

Über den Einfluss von Melittin
auf die Funktion
membranständiger Proteasen der ADAM-Familie

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Anja Fries
geb. in Ottweiler

Mainz März 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2010 – bis März 2013 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz angefertigt. Teile dieser Arbeit stammen von dem Kooperationspartner _____, aus der Arbeitsgruppe von _____ der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitäts-Hautklinik Kiel.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2013

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Sommer A, Fries A, Cornelsen I, Speck N, Koch-Nolte F, Gimpl G, Andrä J, Bhakdi S, Reiss K.: Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23678-89.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Metalloproteinasen.....	1
1.1.1	Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAM).....	2
1.1.2	ADAM10.....	6
1.1.3	ADAM17.....	6
1.1.4	Regulation des <i>Sheddings</i>	7
1.2	P2-Rezeptoren.....	9
1.2.1	Die Familie der P2X-Rezeptoren.....	9
1.2.2	Der P2X7-Rezeptor.....	10
1.3	Biologische Membranen.....	11
1.3.1	Aufbau von Zellmembranen.....	11
1.3.2	Membranasymmetrie.....	13
1.3.3	Phosphatidylserin.....	14
1.4	Melittin.....	16
1.4.1	Struktur und Konformation.....	17
1.4.2	Interaktion mit Lipidmembranen.....	18
1.4.3	Auswirkungen auf Zellen.....	21
1.5	<i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin (VCC).....	23
1.6	Erythrozyten-Modell zur Aktivitätsbestimmung von ADAM10.....	23

1.7	Ziele der Arbeit.....	25
2	Material.....	27
2.1	Chemikalien.....	27
2.2	Aktivatoren und Inhibitoren.....	29
2.3	Puffer, Lösungen und Medien.....	30
2.4	Zellkulturmedien und Zusätze.....	34
2.5	Kitsysteme.....	34
2.6	Antikörper.....	34
2.7	Gebrauchsmaterial.....	35
2.8	Laborgeräte.....	36
3	Methoden.....	39
3.1	Isolierung von Monozyten aus Buffy-Coats.....	39
3.2	Isolierung von Granulozyten aus Frischblut.....	40
3.3	XTT-Assay.....	41
3.4	ATP-Messung.....	42
3.5	Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	43
3.6	Membranfluiditätsmessung.....	44
3.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	46
3.8	Proteinbestimmung.....	47
3.9	Western-Blot Analyse und immunologische Detektion.....	47
3.10	Hämolyse-Experimente mit Kaninchenerythrozyten.....	48
3.10.1	Gewinnung und Aufbereitung von Kaninchenerythrozyten.....	48
3.10.2	Beladung von Kaninchenerythrozyten mit pVCC.....	49
3.10.3	Bestimmung der Hämolyse der Kaninchenerythrozyten.....	49
3.11	Gewinnung von Kaninchenerythrozyten-Ghosts.....	49

3.12	FACS-Analyse.....	50
3.13	L-Selektin FACS-Analyse.....	50
3.14	Annexin V Färbung.....	51
3.15	Untersuchung der ADAM Aktivierung mittels FACS-Analyse und Western-Blot.....	51
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Auswirkungen von Melittin auf die Zellviabilität.....	53
4.1.1	Auswirkungen von Melittin auf die Zellviabilität von Monozyten und Granulozyten.....	53
4.1.2	Auswirkungen von Melittin auf die Zellviabilität von MEF, HUVEC und HaCaT-Keratinozyten.....	54
4.2	Einfluss von Melittin auf die durch ADAM10 und ADAM17 induzierte Proteolyse.....	56
4.2.1	Melittin führt zu vermehrtem <i>Ectodomain Shedding</i> von TNF-alpha durch ADAM17 in Monozyten.....	56
4.2.2	Melittin führt zu vermehrtem <i>Shedding</i> von L-Selektin durch ADAM17 in Granulozyten.....	57
4.2.3	Melittin führt in MEFs zu vermehrtem <i>Shedding</i> von N-Cadherin durch ADAM10.....	58
4.2.4	Melittin führt zu einem vermehrten <i>Shedding</i> von VE-Cadherin in HUVECs.....	60
4.2.5	In HaCaT-Keratinozyten führt Melittin zu einem vermehrten <i>Shedding</i> von E-Cadherin und TGF-alpha.....	61
4.3	Melittin-provoziertes <i>Shedding</i> wird nicht durch den zytosolischen Calciumanstieg beeinflusst.....	64

4.4	Melittin führt zu keiner Änderung der Membranfluidität von HaCaT-Keratinocyten-Membranen.....	67
4.5	Melittin führt zur Aktivierung von P2-Rezeptoren.....	68
4.5.1	Einfluss von P2-Rezeptor-Inhibitoren auf das durch Melittin induzierte <i>Shedding</i>	68
4.5.2	Einfluss der ATPase Hexokinase.....	71
4.5.3	Direkter Nachweis der Beteiligung des P2X7-Rezeptors an der Melittin-induzierten ADAM-Aktivität.....	72
4.6	Das Kaninchenerythrozyten-Modell.....	73
4.6.1	Einfluss von Melittin und bz-ATP auf die Spaltung von pVCC an Kaninchenerythrozyten.....	74
4.6.1.1	Einfluss von Melittin auf die Spaltung von pVCC.....	74
4.6.1.2	Einfluss von bz-ATP auf die Spaltung von pVCC.....	76
4.6.2	Gesteigerte ADAM-Aktivität korreliert mit Phosphatidylserin-Translokation.....	79
4.6.2.1	Aktivierung des P2X7-Rezeptors in Kaninchenerythrozyten induziert PS-Flip.....	79
4.6.2.2	Durch das Ionophor A23187 induzierter PS-Flip korreliert ebenfalls mit erhöhter ADAM-Aktivität.....	86
5	Diskussion.....	93
5.1	Melittin induziert gesteigerte ADAM17- und ADAM10-Aktivität.....	94
5.1.1	Melittin induziert <i>Shedding</i> von ADAM17-Substraten.....	94
5.1.2	Melittin induziert <i>Shedding</i> von ADAM10-Substraten.....	95
5.2	Melittin-induzierte Aktivität der ADAMs ist calciumunabhängig.....	95

5.3	Melittin induziert keine Änderung der Membranfluidität.....	96
5.4	Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch Melittin.....	96
5.5	Das Kaninchenerythrozyten-Modell.....	100
5.5.1	Melittin und bz-ATP induzieren Spaltung von pVCC.....	100
5.5.2	PS-Flip als gemeinsames Merkmal einer gesteigerten ADAM-Aktivität	101
6	Zusammenfassung.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	107
8	Anhang.....	125
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	125
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	128
8.3	Lebenslauf.....	133
9	Danksagung.....	135

1 Einleitung

1.1 Metalloproteinasen

Die Metalloproteinasen können aufgrund gemeinsamer Sequenzmotive, Strukturmerkmale und Faltungsmuster in ungefähr 30 Familien unterteilt werden, die sich wiederum in 5 Hauptgruppen aufteilen (Rawlings and Barrett 1995). Eine dieser fünf Hauptgruppen bilden die Zink-abhängigen Metalloproteinasen, die Metzinkine, zu denen die Matrixine (Matrixmetalloproteinasen MMP), die Serralysine, die Astazine und die Adamlysine gehören (Bode *et al.* 1993, Hooper 1994, Stocker *et al.* 1995). Die Adamlysine werden ihrerseits in die ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) und in die SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinase*) aufgeteilt (Abbildung 1.1).

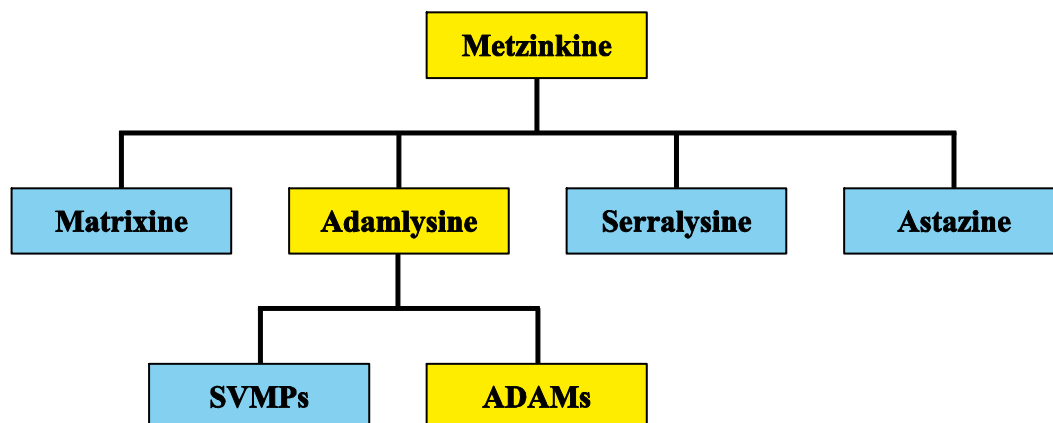


Abbildung 1.1: Proteinfamilie der Zink-abhängigen Metalloproteinasen

Zur Familie der Metzinkine gehören die Matrixine (Matrixmetalloproteinasen MMP), die Serralysine, die Astazine und die Adamlysine. Die Adamlysine lassen sich wiederum in die ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) und in die SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinase*) aufteilen (Abbildung modifiziert aus (Hooper 1994)).

1.1.1 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAM)

Die ADAMs wurden 1987 in Spermien des Meerschweinchens entdeckt, wo sie eine Rolle bei der Spermatogenese und der Fusion von Spermium und Eizelle spielen (Primakoff *et al.* 1987, Blobel *et al.* 1992, Evans 1999). Sie sind im Organismus ubiquitär verteilt und konnten in einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen werden, beispielsweise in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* (Pan and Rubin 1997, Huang *et al.* 2003). In Bakterien und Pflanzen konnten bisher keine ADAMs identifiziert werden (Stone *et al.* 1999).

Sie bilden eine Enzymfamilie, die eine Gruppe von membranständigen Typ I Glykoproteinen umfasst. Die Bezeichnung ADAM (**A** *Disintegrin* **A**nd *Metalloproteinase*) bezieht sich auf die beiden Haupteigenschaften. Zum einen die Fähigkeit die Ektodomänen von membranassoziierten Proteinen proteolytisch zu spalten und zum anderen die Zell-Zell-Interaktion mit Integrinen. Aufgrund dieser Funktionen sind die ADAMs in der Lage die Zelloberfläche zu modifizieren und mit anderen Zellen zu interagieren. Sie spielen daher eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse und sind insbesondere an Entwicklungs- und Regulationsprozessen wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration und der Signaltransduktion beteiligt. Sie sind aber auch an pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Tumorprogression und Metastasierung beteiligt (Blobel 2005, Edwards *et al.* 2008, Goos 2010).

Die ADAMs weisen eine charakteristische Domänenstruktur auf, welche zuerst bei einigen Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMPs) entdeckt wurde. Diese Domänenstruktur setzt sich aus einer N-terminalen Signalsequenz, gefolgt von einer Prodomäne, einer Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer EGF (*Epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen. Bei einigen ADAMs fehlt die EGF-ähnliche Domäne, wie es bei ADAM10 und ADAM17 der Fall ist. Bei den Schlangengift-Metalloproteinasen handelt es sich im Gegensatz zu den ADAMs um lösliche Proteine, da sie keine Transmembran-Domäne und keinen zytoplasmatischen Teil besitzen (Seals and Courtneidge 2003) (Abbildung 1.2).

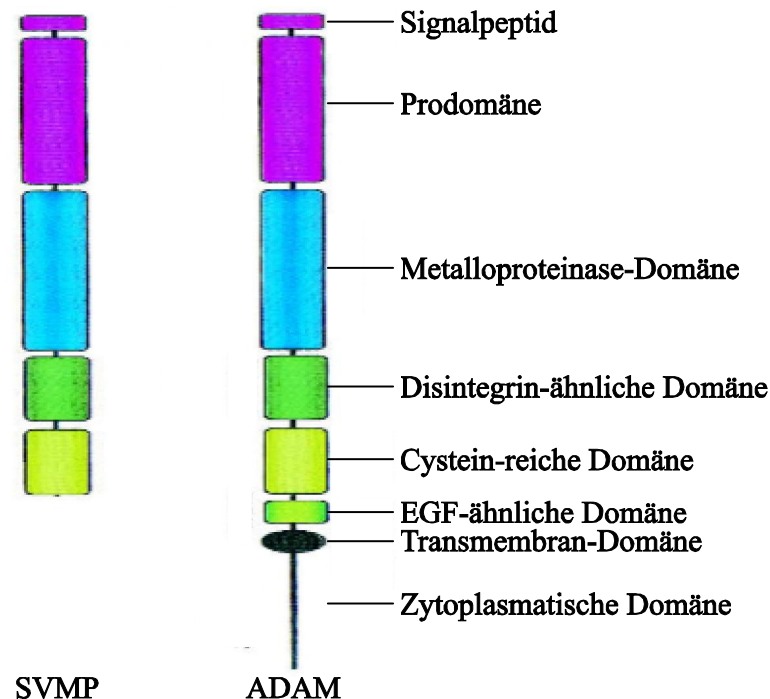


Abbildung 1.2: Darstellung der Domänenstruktur von ADAMs im Vergleich zu SVMPs

Die Domänenstruktur der ADAMs setzt sich aus einer N-terminalen Signalsequenz, gefolgt von einer Prodomäne, einer Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer EGF (*Epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer Zytoplasmatischen Domäne zusammen. Allerdings besitzen nicht alle ADAMs die EGF-ähnlichen Domäne, sie fehlt z.B. bei ADAM10 und ADAM17. Den SVMPs fehlt ebenfalls die EGF-ähnliche Domäne und sie besitzen keine Transmembran-Domäne und keinen zytoplasmatischen Teil (Abbildung modifiziert aus (Seals and Courtneidge 2003)).

