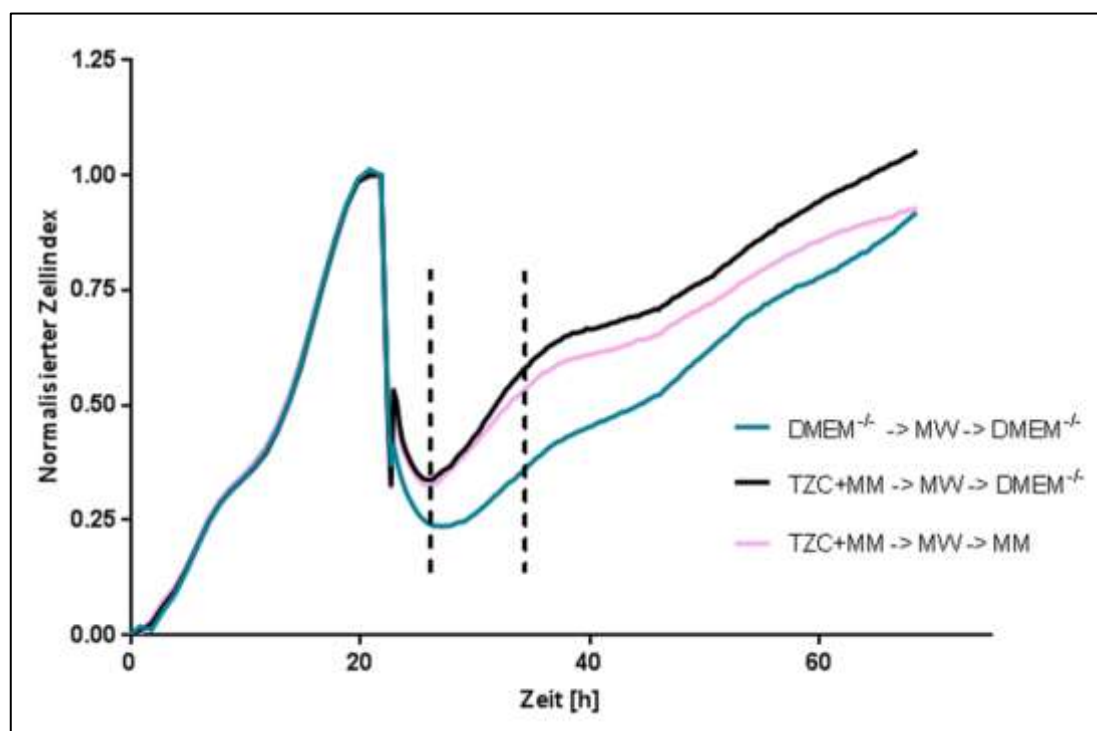


Abbildung 22: Impedanzmessung bei HT29-Zellen nach Überstandstransfer

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch über 70 h mit Normalisierung auf 1 zum Zeitpunkt des Überstandstransfers (ca. 24 h nach Aussaat) aus n=5 im xCELLigence. Für die Überstandsgenerierung wurden HT29-Zellen in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z) und 5 μ g/ml Cycloheximid (C) für 3 h stimuliert, ehe das Medium gewechselt (MW) wurde und die Zellen weitere 2 h in DMEM/- inkubierten und der Überstand anschließend auf neue HT29-Zellen im xCELLigence übertragen wurde. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation mit TC. 10 μ M Marimastat (MM) wurde entweder 15 min vor der Stimulation mit TC oder direkt im Anschluss des Mediumwechsels hinzugegeben. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien kennzeichnet den 10-Stunden-Abschnitt für die Auswertungen der Steigungen in Abbildung 23.

Die ersten Unterschiede zwischen den einzelnen Zellindizes waren direkt nach dem Transfer des Überstandes auf die E-Platten im xCELLigence zu beobachten. Die Negativkontrolle durch die unstimulierten Zellen mit Mediumwechsel zeichneten den größten Abfall im Zellindex auf.

Nach Erreichen des Minimums von etwa 0,25 erholte sich der Zellindex und stieg über die gesamte Zeit unterhalb der anderen Kurven wieder an. Wurde der Überstand von Zellen transferiert, die vorher unter nekroptotischen Bedingungen stimuliert wurden, erholte sich der Zellindex bei etwa 0,35 und stieg in beiden Ansätzen wieder an. Der höchste über die Zeit gesehene Zellindex konnte erzielt werden, indem die Metalloproteasen bei der Überstandsgenerierung ausschließlich vor dem Mediumwechsel durch MM inhibiert wurden und anschließend zwei Stunden ihrer Funktion nachgehen konnten. Die Kurve war ab einem Zeitpunkt von 15 Stunden nach der Überstandstransferierung bis zum Ende etwa 0,1 Punkte höher als der Zellindex ohne die Inhibition mit MM. Auffällig war, dass nach etwa sieben Stunden eine stabile Steigung von weiteren zehn Stunden beobachtet werden konnte. Der Beginn dieser Steigung fällt mit dem Zeitpunkt zusammen, an dem sich die Zellindizes nach Überstandstransfer anfangen sich zu erholen. Zu dieser Zeit war die Steigung in allen Graphen am größten (Abbildung 22: Bereich zwischen den gestrichelten Linien). Wird für diesen Zeitraum die Steigung im Zellindex aufgetragen, fiel auf, dass zu dieser Zeit die Steigung in allen Graphen am größten war. Unter diesen Aspekten und der Annahme, dass die Steigung ein weiteres Maß für die Proliferation darstellt, konnte ein weiterer Vergleich bezüglich der Zellproliferation erfolgen (Abbildung 23).

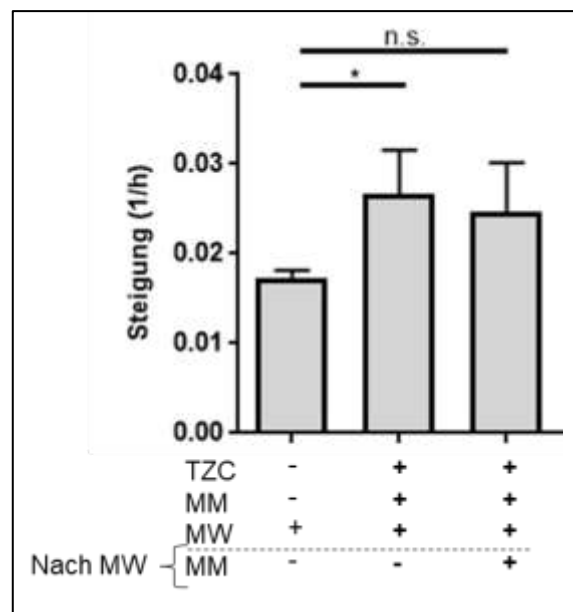


Abbildung 23: Steigung der Wachstumsrate von HT29-Zellen nach Überstandstransfer

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Steigungen in 1/h (reziproke Auftragung der Verdopplungszeit) aus der Impedanzmessung nach Überstandstransfer über den Zeitraum von 10 h (Bereich zwischen der gestrichelten Linie in Abbildung 22) im xCELLigence. Für die Überstandsgenerierung wurden HT29-Zellen in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z) und 5 μ g/ml Cycloheximid (C) für 3 h stimuliert, ehe das Medium gewechselt (MW) und die Zellen weitere 2h in DMEM/-/- inkubiert wurden. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation mit TC. 10 μ M Marimastat (MM) wurde entweder 15 min vor der Stimulation mit TC oder direkt im Anschluss des Mediumwechsels hinzugegeben (n=4). ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: *= signifikante Zunahme; n.s.= nicht signifikant.

Der Vergleich der Steigung im markierten Bereich ergänzt das Ergebnis aus den vorherigen Proliferationskurven. Die einzige signifikante Zunahme in der Steigung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle war bei dem Ansatz des Überstandes mit MM vor dem Mediumwechsel. Die Steigung fiel unter das Signifikanzniveau, sobald nach dem Mediumwechsel zusätzlich MM bei der Stimulation hinzugefügt wurde. Es ist zu bemerken, dass hierbei der absolute Unterschied zwischen beiden stimulierten Ansätzen nur etwa 0,005 betrug und trotz des Verlustes der Signifikanz somit sehr gering ausfiel.

4.6.4 Impedanzmessung von HT29-Zellen mit „nekroptotischem“ Überstand und ADAM17-Überexpression

Sollte ADAM17 bzw. ADAM10 für den Effekt der Proliferation durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zuständig sein, sollte der eben gezeigte Effekt bei einer ADAM17-Überexpression zu verdeutlichen bzw. zu bestätigen sein. Dafür wurde erneut ein ADAM17-Plasmid in HT29-Zellen transfiziert und unter nekroptotischen Bedingungen stimuliert (Abbildung 24A). Die weitere Vorgehensweise und Auswertung im xCELLigence war dieselbe wie oben beschrieben.

Zuerst fielen alle Zellindizes auf etwa 0,5 ab, ehe sie auf etwa 0,7 anstiegen, um wiederum bis Stunde 30 auf etwa 0,5 abzufallen. Anschließend erholten sich alle Zellindizes und stiegen über die Zeit weiter an. Hierbei befand sich der Zellindex von HT29-Zellen, die den stimulierten Überstand von pcDNA-transfizierten Zellen erhalten haben (rosa; dunkelblau) stetig unterhalb bzw. auf der Höhe der Zellindizes von stimulierten ADAM17-transfizierten Zellüberständen (schwarz; hellblau). Erneut konnte der höchste Zellindex beim Überstand mit der Inhibition der Metalloproteasen vor dem Mediumwechsel erzielt werden (schwarz). Jedoch stieg der Zellindex von pcDNA-transfizierten Zellen, die MM auch nur vor dem Mediumwechsel erhalten haben, mit einem Unterschied von etwa 0,1 nur unwesentlich geringer und war über den gesamten Zeitraum höher bzw. auf der Höhe der anderen stimulierten Ansätze mit ADAM17-Überexpression. Der Überstand von unstimulierten ADAM17-überexprimierten Zellen verzeichnete als Negativkontrolle zum geringsten Anstieg des Zellindex (grün). Der Unterschied zum höchsten Zellindex betrug ab Stunde 30 über die Zeit gesehen stabil einen Wert von 0,2. Jedoch befand sich auch dieser Zellindex annähernd auf der Höhe der pcDNA- und ADAM17-transfizierten Zellen und es konnte kein wesentlicher Unterschied erkennbar werden.

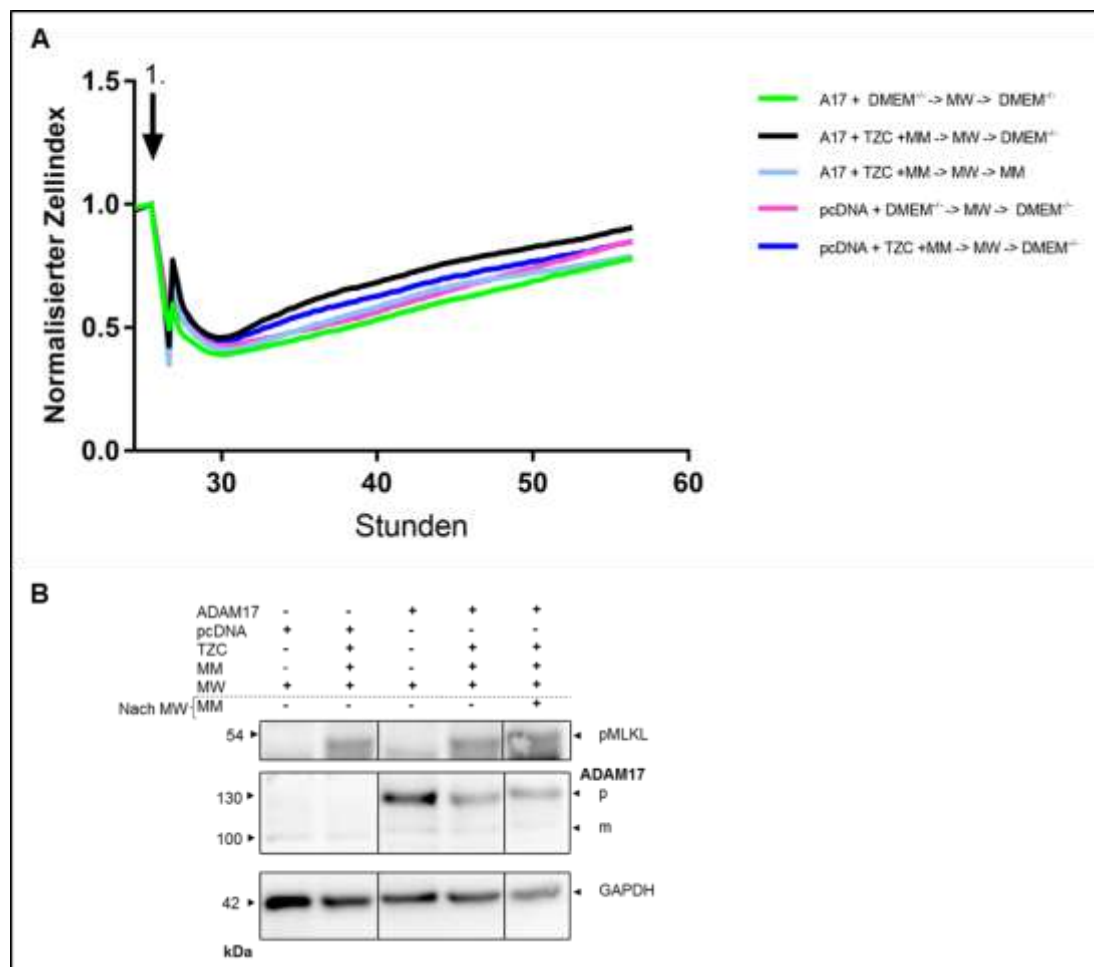


Abbildung 24: Impedanzmessung bei ADAM17-transfizierten HT29-Zellen

A: Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch über 60 h, mit Normalisierung auf 1 zum Zeitpunkt des Überstandstransfers (1.) aus n=3. Für die Überstandsgenerierung wurden in HT29-Zellen 0,5 µg ADAM17- Plasmid oder 0,5 Leervektor (pcDNA) transfiziert und 24 h später in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 µM zVAD (Z) und 5 µg/ml Cycloheximid (C) für 3 h stimuliert, ehe das Medium gewechselt (MW) wurde und die Zellen weitere 2 h in DMEM^{-/-} inkubierten. Anschließend wurde der Überstand auf neue HT29-Zellen im xCELLigence übertragen. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation mit TC. 10 µM Marimastat (MM) wurde entweder 15 min vor TC oder direkt im Anschluss des Mediumwechsels hinzugegeben. **B:** *Western Blot*-Analyse zur Proteinladekontrolle (GAPDH), der Nekroptose (pMLKL) und der ADAM17-Transfektion (ADAM17). A17=ADAM17; P=Proform; m=mature Form

Insgesamt fielen die Unterschiede zwischen den einzelnen Kurven nicht deutlicher als in Abbildung 22 aus. Zusätzlich zu der Auftragung im xCELLigence wurden Kontrollfärbungen für die ADAM17-Transfektion und eine Proteinladekontrolle im *Western Blot* von den stimulierten Zellen für die Überstandsgenerierung durchgeführt. Hier ist auffällig, dass gerade bei der ADAM17-Transfektion in dem Ansatz, bei dem anschließend keine Stimulation erfolgte, eine starke Bande auf Höhe der Proform von ADAM17 zu erkennen ist (Abbildung 24B).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass HT29-Zellen mit dem Überstand von nekroptotischen HT29-Zellen vermehrt proliferieren. Zudem scheint die ADAM17-

Überexpression diesen Effekt zu verstärken. Diese erkennbare Tendenz sollte in weiteren Versuchen untersucht werden.

4.6.5 Rolle des EGF-Rezeptors für die Proliferation der Nachbarzellen von nekroptotischen Zellen

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob einer der entscheidenden Rezeptoren für das Wachstum von Zellen im nekroptotischen Milieu der EGF-Rezeptor selbst ist. Bisher konnte gezeigt werden, dass das ADAM17-Substrat TGF- α als EGF-R-Ligand während der Nekroptose vermehrt freigesetzt wird und sich dieser im Überstand befindet. Es stellt sich die Frage, ob dies ausreicht, den EGF-Rezeptor zu aktivieren.

Dafür wurde im xCELLigence die Tyrosinkinase-Rezeptorantwort betrachtet, zu deren Gruppe auch der EGF-Rezeptor zählt. Der Unterschied zur Vorgehensweise bei den vorherigen xCELLigence-Versuchen ist der betrachtete Zeitraum, der für die Rezeptorantwort nur bei einigen Minuten lag. Durch die Aktivierung von Rezeptoren kommt es zu kurzzeitigen morphologischen Zellveränderungen, die eine Veränderung im Zellindex herbeiführen (Abbildung 25).

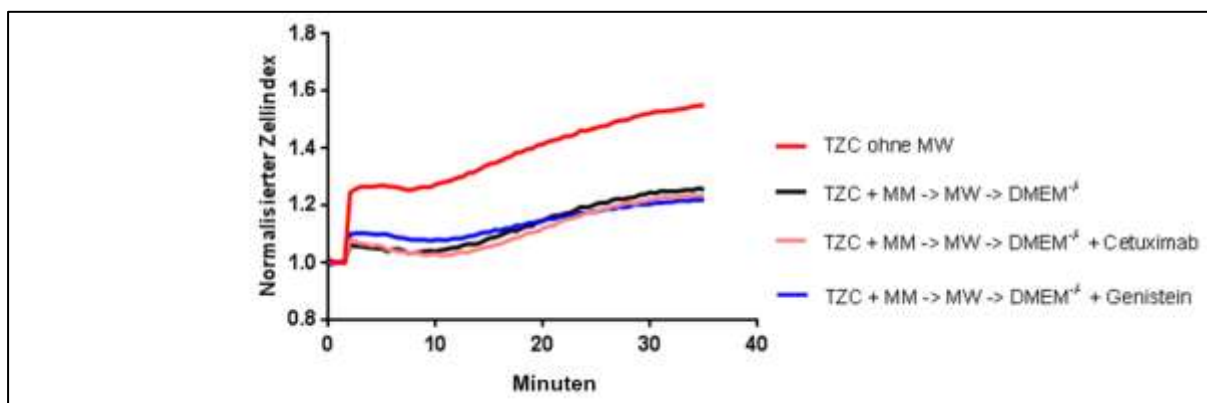


Abbildung 25: EGF-Rezeptor-Aktivierung nach Überstandstransfer

24 h nach Aussaat von 10.000 HT29-Zellen im xCELLigence wurden 100 μ l DMEM^{-/-} für 4h hinzugegeben. Eine Viertelstunde vor dem anschließenden Überstandstransfer von nekroptotischem Überstand wurden die Zellen mit 10 μ g/ml Genistein oder 10 μ g/ml Cetuximab vorinkubiert. Anschließend wurde 100 μ l des Überstands in die Wells transferiert. Für die Überstandsgenerierung wurden HT29-Zellen in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z) und 5 μ g/ml Cycloheximid (C) für 3 h stimuliert, ehe das Medium gewechselt (MW) wurde und die Zellen weitere 2 h in DMEM^{-/-} inkubierten. Bei einem Ansatz wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor der Stimulation mit TC. 10 μ M Marimastat (MM) wurde entweder 15 min vor der Stimulation mit TC oder direkt im Anschluss des Mediumwechsels hinzugegeben. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch aus n=3.

Hierbei dient ein Überstand, bei dem kein Mediumwechsel stattgefunden hat, als Positivkontrolle, da hier die meisten Wachstumsfaktoren freigesetzt werden konnten (rot). Für die weiteren Ansätze wurden jeweils Überstände mit MM vor dem Mediumwechsel gewählt, da auch hiermit die größte Freisetzung von Wachstumsfaktoren erzielt wurde. Um den EGF-Rezeptor zu inhibieren, wurde mit Cetuximab (rosa) ein spezifischer und mit Genistein (blau)

ein Breitband-Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitor verwendet. Diese wurden 15 Minuten vor dem Überstandtransfer auf die HT29-Zellen auf der E-Platte im xCELLigence gegeben. Die schwarze Kurve entsprach der Reaktion auf den nekroptotischen Überstand, der keine weitere Inhibition nach dem Mediumwechsel erfahren hat (schwarz). Zu beobachten war, dass die Positivkontrolle am stärksten mit einer Veränderung des Zellindex auf den neuen Überstand reagierte. In den ersten zwei bis drei Minuten stieg dieser steil auf einen Wert von 1,25, ehe eine Stagnation eintrat und dieser nach weiteren 10 Minuten wieder anstieg (rot). Bei einem längeren Beobachtungszeitraum würde diese Kurve später abfallen, da der Zelltod wie in Abbildung 19 ausgelöst werden würde. Bei den Überständen von nekroptotischen Zellen mit Mediumwechsel waren, unabhängig davon ob eine EGF-Rezeptor-Inhibition erfolgte, jeweils kurze Anstiege des Zellindex nach Überstandtransfer auf etwa 1,1 zu beobachten. Auch im weiteren Verlauf verliefen die Kurven trotz der Inhibition mit Genistein oder Cetuximab relativ parallel zwischen einem Zellindex von 1,0 bis 1,2. Ein Unterschied zwischen der Inhibition des EGF-Rezeptors bzw. aller Tyrosinkinasen-Rezeptoren und keiner Inhibition dieser Rezeptoren konnte in den ersten 15 Minuten nicht beobachtet werden.

Eine weitere Möglichkeit die Aktivierung vom EGF-Rezeptor nachzuweisen, ist die Kontrolle auf Proteinebene mittels Betrachtung der Signalkaskade des EGF-Rezeptors. Hierfür inkubierten HT29-Zellen mit den generierten Überständen von nekroptotischen Zellen für 15 Minuten auf normalen 12-Well-Platten. Anschließend erfolgte eine immunologische Färbung im *Western Blot* für ERK1 und ERK2 und deren phosphorylierte aktivierte Formen. Diese stellen nachgeschaltete Proteine in der Signalkaskade des EGF-Rezeptors dar (Abbildung 26). Die Überstände wurden, wie in Abbildung 25 beschrieben, generiert.

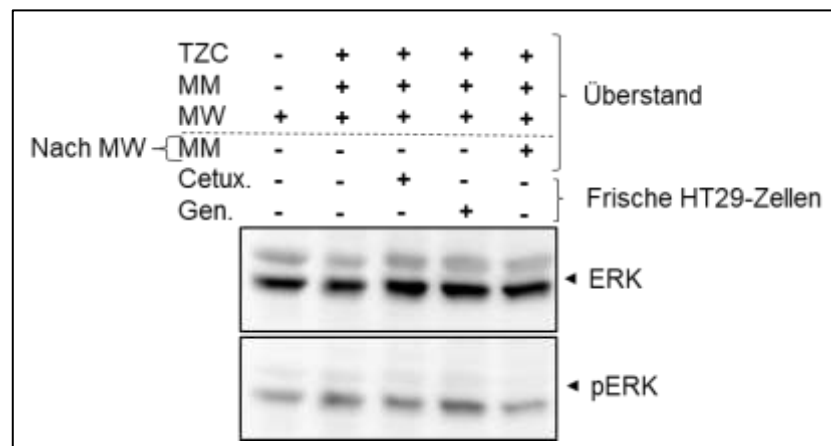


Abbildung 26: MAP-Kinasen-Aktivierung bei Überstandstransfer von nekroptotischen HT29-Zellen
 Der Überstand von HT29-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml kTRAIL (T), 50 μ M zVAD (Z) und 5 μ g/ml Cycloheximid (C) nach einem Mediumwechsel (MW) nach 3 h für weitere 2 h in DMEM⁻ stimuliert. Anschließend wurde der Überstand auf neue konfluente HT29-Zellen auf eine 12-Well Platte transferiert. Die Vorinkubation mit zVAD erfolgte 30 min vor Stimulation mit TC. 10 μ M Marimastat wurde entweder 15 min vor TC oder direkt im Anschluss des Mediumwechsels hinzugegeben. Die Vorinkubation der konfluente HT29-Zellen mit 10 μ g/ml Genistein (Gen.) oder 10 μ g/ml Cetuximab (Cetux.) erfolgte 15 min bevor der Überstand transferiert wurde. Die HT29-Zellen inkubierten 15 min im Überstand. Anschließend wurden die Zelllysate im *Western Blot* analysiert (n=3).

Es fiel auf, dass die Inhibition von Metalloproteasen durch MM vor bzw. nach dem Mediumwechsel nichts an dem Phosphorylierungslevel von ERK1 und ERK2 verändert. Wurden die HT29-Zellen mit Genistein und Cetuximab vorinkubiert, bevor sie den Überstand erhalten haben, hatte auch dies keinen signifikanten Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1 und 2. Dadurch wird deutlich, dass der EGF-Rezeptor bzw. die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren vermutlich keine Rolle für die Proliferation von Gewebe in nekroptotischem Milieu spielen.

5 Diskussion

Während für die Nekroptose der Signalweg und die Beteiligung an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen weitestgehend bekannt ist, sind die inflammatorischen Vorgänge und Konsequenzen in der aktuellen Forschung noch nicht näher untersucht. Ziel dieser Arbeit war es die Aktivierung und Bedeutung für inflammatorische Prozesse von ADAM10 und ADAM17 während der Nekroptose zu untersuchen. Die Datensammlung dieser Arbeit fand von Oktober 2015 bis Juli 2016 statt. Im Juli 2016 haben Cai et. al eine Arbeit veröffentlicht, in denen sie zeigen konnten, dass unter nekroptotischen Bedingungen eine Aktivierung des ADAM9-, ADAM10- und ADAM17- vermittelten *Sheddings* stattfindet, es zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Proteinen und zu einer gesteigerten Zellmigration kommt (Cai et al., 2016). Überschneidungen thematischer Inhalte sind somit unvermeidbar.

5.1 Nekroptose führt zu einer Erhöhung und einem Wechsel des ADAM17- zu ADAM10-vermittelten *Sheddings*

Während des Zelltodprozesses sind zahlreiche Metalloproteasen aktiv. Es ist schon länger bekannt, dass während der Apoptose die proteolytische Freisetzung von ADAM10- und ADAM17-Substraten wie zum Beispiel des IL-6-Rezeptors signifikant erhöht ist (Chalaris et al., 2007). Auch während der Nekrose ist die Freisetzung des IL-6-Rezeptors beobachtet und mit der inflammatorischen Antwort in Verbindung gebracht worden (Vanden Berghe et al., 2006). Ob ADAM10 und ADAM17 auch in anderen programmierten Zelltodwegen zum Zelltod beitragen oder anderweitig eine Rolle spielen, war bisher nicht bekannt. Die Nekroptose ähnelt dem Erscheinungsbild der Nekrose und führt zum Zelltod mit einer einhergehenden inflammatorischen Antwort des Körpers (Pasparakis und Vandenabeele, 2015). Der Gedanke, dass ADAM10 und ADAM17 hierbei eine Rolle spielen, ist nicht abwegig. Unter den über 100 bekannten membrangebundenen ADAM-Substraten sind unter anderem Zytokine wie das TNF- α , welche die proinflammatorische Signalkaskade befeuern (Khokha et al., 2013; Reiss und Saftig, 2009).

Bei den beiden ADAM10- und ADAM17-Substraten IL-6-Rezeptor (Abbildung 8) und TGF- α (Abbildung 11) konnte eine signifikante Erhöhung der Freisetzung während der Nekroptose gezeigt werden. Für die Beteiligung beider Metalloproteasen spricht, dass es durch die Inhibition mit MM, dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI sowie ADAM10- und ADAM17-spezifischen Inhibitor GW zu einer signifikanten Reduktion der Freisetzung gekommen war. Ursächlich für die Aktivierung schien der nekroptotische Zelltod zu sein, da die Inhibition der Nekroptose durch Nec-1s und NSA ebenfalls zu einer Reduzierung der beiden freigesetzten

Substrate führte. Unter physiologischen Umständen werden TGF- α und der IL-6-Rezeptor hauptsächlich von ADAM17 freigesetzt (Edwards et al., 2009). Interessanterweise ließ sich unter Einfluss der Nekroptose in HT29-Zellen eine vermehrte Beteiligung von ADAM10 an der Freisetzung des IL-6-Rezeptors beobachten. Während der Apoptose führte die Hinzugabe von GW im Gegensatz zu GI zu einer signifikanten Abnahme des *Sheddings* vom IL-6-Rezeptor, sodass hier ADAM17 die Rolle als *Hauptsheddase* einnahm (Abbildung 8A). Wurde das *Shedding* für den IL-6-Rezeptor und TGF- α während der Nekroptose betrachtet, war der inhibitorische Effekt durch GI vergleichbar mit dem GWs. Somit fand hier eine Verlagerung des ADAM17-vermittelten *Sheddings* des IL-6-Rezeptors hin zu einer Freisetzung durch ADAM10 statt (Abbildung 8B und Abbildung 11). Die Aktivierung der ADAMs während der Nekroptose konnte ebenfalls durch eine weitere Arbeitsgruppe gezeigt werden (Cai et al., 2016). Cai et al. konnten auch eine erhöhte Freisetzung von weiteren Substraten unter nekroptotischen Bedingungen der proteolytisch-aktiven ADAMs zeigen. Für die HT29-Zellen konnten sie neben ADAM10 ADAM9 als *Hauptsheddase* identifizieren. ADAM17 hingegen wurde mit ADAM10 für das *Shedden* in MEF- (*mouse embryo fibroblast*) und L292-Zellen in Verbindung gebracht. Durch den ADAM10- und ADAM17-*Knockout* konnte das *Shedden* von Zelloberflächenproteinen in den beiden Zelllinien verhindert werden (Cai et al., 2016).