Die katalytisch aktive Metalloproteinase-Domäne weist ein konserviertes charakteristisches Zinkbindungsmotiv mit drei Histidinresten (**HEXXHXXGXXH**) auf, welches Zn^{2+} im aktiven Zentrum bindet (Bode *et al.* 1993, Stocker and Bode 1995). Die vierte Koordinationsstelle des Zn^{2+} wird durch einen Cysteinrest der Prodomäne, einem sogenannten *cystein switch* abgeschirmt, wodurch die katalytische Aktivität der Protease in einem latenten Zustand gehalten wird (Roghani *et al.* 1999). Durch Proprotein Konvertase 7 oder Furin kann die Prodomäne abgespalten werden (Endres *et al.* 2003). Die Carbonylgruppe des konservierten Glutamatrestes katalysiert die Spaltung der Peptidbindung. C-terminal von dieser Konsensussequenz befindet sich ein sogenannter *Met-turn*. Hierbei handelt es sich um einen konservierten Methioninrest in der Nähe des katalytischen Zentrums, der die hydrophobe Tasche für das Zinkion und die Histidinreste

1 Einleitung

formt und somit an der Ausbildung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrum beteiligt ist (Abbildung 1.3) (Bode *et al.* 1993, Stocker and Bode 1995). Nicht alle der bisher bekannten 40 ADAMs sind proteolytisch aktiv, da einigen das Zinkbindungsmotiv in der katalytischen Domäne fehlt.

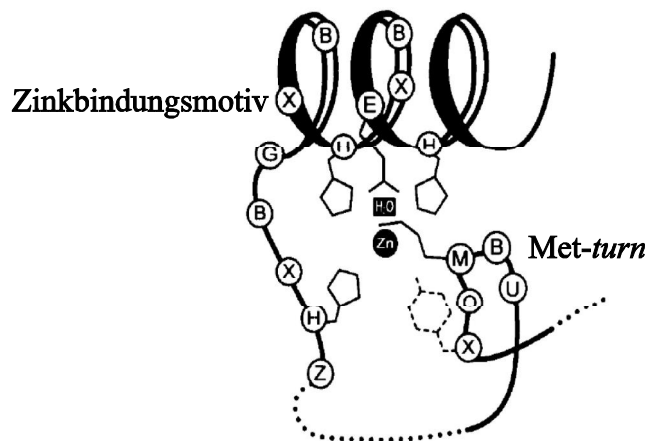


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Zinkbindungsmotivs und des Met-turns (Abbildung modifiziert aus (Stocker and Bode 1995))

Disintegrin wurde erstmals aus Schlangengift isoliert und inhibiert die durch Integrin vermittelte Bindung von Blutplättchen an Fibrin (Gould *et al.* 1990, McLane *et al.* 1998). Die Disintegrin-ähnliche Domäne der ADAMs kann ebenfalls mit Integrinen oder anderen Rezeptoren wechselwirken. Das Disintegrinbindungsmotiv der Schlangengifte umfasst das Tripeptid RGD, das sich am Anfang des Disintegrin-Loops aus 13 Aminosäuren befindet. Die ADAMs besitzen an dieser Stelle ein Tripeptid, das an der Stelle von Aspartat ein Glutamat aufweist. Daher wird davon ausgegangen, dass der negativ geladene Rest für die Funktion als Integrin-Ligand verantwortlich ist (Wolfsberg *et al.* 1995).

Eine proteolytische Spaltung eines membranassoziierten Proteins zur Freisetzung ihrer Ektodomäne bezeichnet man als *Shedding*. ADAMs führen zum *Shedding* vieler membranständiger Proteine, wie den Cadherinen, L-Selektin, TGF- α (Peschon *et al.* 1998), TNF- α (Black *et al.* 1997), IL-6-Rezeptor (Althoff *et al.* 2000), Amyloides Vorläuferprotein APP, Notch-Ligand und Notch-Rezeptor (Hartmann *et al.* 2002, Lieber

et al. 2002). *Shedding* spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse und hat vielfältige Konsequenzen für die Zelle (Blobel 2005). Beispielsweise können membrangebundene Liganden nach erfolgtem *Shedding* an ihre Rezeptoren binden. Aber auch Rezeptoren können gespalten werden, was entweder zu einem Verlust an Responsivität der Zelle führen kann oder es bildet sich ein löslicher Rezeptor-Ligand-Komplex, der über *Trans-signalling* andere Zellen aktivieren kann, wie es für den IL-6-Rezeptor beschrieben ist (Rose-John and Heinrich 1994). In Abbildung 1.4 A ist das *Shedding* eines membrangebundenen Proteins, in Abbildung 1.4 B mögliche Signalwege nach erfolgtem *Shedding* dargestellt.

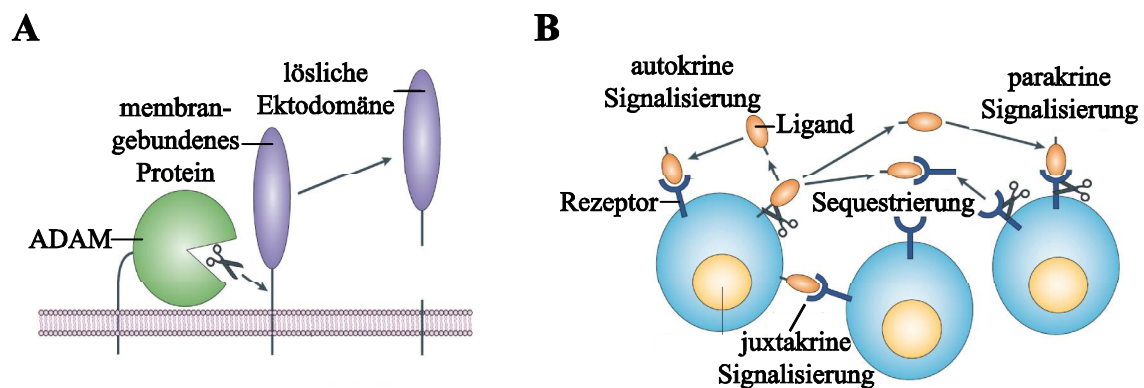


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Ektodomän-Shedding

(A) *Shedding* eines membrangebundenen Proteins führt zur Freisetzung der Ektodomäne in den extrazellulären Raum. (B) Mögliche Signalwege nach dem *Shedding*. Zur juxtakrinen Signalisierung kommt es wenn keine proteolytische Spaltung stattgefunden hat. Bei der autokrinen Signalisierung stimuliert der freigesetzte Ligand die eigene Zelle, bei der parakrinen eine andere Zelle. Wenn Ligand und Rezeptor gespalten werden, kann ein löslicher Ligand-Rezeptor-Komplex entstehen (Abbildung modifiziert aus (Blobel 2005)).

1.1.2 ADAM10

Die Metalloproteinase ADAM10, auch Kuzbanian (KUZ) und *Mammalian Disintegrin Metalloproteinase* (MADM) bezeichnet, wurde erstmals 1989 aus Rinderhirn als MBP (*Myelin Basic Protein*)-degradierendes Enzym isoliert (Chantry *et al.* 1989). ADAM10 wird in vielen Geweben, wie beispielsweise im Herz, Gehirn, Lunge, Leber und Niere exprimiert (Howard *et al.* 1996, Yavari *et al.* 1998, Karkkainen *et al.* 2000).

ADAM10 hat eine α -Sekretaseaktivität, die durch die proteolytische Spaltung des Amyloiden Vorläuferproteins APP nachgewiesen werden konnte. Nach Spaltung von APP durch ADAM10 entsteht das neuroprotektive APPs α und gleichzeitig wird die Bildung des β -Amyloid-Peptids (A β), welches eine Rolle bei der Alzheimer Erkrankung spielt, verhindert. (Lammich *et al.* 1999). Bis heute konnten zahlreiche Substrate identifiziert werden, die durch ADAM10 proteolytisch gespalten werden. Beispiele dafür sind der Notch-Rezeptor (Hartmann *et al.* 2002), der IL-6-Rezeptor (Matthews *et al.* 2003), sowie die Adhäsionsmoleküle (N)-Cadherin (Reiss *et al.* 2005), E-Cadherin (Maretzky *et al.* 2005) (VE)-Cadherin (Schulz *et al.* 2008) und CD44 (Nagano *et al.* 2004).

ADAM10 spielt während der frühen Embryogenese eine wichtige Rolle. ADAM10-defiziente Mäuse sterben am neunten Embryonaltag und zeigen Entwicklungsstörungen in Gehirn, Herz, Neuralrohr und Somiten. Diese Störungen entstehen vermutlich durch die Beeinträchtigung des Notch-Signalweges (Hartmann *et al.* 2002). Eine erhöhte Expression von ADAM10 konnte bei Darmkrebs, Prostatakrebs und Plattenepithelkarzinom nachgewiesen werden (McCulloch *et al.* 2004, Gavert *et al.* 2007, Ko *et al.* 2007).

1.1.3 ADAM17

ADAM17 wurde erstmals 1997 entdeckt und ist maßgeblich an der proteolytischen Spaltung von TNF- α beteiligt, weshalb ADAM17 auch als TACE (*Tumor Necrosis Factor Converting Enzym*) bezeichnet wird (Black *et al.* 1997). ADAM17 spaltet aber auch die Liganden für den EGF-Rezeptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*), wie beispielsweise TGF- α , HB-EGF oder Epiregulin (Reiss and Bhakdi 2012). Wie ADAM10

hat auch ADAM17 eine α -Sekretaseaktivität und spaltet APP in das neuroprotektive APPs α (Allinson *et al.* 2003). Beim *Shedding* von Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin ist TACE ebenfalls beteiligt (Peschon *et al.* 1998).

ADAM17-defiziente Mäuse sterben am Embryonaltag 17 oder kurz nach der Geburt. Sie weisen Entwicklungsstörungen im Bereich des Herzens und der Lunge auf. Aber auch Haut- und Haardefekte sind zu beobachten, wobei die epithelialen Defekte Ähnlichkeiten mit den Defekten bei TGF- α - und EGF-Rezeptor-defizienten Mäusen zeigen (Peschon *et al.* 1998).

1.1.4 Regulation des *Sheddings*

Generell wird zwischen konstitutivem und induziertem *Shedding* unterschieden. Zum konstitutiven *Shedding*, das auf basalem Niveau ohne Aktivierung stattfindet, gehört die Prozessierung der ADAM-Protease-Proform im trans-Golgi durch Proprotein-Konvertasen. Induziert werden kann das *Shedding* zum Beispiel über Aktivierung der MAP-Kinasen (*Mitogen Activated Protein*-Kinase) (Fan and Derynck 1999, Gechtman *et al.* 1999), der Proteinkinase C (Diaz-Rodriguez *et al.* 2002) oder durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Durch den synthetisch hergestellten Proteinkinase C Agonisten PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) werden Membranproteine wie TNF- α , TGF- α und IL-6 Rezeptor gespalten. ADAM17 kann auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert werden, wodurch es zur Freisetzung von EGF-Rezeptor-Liganden kommt und somit zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors und im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung der Kinase ERK1/2 (Prenzel *et al.* 1999, Yan *et al.* 2002, Blobel *et al.* 2009, Maretzky *et al.* 2011).

Der Mechanismus der Aktivierung der ADAMs ist noch nicht genau verstanden und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass es durch die Stimulierung des Ektodomän-*Sheddings* zu einem schnellen Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche kommt (Soond *et al.* 2005, Killock and Ivetic 2010). Andererseits konnte aber auch ein vermehrtes *Shedding* durch ADAM17 ohne eine Veränderung in der Expression gezeigt werden (Horiuchi *et al.* 2007).

Der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 wird eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung nachgesagt (Diaz-Rodriguez *et al.* 2002, Fan *et al.* 2003, Xu and Derynck 2010). Allerdings konnten ADAM17-Mutanten, denen die zytoplasmatische Domäne fehlt durch PMA aktiviert werden (Reddy *et al.* 2000, Doedens *et al.* 2003, Horiuchi *et al.* 2007).

Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Aktivierungsmechanismen sind die Ergebnisse von Xu *et al.* 2012 und Le Gall *et al.* 2010. Hier konnte zum einen beobachtet werden, dass ADAM17 als Dimer oder Multimer in der Zellmembran vorliegt und es durch die Dimerisierung der zytoplasmatischen Domänen zu einer effizienten Bindung von TIMP-3 kommt (Lorenzen *et al.* 2011, Xu *et al.* 2012). Bei den TIMPs (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinase*) handelt es sich um endogene Inhibitoren, die die Sekretaseaktivität von MMPs und ADAMs hemmen. Durch die Aktivierung des ERK- oder p38 MAPK-Signalweges kommt zu einer Verlagerung der Dimere zu Monomeren, wodurch es zu einer verminderten Bindung von TIMP-3 und einem gesteigerten *Shedding* von TGF- α kommt (Xu and Derynck 2010, Lorenzen *et al.* 2011, Xu *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Le Gall *et al.* 2010, die besagen, dass die physiologische Stimulation von ADAM17 nicht von einer Dissoziation von TIMP-3 abhängig ist und dass nicht die zytoplasmatische Domäne sondern die Transmembran-Domäne für die Aktivierung von ADAM17 erforderlich ist.

Somit ist plausibel, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivierung der ADAMs haben können. In der Tat zeigten Reiss *et al.* 2011, dass biophysikalische Änderungen der Membraneigenschaften sich auf die durch ADAM10 und ADAM17 bedingte Substratspaltung auswirken. Demnach führt die Zugabe von ungesättigten freien Fettsäuren zu vermehrtem *Shedding* von ADAM10- und ADAM17-Substraten in verschiedenen Zelltypen. Dieser Befund korreliert mit der gesteigerten Membranfluidität und der vermehrten Mobilität der Enzyme und Substrate in der Membran.

1.2 P2-Rezeptoren

Die P2-Rezeptoren werden aufgrund ihrer molekularen Struktur in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt. Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um Liganden-gesteuerte Kationenkanäle, die aus homo- bzw. heterotrimeren Untereinheiten bestehen. Die P2Y-Rezeptoren gehören dagegen zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Burnstock and Kennedy 1985, Abbracchio and Burnstock 1994) (Abbildung 1.5). Bis heute sind sieben Mitglieder der Familie der P2X-Rezeptoren und acht Mitglieder der Familie der P2Y-Rezeptoren bekannt, die sowohl Purin- als auch Pyrimidin-Nukleotide erkennen (North 2002, Burnstock 2007).