Auffällig war, dass es bei Cai et al. schon vor morphologischen Veränderungen der Zelle zu einer Auflösung von Zell-Zell-Kontakten kommt. Ursächlich dafür war die Aktivierung von ADAM10 und die Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin. Dabei ließ sich dies nur durch eine Inhibition von Metalloproteasen und nicht von Cystein- und Serinproteasen verhindern (Cai et al., 2016). E-Cadherin ist ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül und von großer Bedeutung für die Zellhomöostase (Reiss und Saftig, 2009). Eine genaue Regulation ist für die Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Zell-Kontakte unverzichtbar. Fehlregulationen von ADAM10 können zu einem erhöhten *Shedding* von E-Cadherin führen, die mit dem Verlust der Zelladhäsion und dem Ansteigen von Zellmigration assoziiert werden (Maretzky et al., 2005). Ähnliches gilt für das ADAM10-Substrat VE-Cadherin (*vascular endothelial*), welches die Permeabilität von Endothelzellen erhöht (Schulz et al., 2008). Für das E-Cadherin konnte gezeigt werden, dass das Nekroptose-induzierte *Shedding* zu einer Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und zu einer Zellmigration führte (Cai et al., 2016). Dies könnte eine essentielle Rolle bei der Metastasierung von Tumoren einnehmen. Strilic et al. konnten zeigen, dass Tumorzellen über den *Death Receptor 6* Nekroptose in Endothelzellen auslösen. Dies würde wiederum die Aktivierung von ADAM10 und das Auflösen von Zell-Zell-Kontakten inklusive des Herauslösen der Endothelzellen aus dem Zellverbund bedeuten. Eine Extravasation von Tumorzellen ins umliegende Gewebe könnte nun stattfinden. Zudem könnte die Freisetzung von *DAMPs* durch nekroptotische Zellen weitere Endothelzellen zur Zellmigration anregen

(Strilic et al., 2016). Denkbar wäre es, über ADAM10 gezielt auf die Metastasierung von Tumorzellen einzuwirken. Hier besteht ein Bedarf an intensiver Nachforschung.

Von besonderer Bedeutung wäre ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von Zell-Zell-Kontakten und inflammatorischen Hauterkrankungen. Wurde RIPK3 in Mäusen ausgeschaltet, waren diese vor Hautentzündungen geschützt. Es wird angenommen, dass, sollte Caspase-8 oder FADD in der Epidermis fehlen, RIPK3-abhängige Nekroptose in den Keratinozyten stattfindet und für die inflammatorische Antwort ursächlich ist (Bonnet et al., 2011; Weinlich et al., 2013). Die Toxische Epidermale Nekrolyse (TEN) im Rahmen des Steven-Johnson-Syndrom ist eine zytotoxische Reaktion auf Medikamente (zum Beispiel Allopurinol) und ist gekennzeichnet durch das blasige Ablösen der Epidermis von über 30 Prozent der Hautoberfläche mit lebensbedrohlichen Folgen (Moll, 2010). Interessanterweise ist die TEN mit der Nekroptose assoziiert (Saito et al., 2014). In TEN-Hautarealen konnte eine pMLKL-Expression gezeigt werden (Kim et al., 2015). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Nekroptose und dem phänotypischen Auftreten der TEN könnte die Aktivierung von ADAM10 in Keratinozyten, dem anschließenden Verlust von Zelladhäsionsmolekülen und dem Ablösen der Oberhaut sein. Um zu überprüfen, ob ADAM10 zu dem Erscheinungsbild der TEN beiträgt, müssten Gewebeschnitte von Patienten auf eine erhöhte Expression und Substratfreisetzung der ADAMs untersucht werden. Ähnlich zur TEN geht die *Dermatitis ekzematosa* auch mit einer Blasenbildung einher. Es ist noch nicht bekannt, ob die Nekroptose hier eine Rolle spielt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte ADAM10-Aktivität mit der Blasenbildung einhergeht und gleichzeitig eine signifikante Erhöhung von E-Cadherin-Spaltprodukten in den Blasenarealen zu finden ist (Maretzky et al., 2008). Hier wäre der Ansatz zu untersuchen, ob nicht die Nekroptose, ähnlich wie bei der TEN, für die ADAM10-Aktivierung verantwortlich ist. Dafür könnten Gewebeschnitte von Patienten mit *Dermatitis ekzematosa* auf die Effektorproteine der Nekroptose gefärbt werden. Sollte ein Zusammenhang darstellbar sein, kann Nekroptose-vermittelte Aktivierung von ADAM10 für die TEN und für die *Dermatitis ekzematosa* als möglicher Angriffspunkt für die Behandlung der Erkrankungen betrachtet werden. Weitere inflammatorische Erkrankungen bei denen E-Cadherin bzw. ADAM10 bedeutsam erscheinen, sind inflammatorische Darmerkrankungen. Erst vor kurzem konnte in Proben von betroffenen Patienten gezeigt werden, dass es unter der Nekroptose zu einer Auflösung der Zell-Zell-Kontakte kam. Verantwortlich schien hierfür RIP3-aktiviertes pMLKL zu sein (Negroni et al., 2017). In Zukunft sollte zudem auch eine alleinige Betrachtung bezüglich der ADAM17-Aktivierung während der Nekroptose erfolgen. Diese sollte selbstverständlich auch in anderen Zelllinien als den HT29-Zellen stattfinden. ADAM17 ist ein potenter *Trigger* von inflammatorischen Erkrankungen (Jürgen Scheller et al. 2011; Lisi et al. 2014). Das

Verständnis der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 könnte einen wesentlichen Beitrag für die Bedeutung der Nekroptose in inflammatorischen Prozessen darstellen.

Wie es zur Aktivierung von ADAM10 während der Nekroptose kommt, bleibt hierbei unklar. Die Phosphorylierung von MLKL wird als letzter Schritt der Nekroptose betrachtet. Das durch RIP3 phosphorylierte MLKL oligomerisiert, gelangt an die Zellmembran und führt anschließend noch auf ungeklärte Art und Weise zum Zelltod. Ob die Aktivierung von Ionen-Kanälen, die Bildung eines Ionen-Kanals oder andere Mechanismen letztendlich zur Nekroptose führen, ist noch zu klären (Vanden Berghe et al., 2014). Cai et al. vermuten den Aktivierungsschritt von ADAM10 während der Nekroptose an der Zellmembran. Sie gehen von einer Komplexbildung zwischen pMLKL und ADAM10 aus, die zu einer Aktivierung der Protease führt. Inwieweit die Protease dadurch aktiviert wird, ist unbekannt. Diese Komplexbildung fand wiederum nur statt, als RIP3 zuständig für die Phosphorylierung von MLKL war. Gerade in HT29-Zellen scheint der Zusammenschluss von pMLKL nur mit ADAM10 bzw. unter ADAM10-*Knockdown* auch mit ADAM9 zu funktionieren (Cai et al., 2016). Dies könnte der Grund sein, warum ADAM17 zur gleichen Zeit während der Nekroptose nicht aktiviert ist. Wieso ADAM17 keine Komplexbildung mit pMLKL eingehen kann, bleibt unklar. Ein möglicher Grund für eine fehlende Komplexbildung könnte die geringe Expression von ADAM17 in HT29-Zellen sein (Abbildung 15). Daher wäre es möglich, dass ADAM10 und ADAM9, wie schon in anderen Situationen nachgewiesen, die Funktion von ADAM17 übernehmen (Sahin et al., 2004). Für ADAM10 ist zudem bekannt, dass Proteasen aus der ADAM-Familie (ADAM9 und ADAM15) die Protease selbst *shedden* können (Tousseyn et al., 2009).

Bei ADAM17 ist die Bindung an PtdSer in der äußeren Zellmembran erforderlich, um die Protease zu aktivieren (Sommer et al., 2016). Auch für ADAM10 konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Membraninteraktion mit PtdSer das *Shedding* triggert (Bleibaum et al., 2019). Es wäre denkbar, dass auch im Zusammenhang mit der Nekroptose-abhängigen Aktivierung von ADAM10 PtdSer eine Rolle einnimmt. Es wäre möglich, dass PtdSer zur Komplexbildung von pMLKL und ADAM10 beiträgt oder der Komplex erst entstehen muss, damit es zur Bindung mit PtdSer kommen kann. Zudem wäre von Interesse, ob pMLKL selbst die Funktion einer Scramblase einnehmen kann und womöglich PtdSer oder andere Phospholipide innerhalb der Zellmembran transportieren kann. An der Zellmembran scheint pMLKL über positive Bindungsstellen mit dem in der inneren Zellmembran gelegenen Phospholipid Phosphatidylinositol-Phosphat zu interagieren. Dies spricht daher schon für ein elektrostatisches Zusammenspiel bei der Interaktion von pMLKL und der Zellmembran (Dondelinger et al., 2014; Wang et al., 2014). Ob diese elektrostatische Bindung einen Einfluss auf die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 hat, ist noch ungewiss. Eine mögliche

Untersuchung wäre die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 unter Ausschaltung oder Belegung der positiven Aminosäuren in den helikalen Bindungstellen von pMLKL.

Interessant ist auch, dass die Aktivierung der ADAMs während der Nekroptose mit keiner Veränderung in der Metalloproteasen-Aktivität einhergeht (Abbildung 12). Um diese Frage zu prüfen, wurde ein Peptidsubstrat-Assay durchgeführt. Dieser zeigte zwar eine erhöhte Peptidsubstratumsetzung unter der Nekroptose, diese war jedoch nicht auf Metalloproteasen zurückzuführen, wie das inhibitorische Profil klar zeigte. Offensichtlich scheinen weitere Protease-Gruppen während der Nekroptose aktiviert oder als Vesikel freigesetzt zu werden. In den Fokus könnten dabei die Serinproteasen rücken. Die Inhibition von *HtrA serine peptidase 2* (HTrA2/Omi), die als mitochondriale Serinprotease bekannt und unter anderem mit neurodegenerativen Prozessen assoziiert ist, verhindert gänzlich den regulierten Zelltod. Durch die Inhibition von Metallo-, Cystein oder Cathepsinproteasen ist dies nicht gelungen (Sosna et al., 2013). Weil aber die Inhibition nachgeschalteter Proteasen unter HtrA2/Omi wie zum Beispiel der *ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1* (UCH-L1) nicht jede Form von Nekroptose verhindern konnte, ist anzunehmen, dass die Nekroptose je nach Auslöser und Situation verschiedenen proteolytischen Aktivierungs- und Regulierungsschritten unterliegt (Fuchslocher Chico et al., 2017; Sosna et al., 2016).

Zusammengefasst führen die Ergebnisse zur Untersuchung der ADAM10-Aktivierung zu dem in Abbildung 27 abgebildeten Schaubild.

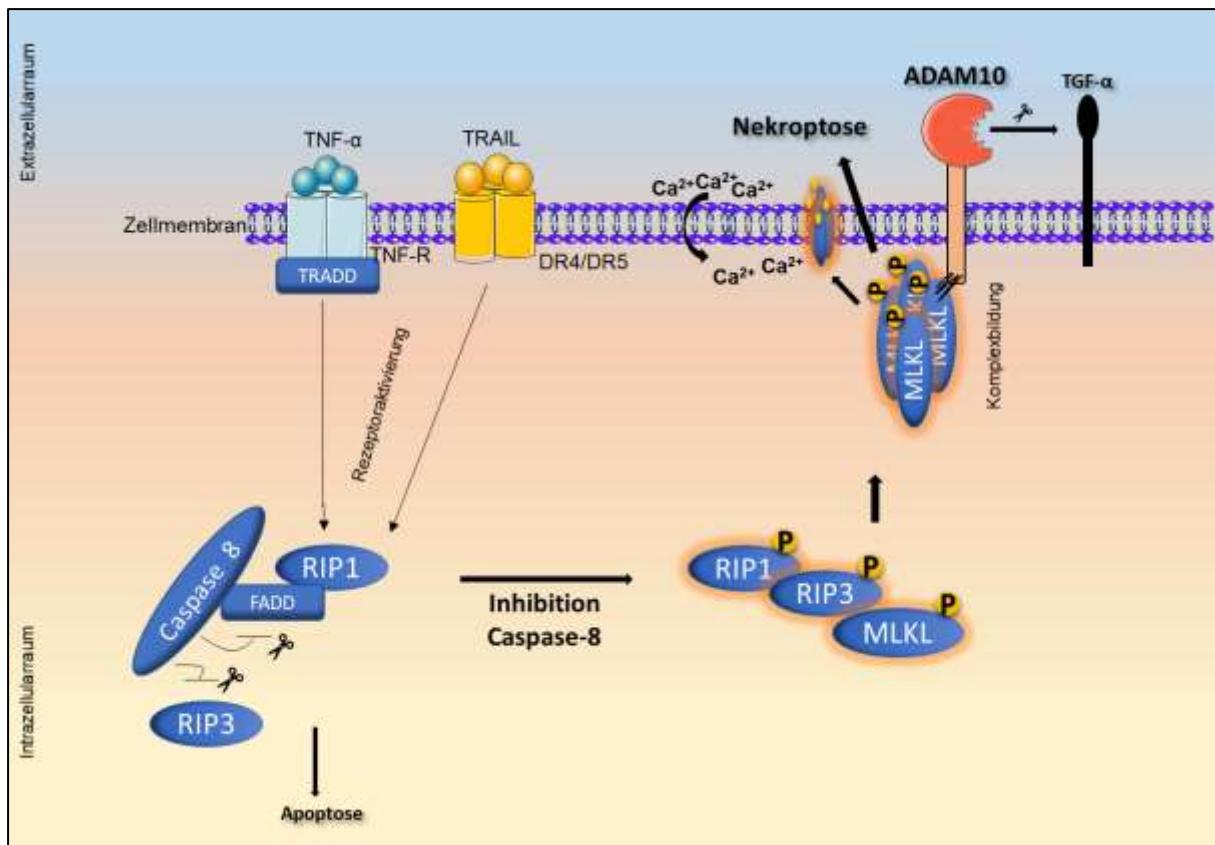


Abbildung 27: ADAM10-Aktivierung während der Nekroptose mit Beispiel des E-Cadherin-Sheddings
 Die Aktivierung des Nekrosoms bestehend aus RIP1 (*interacting Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), RIP3 und MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*) durch die Stimulation des TNF-Rezeptors (TNF-R) (*tumor necrosis factor*) durch TNF-α oder der Todesrezeptoren 3 oder 4 (*death receptor*) durch TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) erfolgt wie in Abbildung 4 beschrieben. Das phosphorylierte MLKL gelangt zur Zellmembran und vermittelt wahrscheinlich den nekroptotischen Zelltod durch die Bildung eines Ionenkanals oder durch den unkontrollierten Einstrom von Ionen. Im Zuge dessen kommt es vermutlich zu einer Komplexbildung und Aktivierung von ADAM10, welche wiederum die Freisetzung von TGF-α bewirken können. Während der Nekroptose kommt es offensichtlich zu einem Wechsel von einem ADAM17- hin zu einem ADAM10-vermittelten *Shedding*.

5.2 Nekroptotische HT29-Zellen externalisieren Phosphatidylserin vor Ruptur der Zellmembran

Während der Nekroptose steigt die ADAM10-*Sheddase*-Aktivität in HT29-Zellen signifikant an. Daher stellt sich zwangsläufig die Frage, wie die Aktivierung stattfindet. Die Bindung zwischen der MPD von ADAM17 bzw. der *stalk*-Region von ADAM10 und PtdSer an der äußeren Zellmembran ist als letzter Aktivierungsschritt vor einer Substratspaltung erforderlich (Bleibaum et al., 2019; Sommer et al., 2016). Bekannt ist, dass der Aufbau der Zellmembran einen Einfluss auf die Regulation der *Sheddasen* hat (Reiss und Bhakdi, 2017). Der Verlust der Zellmembranasymmetrie, zum Beispiel in Form der PtdSer-Externalisierung, spielt dabei nicht nur für die ADAMs eine wichtige Rolle. Der Zusammenbruch der Zellmembranstruktur ist oft gleichbedeutend mit dem Funktionsverlust und dem Tod der Zelle. Bei der Apoptose ist

diese Zellmembranzumstrukturierung mit dem Erkennungszeichen der PtdSer-Externalisierung von entscheidender Bedeutung (Fadok et al., 1992). Während der Nekrose konnte bisher nur vereinzelt ein ähnliches Phänomen beobachtet werden (Krysko et al., 2004; Waring et al., 1999). Die Situation während der Nekroptose war dahingegen zum Zeitpunkt der Datenerhebung ungeklärt.

Interessanterweise externalisierten nekroptotische HT29-Zellen nach etwa zweieinhalb Stunden PtdSer (Abbildung 13). Dabei ist zu bemerken, dass dies passierte, bevor es zu einem Verlust der Zellmembranintegrität kam, da die Zellen zwar ein Annexin- aber kein PI-positives Signal zeigten. Dies bedeutet, dass der Transport von PtdSer in HT29-Zellen während der Nekroptose zur äußeren Zellmembran ähnlich der Apoptose ein frühes Phänomen ist. Dass erst nach etwa dreieinhalb bis vier Stunden die ersten PI-positiven Zellen zu erkennen waren, obwohl die Nekroptose in HT29-Zellen durch pMLKL im *Western Blot* schon nach drei Stunden nachgewiesen werden konnte, liegt an dem schnellen Prozess der Phosphorylierung, welcher vor der Interaktion von pMLKL mit der Zellmembran stattfindet. Das PI gelangte dementsprechend zu einem späteren Zeitpunkt in die Zellen und färbte diese zeitversetzt an.

Inzwischen konnten auch andere Arbeiten eine PtdSer-Externalisierung bei nekroptotischen Zellen zeigen (Zargarian et al., 2017). Zargarian et al. konnten nach 4 Stunden in HaCaT-Zellen und in U937-Zellen nach eineinhalb Stunden eine PtdSer-Externalisierung beobachten. Auffällig war, dass dieser Effekt unter Einsatz von Nekroptose-Inhibitoren vollständig ausblieb. Sie beschreiben ebenfalls die Notwendigkeit von der Interaktion von pMLKL mit der Zellmembran (Zargarian et al., 2017). Passend zum gezeigten PtdSer-Flip (Abbildung 13) haben Cai et al. die schon beschriebene Membraninteraktion von pMLKL und ADAM10 erst nach 4 Stunden gezeigt. Die Interaktion zwischen dem Komplex aus pMLKL und ADAM10 mit PtdSer wäre nun möglich und würde mit der frühen Aktivierung der ADAMs, die Cai et al. gesehen haben in Einklang stehen (Cai et al., 2016). Außerdem könnte es auch ein Grund dafür gewesen sein, dass in den ersten Versuchen dieser Arbeit unter NSA undeutliche Effekte bei der Substratspaltung des IL-6-Rezeptors zu beobachten waren (Abbildung 8). Durch die Inhibition von pMLKL fand keine Interaktion mit PtdSer und somit auch keine Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 statt. Dabei bleibt abzuwarten, ob dies durch eine direkte Stimulation funktioniert, pMLKL die Rolle als Scramblase einnimmt oder andere Mechanismen eine größere Rolle spielen.

Von besonderer Bedeutung für die PtdSer-Externalisierung und eine anschließende ADAM10- und ADAM17-Aktivierung ist die Scramblase ANO6 (Bleibaum et al., 2019; Veit et al., 2018). Daher stellte sich die Frage, ob ANO6 eine Rolle während der Nekroptose einnimmt und gegebenenfalls für die PtdSer-Externalisierung mitverantwortlich ist. Für die Freisetzung von

TGF- α schien ANO6 aufgrund des nicht vorhandenen Unterschieds zwischen ANO6- und kontrolltransfizierten HT29-Zellen keine Rolle einzunehmen (Abbildung 14). Inzwischen konnte während der Nekroptose zwar ein geringer Kalzium-Einfluss in die Zelle beobachtet werden, wobei dieser jedoch keinen Einfluss auf die ANO6-Aktivität zu haben scheint (Ousingsawat et al., 2016). ANO6 ist somit vermutlich auch für den nekroptotischen Zelltod nicht von Bedeutung. Welcher Phospholipid-Transporter für den PtdSer-Transport zur äußeren Zellmembran zuständig ist, bleibt damit unklar. Sollte in Zukunft dem PtdSer eine bedeutsame Rolle während der Nekroptose zugeschrieben werden, könnte dies ein weiteres Interventionsziel für das Eingreifen in die Nekroptose darstellen.

Fraglich ist auch die physiologische Relevanz der PtdSer-Externalisierung während der Nekroptose. Bemerkenswerterweise werden wohl ähnlich zur Apoptose *neuroptotic bodies* als eine Art Vesikel von nekroptotischen Zellen freigesetzt. Diese werden dann auch durch die PtdSer-Externalisierung als „eat-me“-Signal phagozytiert. Auch bei der Nekroptose scheint die Zelle somit das Immunsystem zu aktivieren (Zargarian et al., 2017). Gebildet werden diese Vesikel vermutlich mit Hilfe des *endosomal sorting complexes required for transport III* (ESCRT-III). Hier ist auch der beschriebene Kalzium-Influx von Bedeutung. Die Aktivierung des ESCRT-III kann so weit gehen, dass unter Inhibition von pMLKL in schon PtdSer-positiven nekroptotischen Zellen sich die Zelle selbständig reparieren und dem Zelltod entgehen kann. Beachtlich ist zudem, dass bei der Ausschaltung des ESCRT-III auf eine Caspasen-Inhibition für die Auslösung der Nekroptose verzichtet werden kann. In Zellen, wo nur eine geringe Aktivierung von MLKL stattfindet, könnte der Reperaturmechanismus von ESCRT-III das Zellüberleben ermöglichen oder der Zelle die Zeit verschaffen, Proteine zu exprimieren, die für die Antigen-Präsentation und den Abbau der nekroptotischen Zelle notwendig sind (Gong et al., 2017; Krysko et al., 2017).

Die Ergebnisse des PtdSer-Flips im Zusammenhang mit der ADAM-Aktivierung sind in Abbildung 28 zusammengefasst.

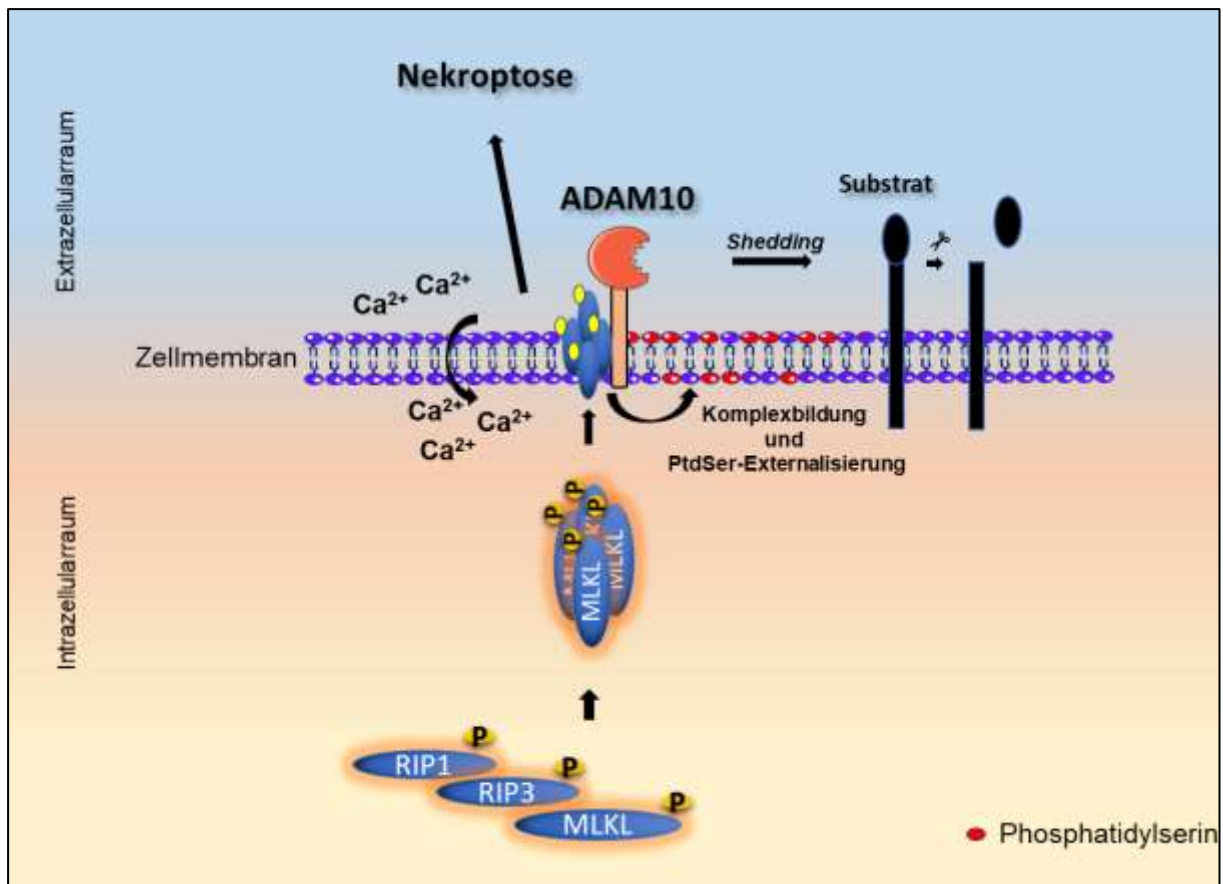


Abbildung 28: ADAM10-Aktivierung während der Nekroptose mit PtdSer-Flip

Wie schon in Abbildung 27 dargestellt, kommt es zur Aktivierung des Nekrosoms bestehend aus RIP1 (*interacting Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), RIP3 und MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*). Hier wird nur der weitere Signalweg an der Zellmembran dargestellt. Neben der beschriebenen Interaktion mit der Zellmembran, die auf noch ungeklärte Art und Weise zum Zelltod führt, kommt es zur Komplexbildung von MLKL mit ADAM10. Währenddessen findet eine Phosphatidylserin (PtdSer)-Externalisierung an der Zellmembran statt. Dies führt vermutlich zu einer Aktivierung von ADAM10 und nicht von ADAM17. Darüberhinaus werden vermehrt membrangebundene Substrate freigesetzt.

5.3 Die Aktivierung von ADAM17 bzw. ADAM10 kann den Zelltod nicht verhindern

Unter den ADAM10- und ADAM17-Substraten sind einige Wachstumsfaktoren und Zytokine, die für das Überleben einer Zelle benötigt werden. Die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 könnte dementsprechend Wachstumssignale für Zellen in der Umgebung freisetzen und ein Überlebenssignal darstellen. Dass nekroptotische Zellen in der Lage sind trotz aktiviertem pMLKL der Nekroptose zu entgehen, ist durch die Entdeckung des ECSRT-III Komplexes gezeigt worden (Gong et al., 2017). Die Grundüberlegung ist, dass durch die vermehrte proteolytische Aktivität die Todesrezeptordichte durch *Shedding* oder anderer Mechanismen, die nach einer Rezeptoraktivierung ablaufen, an der Oberfläche abnimmt. Für den TNF-Rezeptor wurde dieses Phänomen früh gezeigt. Die abnehmende Rezeptordichte geht mit einer verminderten Sensibilität gegenüber TNF- α einher, was zu einer

abgeschwächten Immunantwort führt (Peschon et al., 1998; Pocsik et al., 1994; Reddy, 2000). In HT29-Zellen wäre dies an einem schwächeren oder ausbleibenden Nachweis von pMLKL zu erkennen (Abbildung 29).