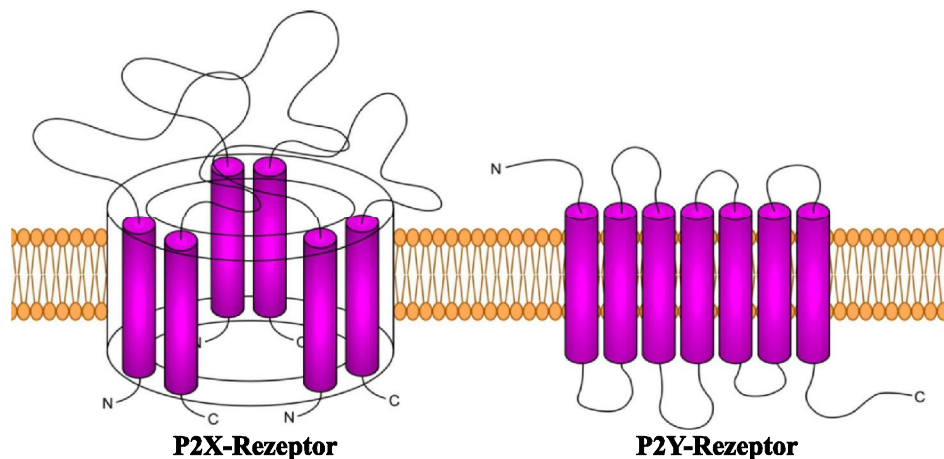


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der P2X- und P2Y-Rezeptoren

Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ATP-gesteuerte Kationenkanäle, bestehend aus homo- bzw. heterotrimeren Untereinheiten. Die P2Y-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

1.2.1 Die Familie der P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren werden in vielen Geweben exprimiert, unter anderem auch in hämatopoetischen Zellen (Di Virgilio *et al.* 2001, Burnstock 2007). Die Familie besteht aus sieben Mitgliedern (P2X1 bis P2X7). Diese Rezeptoren sind ATP-gesteuerte, nicht selektive Kationenkanäle und bestehen aus einem intrazellulären N- und C-Terminus, zweier Transmembran-Domänen und einer relativ großen extrazellulären Schleife. In

dieser befinden sich neben zehn konservierten Cysteinresten, welche intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, zwei bis sechs Konsensussequenzen für die N-Glykosylierung sowie die ATP-Bindungsstelle (Hansen *et al.* 1997, North 2002, Burnstock 2007). Die Ionenkanäle bestehen aus drei Untereinheiten, die entweder homo- oder heterotrimer organisiert sind (North 2002, Barrera *et al.* 2005). Nach Bindung von ATP öffnet sich der Ionenkanal innerhalb von Millisekunden und es kommt zu einem schnellen Einstrom von Na- und Ca-Ionen sowie einem Ausstrom von Kaliumionen. Dies führt zur Depolarisation der Zellmembran und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, wodurch die intrazelluläre Calciumionenkonzentration weiter ansteigt und Signaltransduktionswege aktiviert werden (Di Virgilio *et al.* 2001, North 2002).

1.2.2 Der P2X7-Rezeptor

Der P2X7-Rezeptor weist einige Besonderheiten auf. Er ist das größte Protein innerhalb der Familie der P2X-Rezeptoren mit einem deutlich längeren C-terminalen Bereich. Mit Ausnahme der heterotrimeren P2X4/P2X7-Ionenkanäle bilden sich ausschließlich homotrimere Ionenkanäle aus (North 2002, Guo *et al.* 2007). Zur Aktivierung benötigt er hohe ATP-Konzentrationen ($> 100 \mu\text{M}$) und die Ansprechbarkeit gegenüber bz-ATP (2',3'-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP) ist 10- bis 30fach höher als bei anderen P2X-Rezeptoren. Eine weitere Besonderheit ist seine geringe Desensitivierung. Auch bei anhaltender Stimulation durch ATP densitiviert der P2X7-Rezeptor kaum (North 2002). Eine länger andauernde Aktivierung führt zur Bildung einer Pore, die für Moleküle mit bis zu einer Größe von 900 Da durchlässig ist. Die Größe dieser Pore konnte mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs Yo-Pro-1 nachgewiesen werden (Rassendren *et al.* 1997). Es wird davon ausgegangen, dass die Porenbildung durch Pannexin-1 geschieht, ein Membranprotein, das strukturelle Ähnlichkeiten mit den Connexinen aufweist (Pelegriin and Surprenant 2006).

Der P2X7-Rezeptor wird auch in Verbindung mit der Aktivität von Metalloproteinasen gebracht. So konnte in Lymphozyten durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors ein vermehrtes *Shedding* von L-Selektin und CD23 durch Metalloproteinasen nachgewiesen werden (Gu *et al.* 1998). Des Weiteren wird in Thymozyten sowie in Erythrozyten nach

Aktivierung des Rezeptors eine Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran beobachtet (Courageot *et al.* 2004, Sluyter *et al.* 2007).

1.3 Biologische Membranen

1.3.1 Aufbau von Zellmembranen

Biologische Membranen grenzen Zellen von ihrer Außenwelt ab und weisen eine hochselektive Permeabilität auf. Dies ermöglicht der Zelle einen gerichteten Energie-, Stoff- und Informationsaustausch mit ihrer Umwelt. Vor ungefähr 40 Jahren wurde durch das *fluid mosaic model* von Singer und Nicolson die Grundlage für das Verständnis biologischer Membranen gelegt. Demnach bestehen biologische Membranen aus einer etwa 5 nm dicken fluiden Lipiddoppelschicht, in die integrale und periphere Membranproteine eingebaut sind (Singer and Nicolson 1972). Die Membranlipide gliedern sich in drei Hauptgruppen: Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin.

Die Phospholipide bilden den größten Anteil und bestehen aus einem hydrophilen Kopf und einem langen hydrophoben Schwanz. Daher ordnen sie sich in der Membran so an, dass die hydrophilen Köpfe jeweils zur wässrigen Phase zeigen und die hydrophoben Schwänze in das Membraninnere ragen (Abbildung 1.6). Der hydrophile Kopf besteht entweder aus dem Grundgerüst des Alkohols Glycerin oder Sphingosin, an den über eine Phosphatgruppe ein weiterer Alkohol gebunden ist. Anhand des Grundgerüsts werden die Phospholipide in die beiden Hauptgruppen Phosphoglyceride und Sphingolipide aufgeteilt. Je nach phosphoryliertem Alkohol gehören zu den Phosphoglyceriden Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylinositol (PI).

Zu der Gruppe der Sphingolipide gehört das Sphingomyelin (SM), das aus einer Esterbindung der primären Hydroxylgruppe des Sphingosins mit Phosphorylcholin besteht. Der hydrophobe Anteil der Phospholipide besteht aus langkettigen Fettsäuren (Stryer 2003).

Glykolipide sind kohlenhydrathaltige Lipide, die sich ebenfalls von dem Sphingosin ableiten. An der primären Hydroxylgruppe des Sphingosins sind ein oder mehrere

1 Einleitung

Kohlenhydrateinheiten substituiert, welche sich immer auf der extrazellulären Seite der Membran befinden (Stryer 2003).

Cholesterin weist dagegen eine komplett andere Struktur auf. Cholesterin besteht aus einem planaren Steroid-Ringsystem, mit einem hydrophoben Schwanz aus Kohlenwasserstoffen auf der einen Seite und einer hydrophilen Hydroxylgruppe auf der anderen Seite. Cholesterin lagert sich in Membranen parallel zu den Fettsäureketten an, wobei der hydrophile Bereich mit dem der Phospholipide in Wechselwirkung tritt.

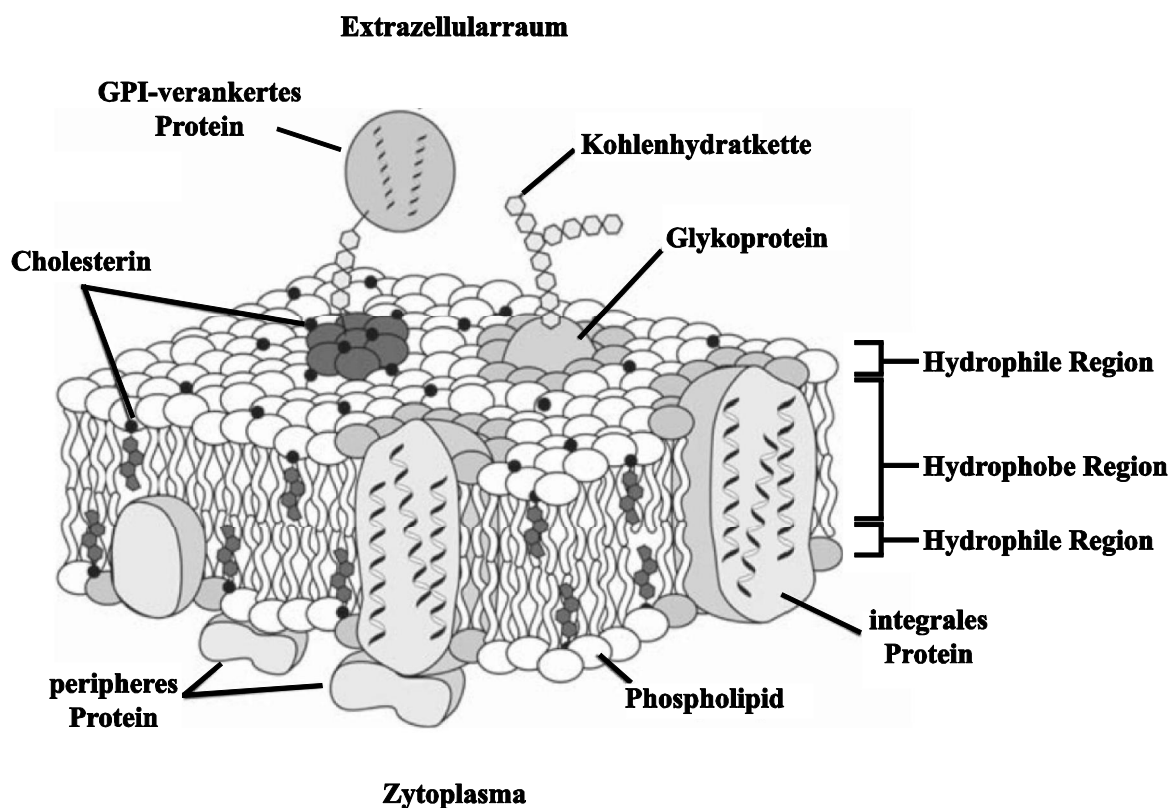


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des *fluid mosaic model* nach Singer und Nicolson

Biologische Membranen bestehen aus einer etwa 5 nm dicken fluiden Lipiddoppelschicht, in die integrale und periphere Membranproteine eingebettet sind (Abbildung modifiziert aus (Sachs *et al.* 2009)).

1.3.2 Membranasymmetrie

Die Membran der Erythrozyten ist die bisher am besten untersuchte Zellmembran. In ihr befinden sich die Phospholipide Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hauptsächlich auf der Außenseite, während Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin fast ausschließlich auf der Innenseite lokalisiert sind. Diese charakteristische Verteilung der Phospholipide verleiht der Membran eine Asymmetrie, welche eine wichtige physiologische Rolle spielt (Connor *et al.* 1994) und unter Energieaufwand aufrechterhalten wird (Rothman and Lenard 1977). Für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie sind die Aminophospholipid-Translokase und die Floppase verantwortlich.

Die Aminophospholipid-Translokase, auch Flippase oder P-Typ ATPase genannt, transportiert ausschließlich Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin unter Verbrauch von einem Molekül ATP, gegen den Konzentrationsgradienten von der Außenseite der Membran auf die Innenseite (Morrot *et al.* 1989, Beleznyay *et al.* 1993). Phosphatidylserin wird dabei viel schneller transportiert als Phosphatidylethanolamin (Connor *et al.* 1992). Durch Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird die Translokase gehemmt (Tilly *et al.* 1990).

Die weniger spezifische Floppase transportiert ATP-abhängig Phosphatidylcholin und Sphingomyelin aber auch Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin von der Innenseite zur Außenseite der Membran (Zwaal and Schroit 1997). Da der Transport nach außen in etwa 10mal mehr Zeit benötigt als der Einwärtstransport der Translokase, wird so die Asymmetrie aufgebaut und aufrecht erhalten (Bitbol and Devaux 1988, Andrick *et al.* 1991, Connor *et al.* 1992).

Die Phospholipid-Scramblase ist ein weiteres Protein, das die Lipidverteilung in der Membran beeinflusst. Die Scramblase wird durch Calcium aktiviert und transportiert unspezifisch PS, PE, PC und SM (Smeets *et al.* 1994, Williamson *et al.* 1995). Dieser Prozess ist ATP-unabhängig und die Phospholipide werden entlang ihres Konzentrationsgradienten transportiert. Somit führt die Aktivierung der Scramblase, im Gegensatz zur Translokase und Floppase, innerhalb kürzester Zeit zu einem Verlust der Membranasymmetrie (Zwaal and Schroit 1997).

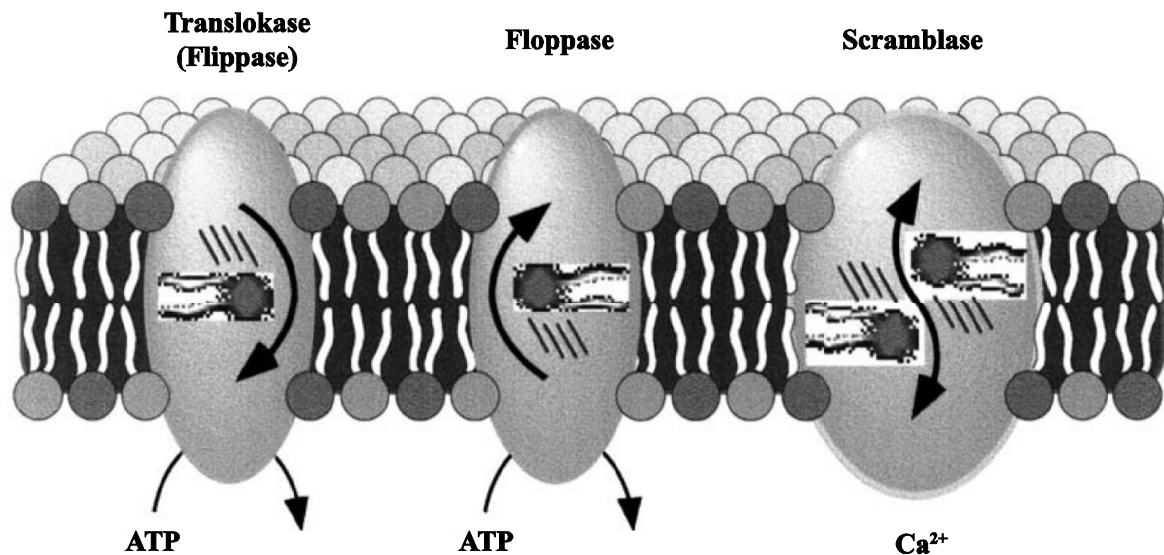


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Translokase, Floppase und Scramblase (Abbildung aus (Zwaal *et al.* 2004))

Ein Zusammenbruch der Asymmetrie, vor allem die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran ist mit vielen physiologischen und pathologischen Prozessen verbunden (Zwaal and Schroit 1997).

1.3.3 Phosphatidylserin

Phosphatidylserin ist in gesunden, nicht aktivierten Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Membran lokalisiert (Kuypers 1998). In der Literatur werden mehrere Mechanismen zur Exposition von PS auf der Außenseite der Membran diskutiert.

In den meisten Fällen wird die Präsentation von Phosphatidylserin mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration in Verbindung gebracht. Dies beruht auf der Aktivierung der Scramblase und gleichzeitiger Inaktivierung der Translokase (Zwaal and Schroit 1997). Zusätzlich werden durch den Ca^{2+} -Anstieg calciumabhängige K^{+} -Kanäle (Gardos-Kanäle) geöffnet. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und dadurch zu einem Verlust von KCl, wodurch die Exposition von PS verstärkt wird (Lang *et al.* 2003b).

Nach den Befunden von De Jong *et al.* 2002, führt bei Erythrozyten die durch eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration aktivierte Scramblase nur in Verbindung mit der Aktivität von Proteinkinase C zu einer Exposition von PS (de Jong *et al.* 2002).

Auch Ca^{2+} -unabhängige Mechanismen werden diskutiert. Beispielsweise erhöht Ceramid die Sensitivität der Scramblase für Calcium und begünstigt deren Aktivität (Lang *et al.* 2004). Ceramid gehört zu den Sphingolipiden und wird durch Spaltung von Sphingomyelin durch die Sphingomyelinase gebildet. Die Behandlung von Zellen in hypertonem Medium führt zu einer Anhäufung von Ceramid. Ceramid spielt auch als sekundärer Botenstoff bei der Apoptoseinduktion vieler Zellen eine wichtige Rolle (Frago *et al.* 1998, Goldkorn *et al.* 1998, Kolesnick and Fuks 2003).

Eine weitere Ca^{2+} -unabhängige Exposition von Phosphatidylserin wird durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors in Thymozyten und in Erythrozyten bewirkt (Courageot *et al.* 2004, Sluyter *et al.* 2007).

Die Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran ist mit vielen physiologischen und pathologischen Prozessen verbunden. Phosphatidylserin spielt zum Beispiel bei der Hämostase eine wichtige Rolle, indem es die Aktivierung des Tenasekomplexes (Faktor VIIIa und IXa) und des Prothrombinkomplexes (Faktor Va und Xa) unterstützt (Mann *et al.* 1990, Kalafatis *et al.* 1994). PS ist auch in der Lage, den alternativen Weg des Komplementsystems zu aktivieren (Chonn *et al.* 1991, Wang *et al.* 1993).

Des Weiteren kann Phosphatidylserin als ein Signal für die Aktivierung der Phagozytose angesehen werden. Apoptotische Zellen präsentieren auf ihrer Außenseite Phosphatidylserin und werden durch das retikuloendotheliale System entfernt (Allen *et al.* 1988, van Engeland *et al.* 1998, Schlegel and Williamson 2001). Makrophagen besitzen einen Phosphatidylserin-Rezeptor auf ihrer Außenseite, mit dem sie die apoptotischen Zellen binden und eliminieren (Shiratsuchi *et al.* 1998, Fadok *et al.* 2000).

Zahlreiche Krankheiten, wie die Sichelzellanämie (Chiu *et al.* 1979, Tait and Gibson 1994) und β -Thalassämie (Borenstein-Ben Yashar *et al.* 1993) aber auch die chronische Urämie (Bonomini *et al.* 2001), führen zu einem Verlust der Membranasymmetrie und somit zu einer vermehrten Exposition von Phosphatidylserin.

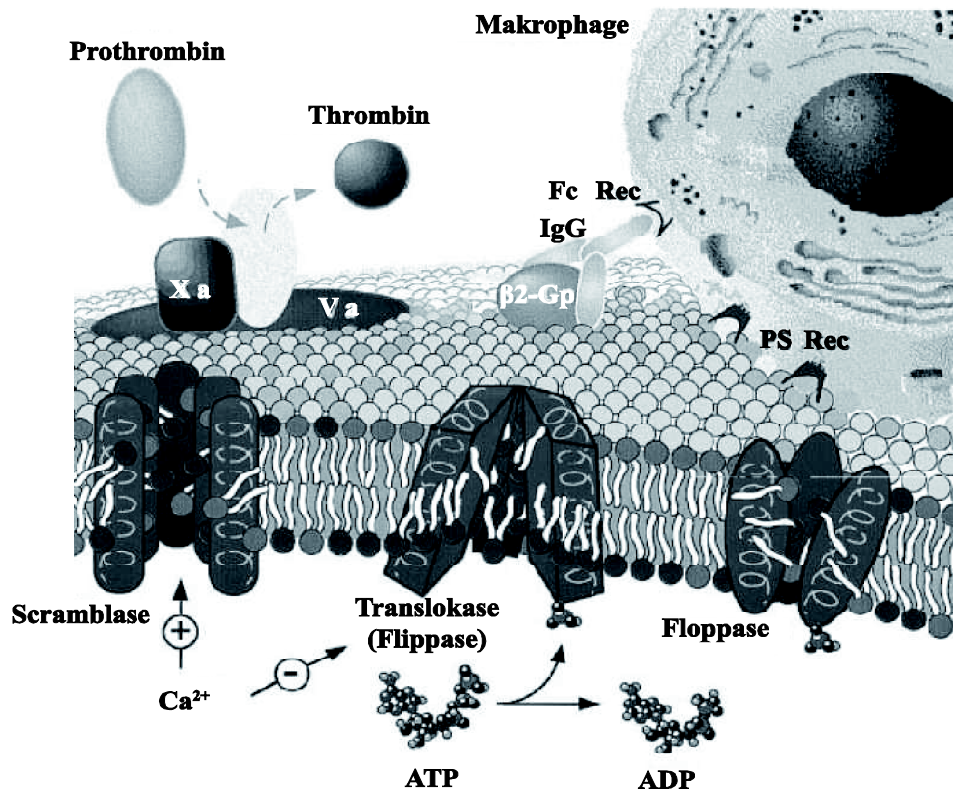


Abbildung 1.8: Regulation und physiologische Prozesse der Exposition von Phosphatidylserin (Abbildung modifiziert aus (Zwaal and Schroit 1997))

1.4 Melittin

Das Gift der Honigbiene (*Apis mellifera*) enthält eine Vielzahl von sowohl pharmakologisch als auch enzymatisch aktiven Komponenten, wie Melittin, Apamin, Phospholipase A2, Histamin und Mastzelldegranulierendes Peptid (MCD-Peptid). Melittin ist der Hauptbestandteil des Bienengifts und macht 50 % des Trockengewichtanteils aus (Habermann 1972, Raghuraman and Chattopadhyay 2007). Es handelt sich um ein kationisches Peptid, das sich in die Zellmembran einlagern und deren biophysikalische Eigenschaften ändern kann (Dawson *et al.* 1978, Schoch and Sargent 1980). Melittin gehört zur Familie der antimikrobiellen Peptide (AMPs) und wird als aussichtsreiches Anti-Krebsmittel und Antibiotikum diskutiert (Duclohier 2010, Orsolic 2012). In vitro konnten positive Wirkungen von Melittin auf Zellen von Nieren-, Blasen-, Lungen- und Brustkrebs beobachtet werden (Son *et al.* 2007). Des Weiteren konnten auch schon im Tiermodell erfolgsversprechende Ergebnisse bei Lungen-, Leber- und Prostatakrebs gezeigt werden (Russell *et al.* 2004, Liu *et al.* 2008, Soman *et al.* 2009).

Melittin wird auch eine entzündungshemmende, anti-rheumatische, anti-arthritische und schmerzlindernde Wirkung zugeschrieben (Son *et al.* 2007).

1.4.1 Struktur und Konformation

Melittin ist ein aus 26 Aminosäuren aufgebautes kationisches, überwiegend hydrophobes Peptid mit einer Nettoladung von +5. Vier der positiven Ladungen befinden sich in der C-terminalen Region (KRKR) und die fünfte befindet sich im N-terminalen Bereich an Position sieben. In der Literatur wird aufgrund der asymmetrischen Verteilung der polaren und unpolaren Aminosäuren eine amphipathische α -helikale Sekundärstruktur vorgeschlagen (Dathe and Wieprecht 1999).

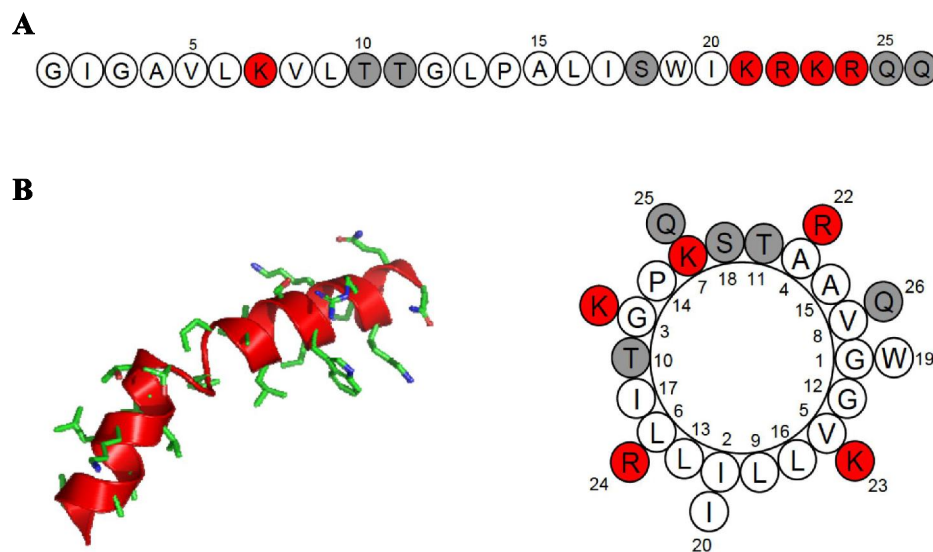


Abbildung 1.9: Primär- und Sekundärstruktur von Melittin
(Abbildung modifiziert aus (Raghuraman and Chattopadhyay 2007))

Trotz des hohen Anteils an unpolaren Aminosäuren ist Melittin gut in Wasser und weniger gut in Methanol löslich. In wässrigen Lösungen kann das Peptid verschiedene Konformationen annehmen. Bei niedriger Peptidkonzentration liegt Melittin hauptsächlich als Monomer in einer Random-Coil-Struktur vor, während sich bei höheren Peptidkonzentrationen, einer erhöhten Ionenkonzentration oder einem hohem pH-Wert

Tetramere bilden (Dempsey 1990). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte die Struktur der Tetramere in wässriger Lösung bestimmt werden (Anderson *et al.* 1980, Terwilliger and Eisenberg 1982b, a, Terwilliger *et al.* 1982). Jedes der vier Melittin-Monomere besteht aus zwei α -helikalen Segmenten, die durch Prolin an Position 14 getrennt sind und in einem Winkel von 120° zueinander stehen. Dieser Winkel ermöglicht eine optimale Verpackung der hydrophoben Seitenketten innerhalb des Tetramers (Raghuraman and Chattopadhyay 2007).

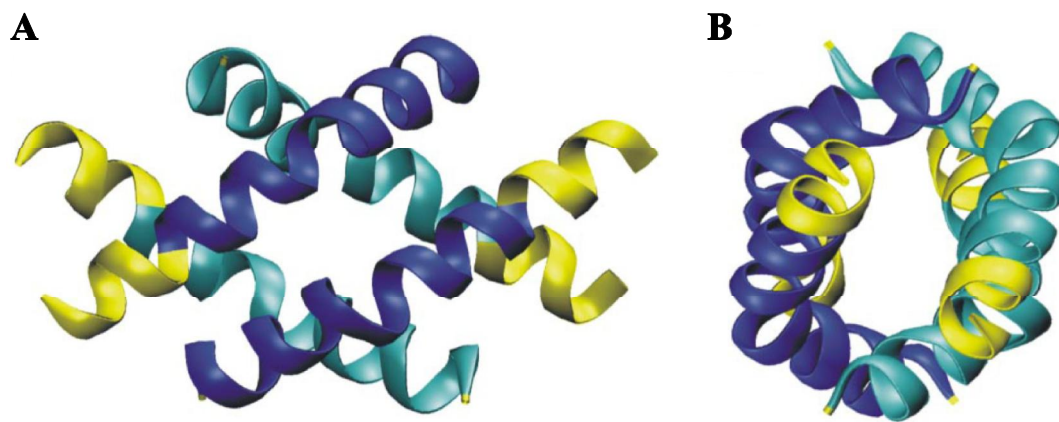


Abbildung 1.10: Kristallstruktur der Melittin-Tetramere

Kristallstruktur eines Melittin-Tetrameres von der Vorder- (A) und der Seitenansicht (B). Gelb dargestellt sind die kationischen C-terminalen Bereiche (Abbildung aus (Giovambattista *et al.* 2008)).

1.4.2 Interaktion mit Lipidmembranen

Die Interaktion von Melittin mit Lipidmembranen ist von mehreren Faktoren abhängig. Wie zum Beispiel von den Eigenschaften des Peptids in wässriger Lösung, der Peptidkonzentration, der Lipidzusammensetzung der Membran und dem Membranpotential (Dempsey 1990). Die Affinität von Melittin gegenüber negativ geladenen Lipiden ist größer als gegenüber zwitterionischen Lipiden. An der Bindung von Melittin an Membranen sind sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt (Beschiaschvili and Seelig 1990, Yang *et al.* 2001).