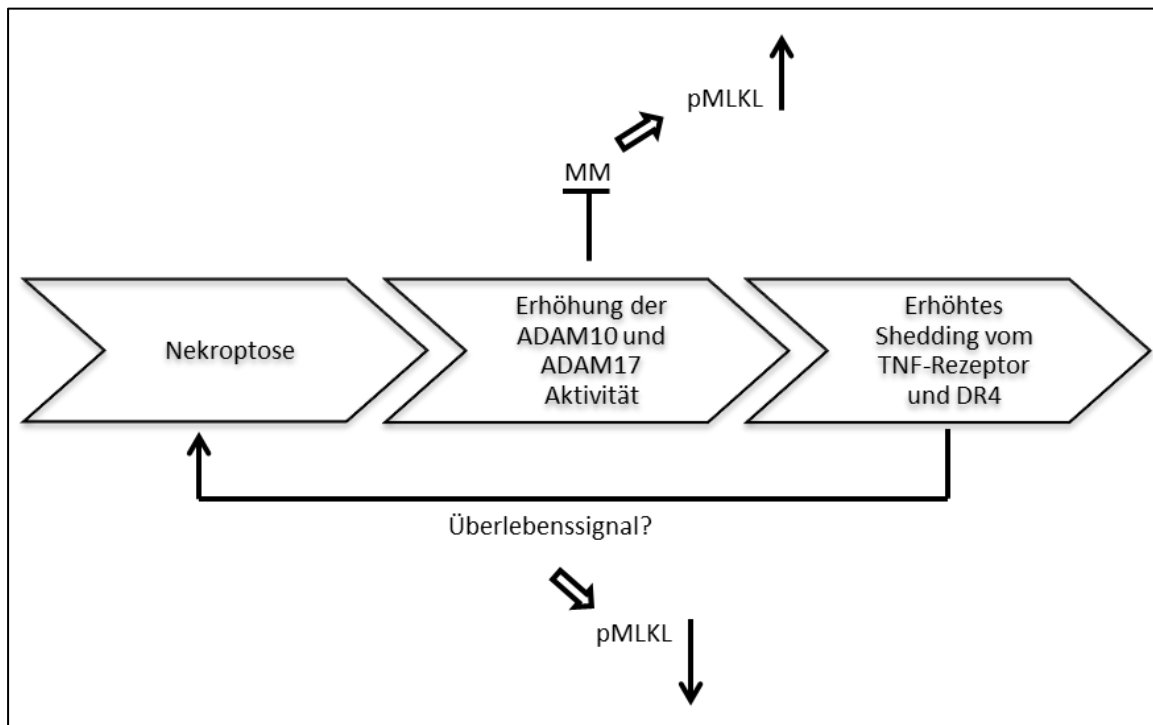


Abbildung 29: Flussdiagramm Überlebenssignal durch Erhöhung der ADAM10- und ADAM17-Aktivierung
 TNF-Rezeptor = Tumornekrosisfaktor-Rezeptor; DR4 = Death-Rezeptor 4 (auch: TRAIL-Rezeptor 1 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)); MM = Marimastat

Bei der Überexpression von ADAM17 war dies der Fall. Bei den ADAM17-überexprimierenden HT29-Zellen war das pMLKL-Signal schwächer (Abbildung 16). Aufgrund der geringen Expression von ADAM17 in HT29-Zellen (Abbildung 15) wurde das Modell der Überexpression verwendet. Interessanterweise war dieser Effekt auch morphologisch darstellbar (Abbildung 17). Nach 24 Stunden unter nekroptotischen Bedingungen überlebten mehr ADAM17-überexprimierende Zellen als bei einer Überexpression von ADAM9 und ADAM10. ADAM17 scheint den nekroptotischen Sterbeprozess nicht aufhalten zu können, könnte diesen aber verlangsamen. Nachträglich müssten an dieser Stelle die Zellen quantifiziert werden, um diesbezüglich eine sichere Aussage treffen zu können. Des Weiteren scheinen ADAM9 und ADAM10 eine größere Rolle in HT29-Zellen zu haben (Cai et al., 2016). Hierbei ist zu beachten, dass diese Überexpressionsversuche nicht den physiologischen Zustand der Zellen darstellte. Zudem erfolgte die Stimulation mit kTRAIL und es ist zumindest während der Apoptose nicht eindeutig, ob der TRAIL-Rezeptor von ADAMs *geshededet* wird (Liu et al., 2005; Mariani und Krammer, 1998). Ob dies auch für die Nekroptose zutrifft, ist nicht bekannt. Es

stellt sich daher die Frage, ob dieser überhaupt zu Überlebenszwecken durch ADAM10 und ADAM17 freigesetzt werden kann. Da jedoch auch bei einer Stimulation über den TNF-Rezeptor in U937-Zellen kein Überlebensseffekt während der Nekroptose beobachtet werden konnte, ist die Rolle der ADAMs für das Überleben der Zelle kritisch zu betrachten (Abbildung 18). Dennoch kann der Eingriff auf die Rezeptordichte durch ADAM10 und ADAM17 eine Möglichkeit von Zellen sein, um zu überleben. Dass dies funktionieren kann, konnte anhand des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*non-small lung carcinoma* (NSCLC)) gezeigt werden. Charakteristische Kennzeichen des NSCLC sind eine Überexpression des EGF-Rezeptors und seine ständige Aktivierung. Durch Einfluss auf den Notch1-Signalweg, der für die ADAM17-Maturierung notwendig ist, kann die Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors bei NSCLC-Zellen gesteuert und auf das Wachstum und Überleben der Tumorzellen eingegriffen werden (Baumgart et al., 2010). Dies könnten vielversprechende Therapiemöglichkeiten sein.

5.4 Das *Microenvironment* von nekroptotischen Zellen regt das Zellwachstum von HT29-Zellen unabhängig von ADAM10 und ADAM17 an

Die Aktivierung der Nekroptose in Apoptose-resistenten Tumoren gilt als eine hoffnungsvolle Therapiealternative für Krebs (Krysko et al., 2017; Philipp et al., 2016; Su et al., 2016). Die größte Gefahr bei der Nekroptose liegt zurzeit noch in der Unklarheit, welche Bedeutung die freigesetzten DAMPs und andere freigesetzte Moleküle für das Immunsystem und für das Überleben des Tumors haben (Chen et al., 2016). Hierbei ist es wichtig zu betrachten, ob die nekroptotische Immunreaktion nicht einen Vorteil zum Beispiel zur besseren Ausbreitung der Tumorzellen darstellen könnte. Es ist bekannt, dass inflammatorische Prozesse das Tumorstadium begünstigen (Grivennikov et al., 2010; Korniluk et al., 2017). In der Tat war ein schnelleres Wachstum und eine erhöhte Zelldichte von HT29-Zellen, die den Überstand von nekroptotischen Zellen erhalten haben, zu beobachten (Abbildung 22; Abbildung 23). ADAM10 und ADAM17 schienen hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen, da nur geringe Unterschiede zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit der HT29-Zellen in An- oder Abwesenheit von MM in den ersten 10-12 Stunden im xCELLigence-System festzustellen waren (Abbildung 22). Dennoch sind ADAM10 und ADAM17, aufgrund des stetig höheren Zellindex sowie vermutlich weitere Metalloproteasen nicht für das Wachstum von Zellen in nekroptotischem Milieu zu vernachlässigen. TGF- α diente hier nur als Beispiel für einen Wachstumsfaktor, der das Tumorstadium begünstigen könnte. Dass nekroptotische HT29-Zellen in dem Versuchsaufbau mit Mediumwechsel Wachstumsfaktoren freisetzen, konnte für TGF- α dargestellt werden. Im Versuchsaufbau wurde dieser trotz der nach dem

Mediumwechsel gemessenen geringen Konzentration im Überstand, auch wegen der Erfahrung im Umgang und Nachweis im hiesigen Labor, verwendet (Abbildung 20). Hierbei schien die Inhibition der Metalloproteasen vor dem Mediumwechsel diese in ihrer Funktion so einzuschränken, dass diese nach der Entfernung des Inhibitors effizienter *sheddeten*. Dies wurde in der erhöhten Freisetzung von TGF- α nach dem Mediumwechsel und keiner erneuten Zugabe von MM deutlich und erklärt damit die Kurve mit dem größten Zellindexanstieg und die größte Steigung in der Wachstumsgeschwindigkeit der HT29-Zellen (Abbildung 22 und Abbildung 23). Zudem wird inzwischen die Aktivierung der Oberflächenproteasen während der Nekroptose der frühen Phase des Zelltodes vermutet (Cai et al., 2016). Dies würde einerseits, die durch den Versuchsaufbau für das xCelligence bedingte geringe Konzentration an TGF- α mit dem Verwerfen des ersten Mediums, erklären und andererseits einen Grund für die erhöhte Freisetzung nach der Entfernung des Inhibitors darstellen. Um diesen Effekt auszuschalten, müsste es gelingen, den Todesliganden aus dem Überstand herauszufiltern, ohne jedoch weitere Proteine aus dem Überstand zu entfernen. Auch die Überexpression von ADAM17, um eine größere TGF- α -Konzentration im Überstand zu erreichen, führte zu keiner Vergrößerung der Unterschiede im Zellwachstum im xCELLigence (Abbildung 24). Dementsprechend ist es notwendig weitere Proteasen, Wachstumsfaktoren und freigesetzte Substrate zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Proliferation der umgebenden Zellen haben, unabhängig davon, ob sie durch ADAM10 und ADAM17 freigesetzt werden.

Einige der Schlüsselmoleküle im Nekroptose-Signalweg sind schon selbst als kanzerogen beschrieben (Liu et al., 2016). Im duktalem Pankreaskarzinom wurde zum Beispiel unter der Steuerung von RIP3 eine anhaltende Immunsuppression nachgewiesen, die den Tumor immer weiter wachsen ließ (Seifert et al., 2015). Aber nicht nur Moleküle innerhalb der Signalkaskade scheinen von besonderer Bedeutung. Wie schon beschrieben, begünstigte die Nekroptose durch die Freisetzung von Substraten gerade auch durch ADAM10 und ADAM17 das Tumorstadium und die Tumormigration (Cai et al., 2016; Strlic et al., 2016). Das *Shedding* von E-Cadherin scheint hier eine besondere Rolle einzunehmen. Speziell auch für die Fragmente des E-Cadherin ist ein kanzerogenes Potential im Hinblick auf Tumorstadium und Tumorstadium nachgewiesen worden (David und Rajasekaran, 2012). Dass die Aktivierung des Zelltodes nicht immer an das gewünschte Ziel führt, ist auch schon für die Apoptose bekannt. Beispielsweise konnte in Mäusen bewiesen werden, dass unter Umständen die Stimulation mit CD95L (Fas-Ligand) Tumore begünstigen kann. Weiterhin konnte in einigen Tumoren eine erhöhte Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden, was eine Tumorzellregeneration während einer Radiotherapie begünstigen kann (Chen et al., 2010; Huang et al., 2012).

Trotz dieser Beispiele gilt die Nekroptose weiterhin als vielversprechende Alternative für die Krebstherapie. Zum Beispiel führte die Nekroptose im Apoptose-resistenten kolorektalen Karzinom zu einer signifikanten Regression des Tumors (He et al., 2017). Interessanterweise ist es sogar möglich, mit Hilfe einer Impfung die Nekroptose im Gewebe von Mäusen zu aktivieren und ein *Microenvironment* zu erschaffen, welches als potenter *Trigger* für eine Immunantwort und einer einhergehenden Anti-Tumor-Immunität gilt (Aaes et al., 2016). Hierbei ist es auch gut möglich, dass ADAM10 und ADAM17 einen Beitrag für das *Microenvironment* schaffen. Weiterhin ist zu bemerken, dass in vielen Tumoren wie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) und dem Brustkrebs viele der Schlüsselmoleküle der Nekroptose signifikant reduziert sind (Hückendorf et al., 2016; Koo et al., 2015). Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass die Tumore sich vor der Nekroptose schützen, damit diese nicht in Regression gehen. Daher ist es wichtig, dass vor einer möglichen Therapie durch die Nekroptose die Expression der Zielmoleküle bestimmt werden. Nicht jeder Tumor würde auf die Aktivierung der Nekroptose reagieren (Wang et al., 2017).

Insgesamt ist aber die Indizierung der Nekroptose als Alternative für die Krebstherapie derzeit noch kritisch zu betrachten. Gerade im Gebiet der inflammatorischen Prozesse, die durch die Nekroptose verursacht werden, bedarf es weiterer Forschung. Insbesondere sollte dabei auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch Proteasen wie ADAM10 und ADAM17 der Fokus gesetzt werden, da diese gerade für inflammatorische Prozesse in verschiedenster Art und Weise ein Alleinstellungsmerkmal haben. Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Aktivierung stattfindet und ihre Rolle nicht zu vernachlässigen ist. Wichtig wäre es an dieser Stelle, weitere xCELLigence-Versuche zu generieren, in denen gezielt bestimmte ADAMs und weitere Proteasen inhibiert werden, um herauszufinden, welche der Proteasen einen besonderen Stellenwert für die Proliferation während der Nekroptose haben könnten.

Die Aktivierung von Proteasen und ihre Freisetzung von Wachstumsfaktoren ist exemplarisch in Abbildung 30 zusammengefasst.