Melittin führt zur Bildung einer Pore in der Membran und übt somit lytische Effekte auf Zellen aus (Vogel and Jahnig 1986, Sansom 1991). Für diese Porenbildung werden hauptsächlich zwei Mechanismen vorgeschlagen. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen von Melittin mit der Membran wurden das *barrel-stave*-Modell und das *toroidal*-Modell vorgeschlagen (Abbildung 1.11). Nach dem *barrel-stave*-Modell bilden amphipathische α -Helices eine Pore, in dem sie mit ihren hydrophoben Oberflächen in Wechselwirkung mit dem Lipidkern der Membran treten und die hydrophilen Oberflächen zum Inneren der Pore zeigen (Katsu *et al.* 1988, Ladokhin *et al.* 1997, Rex and Schwarz 1998). Das *toroidal*-Modell unterscheidet sich von dem *barrel-stave*-Modell dahingehend, dass die Peptide immer auch mit den Kopfgruppen der Phospholipide assoziiert sind. Die Pore besteht somit aus den Kopfgruppen der Membranlipide und den Peptidmolekülen (Yang *et al.* 2001, Allende *et al.* 2005).

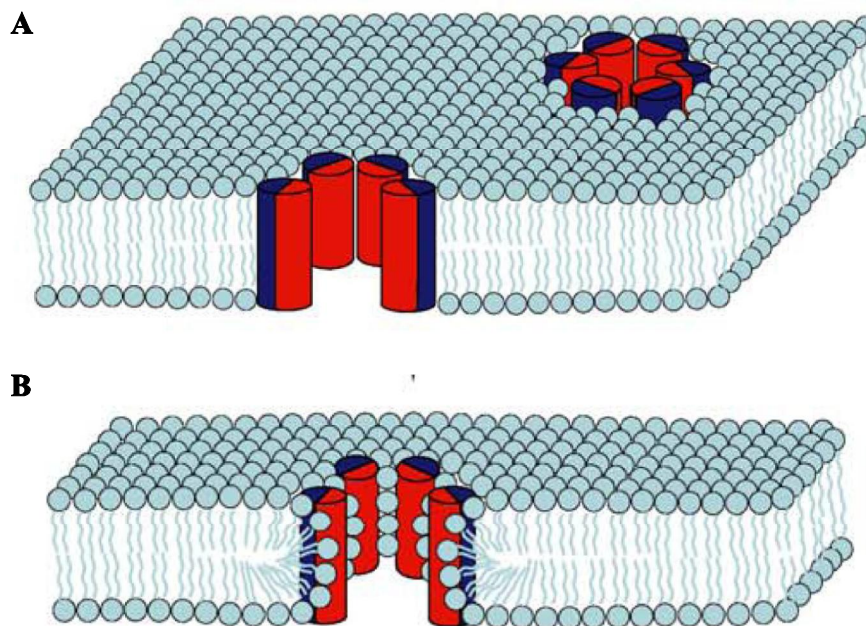


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung des (A) *barrel-stave*-Modells und des (B) *toroidal*-Modells

(A) Im *barrel-stave*-Modell bilden die amphipathischen α -Helices (blau sind die hydrophoben, rot die hydrophilen Bereiche dargestellt) eine Pore, in dem sie mit ihren hydrophoben Oberflächen in Wechselwirkung mit dem Lipidkern der Membran treten und die hydrophilen Oberflächen zum Inneren der Pore zeigen. (B) In dem *toroidal*-Modell sind die Peptide immer auch mit den Kopfgruppen der Phospholipide assoziiert. Die Pore besteht in diesem Fall aus den Kopfgruppen der Membranlipide und den Peptidmolekülen (Abbildung aus (Chan *et al.* 2006)).

1 Einleitung

Ein weiteres Modell ist das *detergent-like*-Modell. Dieses besagt, dass sich Melittin aufgrund seiner amphiphatischen Struktur wie ein Detergenz verhält. Bei niedrigen Konzentrationen orientiert sich Melittin aufgrund der elektrostatischen Anziehung zwischen den negativ geladenen Phospholipiden und seiner positiven Ladung parallel zu der Lipiddoppelschicht. Es dringt nicht in die Membran ein sondern bindet an die Kopfgruppen der Lipide. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration führt zu einer Aggregation der Melittine. Bei Erreichen eines Schwellenwertes ändern die Peptide nach diesem Modell ihre Orientierung und inserieren in die Membran, was eine Mizellenbildung zur Folge hat (Abbildung 1.12) (Monette and Lafleur 1995, Ladokhin and White 2001, Shai 2002, Bechinger and Lohner 2006).

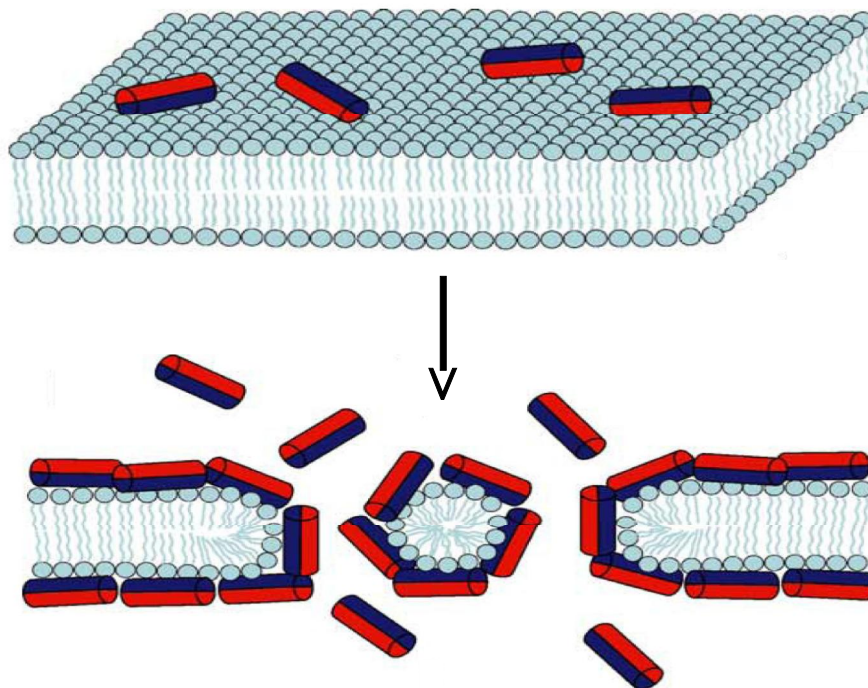


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung des *detergent-like*-Modells

Bei niedrigen Konzentrationen orientiert sich Melittin parallel zu der Lipiddoppelschicht und dringt nicht in die Membran ein sondern bindet an die Kopfgruppen der Lipide. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration führt zur Aggregation der Peptide. Bei Erreichen eines Schwellenwertes ändern die Melittine ihre Orientierung und inserieren in die Membran, was eine Mizellenbildung zur Folge hat (Abbildung modifiziert aus (Chan *et al.* 2006)).

Nach welchem Modell die Porenbildung von Melittin verläuft, kann aufgrund verschiedener Faktoren, wie dem Peptid/Lipid-Verhältnis, der Membranzusammensetzung, der Temperatur oder der Pufferzusammensetzung, nicht eindeutig gesagt werden (Bechinger and Lohner 2006).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Cholesterin die hämolytische Aktivität von Melittin in Modellmembranen inhibiert. Das in Melittin an Position 19 vorkommende Tryptophan bildet vermutlich einen stabilen Komplex mit dem starren Ringsystem des Cholesterins (Raghuraman and Chattopadhyay 2004, Allende *et al.* 2005). Ebenfalls konnte an Erythrozytenmembranen gezeigt werden, dass Cholesterin die Bindung von Melittin an die Membran reduziert. Da die Membran von Erythrozyten reich an Cholesterin ist, wird nach Cholesterin-Depletion eine gesteigerte Hämolyse der Erythrozyten beobachtet (Raghuraman and Chattopadhyay 2005). Diese Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen aus Modellmembranen überein, wonach eine Melittin-induzierte Porenbildung durch steigende Cholesterinkonzentrationen reduziert wird (Raghuraman and Chattopadhyay 2004, Allende *et al.* 2005).

1.4.3 Auswirkungen auf Zellen

Melittin besitzt eine breite antibakterielle Aktivität und gehört zur Familie der antimikrobiellen Peptide (AMPs) (Dawson *et al.* 1978, Schoch and Sargent 1980). In mikromolaren Konzentrationen tötet Melittin gram-negative und gram-positive Bakterien. Bei humanen Erythrozyten und anderen Zellen zeigt Melittin eine sehr hohe lytische Aktivität. Bereits in sub-mikromolaren Konzentrationen induziert Melittin einen Anstieg der Membranpermeabilität und letztlich die Lyse der Erythrozyten (DeGrado *et al.* 1982, Tosteson *et al.* 1985).

Neben seiner antimikrobiellen und hämolytischen Aktivität weist Melittin eine Vielzahl anderer biologischer Wirkungen auf. Unter anderem ist Melittin für die unspezifische Entzündungsreaktion des Bienengifts verantwortlich (Mackler and Kreil 1977) und zeigt auch schwach allergene Wirkungen (Hoffman and Shipman 1976, Sobotka *et al.* 1976, Paull *et al.* 1977).

Darüberhinaus führt Melittin zu Aggregationen von Membranproteinen, wie der Bande 3 in Erythrozyten (Clague and Cherry 1988) und der Ca^{2+} -ATPase (Mahaney and Thomas 1991, Voss *et al.* 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung und Aggregation dieser Proteine von dem Verhältnis von Melittin zu Protein und nicht vom Verhältnis Lipid zu Melittin abhängt. Dies kann durch eine direkte Interaktion von Melittin mit den Proteinen erklärt werden. Eine Quervernetzung der Proteine zu größeren Aggregaten wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Resten des C-Terminus von Melittin und den negativ geladenen Seitengruppen der Membranproteine ermöglicht.

Melittin ist ein potenter Inhibitor der H^+/K^+ -ATPase (Cuppoletti *et al.* 1989, Cuppoletti 1990, Cuppoletti and Malinowska 1992), der Na^+/K^+ -ATPase (Cuppoletti and Abbott 1990) und der Ca^{2+} -ATPase (Mahaney and Thomas 1991, Voss *et al.* 1991). Die Inhibition der Funktion dieser Ionenpumpen erfolgt wahrscheinlich durch direkte Wechselwirkung von Melittin mit dem Protein. Die H^+/K^+ -ATPase enthält eine Bindungsstelle für Polypeptide, welche ein amphiphatisches, helikales Motiv aufweist (Cuppoletti and Malinowska 1992). Durch Bindung von Melittin an dieses Motiv kommt es zur Inhibition des Proteins. Im Falle der Na^+/K^+ -ATPase werden durch Bindung von Melittin funktionsstörende Konformationsänderungen der Ionenpumpe induziert (Cuppoletti and Abbott 1990).

Die Aktivität der Phospholipase A2 (PLA2) wird durch Melittin auf das 5fache erhöht, was auch zu einer vermehrten Synthese der Arachidonsäure führt (Mollay and Kreil 1974, Vernon and Bell 1992). Die PLA2-abhängigen Effekte tragen zusammen mit der Aktivierung von Caspase-3 zur Anti-Krebs-Zytotoxizität von Melittin bei (Moon *et al.* 2006a). Auch eine entzündungshemmende Wirkung von Melittin vermittelt über Hemmung der DNA-Bindeaktivität des Transkriptionsfaktor NF- κ B wird diskutiert (Park *et al.* 2007).

1.5 *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC)

Vibrio cholerae Cytolysin (VCC) ist ein porenbildendes Toxin (Pore-forming Toxin PFT), das in Membranen inseriert und diese permeabilisiert. Es gehört zur Gruppe der Exotoxine und wird von den Stämmen des fakultativ anaeroben gram-negativen Stäbchens *Vibrio cholerae* El Tor O1 und non-O1 sezerniert (Honda and Finkelstein 1979, Yamamoto *et al.* 1986, Zitzer *et al.* 1997, Laohachai *et al.* 2003). Das Strukturgen *hlyA* kodiert ein prepro-Toxin mit einem Molekulargewicht von 82 kDa und besteht aus einem Signalpeptid, einer Pro-Region, einer cytolytischen Region und zwei lektin-ähnlichen Domänen (β -Trefoil und β -Prism) am C-terminalen Ende (Yamamoto *et al.* 1990, Olson and Gouaux 2005). Durch Abspaltung des Signalpeptids entsteht das 79 kDa schwere pro-Toxin pVCC. Das reife VCC (65 kDa) entsteht durch proteolytische Spaltung von pVCC entweder in Lösung oder nach Bindung an die Membran (Yamamoto *et al.* 1990). Die membrangebundene Spaltung von pVCC zu VCC erfolgt dabei unter anderem durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 (Valeva *et al.* 2004, Reiss *et al.* 2011). VCC verbleibt als Monomer in Lösung und oligomerisiert nach Bindung an die Zellmembran (Zitzer *et al.* 1995, Ikigai *et al.* 1996). Die Porenbildung erfolgt, indem sieben membranassoziierte Monomere ein Oligomer bilden, das anschließend in die Membran inseriert und eine mit Wasser gefüllte Pore bildet (Olson and Gouaux 2005). Die Pore hat einen Durchmesser von 1,5 nm und eine Höhe von 10 – 12 nm (Zitzer *et al.* 1995, Zitzer *et al.* 1999). Die Bindung des Toxins an die Zellmembran ist temperaturunabhängig. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass VCC eine hohe Affinität zu cholesterinhaltigen Membranen hat (Ikigai *et al.* 1996, Zitzer *et al.* 2001).

1.6 Erythrozyten-Modell zur Aktivitätsbestimmung von ADAM10

Von Reiss *et al.* 2011 wurde ein Modell entwickelt, mit dem die Aktivität von ADAM10 anhand der Spaltung von pVCC in VCC untersucht werden kann (Reiss *et al.* 2011). Dieses Modell basiert darauf, dass pVCC in die Membranen von Kaninchenerythrozyten inseriert und diese ADAM10 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Wilke and Bubeck Wardenburg 2010). Durch die Porenbildung von VCC wird die Membranpermeabilität für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} erhöht, was zu einem kolloidalen osmotischen Schock und zur

1 Einleitung

Hämolyse der Erythrozyten führt. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, die Aktivität von ADAM10 auf zweifache Weise zu bestimmen. Zum einen kann die Hämolyse der Erythrozyten gemessen werden und zum anderen kann die proteolytische Entstehung von VCC mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens nachgewiesen und quantifiziert werden.