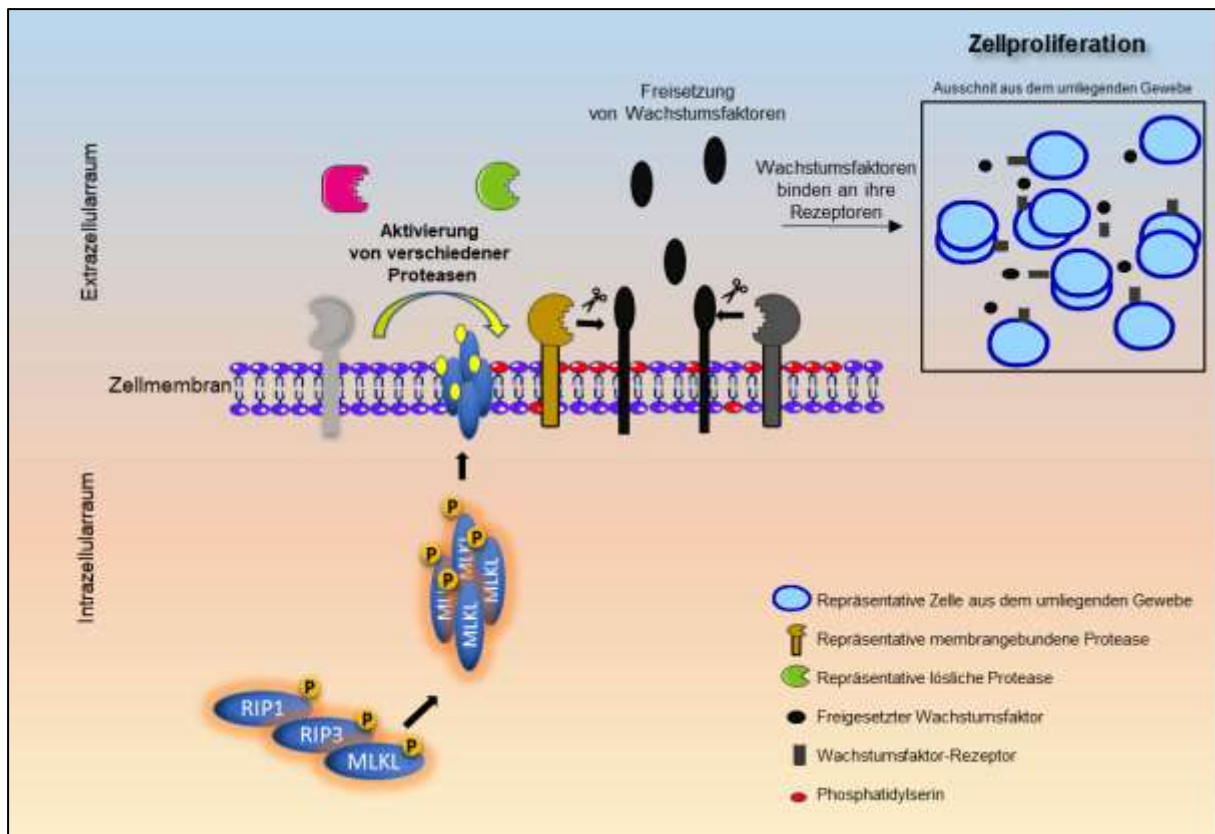


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der Zellproliferation während der Nekroptose

Die Aktivierung des Nekrosoms bestehend aus RIP1 (*interacting Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), RIP3 und MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*) erfolgt wie in Abbildung 4. Exemplarisch ist die Aktivierung von löslichen und membrangebundenen Proteasen während der Nekroptose dargestellt, die zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen. Diese binden an ihre Rezeptoren auf benachbarte Zellen und regen diese zur Proliferation an.

5.5 Der EGF-Rezeptor spielt keine Rolle für die Proliferation von HT29-Zellen in nekroptotischem Milieu

Der EGF-Rezeptor stellt einen der wichtigsten Tyrosin-Kinase-Rezeptoren für die Proliferation von Zellen dar. Eine ständige Aktivierung führt zu unkontrolliertem Zellwachstum, was mit Krebserkrankungen assoziiert wird (Dhomen et al., 2012). TGF- α stellt einen seiner Liganden dar und wurde, wie oben beschrieben, während der Nekroptose vermehrt freigesetzt. Die Freisetzung sollte zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors führen. Dafür wurde angenommen, dass bei Stimulation dieses Rezeptors die Proliferation induziert wird und dies im Zellindex nachweisbar ist. In der Tat veränderte sich der Zellindex kurz nach Auftragen des Überstandes. Aufgrund der höchsten Konzentration an TGF- α im Überstand, welcher nicht ausgewechselt wurde, war es nicht verwunderlich, dass in diesem Ansatz der Zellindex die größte positive Veränderung erfahren hat. Diese Situation entspricht am ehesten der physiologischen Situation im Körper bei einer nekroptotischen Zellantwort. Daher kann vermutet

werden, dass der EGF-Rezeptor womöglich für die Proliferation im umliegenden Gewebe eine Rolle spielt (Abbildung 25). Gegen diese Vermutung spricht jedoch, dass weder bei der spezifischen Inhibition, noch der Breitbandinhibition der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ein signifikanter Unterschied im Zellindex nachgewiesen werden konnte. Der kurzzeitige Anstieg des Zellindexes sowie der weitere Verlauf über 30 Minuten blieb trotz dieser Inhibition auf einem ähnlichen Niveau. Da auch in der Phosphorylierung der MAP-Kinasen (ERK1 und ERK2) keine deutlichen Unterschiede zu beobachten waren, ist die Rolle des EGF-Rezeptors kritisch zu betrachten (Abbildung 26). Dass MAP-Kinasen wiederum bei unkontrollierter Aktivierung mit Krebs assoziiert werden, ist schon länger bekannt (Roberts und Der, 2007). Zwar wird TGF- α von den beiden Proteasen während der Nekroptose vermehrt *gesheddet*, aktiviert aber nur in geringem Maße den EGF-Rezeptor. Somit ist das ADAM10- und ADAM17-vermitteltem *Shedding* für die Proliferation von Zellen im nekroptotischen Milieu vermutlich von geringer Bedeutung. Für die Aktivierung der MAP-Kinasen müssen andere Rezeptoren als die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren verantwortlich sein, da trotz Breitbandinhibition mit Genistein die Phosphorylierung von ERK stattfand. Es ist von großer Bedeutung zu erfahren, welcher Rezeptor für die Proliferation der Zellen im Entzündungsprozess der Nekroptose zuständig ist. Neben dem EGF-Rezeptor könnte die Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren in Frage kommen (Mebratu und Tesfaigzi, 2009). Sollte in nächster Zeit bestätigt werden, dass die Auslösung der Nekroptose zu einer Zellproliferation führt, sind weitere Interventionsmöglichkeiten gegeben.

5.6 Ausblick

Die Aktivierung von Zelloberflächenproteasen scheint ein essentieller Mechanismus während der Nekroptose zu sein. Neben der in dieser Arbeit gezeigten Aktivierung von ADAM10 und der möglichen Beteiligung von ADAM17 spielen vermutlich eine Reihe von anderen Proteasen eine wichtige Rolle während oder für die Nekroptose. Es ist von großer Bedeutung den inflammatorischen Prozess während der Nekroptose zu verstehen. Erst das genaue Verständnis der Auswirkungen auf den Organismus ermöglicht die Nekroptose als alternative Krebstherapie in Betracht zu ziehen. Gerade die in der Arbeit aufgezeigte erhöhte Proliferation von Zellen im nekroptotischen Milieu lässt kritische Fragen offen. Entscheidend ist dementsprechend auch, den Mechanismus hinter der Aktivierung der Proteasen zu verstehen, um gegebenenfalls gezielt intervenieren zu können. Die gezeigte PtdSer-Externalisierung kann hierbei eine wichtige Rolle einnehmen. Neben seiner Bedeutung für die Immunantwort und der Antigen-Präsentation sollte dieser Mechanismus wie in der Apoptose während der Nekroptose genauer verstanden werden. Damit verbunden ist die Frage, welche Scramblasen bzw. Flippasen oder Floppasen während der Nekroptose für den Phospholipidtransport zuständig sind. Dabei sollten nicht nur weitere Proteine untersucht werden, sondern auch der

Komplex aus phosphoryliertem MLKL und ADAM10 genauer betrachtet werden. Es gilt nun, den PtdSer-Flip mit der Aktivierung von ADAM10 bzw. ADAM17 in Zusammenhang zu bringen.

In erster Linie sollten nun die Erkenntnisse der Aktivierung der ADAM-Proteasen während der Nekroptose gefestigt werden. Dafür muss die Aktivität in verschiedenen Zelllinien getestet werden, um mögliche Interpretationsfehler zu vermeiden. Zeitgleich ist es ratsam in weiteren Studien zu untersuchen, welche Proteasen während der Nekroptose aktiviert werden. Hierbei sollte darauf geachtet werden, welche Relevanz diese Aktivierung einerseits für die Nekroptose selbst und andererseits für den Organismus aufweist. Genauso ist es von Interesse die proteolytische Seite bei weiteren programmierten Zelltodwegen, wie zum Beispiel der Ferroptose und Pyroptose zu beleuchten. Ziel sollte es sein, das Verständnis über den programmierten Zelltod mit dem inflammatorischen Prozess in Einklang zu bringen und somit neue Behandlungsansätze für Erkrankungen wie der TEN oder in der Krebstherapie zu ermöglichen.

6 Zusammenfassung

ADAM10 und ADAM17 sind zwei der wichtigsten Metalloproteasen aus der „*A Disintegrin and Metalloproteases*“-Familie. Sie sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, in dem sie unter anderem für die proteolytische Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Oberflächenrezeptoren sorgen. Ihre Rolle in inflammatorischen Vorgängen ist unumstritten. Seit einigen Jahren sind neben der Apoptose weitere programmierte Zelltodwege, wie die der Nekroptose und Ferroptose entdeckt worden. Entscheidend ist, dass diese mit einem inflammatorischen Prozess im Gewebe einhergehen. Bis dahin wurden der programmierte Zelltod und entzündliche Prozesse als unterschiedliche Vorgänge betrachtet. Im Anschluss an die Nekroptose kommt es zu einer unkontrollierten Freisetzung von inflammatorischen Proteinen, wodurch das Immunsystem aktiviert wird. Jedoch ist die Beteiligung von Zelloberflächenproteasen weitestgehend unbekannt.

Daher befasste sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Frage, ob es während der Nekroptose zu einer Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 kommt. In der Tat ließ sich eine erhöhte Freisetzung der beiden ADAM-Substrate *Transforming Growth Factor alpha* (TGF- α) und Interleukin-6-Rezeptor beobachten. Erstaunlicherweise kann ADAM10 während der Nekroptose die Funktionen von ADAM17 weitestgehend übernehmen. Es kam zu einer Verlagerung von einem ADAM17- zu einem ADAM10-vermittelten *Shedding* der beiden Substrate in HT29-Zellen. Inzwischen wird vermutet, dass die Nekroptose-vermittelte Aktivierung von ADAM10 zu einer erhöhten inflammatorischen Antwort und zu einer verstärkten Zellmigration führt. Zwangsläufig ergab sich daher die Frage, auf welchem Wege ADAM10 aktiviert wird. Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass Phosphatidylserin in der äußeren Zellmembran eine wichtige Rolle in der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 einnimmt. Um herauszufinden, ob auch während der Nekroptose eine Externalisierung des Phospholipids stattfindet, wurde dies mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Interessanterweise kommt es auch unter der Nekroptose vor Verlust der Zellmembranintegrität zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin. Anoctamin6 ist eine Scramblase, die PtdSer externalisiert. Es konnten Daten generiert werden, die die Bedeutung von Anoctamin6 für die ADAM-Aktivierung stützen. Für die Nekroptose konnte kein Zusammenhang mit Anoctamin6 gezeigt werden, sodass die Möglichkeit besteht, dass hierfür das phosphorylierte *mixed lineage kinase domain-like protein* (pMLKL) selbst zuständig ist. Zudem ist eine Komplexbildung mit ADAM10 publiziert worden, die vermutlich in den Aktivierungsprozess eingreift.

Zuletzt sollte die Frage der Relevanz der ADAM-Aktivierung unter der Nekroptose geklärt werden. Beide Proteasen konnten trotz künstlicher Überexpression den Zelltod durch

Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder der Todesrezeptoren nicht verhindern. Dabei schien ADAM17 in HT29-Zellen einen größeren Effekt auf den nekroptotischen Zelltod zu haben und konnte diesen Zelltod etwas verlangsamen. Die Nekroptose gilt weiterhin als eine alternative Krebstherapie in Apoptose-resistenten Zellen. Der sich dem Zelltod anschließenden inflammatorischen Antwort wurde dabei nur wenig Beachtung geschenkt. Jedoch ist in dieser Arbeit mit Hilfe von Echtzeit-Zellanalysen festgestellt worden, dass Zellen in nekroptotischem Überstand vermehrt proliferierten. Hierbei spielten aber weder ADAM10, noch ADAM17 oder der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor eine übergeordnete Rolle. Für dieses Wachstum werden weitere Proteasen, Zytokine oder lösliche Wachstumsfaktoren verantwortlich sein, die während der Nekroptose aktiviert werden. Daher ist die mögliche zukünftige Therapieform, in Tumorzellen Nekroptose auszulösen, kritisch zu betrachten, da eine verstärkte Proliferation dieser Zellen nicht ausgeschlossen werden kann und die Folgen der inflammatorischen Antwort noch nicht bekannt sind.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit im Rahmen der Nekroptose Erkenntnisse über den Zusammenhang von Zelloberflächenproteasen wie ADAM10 und ADAM17 und der inflammatorischen Antwort. Ein genaueres Verständnis könnte dazu beitragen, den entzündlichen Prozess in Zukunft besser einzugrenzen und die Nekroptose der Therapie von Krankheiten immer weiter zugänglich zu machen.

7 Summary

ADAM10 and ADAM17 are two of the most important members of the "A disintegrin and metalloproteases" family. They are involved in a variety of physiological and pathophysiological processes, including the proteolytic release of growth factors, cytokines, and surface receptors. Their role in inflammatory processes is undisputed. In addition to apoptosis, other programmed cell death pathways, such as necroptosis and ferroptosis, have been discovered for several years. Crucially, these are associated with an inflammatory answer in the tissue. Until then, programmed cell death and inflammatory processes were considered to be different processes. Following necroptosis, there is an uncontrolled release of inflammatory proteins, which activates the immune system. However, the involvement of cell surface proteases is largely unknown.

Therefore, the first part of this work addresses the question of whether activation of ADAM10 and ADAM17 occurs during necroptosis. In fact, an increased release of the two ADAM substrates *transforming growth factor alpha* (TGF- α) and *interleukin-6 receptor* can be observed. Surprisingly ADAM10 takes over the functions of ADAM17, during necroptosis. There is a shift from ADAM17 to ADAM10-mediated shedding of the two substrates in HT29 cells. Meanwhile, it is thought that necroptosis-mediated activation of ADAM10 leads to an increased inflammatory response and increased cell migration. Therefore, the question is how ADAM10 is activated. Recently, phosphatidylserine has been shown to play an important role in the activation of ADAM17. For ADAM10 this mechanism seems to be similar. In order to find out whether the phospholipid is externalized during necroptosis as well, fluorescence microscopy was used. We found that even under necroptosis externalization of phosphatidylserine (PtdSer) occurs before loss of cell membrane integrity. Anoctamin6 is a scramblase that externalizes PtdSer. Data could be generated to support the role of anoctamin6 for ADAM activation. A correlation between anoctamin6 and the necroptosis was not found. At present it has to be assumed that the phosphorylated mixed lineage kinase domain-like protein (pMLKL) itself is responsible for the externalization of PtdSer. In addition, a complex formation with ADAM10 and pMLKL has been published, which probably interferes with the activation process.