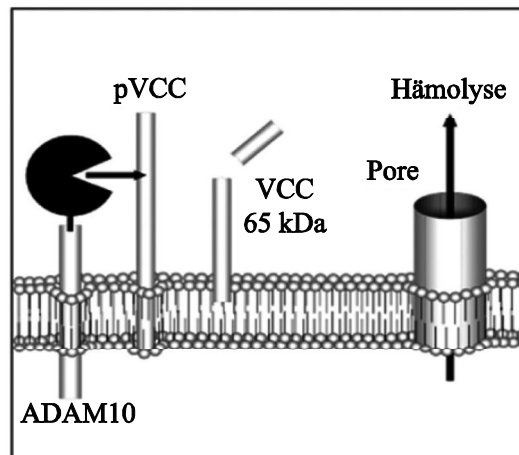


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Porenbildung von VCC durch ADAM10

Das an die Erythrozytenmembran gebundene pVCC wird von ADAM10 in die aktive Form (VCC) gespalten. VCC bildet in der Membran eine Pore, wodurch es zur Hämolyse der Zellen kommt (Abbildung aus (Reiss *et al.* 2011)).

Der Vorteil des Erythrozyten-Modells gegenüber der Verwendung von kernhaltigen Zellen ist, dass eine direktere Beziehung zur Aktivitätsbestimmung von ADAM10 besteht. Denn in Erythrozyten gibt es keine vesikulär gespeicherten Enzyme und Signaltransduktionswege fehlen, welche die Enzymaktivität auf sekundäre Weise, z.B. durch Phosphorylierungsvorgänge, beeinflussen könnten.

1.7 Ziele der Arbeit

Da die ADAMs eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Regulationsprozessen sowie bei pathologischen Prozessen spielen, ist die Aufklärung ihres Aktivierungsmechanismus von großer Bedeutung. Dieser ist bislang noch nicht genau verstanden und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Reiss *et al.* 2011 konnten zeigen, dass Veränderungen in den biophysikalischen Membraneigenschaften (Fluidität) die Funktion der ADAMs beeinflussen. Melittin, der Hauptbestandteil des Bienengiftes, ist in der Lage, die Membranstruktur zu verändern (Dawson *et al.* 1978, Schoch and Sargent 1980).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Melittin einen Einfluss auf die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 ausübt. Dazu wurde das *Ectodomain Shedding* für unterschiedliche ADAM10- und ADAM17-Substrate bei verschiedenen Zellen untersucht. Nachdem festgestellt wurde, dass Melittin die Aktivität der Proteasen tatsächlich stimuliert, sollte der zugrunde liegende Mechanismus näher analysiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese-Gel)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Annexin V-FITC	Invitrogen, Karlsruhe
Apyrase	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP γ S	Jena Bioscience, Jena
Bapta-AM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bio-Rad	Bio-Rad, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Calcium Ionophor A23187	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextran 4	Serva, Heidelberg
Dextran T500	Amersham Biosciences, Freiburg,
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Diphenylhexatrien	Sigma-Aldrich, Steinheim

2 Material

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
EGTA	Roth, Karlsruhe
Fotochemikalien (Entwickler und Fixierer)	Kodak, Stuttgart
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Melittin	Calbiochem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe

Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TMB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trishydroxyaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

2.2 Aktivatoren und Inhibitoren

Aktivatoren/Inhibitoren	Hersteller
bz-ATP	Jena Bioscience, Jena
oATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
GI254023X	GlaxoSmithKline, Hamburg
GW280264X	GlaxoSmithKline, Hamburg
Marimastat	Calbiochem, Darmstadt
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim
PPADS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Suramin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tapi-0	Calbiochem, Darmstadt

2.3 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Zusammensetzung
Annexin V-Bindepuffer 5X	50 mM Hepes 700 mM NaCl 12,5 mM CaCl ₂ pH 7,4
Blotpuffer	11,6 g/l Tris 5,8 g/l Glycin 3,75 ml 20 % SDS 200 ml Methanol
Blockpuffer ELISA	0,5 % BSA 0,05 % Tween-20 in PBS 1x
Blockpuffer WB	5 % Milchpulver in TBST
Dextran 4,5 % für PMN-Isolation	2,25 g Dextran T500 0,45 g NaCl auffüllen auf 50 ml H ₂ O

HBSS 10x	0,6 g KH_2PO_4 1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 80 g NaCl 0,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10 g D-Glucose in 900 ml H_2O auflösen, 1,4 g CaCl_2 und 4 g KCl zugeben, pH 6,0
Lysepuffer Erythrozyten	2,07 g NH_4Cl 0,25 g KHCO_3 250 μl 0,1 M EDTA pH 7,4 in 250 ml dH_2O lösen pH 7,27
PBS 10x	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na_2HPO_4 2,4 g/l KH_2PO_4 pH 7,4
Percoll-HBSS	30 ml Percoll 5 ml HBSS 10x pH 7,2

2 Material

Phosphatpuffer 5 mM

5 mM Na_2HPO_4

5 mM NaH_2PO_4

pH 8

Probenpuffer 4x für WB

13 ml Tris pH 6,8

11,6 ml 86 % Glycerin

20 ml 10 % SDS

5 ml 2-Mercaptoethanol

0,02 % Bromphenolblau

auf 200 ml H_2O auffüllen

Sammelgel

3 ml H_2O

1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8

0,7 ml Acrylamid 30 %

25 μl SDS 20 %

25 μl APS 10 %

10 μl TEMED

SDS-Laufpuffer 10x

30 g/l Tris

144 g/l Glycin

10 g/l SDS

TBS 10x

60,5 g/l Tris

87,6 g/l NaCl

pH auf 7,5 einstellen

TBST 1x	100 ml TBS 10x 1 ml Tween-20 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Trenngel 7,5 %	2,7 ml H ₂ O 1,25 ml 1,5 M Tris pH 8,8 1,25 ml Acrylamid 30 % 25 µl SDS 20 % 25 µl APS 10 % 10 µl TEMED
Tris-Puffer 0,5 M, pH 6,8 für WB-Sammelgel	6,05 g Tris 0,4 g SDS H ₂ O ad 100 ml, pH 6,8
Tris-Puffer 1,5 M, pH 8,8 für WB-Trenngel	18,17 g Tris 0,4 g SDS H ₂ O ad 100 ml, pH 8,8
Waschpuffer ELISA	0,05 % Tween-20 in PBS 1x

2.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
Biocoll (Ficoll)	Biochrome AG, Berlin
Fötales Kälberserum (FCS) Gold	PAA, Pasching (A)
L-Glutamin	PAA, Pasching (A)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching (A)
Percoll	AmershamBiosciences, Freiburg
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Kitsysteme

Kitsysteme	Hersteller
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche, Mannheim
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche, Mannheim
TNF- α ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Cell Proliferation Kit XTT	AppliChem, Darmstadt

2.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Human CD62L FITC	eBioscience, Frankfurt
anti-pVCC	Zitzer <i>et al.</i> 1993, Mainz
anti-Rabbit IG, biotinylated	GE Healthcare, München

2.7 Gebrauchsmaterial

Gebrauchsmaterial	Hersteller
24-, 48- Well-Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Solingen
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Solingen
Einmal-Küvetten 2 ml	MBT Brand, Gießen
Einmal-Skalpelle	B. Braun, Tuttlingen
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heparinröhrchen	
Latex-Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatte ELISA Microton	Greiner Bio-One, Solingen
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
PP-Falkonröhrchen 15 und 50 ml	Greiner Bio-One, Solingen
Röntgenfilme Fuji Fotofilm Super RX	Fujifilm, Düsseldorf
Sorvall-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Solingen
Spritzen steril Luer inject 10 und 25 ml	B. Braun, Tuttlingen
Spritzenfilter, steril 45 µm	Roth, Karlsruhe
Whatman-Filterpapier	Roth, Karlsruhe

2.8 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analysenwaage	Satorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank, CO ₂	Heraeus Instruments, Hanau
Elektrophorese-Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Wien
Elektrophoresekammer für Western Blots	Kreutz Labortechnik, Reiskirchen
ELISA-Reader Titertek Multiskan MCC	Fisher Scientific, Schwerte
Durchflusszytometer	BD, Heidelberg
Filmkassette	Kodak, Stuttgart
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -70 °C	Heraeus Instruments, Hanau
Horizontalschüttler KS 10	Edmund Bühler, Hechingen
Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetrührer IKAMAG	Jankel und Kunkel, Staufen
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Neubauerzählkammer	Assistent, Sondheim
pH-Meter pH320	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe 'Pipetus'	Hirschman Laborgeräte, Eberstadt

Pipetten 10 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
QuantaMaster	PTI, Kanada
Semi-Dry-Blot Apparatur Trans-Blot® SD	Bio-Rad, München
Sorvall-Zentrifuge	Sorvall, Bad Nauheim
Sorvall-Zentrifugenrotor	Sorvall, Bad Nauheim
Standzentrifuge GPKR	Beckman, München
Sterilwerkbank	Cryo-Technik, Seevetal
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Reax 2000	Heidolph, Kelheim
Waage	Mettler, Gießen
Wasserbad WB 12	Medingen, Freital

3 Methoden

3.1 Isolierung von Monozyten aus Buffy-Coats

Unter einem Buffy-Coat versteht man die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und dem Blutplasma die entsteht, wenn Vollblut mit einem Gerinnungshemmer versetzt und anschließend zentrifugiert wird. Diese Schicht besteht hauptsächlich aus Leukozyten, Thrombozyten und einem Rest von Erythrozyten.

Die Buffy-Coats wurden von gesunden Spendern zwischen 18 und 65 Jahren ohne bekannte Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabestes oder Medikamenteneinnahme gewonnen und freundlicherweise von der Blutbank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Buffy-Coats wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Isolierung von Monozyten aus Buffy-Coats erfolgte über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und eine anschließende Percoll-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll ist ein wasserlösliches, synthetisches Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,007 g/ml. Während der Zentrifugation sedimentieren die Blutzellen in Richtung der Grenzschicht zwischen Blut und Ficoll. Die Erythrozyten aggregieren durch das Reagenz und sedimentieren schnell zum Boden des Röhrchens. Auch tote Zellen höherer Dichte und Granulozyten passieren die Ficoll-Phase. Monozyten und Lymphozyten besitzen eine geringere Dichte und können die Ficoll-Schicht nicht durchdringen und sammeln sich in der Interphase. Percoll besteht aus Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichteten Silicapartikeln mit einer Dichte von 1,130 g/ml. Da die Interphase aus der Ficoll-Zentrifugation noch vereinzelt Erythrozyten und Granulozyten enthalten kann, wird die Interphase durch die Percoll-Zentrifugation erneut aufgetrennt. Die Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren und die Monozyten und Lymphozyten verbleiben im Überstand.

Unter sterilen Bedingungen wurde das Blut aus einem Buffy-Coat in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen in einem Verhältnis von 1:4 mit PBS verdünnt. 12,5 ml Ficoll wurden in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen gegeben und das verdünnte Blut vorsichtig bis zur 50 ml Marke auf das Ficoll geschichtet. Die Röhrchen wurden für 20 Minuten bei 1800 rpm bei RT

ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Interphase-Ring vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgenommen und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen mit 25 ml PBS überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 rpm bei RT und leichter Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 7,5 ml PBS resuspendiert. Je 4 ml dieser Zellsuspension wurden in einem Sorvall-Zentrifugenröhrchen mit je 8 ml einer Percoll-HBSS Lösung (pH-Wert 7,0 – 7,4) gründlich gemischt. In der Sorvall-Zentrifuge wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 2000 rpm bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml Greiner-Röhrchen mit 20 ml PBS überführt und für 10 Minuten bei 1000 rpm bei RT mit leichter Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml vorgewärmten RPMI-Medium ohne FCS aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. In 24 Well-Platten wurden pro Well 1 Million Monozyten und in 48 Well-Platten 0,5 Millionen Zellen pro Well ausgesät. Die Monozyten, nicht aber die Lymphozyten, heften sich unter serumfreien Bedingungen rasch an die Zellkulturplatten an. Daher wurden die Platten für mindestens eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um die Lymphozyten zu entfernen wurden die Platten im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen. Die Monozyten wurden dann in RPMI-Medium mit FCS im Brutschrank bis zum nächsten Tag inkubiert.

3.2 Isolierung von Granulozyten aus Frischblut

Die Isolierung von Granulozyten, auch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) genannt, erfolgte über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Gesunden freiwilligen Spendern wurde aus der Armvene Blut in Heparin-Röhrchen entnommen. Je 7 ml Vollblut wurden mit 2 ml einer 4,5 %igen Dextran-Lösung vermischt und für 20 Minuten in schräger Lage sedimentieren lassen. In ein 15 ml Greiner-Röhrchen wurden 5 ml Biocoll Separating Solution gegeben. Der Überstand aus der Dextran-Sedimentation wurde vorsichtig mit einer 10 ml Pipette auf die 5 ml Biocoll geschichtet. Das Ganze wurde für 20 Minuten bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. In dem so erhaltenen Pellet waren PMNs und noch restliche Erythrozyten enthalten. Der Überstand wurde verworfen und zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet mit 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 7 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 13 ml PBS zugegeben und für 10 Minuten bei 1000 rpm mit leichter Bremse zentrifugiert. In dem Pellet

befanden sich die Granulozyten. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 1 ml PBS suspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die gewünschte Zellzahl entweder in PBS oder in HBSS eingestellt.

3.3 XTT-Assay

Bei dem XTT-Assay handelt es sich um einen Viabilitätsassay mit dem ermittelt wurde, ab welcher Konzentration Melittin toxisch auf verschiedene Zellen wirkt. Der XTT-Assay beruht auf der Reduktion von XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) in den orangefarbenen, wasserlöslichen Farbstoff Formazan.