Lastly, the question concerning relevance of activating ADAMs during the necroptosis needs to be clarified. Despite artificial overexpression, both proteases fail to prevent cell death by releasing growth factors or the death receptors. ADAM17 in HT29 cells appears to have a greater effect on necroptotic cell death and can slow down this cell death. Necroptosis continues to be considered an alternative cancer therapy in apoptosis-resistant cells. The inflammatory response following cell death receives little attention. In this work, real-time cell

analyses could show that cells proliferate in necroptotic supernatant. However, neither ADAM10 nor ADAM17 or the epidermal growth factor receptor play a major role. This growth seems to be due to other proteases, cytokines or soluble growth factors activated during necroptosis. Therefore, the discussed future form of therapy in tumor cells to trigger necroptosis should be viewed critically, since a proliferation of these cells cannot be excluded and the consequences of the inflammatory response are not known.

In conclusion, this work provides insights into the network of cell surface proteases such as ADAM10 and ADAM17 and the inflammatory response to the context of necroptotic cell death. A closer understanding could help to better isolate the inflammatory process in the future and make necroptosis more and more accessible to the treatment of disease.

Literaturverzeichnis

Aaes, T.L., Kaczmarek, A., Delvaeye, T., De Craene, B., De Koker, S., Heyndrickx, L., Delrue, I., Taminau, J., Wiernicki, B., De Groote, P., Garg, A.D., Leybaert, L., Grooten, J., Bertrand, M.J.M., Agostinis, P., Berx, G., Declercq, W., Vandenabeele, P., und Krysko, D. V. (2016). Vaccination with necroptotic cancer cells induces efficient anti-tumor immunity. *Cell Rep.* *15*, 274–287.

Adrain, C., Taylor, N., und Freeman, M. (2012). Trafficking and activation of tace. *Science.* *335*, 225–228.

de Almagro, M.C., und Vucic, D. (2015). Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Semin. Cell Dev. Biol.* *39*, 56–62.

Amour, A., Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knäuper, V., Docherty, A.J. p, und Murphy, G. (1998). TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* *435*, 39–44.

Arribas, J., und Esselens, C. (2009). ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 2319–2335.

Bandsma, R.H.J., Van Goor, H., Yourshaw, M., Horlings, R.K., Jonkman, M.F., Schölvinck, E.H., Karrenbeld, A., Scheenstra, R., Kömhoff, M., Rump, P., Koopman-Keemink, Y., Nelson, S.F., Escher, J.C., Cutz, E., und Martín, M.G. (2015). Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction. *Hum. Pathol.* *46*, 923–928.

Barnhart, B.C., Alappat, E.C., und Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin. Immunol.* *15*, 185–193.

Baumgart, A., Seidl, S., Vlachou, P., Michel, L., Mitova, N., Schatz, N., Specht, K., Koch, I., Schuster, T., Grundler, R., Kremer, M., Fend, F., Siveke, J.T., Peschel, C., Duyster, J., und Dechow, T. (2010). ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* *70*, 5368–5378.

Bennett, T.A., Edwards, B.S., Sklar, L.A., und Rogelj, S. (2000). Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *J. Immunol.* *164*, 4120–4129.

Vanden Berghe, T., Kalai, M., Denecker, G., Meeus, A., Saelens, X., und Vandenabeele, P. (2006). Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not. *Cell. Signal.* *18*, 328–335.

- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., und Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* *17*, 922–930.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., und Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 135–147.
- Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., und Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* *30*, 689–700.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., und Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* *385*, 729–733.
- Blaydon, D.C., Biancheri, P., Di, W.-L., Plagnol, V., Cabral, R.M., Brooke, M.A., van Heel, D.A., Ruschendorf, F., Toynbee, M., Walne, A., O’Toole, E.A., Martin, J.E., Lindley, K., Vulliamy, T., Abrams, D.J., MacDonald, T.T., Harper, J.I., und Kelsell, D.P. (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N. Engl. J. Med.* *365*, 1502–1508.
- Bleibaum, F., Sommer, A., Veit, M., Rabe, B., Andrä, J., Kunzelmann, K., Nehls, C., Correa, W., Gutschmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2019). ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *J. Mol. Cell Biol.* in Druck.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X., und Stückler, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins.’ *FEBS Volume 331*, 134–140.
- Bonnet, M.C., Preukschat, D., Welz, P.S., Van Loo, G., Ermolaeva, M.A., Bloch, W., Haase, I., und Pasparakis, M. (2011). The adaptor protein FADD p epidermal keratinocytes from necroptosis in vivo and prevents skin inflammation. *Immunity* *35*, 572–582.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.-C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L., und Liu, Z.-G. (2013). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* *16*, 55–67.

- Cai, Z., Zhang, A., Choksi, S., Li, W., Li, T., Zhang, X.-M., und Liu, Z.-G. (2016). Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration. *Cell Res.* 26, 886–900.
- Campbell, N.A., und Reece, J.B. (2006). *Biologie*, 6. Aufl. (Hallbergmoos: Pearson Deutschland GmbH).
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C.A., Jones, S.A., Rose-John, S., und Scheller, J. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110, 1748–1755.
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Häsler, R., Becker, C., Neurath, M.F., Reiß, K., Saftig, P., Scheller, J., und Rose-John, S. (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J. Exp. Med.* 207, 1617–1624.
- Chen, D., Yu, J., und Zhang, L. (2016). Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1865, 228–236.
- Chen, L., Park, S., Tumanov, A. V, Hau, A., Sawada, K., Feig, C., Turner, J.R., Fu, Y., Romero, I., Lengyel, E., und Peter, M.E. (2010). CD95/Fas promotes tumour growth. *Nature* 465, 492–496.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.-T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., und Han, J. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res.* 24, 105–121.
- Christova, Y., Adrain, C., Bambrough, P., Ibrahim, A., und Freeman, M. (2013). Mammalian iRhoms have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation. *EMBO Rep.* 14, 884–890.
- Clark, M.R. (2011). Flippin' lipids. *Nat. Immunol.* 12, 373–375.
- Conrad, M., Angeli, J.P.F., Vandenabeele, P., und Stockwell, B.R. (2016). Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 348–366.
- D'Alessio, A., Esposito, B., Giampietri, C., Ziparo, E., Pober, J.S., und Filippini, A. (2012). Plasma membrane microdomains regulate TACE-dependent TNFR1 shedding in human endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 626–635.

- David, J.M., und Rajasekaran, A.K. (2012). Dishonorable discharge: The oncogenic roles of cleaved e-cadherin fragments. *Cancer Res.* 72, 2917–2923.
- Dhomen, N.S., Mariadason, J., Tebbutt, N., und Scott, A.M. (2012). Therapeutic targeting of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 17, 31–50.
- Díaz-Rodríguez, E., Montero, J.C., Esparís-Ogando, A., Yuste, L., und Pandiella, A. (2002). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol. Biol. Cell* 13, 2031–2044.
- Dillon, C.P., Oberst, A., Weinlich, R., Janke, L.J., Ben-moshe, T., Mak, T.W., Wallach, D., und Green, D.R. (2012). Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP L complex. *Cell Rep.* 1, 401–407.
- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., Hulpiau, P., Weber, K., Sehon, C.A., Marquis, R.W., Bertin, J., Gough, P.J., Savvides, S., Martinou, J.C., Bertrand, M.J.M., und Vandenabeele, P. (2014). MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* 7, 971–981.
- Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E., und Ludwig, A. (2012). The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 472–485.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., und Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.
- Dunai, Z.A., Imre, G., Barna, G., Korcsmaros, T., Petak, I., Bauer, P.I., und Mihalik, R. (2012). Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells. *PLoS One* 7, 1–14.
- Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C.W., Tholey, A., Sönnichsen, F.D., Grötzinger, J., und Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 5776–5781.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., und Pennington, C.J. (2009). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 258–289.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 495–516.

- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., und Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* *148*, 2207–2216.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., und Henson, P.M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: Recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* *108*, 957–962.
- Feoktistova, M., und Leverkus, M. (2015). Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* *282*, 19–31.
- Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.S., Leahy, D.J., und Lemmon, M.A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* *11*, 507–517.
- Fuchslocher Chico, J., Saggau, C., und Adam, D. (2017). Proteolytic control of regulated necrosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1864*, 2147–2161.
- Le Gall, S.M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, R.D., Conrad, D., Saftig, P., und Blobel, C.P. (2009). ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , I-Selectin, and tumor necrosis factor α . *Mol. Biol. Cell* *20*, 1785–1974.
- Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D. a, Niu, X.-D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., und Blobel, C.P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell Sci.* *123*, 3913–3922.
- Geserick, P., Wang, J., Schilling, R., Horn, S., Harris, P.A., Bertin, J., Gough, P.J., Feoktistova, M., und Leverkus, M. (2015). Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell Death Dis.* *6*, 1–12.
- Giebeler, N., und Zigrino, P. (2016). A disintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions. *Toxins (Basel).* *8*, 1–14.
- Gong, Y.N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J.U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., und Green, D.R. (2017). ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell Press* *169*, 286–300.
- Grieve, A.G., Xu, H., Künzel, U., Bambrough, P., Sieber, B., und Freeman, M. (2017). Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling. *Elife* 1–22.

- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., und Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Grootjans, S., Vanden Berghe, T., und Vandenabeele, P. (2017). Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ.* 24, 1184–1195.
- Grötzinger, J., Lorenzen, I., und Düsterhöft, S. (2017). Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *BBA - Mol. Cell Res.* 2088–2095.
- Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K.L., Prorock, A.J., Huo, Y., und Ley, K. (2001). L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J. Exp. Med.* 193, 863–872.
- Hankins, H.M., Baldrige, R.D., Xu, P., und Graham, T.R. (2015). Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic* 35–47.
- Hartmann, D., Strooper, B. De, Serneels, L., und Craessaerts, K. (2002). The disintegrin / metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2615–2624.
- He, G.-W., Günther, C., Thonn, V., Yu, Y.-Q., Martini, E., Buchen, B., Neurath, M.F., Stürzl, M., und Becker, C. (2017). Regression of apoptosis-resistant colorectal tumors by induction of necroptosis in mice. *J. Exp. Med.* 214, 1655–1662.
- He, L., Peng, K., Liu, Y., Xiong, J., und Zhu, F.F. (2013). Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco. Targets. Ther.* 6, 1539–1543.
- Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y., und Blobel, C.P. (2007). Cutting edge: TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J. Immunol.* 179, 2686–2689.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F., Han, G., Wang, X., Thorburn, J., und Thorburn, A. (2012). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* 17, 860–866.
- Hückendorf, U., Yabal, M., Herold, T., Munkhbaatar, E., Rott, S., Jilg, S., Kauschinger, J., Magnani, G., Reisinger, F., Heuser, M., Kreipe, H., Sotlar, K., Engleitner, T., Rad, R., Weichert, W., Peschel, C., Ruland, J., Heikenwalder, M., Spiekermann, K., Slotta-Huspenina, J., Groß, O., und Jost, P.J. (2016). RIPK3 restricts myeloid leukemogenesis by promoting cell death and differentiation of leukemia initiating cells. *Cancer Cell* 30, 75–91.

- Huovila, A.P.J., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., und Ortiz, R.M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 413–422.
- Jackson, L.F., Qiu, T.H., Sunnarborg, S.W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., und Lee, D.C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* 22, 2704–2716.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., und Krysko, D. V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38, 209–223.
- Kaiser, W.J., Upton, J.W., Long, A.B., Livingston-Rosanoff, D., Daley, P., Hakem, R., Caspary, T., Mocarski, E.S., Daley-Bauer, L.P., Hakem, R., Caspary, T., und Mocarski, E.S. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* 471, 368–373.
- Kaiser, W.J., Upton, J.W., und Mocarski, E.S. (2013). Viral modulation of programmed necrosis. *Curr. Opin. Virol.* 3, 296–306.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., und Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* 8, 297–303.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., und Curriert, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Khokha, R., Murthy, A., und Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 649–665.
- Kim, S.K., Kim, W.-J., Yoon, J.-H., Ji, J.-H., Morgan, M.J., Cho, H., Kim, Y.C., und Kim, Y.-S. (2015). Upregulated RIP3 expression potentiates MLKL phosphorylation-mediated programmed necrosis in toxic epidermal necrolysis. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2021–2030.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., und Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Kodigepalli, K.M., Bowers, K., Sharp, A., und Nanjundan, M. (2015). Roles and regulation of phospholipid scramblases. *FEBS Lett.* 589, 3–14.
- Koo, G.B., Morgan, M.J., Lee, D.G., Kim, W.J., Yoon, J.H., Koo, J.S., Kim, S. II, Kim, S.J., Son, M.K., Hong, S.S., Levy, J.M.M., Pollyea, D.A., Jordan, C.T., Yan, P., Frankhouser, D., Nicolet, D., Maharry, K., Marcucci, G., Choi, K.S., Cho, H., Thorburn, A., und Kim, Y.S. (2015). Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res.* 25, 707–725.

- Korniluk, A., Koper, O., Kemona, H., und Dymicka-Piekarska, V. (2017). From inflammation to cancer. *Ir. J. Med. Sci.* 186, 57–62.
- Krysko, O., De Ridder, L., und Cornelissen, M. (2004). Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis* 9, 495–500.
- Krysko, O., Aaes, T.L., Kagan, V.E., D'Herde, K., Bachert, C., Leybaert, L., Vandenabeele, P., und Krysko, D. V. (2017). Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunol. Rev.* 280, 207–219.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lau, A., Wang, S., Jiang, J., Haig, A., Pavlosky, A., Linkermann, A., Zhang, Z.X., und Jevnikar, A.M. (2013). RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. *Am. J. Transplant.* 13, 2805–2818.
- Leppkes, M., Roulis, M., Neurath, M.F., Kollias, G., und Becker, C. (2014). Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. *Int. Immunol.* 26, 509–515.
- Leventis, P.A., und Grinstein, S. (2010). The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* Vol 39 39, 407–427.
- Li, J., Mcquade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Hsiao, Y., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., Chan, F.K., und Wu, H. (2013). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell.* 150, 339–350.
- Li, X., Pérez, L., Pan, Z., und Fan, H. (2007). The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res.* 17, 985–998.
- Linkermann, A., Bräsen, J.H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T.B., Kunzendorf, U., und Krautwald, S. (2012). Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 81, 751–761.
- Linkermann, A., Brasen, J.H., Darding, M., Jin, M.K., Sanz, A.B., Heller, J.-O., De Zen, F., Weinlich, R., Ortiz, A., Walczak, H., Weinberg, J.M., Green, D.R., Kunzendorf, U., und Krautwald, S. (2013). Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 12024–12029.

- Lisi, S., D'Amore, M., und Sisto, M. (2014). ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity. *Immunol. Lett.* 162, 159–169.
- Liu, X., Zhou, M., Mei, L., Ruan, J., Hu, Q., Peng, J., Su, H., Liao, H., Liu, S., Liu, W., Wang, H., Huang, Q., Li, F., und Li, C.-Y. (2016). Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget* 7, 22219–22233.
- Liu, X.W., Taube, M.E., Jung, K.K., Dong, Z., Lee, Y.J., Roshy, S., Sloane, B.F., Fridman, R., und Kim, H.R. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res.* 65, 898–906.
- Locksley, R.M., Killeen, N., und Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 487–501.
- Van Loo, G., Van Gorp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S., Rodriguez, I., Alnemri, E., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., und Vandenaabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 9, 20–26.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M., Broadway, N., Andrews, R., Bickett, D., Leesnitzer, M., und Becherer, J. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8, 161–171.
- Luedde, M., Lutz, M., Carter, N., Sosna, J., Jacoby, C., Vucur, M., Gautheron, J., Roderburg, C., Borg, N., Reisinger, F., Hippe, H.J., Linkermann, A., Wolf, M.J., Rose-John, S., Lüllmann-Rauch, R., Adam, D., Flögel, U., Heikenwalder, M., Luedde, T., und Frey, N. (2014). RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 103, 206–216.
- Lüllman-Rauch, R. (2012). Taschenlehrbuch Histologie, 4. Aufl. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG).
- Madge, L.A., Sierra-honigmann, M.R., und Pober, J.S. (1999). Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). *Biochemistry* 274, 13643–13649.

- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., und Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates e-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 9182–9187.
- Maretzky, T., Scholz, F., Kö Ten, B., Proksch, E., Saftig, P., und Reiss, K. (2008). ADAM10-mediated e-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1737–1746.
- Mariani, S.M., und Krammer, P.H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* 28, 973–982.
- Maskos, K., Fernandez-Catalan, C., Huber, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H., Ellestad, G. a, Reddy, P., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Castner, B.J., Davis, R., Clarke, H.R., Petersen, M., Fitzner, J.N., Cerretti, D.P., March, C.J., Paxton, R.J., Black, R. a, und Bode, W. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3408–3412.
- Mebratu, Y., und Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8, 1168–1175.
- Micheau, O., und Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., und Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435–439.
- Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M., und Nagata, S. (2004). Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1414–1422.
- Mizumura, K., Cloonan, S.M., Nakahira, K., Bhashyam, A.R., Cervo, M., Kitada, T., Glass, K., Owen, C.A., Mahmood, A., Washko, G.R., Hashimoto, S., Ryter, S.W., und Choi, A.M.K. (2014). Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J. Clin. Invest.* 124, 3987–4003.
- Moll, I. (2010). *Duale Reihe, Dermatologie*, 7. Aufl. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG).
- Moriwaki, K., Bertin, J., Gough, P.J., Orlowski, G.M., und Chan, F.K. (2015). Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death Dis.* 1–11.

- Moss, M.L., und Minond, D. (2017). Recent advances in ADAM17 research: a promising target for cancer and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2017, 1–21.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T. a, Lambert, M.H., Leesnitzer, M. a, McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., und Becherer, J.D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, 733–736.
- Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A.I., Young, S.N., Varghese, L.N., Tannahill, G.M., Hatchell, E.C., Majewski, I.J., Okamoto, T., Dobson, R.C.J., Hilton, D.J., Babon, J.J., Nicola, N.A., Strasser, A., Silke, J., und Alexander, W.S. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 39, 443–453.
- Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., und Arita, H. (1997). Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6*. *J. Biol. Chem.* 272, 29411–29414.
- Negróni, A., Colantoni, E., Pierdomenico, M., Palone, F., Costanzo, M., Oliva, S., Tiberti, A., Cucchiara, S., und Stronati, L. (2017). RIP3 and pMLKL promote necroptosis-induced inflammation and alter membrane permeability in intestinal epithelial cells. *Dig. Liver Dis.* 49, 1201–1210.
- Neumann, S., Bidon, T., Branschädel, M., Krippner-Heidenreich, A., Scheurich, P., und Doszczak, M. (2012). The transmembrane domains of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors 1 and 2 co-regulate apoptotic signaling capacity. *PLoS One* 7, 1–12.
- Nugues, A.-L., El Bouazzati, H., Héтуin, D., Berthon, C., Loyens, A., Bertrand, E., Jouy, N., Idziorek, T., und Quesnel, B. (2014). RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death Dis.* 1–12.
- Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., und Green, D.R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP L complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471, 363–368.
- Ofengeim, D., Ito, Y., Najafov, A., Zhang, Y., Shan, B., DeWitt, J.P., Ye, J., Zhang, X., Chang, A., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Geng, J., Py, B., Zhou, W., Amin, P., Lima, J.B., Qi, C., Yu, Q., Trapp, B., und Yuan, J. (2015). Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Rep.* 10, 1836–1849.

- Ousingsawat, J., Cabrita, I., Wanitchakool, P., Sirianant, L., Krautwald, S., Linkermann, A., Schreiber, R., und Kunzelmann, K. (2016). Ca²⁺ signals, cell membrane disintegration, and activation of TMEM16F during necroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–9.
- Pasparakis, M., und Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517, 311–320.
- Peiretti, F., Canault, M., Deprez-Beauclair, P., Berthet, V., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., und Nalbone, G. (2003). Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp. Cell Res.* 285, 278–285.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stoskiing, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russel, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlozky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J., und Black, R.A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* (80-). 282, 1281–1284.
- Philipp, S., Sosna, J., und Adam, D. (2016). Cancer and necroptosis: friend or foe? *Cell. Mol. Life Sci.* 1–11.
- Pocsik, E., Mihalik, R., Ali Osman, F., und Aggarwal, B.B. (1994). Cell density-dependent regulation of cell surface expression of two types of human tumor necrosis factor receptors and its effect on cellular response. *J.Cell.Biochem.* 54, 453–464.
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., und Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2919–2932.
- Re, D.B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M.W., Politi, K.A., Phani, S., Ikiz, B., Hoffmann, L., Koolen, M., Nagata, T., Papadimitriou, D., Nagy, P., Mitsumoto, H., Kariya, S., Wichterle, H., Henderson, C.E., und Przedborski, S. (2014). Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 81, 1001–1008.
- Reddy, P. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 14608–14614.
- Reiss, K., und Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 2082–2087.
- Reiss, K., und Saftig, P. (2009). The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 126–137.

- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., und Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell–cell adhesion and β -catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24, 742–752.
- Renehan, A.G., Booth, C., und Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322, 1536–1538.
- Roberts, P.J., und Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310.
- Rose-John, S., und Heinrich, P.C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* 300, 281–290.
- Saftig, P., und Lichtenthaler, S.F. (2015). The alpha secretase ADAM10: a metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog. Neurobiol.* 135, 1–20.
- Saftig, P., und Reiss, K. (2011). The “a disintegrin and metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur. J. Cell Biol.* 90, 527–535.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., und Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769–779.
- Saito, N., Qiao, H., Yanagi, T., Shinkuma, S., Nishimura, K., Suto, A., Fujita, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nakamura, H., Nagao, K., Obuse, C., Shimizu, H., und Abe, R. (2014). An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions. *Sci. Transl. Med.* 6, 245ra95.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., und Rose-John, S. (2011a). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 878–888.
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., und Rose-John, S. (2011b). ADAM17: A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 32, 380–387.
- Schlöndorff, J., Becherer, J.D., und Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem. J.* 347 Pt 1, 131–138.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeier, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., und Schütze, S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: Internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* 21, 415–428.

- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P., und Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ. Res.* 102, 1192–1201.
- Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.W., Rabe, B., Rose-John, S., und Chalaris, A. (2013). Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3355–3367.
- Schwarz, J., Schmidt, S., Will, O., Koudelka, T., Köhler, K., Boss, M., Rabe, B., Tholey, A., Scheller, J., Schmidt-Arras, D., Schwake, M., Rose-John, S., und Chalaris, A. (2014). Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor α ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* 289, 3080–3093.
- Seals, D.F., und Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7–30.
- Segawa, K., und Nagata, S. (2015). An apoptotic “eat me” signal: phosphatidylserine exposure. *Trends Cell Biol.* 25, 639–650.
- Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Ly, N.N.G., Alothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S.H., Torres-Hernandez, A., Pergamo, M., Ochi, A., Zam, C.P., Hundeyin, M., Mani, V.R., Hajdu, C., Engle, D., und Miller, G. (2015). The necrosome promotes pancreas oncogenesis via CXCL1 and mincle induced immune suppression. *Abdom. Imaging* 40, 3070–3077.
- Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Gläser, R., und Harder, J. (2016). The inflammasome and the epidermal growth factor receptor (EGFR) are involved in the staphylococcus aureus-mediated induction of IL-1 α and IL-1 β in human keratinocytes. *PLoS One* 11, 1–14.
- Slee, E.A., Adrain, C., und Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320–7326.
- Sommer, A., Fries, A., Cornelsen, I., Speck, N., Koch-Nolte, F., Gimpl, G., Andrä, J., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2012). Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *J. Biol. Chem.* 287, 23678–23689.

- Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., Maretzky, T., Evers, A., Andrä, J., Düsterhöft, S., Michalek, M., Lorenzen, I., Somasundaram, P., Tholey, A., Sönnichsen, F.D., Kunzelmann, K., Heinbockel, L., Nehls, C., Gutschmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2016). Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat. Commun.* 1–14.
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Kabelitz, D., Trad, A., Janssen, O., Meyer-schwesinger, C., und Schütze, S. (2013). The proteases HtrA2 / Omi and UCH-L1 regulate TNF- induced necroptosis. *Cell Commun. Signal.* 11, 1–18.
- Sosna, J., Philipp, S., Chico, F., Saggau, C., Fritsch, J., Föll, A., Plenge, J., Arenz, C., Pinkert, T., Kalthoff, H., Trauzold, A., Schmitz, I., und Schütze, S. (2016). Differences and similarities in TRAIL- and tumor necrosis factor- mediated necroptotic signaling in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2626–2644.
- Stone, A.L., Kroeger, M., und Sang, Q.X.A. (1999). Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J. Protein Chem.* 18, 447–465.
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U.C., Pasparakis, M., und Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* 536, 215–218.
- Su, L., Quade, B., Wang, H., Sun, L., Wang, X., und Rizo, J. (2014). A plug release mechanism for membrane permeation by MLKL. *Structure* 22, 1489–1500.
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L., Dewitt, J.P., und Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death Differ.* 23, 748–756.
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., und Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834–840.
- Suzuki, J., Imanishi, E., und Nagata, S. (2014). Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 289, 30257–30267.
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., Annaert, W., Saftig, P., Hartmann, D., und de Strooper, B. (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the γ -secretase. *J. Biol. Chem.* 284, 11738–11747.

- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., und Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267–276.
- Veit, M., Koyro, K.I., Ahrens, B., Bleibaum, F., Munz, M., Rövekamp, H., Andrä, J., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Sommer, A., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2018). Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 1598–1610.
- Walsh, C.M. (2014). Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 1–4.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.F., Wang, F.S., und Wang, X. (2014). Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* 54, 133–146.
- Wang, L., Du, F., und Wang, X. (2008). TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693–703.
- Wang, T., Jin, Y., Yang, W., Zhang, L., Jin, X., Liu, X., He, Y., und Li, X. (2017). Necroptosis in cancer: an angel or a demon? *Tumor Biol.* 39, 1–11.
- Waring, P., Lambert, D., Sjaarda, a, Hurne, a, und Beaver, J. (1999). Increased cell surface exposure of phosphatidylserine on propidium iodide negative thymocytes undergoing death by necrosis. *Cell Death Differ.* 6, 624–637.
- Weinlich, R., Oberst, A., Dillon, C.P., Janke, L.J., Milasta, S., Lukens, J.R., Rodriguez, D.A., Gurung, P., Savage, C., Kanneganti, T.D., und Green, D.R. (2013). Protective roles for caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis. *Cell Rep.* 5, 340–348.
- Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H.M., und Green, D.R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 127–136.
- Weiss, H.J., und Lages, B. (1997). Family studies in scott syndrome. *Blood* 90, 475–476.
- Welz, P.-S., Wullaert, A., Vlantis, K., Kondylis, V., Fernández-Majada, V., Ermolaeva, M., Kirsch, P., Sterner-Kock, A., van Loo, G., und Pasparakis, M. (2011). FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* 477, 330–335.
- White, J.M. (2003). ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 598–606.

- Willems, S.H., Tape, C.J., Stanley, P.L., Taylor, N.A., Mills, I.G., Neal, D.E., McCafferty, J., und Murphy, G. (2010). Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem. J.* 439–450.
- Wisniewska, M., Goettig, P., Maskos, K., Belouski, E., Winters, D., Hecht, R., Black, R., und Bode, W. (2008). Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 Complex. *J. Mol. Biol.* 381, 1307–1319.
- Wong, E., Maretzky, T., Peleg, Y., Blobel, C.P., und Sagi, I. (2015). The functional maturation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 requires processing at a newly identified proprotein convertase (PC) cleavage site. *J. Biol. Chem.* 290, 12135–12146.
- Wu, X.-N., Yang, Z.-H., Wang, X.-K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., und Han, J. (2014). Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ.* 21, 1709–1720.
- Würstle, M.L., Laussmann, M.A., und Rehm, M. (2012). The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp. Cell Res.* 318, 1213–1220.
- Xu, D., Sharma, C., und Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB J.* 23, 3674–3681.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 127–37.
- Yeh, W.-C., Itie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.-B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., und Mak, T.W. (2000). Requirement for casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12, 633–642.
- Yeh, W.C., De La Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D. V., und Mak, T.W. (1998). FADD: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* (80-.). 279, 1954–1958.
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., und Wallach, D. (2017). MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation. *Immunity* 47, 51–65.e7.

Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., Croker, B.A., Regev-Rudzki, N., Edry-Botzer, L., und Gerlic, M. (2017). Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biol.* 15, 1–23.

Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., und Liu, Z.-G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5322–5327.

Zhou, W., und Yuan, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 35, 14–23.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Hagen Claus Rövekamp, 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. Des Weiteren 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 im März 2017 auf der Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung | ADF e.V. in Göttingen als Poster (P030) vorgestellt:

44th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) Göttingen, Germany, March 9–11, 2017. *Exp Dermatol*, 26: E1–115.

Aufgrund der Untersuchungen zur Rolle von ANO6 für die ADAM-Aktivierung im Rahmen des Zelltodes, konnte ein Beitrag für das Verständnis der Funktion von ANO6 geleistet werden, der zu einer Koauthorschaft in folgender Publikation geführt hat.

Veit, M., Koyro, K.I., Ahrens, B., Bleibaum, F., Munz, M., Rövekamp, H., Andrä, J., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Sommer, A., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2018). Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 1598–1610.

Kiel, den 06.01.2019

Hagen Claus Rövekamp