Abbildung 3.1: Reduktion von XTT zu dem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan (Abbildung aus ATCC, XTT Cell Proliferation Assay Kit, Instruction Manual)

Die Intensität des gebildeten Formazans ist dabei direkt proportional zu dem Anteil lebender Zellen und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. XTT kann aufgrund seiner negativen Ladung nicht in die Zellen eindringen. Die Reduktion von XTT findet daher an der Außenseite der Membran durch einen Elektronentransport über die Zellmembran statt. Die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$, die als Elektronendonoren dienen, kommen überwiegend aus dem Citratzyklus der Mitochondrien. Plasmamembran-Oxidoreduktasen übertragen die Ladung auf die Außenseite der Zellmembran. Das in dem Assay enthaltene Aktivierungsreagenz PMS (Phenazinmethosulfat) dient als intermediärer Elektronenakzeptor. PMS nimmt die

3 Methoden

Elektronen an der Außenseite von den Oxidoreduktasen auf und bildet eine reaktive Zwischenstufe. Diese Zwischenstufe reduziert dann XTT zu Formazan.

Monozyten wurden in 48 Well-Platten ausgesät und mit je 100 µl einer Melittin-Verdünnungsreihe, angefangen bei 4 µM Melittin, in serumfreien RPMI Medium für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 100 µl RPMI Medium mit FCS und 50 µl des XTT-Reagenz zugegeben und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde die Absorption im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Die Granulozyten wurden auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^6/\text{ml}$ in HBSS eingestellt. Davon wurden je 100 µl mit einer Melittin-Verdünnungsreihe, angefangen bei 4 µM, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Granulozyten bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 100 µl HBSS resuspendiert, 50 µl von dem XTT-Reagenz zugegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Granulozyten wurden für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und von 100 µl des Überstands wurde die Absorption im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

3.4 ATP-Messung

Die ATP-Messung erfolgte mit dem ATP-Bioluminescence-Kit von Roche. Das Kit enthält das ATP-Substrat D-Luciferin sowie das lichtbildende Enzym Luciferase, aus dem Leuchtkäfer. Mit dem ATP lysierter Zellen setzt Luciferase D-Luciferin zu Oxyluciferin um und es kommt zur Chemilumineszenz.

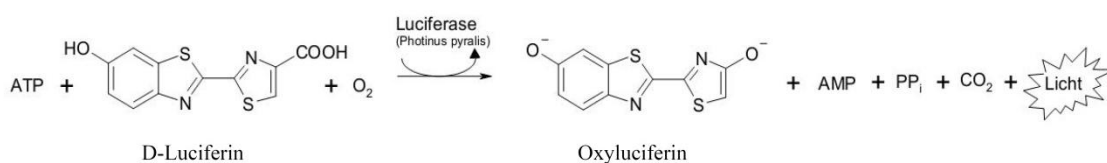


Abbildung 3.2: Reaktionsschema der ATP-Messung

Monozyten wurden in 48 Well-Platten ausgesät und mit 100 µl serumfreien Medium mit einer Melittin-Verdünnungsreihe für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 100 µl einer 1 %igen Triton-X 100 Lösung auf die Zellen gegeben. Nach mehrmaligem Mischen wurden die 100 µl Zelllysate zu 150 µl Wasser in einem Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl ATP-Substrat wurde der Ansatz gevortext und anschließend die Chemilumineszenz im Berthold Lumat LB 9507 in dem 10s-Integrationsmodus gemessen.

Die Granulozyten wurden auf eine Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ /ml in HBSS eingestellt. Davon wurden je 100 µl in Eppis pipettiert und eine Melittin-Verdünnungsreihe angesetzt. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl einer 10 %igen Triton-X 100 Lösung zu den Granulozyten gegeben und zu 150 µl Wasser pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl ATP-Substrat wurde der Ansatz gevortext und anschließend die Chemilumineszenz im Berthold Lumat LB 9507 in dem 10s-Integrationsmodus gemessen

3.5 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein Immunoassay mit dessen Hilfe Proteine über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können. Bei dem hier verwendeten ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA (Antikörper-Antigen-Antikörper-Reaktion). Dabei werden spezielle 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem ersten Antikörper, dem sogenannten *Capture Antibody*, beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wird der *Capture Antibody* mit Albumin gesättigt. Anschließend werden die Proben mit dem nachzuweisenden Antigen in die Wells pipettiert und inkubiert. Die Detektion des Antigens erfolgt mit Hilfe des zweiten Antikörpers, dem sogenannten *Detection Antibody*. Der Zweitantikörper ist biotinyliert und kann mit einem Streptavidin-Meerrettischperoxidase-Komplex nachgewiesen werden. Zur Detektion der Menge an gebundenem Antigen, wird das chromogene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), welches von dem Peroxidase-Komplex zu dem blauen Tetramethylbenzidindiimin umgesetzt wird, zugegeben. Durch Zugabe einer 1 M H_3PO_4 wird die Reaktion gestoppt und es kommt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb, dessen Intensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden kann. Anhand einer

3 Methoden

Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen des nachzuweisenden Antigens kann eine quantitative Bestimmung erfolgen.

Die auf 24 Well-Platten ausgesäten Monozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Melittin für 30 Minuten in serumfreien Medium bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und je 100 µl der Proben und der Standardreihe wurden in die Wells der, mit dem *Capture Antibody* beschichteten, Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Je 100 µl des Detektionsantikörpers wurden zusammen mit dem Enzym in die Wells pipettiert und für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Platte wieder dreimal gewaschen. Je 100 µl TMB wurden zugegeben und maximal für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Stopplösung wurde die Platte im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

3.6 Membranfluiditätsmessung

Nach dem *fluid mosaic model* von Singer und Nicolson 1972 bestehen biologische Membranen aus einer fluiden Lipiddoppelschicht, in die integrale und periphere Membranproteine eingebaut sind, welche sich relativ frei bewegen können. Dabei weisen membranständige Proteine eine hohe Lateralbeweglichkeit auf und können Rotationen um eine zur Membranebene senkrechte Achse durchführen. Die Fluidität der Lipiddoppelschicht ist sowohl für die Signaltransduktion als auch für die Aktivität der Membranproteine von entscheidender Bedeutung.

Die relativ freie Beweglichkeit intramembranärer Moleküle macht man sich bei der spektroskopischen Bestimmung der Fluiditätseigenschaften von Membranen zunutze. Bei der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie wird eine membrangebundene Fluoreszenzsonde durch Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht definierter Wellenlänge in einen energetisch ungünstigen Übergangszustand gebracht. Bei Rückkehr in den stabileren Grundzustand kommt es zu einer Fluoreszenz-Emission. Die Polarisationsrichtung der emittierten Fluoreszenzstrahlung ist dabei von der Beweglichkeit der angeregten Fluoreszenzsonde in der Membran abhängig. Die Richtungsabhängigkeit mit der sich die fluoreszierenden Moleküle durch die Membran

bewegen, wird als Anisotropie bezeichnet. Die Anisotropie lässt sich aus der gemessenen Polarisation berechnen.

Abhängig von der Bewegungsfreiheit der angeregten Fluoreszenzsonde kommt es über den Zeitraum der Lebensdauer der Fluoreszenz zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Rotationen, die die Polarisationsrichtung der Emissionsstrahlung verändern. Das Ausmaß dieser Emissionsdepolarisation ist proportional zum Verlust der anfänglich selektiven Orientierung der Fluorophore. Je stärker ein Molekül im angeregten Zustand rotieren kann, desto geringer ist die Polarisation der emittierten Strahlung. Daraus folgt, dass sich Polarisation und Anisotropie umgekehrt proportional zur Membranfluidität verhalten. Niedrige Anisotropiewerte zeigen ein hohes Maß an Rotationsfreiheit und entsprechen somit einer erhöhten Membranfluidität

Die Fluoreszenz-Anisotropie lässt sich in einem zeitlich aufgelösten (*time resolved fluorescence anisotropy*) und in einem statischen (*steady state fluorescence anisotropy*) Verfahren bestimmen. Da in Membranen eine geordnete Struktur vorliegt und somit nicht alle denkbaren Bewegungsfreiheitsgrade möglich sind, können die Fluoreszenz-Emissions-Dipole keine isotropische Verteilung erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das statische Verfahren gewählt und die Anisotropie r wie folgt bestimmt:

$$r = (I_{VV} - I_{VH}G)/(I_{VV} + 2I_{VH}G)$$

Das durch einen Polarisator linear polarisierte Anregungslicht trifft auf die Probe mit der Fluoreszenzsonde und die Intensität der Emission wird durch einen Analysator bestimmt. Der Analysator nimmt dabei zwei Stellungen ein, einmal parallel und einmal senkrecht zu dem Polarisator. I_{VV} und I_{VH} sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei vertikalem Polarisator und vertikalem bzw. horizontalem Analysator. G ist ein gerätespezifischer Korrekturfaktor für die ungleiche Transmission unterschiedlich polarisierten Lichts.

Als Fluoreszenzsonde wurde der Fluoreszenzfarbstoff Diphenylhexatrien (DPH) verwendet. DPH weist eine kompakte und lineare Struktur auf und kann auf Grund seiner hohen Lipophilie gut in die Zellmembran interkalieren. DPH lagert sich innerhalb der Membran parallel zu den Fettsäureketten der Membranphospholipiden, wodurch seine Beweglichkeit von der Flexibilität der Fettsäurereste abhängt.

Membranen von HaCaT-Keratinocyten wurden auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^8/\text{ml}$ eingestellt und für 30 Minuten bei 32 °C mit DPH (4 µM) unter Lichtausschluss

inkubiert. Um nicht gebundenes DPH zu entfernen, wurden die Membranen für 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde in eine Küvette pipettiert. Unter ständigem Rühren wurde in einem Fluoreszenzspektrometer die Anisotrope bei 30°C bestimmt. Die Membranen wurden mit monochromatischem Licht bestrahlt und nach 100 s wurde Melittin in den Konzentrationen 1 – 100 µM hinzugefügt. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 360 nm (+/- 4 nm) und die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 430 nm (+/- 4 nm) gemessen. Als Positivkontrolle wurde den Proben nach 400 Sekunden Ölsäure OA (100 µM) hinzugefügt.

3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Mithilfe der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei werden die Proteine durch das negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Die SDS-Anionen binden an die positiven Gruppen der Proteine, wodurch diese, proportional zu ihrer Größe, eine negative Nettoladung erhalten. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Proteine im Gel zur Anode. Das Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine bei niedrigem pH-Wert (6,8) zu einer schmalen Bande konzentriert. Im Trenngel, welches eine höhere Vernetzung als das Sammelgel hat und einen pH-Wert von 8,8 aufweist, trennen sich die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht auf.

In einer Kreutz-Apparatur wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichte um eine glatte, blasenfreie Oberfläche zu erhalten. Das Gel wurde anschließend für 20 Minuten zur Auspolymerisation stehen gelassen. Dann wurde das Isopropanol mit Wasser abgespült und das Wasser mit Filterpapier aufgesaugt. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen, in das der Probenkamm vorsichtig eingesetzt wurde. Das Sammelgel wurde ebenfalls für 20 Minuten auspolymerisieren lassen. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde der Probenkamm gezogen, das Gel in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Apparatur mit Laufpuffer gefüllt, so dass beide Elektrodendrähte mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die Taschen im Gel wurden mit Laufpuffer gespült um eventuell vorhandene Gelreste zu entfernen. Die aufzutrennenden

Protein-Proben wurden in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 Minuten bei 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben in die Taschen des Gels eingefüllt. Die Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proteine bei einer Spannung von 150 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen.

3.8 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay durch spektralphotometrische Analyse bei 595 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Eichkurve aus verschiedenen Konzentrationen des Standardproteins BSA (*Bovine serum albumin*). Die Bio-Rad Lösung wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zu je 1 ml der verdünnten Lösung wurden je 10 µl der Proteinproben pipettiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Proben wurden in einem Photometer bei 595 nm gemessen und die Proteinmenge mit Hilfe der Eichkurve bestimmt.

3.9 Western-Blot Analyse und immunologische Detektion

Bei der Western-Blot Analyse werden die Proteine, die zuvor bei der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dort können sie angefärbt oder durch die Bindung von Antikörpern spezifisch markiert werden. Der gebundene Erstantikörper kann mit Hilfe eines mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörpers, der an den ersten Antikörper bindet sichtbar gemacht werden. Die Peroxidase spaltet ein zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat an der Stelle, wo die Antikörper gebunden sind. Durch diese Reaktion entsteht Licht, welches einen aufgelegten Röntgenfilm belichtet.

Die Durchführung des Western-Blot erfolgte in einer Semi-Dry-Apparatur. Dazu wurden Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Transfer-Puffer vorinkubiert. Der Aufbau des Blots bestand aus drei Lagen Filterpapier, der Blot-Membran, dem Gel und aus weiteren drei Lagen Filterpapieren. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Um zu verhindern, dass es zu unspezifischen Bindungen der Antikörper an die Nitrocellulose-Membran kommt, wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 5 %igen Lösung von Magermilchpulver in TBST inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Der erste Antikörper wurde in 10 ml einer 5%igen BSA-TBST-Lösung verdünnt, auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Der zweite Antikörper wurde ebenfalls in 10 ml einer 5%igen BSA-TBST-Lösung verdünnt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation des zweiten Antikörpers wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen und das Antikörpersignal wurde detektiert.

Die Detektion erfolgte mit dem BM Chemiluminescence Blotting Substrat (POD) Kit. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation von Luminol, bei der Licht frei wird. Zu Substrat A wurde Substrat B in einer Verdünnung von 1:100 gegeben und auf die Membran pipettiert. Überschüssige Detektionslösung wurde entfernt, die Membran zwischen zwei Folien in eine Kassette eingeklebt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde nach Bedarf einige Sekunden bis hin zu einer halben Stunde belichtet, entwickelt und fixiert.

3.10 Hämolysen-Experimente mit Kaninchenerythrozyten

Auf der Oberfläche von Kaninchenerythrozyten befindet sich die Metalloproteinase ADAM10. Die Erythrozyten wurden mit pVCC (pro-*Vibrio cholerae* Cytolysin) beladen, das durch ADAM10 in das porenbildende VCC gespalten wird. Dadurch kommt es zur Hämolysen der Erythrozyten.

3.10.1 Gewinnung und Aufbereitung von Kaninchenerythrozyten

Die verwendeten Kaninchenerythrozyten wurden von dem Tierstall des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Die Kaninchenerythrozyten wurden vor ihrer Verwendung dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

zugegeben. Die Erythrozyten wurden bei 4°C gelagert und maximal eine Woche verwendet.

3.10.2 Beladung von Kaninchenerythrozyten mit pVCC

Die Kaninchenerythrozyten wurden vor der Beladung mit pVCC mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde pVCC in einer Endkonzentration von 3 µg/ml zugegeben und die Erythrozyten für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um nicht gebundenes Toxin zu entfernen, wurden die Zellen in einer auf 4°C gekühlter Zentrifuge für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellt wurde dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurde das Pellet mit eiskaltem PBS wieder auf die Zellzahl $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt.

3.10.3 Bestimmung der Hämolyse der Kaninchenerythrozyten

Nach der Beladung der Erythrozyten mit pVCC wurden diese mit verschiedenen Substanzen behandelt und bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kaninchenerythrozyten für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert und 10 µl von dem Überstand zu 90 µl Wasser gegeben. Die Absorption des freigesetzten Hämoglobins wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der maximal möglichen Hämolyse wurden 10 µl der nicht zentrifugierten Probe in 90 µl H₂O lysiert.

3.11 Gewinnung von Kaninchenerythrozyten-Ghosts

Kaninchenerythrozyten wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 mM Phosphatpuffer pH 8 osmotisch lysiert. Die so erhaltenen Membranen wurden für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mehrmals mit Phosphatpuffer gewaschen bis der Überstand klar war. Anschließend wurden die Ghosts noch einmal mit PBS gewaschen. Die Membranen wurden in 1 ml PBS aufgenommen, aliquotiert und bei – 20°C gelagert.

3.12 FACS-Analyse

Bei der FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) handelt es sich um das Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie. Das Messprinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion optischer Signale, welche von Zellen nach Anregung durch einen Laserstrahl ausgesendet werden.

Die sich in einer Zellsuspension befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare angesaugt und passieren einzeln den Laserstrahl. Dabei streuen die Zellen einen Teil des Lichts, das durch Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und der Komplexität der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) hängt vom Volumen der Zelle ab und ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Licht im rechten Winkel. Es hängt von der Granularität der Zelle, der Menge an Vesikeln in der Zelle und von der Größe und Struktur des Zellkerns ab.

Neben der Größe und der Granularität kann mit der Durchflusszytometrie auch die Fluoreszenz der Zellen gemessen werden. Man verwendet Fluorophore, die an bestimmte Bestandteile der Zelle binden. Werden Farbstoffe wie DAPI oder Propidiumiodid verwendet, die in die DNA interkalieren, kann man anhand der Fluoreszenzintensität der Zelle auf deren DNA-Gehalt schließen. Es können auch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, verwendet werden. Die Antikörper sind dabei meist gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet. Durch den Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern sowie speziellen Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung und somit die Informationsdichte erhöht werden.

3.13 L-Selektin FACS-Analyse

Frisch isolierte Granulozyten wurden auf eine Zellzahl von $3 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Anschließend wurden die Granulozyten mit dem FITC-markierten anti-Human CD62L für 30 Minuten auf Eis gefärbt. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in HBSS resuspendiert und je 100 μl der Granulozyten wurden mit 0,5 μM Melittin in An- und Abwesenheit der ADAM-Inhibitoren Marimastat (10 μM) und Tapi-0

(10 μM) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die 100 μl Proben wurde zu je 400 μl HBSS pipettiert. Im Anschluss daran wurde im Durchflusszytometer die Menge an gebundenem CD62L detektiert.

3.14 Annexin V Färbung

Kaninchenerythrozyten wurden in PBS auf die Zellzahl $5 \cdot 10^8/\text{ml}$ eingestellt und mit bzATP (0,5 mM) +/- PPADS (100 μM) oder bz-ATP (0,5 mM) +/- oATP (0,5 mM), wobei oATP einer Vorinkubation von 2 Stunden bei 37 °C benötigte, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Weitere Proben wurden mit dem Ionophor A23187 (0,3 μM) +/- Bapta-AM (10 μM) und KCl (135 mM) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden den Proben 10^6 Zellen pro ml entnommen und in 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 μl Annexin V-Bindepuffer resuspendiert und mit 5 μl FITC-konjugiertem Annexin V für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben zu 400 μl Annexin V-Bindepuffer gegeben und im Durchflusszytometer auf die Bindung von Annexin V analysiert.

3.15 Untersuchung der ADAM Aktivierung mittels FACS-Analyse und Western-Blot

Gewaschene Kaninchenerythrozyten wurden in PBS ($5 \cdot 10^8/\text{ml}$) mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pVCC für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und wieder als 10 %ige Erythrozyten in Dextran 6 (30 mM) resuspendiert. Die Erythrozyten wurden mit dem Breitbandmetalloproteinase-Inhibitor Marimastat (10 μM) bei gleichzeitiger Zugabe des Ionophors A23187 (0,3 μM) +/- Bapta-AM (10 μM) und KCl (135 mM) oder bz-ATP (0,5 mM) +/- PPADS (100 μM) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des Phosphatidylserin-Flips wurden den Proben 10^6 Zellen pro ml entnommen, mit PBS gewaschen, in 100 μl Annexin V Bindepuffer aufgenommen und mit FITC-konjugiertem Annexin V für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Zur Entfernung der Stimulanzen und Inhibitoren wurden die Proben fünfmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde dann wieder mit PBS auf 10 % eingestellt und die Proben für 30 Minuten bei 37

3 Methoden

inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben abzentrifugiert und die Hämolyse aus dem Überstand bestimmt. Für den Western-Blot wurden die Pellets mit Phosphatpuffer 5 mM, pH 8 gewaschen.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von Melittin auf die Zellviabilität

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Melittin einen Einfluss auf die Aktivität der ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), insbesondere ADAM10 und ADAM17 hat. Da Melittin in höheren Konzentrationen zu Apoptose und Nekrose führen kann, wurde zuerst die Viabilität von verschiedenen Zellen nach Behandlung mit steigenden Melittinkonzentrationen bestimmt.

4.1.1 Auswirkungen von Melittin auf die Zellviabilität von Monozyten und Granulozyten

Zur Untersuchung der Zellviabilität von Monozyten und Granulozyten auf steigende Melittinkonzentrationen wurde der XTT-Test durchgeführt. Dazu wurden die am Vortag isolierten und ausgesäten Monozyten mit verschiedenen Konzentrationen Melittin behandelt und anschließend mit dem XTT-Reagenz versetzt. Die Granulozyten wurden dagegen direkt, nach ihrer Isolation aus Vollblut, mit Melittin und im Anschluss mit dem XTT-Reagenz inkubiert. Das durch die Stoffwechselleistung lebender Zellen reduzierte XTT wurde anschließend photometrisch bei 450 nm gemessen.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, bewirken 0,5 μM und 1 μM Melittin nur eine geringgradige Beeinträchtigung der Stoffwechselleistung. Bei einer Konzentration von 2 μM Melittin sind noch über 60% der Monozyten lebensfähig, wohingegen 4 μM Melittin einen stark toxischen Effekt auf die Zellen ausüben. Granulozyten reagieren schon auf geringe Melittin-Konzentrationen empfindlicher. Bei 0,5 μM beträgt die Zellviabilität noch rund 75 %, bei 1 μM liegt sie um die 60 %.

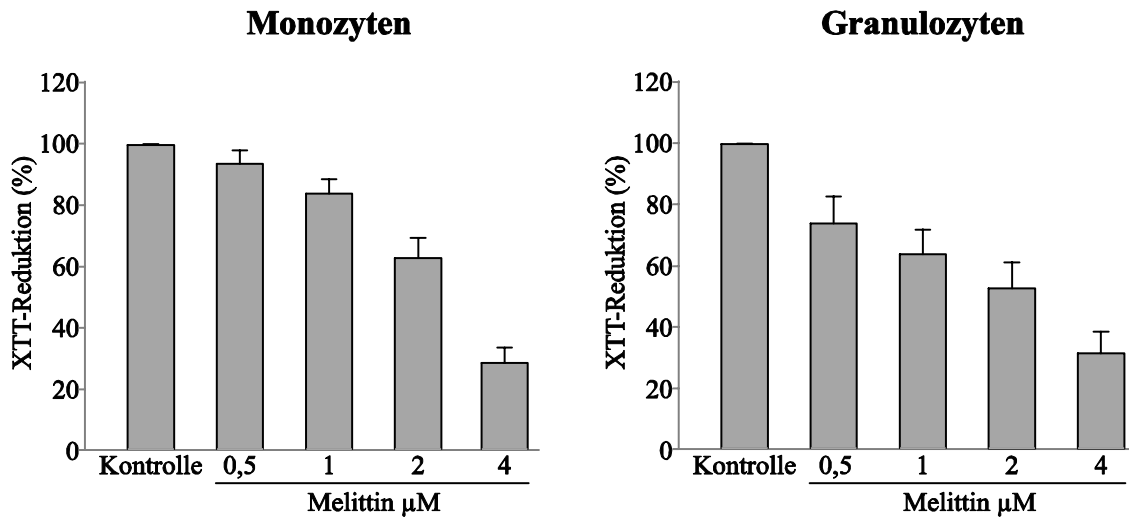


Abbildung 4.1: Einfluss von Melittin auf die Zellviabilität von Monozyten und Granulozyten

Monozyten wurden auf 48 Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag für 30 min mit steigenden Konzentrationen von Melittin (0,5 - 4 µM) bei 37°C inkubiert. Die Granulozyten wurden direkt nach ihrer Isolation mit Melittin versetzt und ebenfalls für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit dem XTT-Reagenz versetzt und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption des reduzierten XTT im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem der Mittelwert der unbehandelten Proben auf 100 % und die anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt wurden. Dann wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 3).

4.1.2 Auswirkungen von Melittin auf die Zellviabilität von MEF, HUVEC und HaCaT-Keratinocyten

Die Versuche zur Viabilität von MEF (*Murine Embryonic Fibroblast*), HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) und HaCaT-Keratinocyten wurden mit Hilfe des MTT-Tests untersucht. Die Zellen wurden ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen Melittin behandelt. Im Anschluss daran wurde der MTT-Test durchgeführt. Dabei wird der gelbe wasserlösliche Farbstoff MTT durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums unter Verwendung der Pyridin-Nukleotide NADH und NADPH zu dem blau-violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert. Durch Zugabe von 10 % Triton-X 100 in Isopropanol wurde das gebildete Formazan in Lösung gebracht und die Absorption bei 590 nm gemessen.

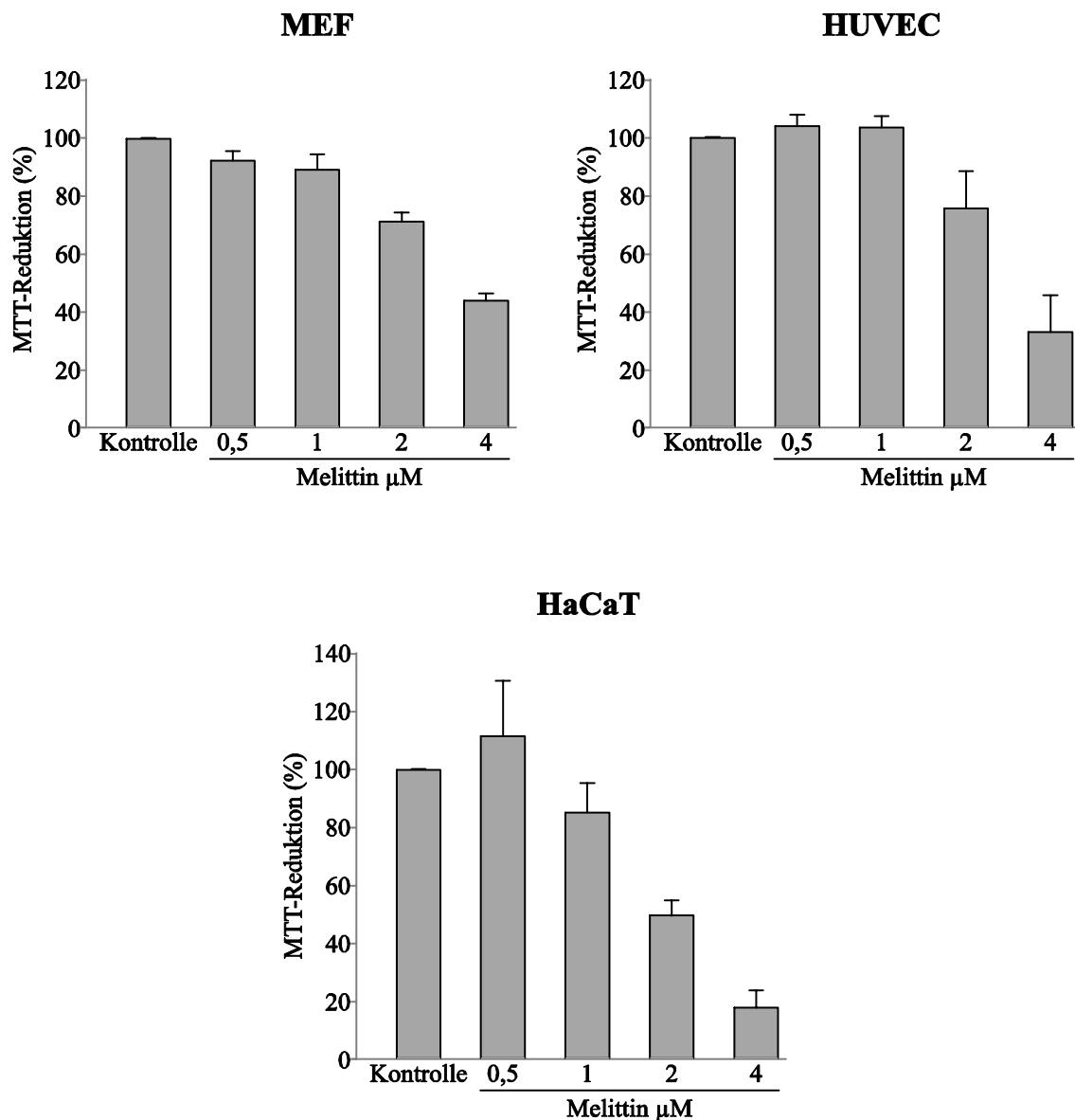


Abbildung 4.2: Einfluss von Melittin auf die Viabilität von MEF, HUVEC und HaCaT-Keratinocyten

Die Zellen wurden auf 96 Well-Platten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen Melittin (0,5 - 4 µM) für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das MTT-Reagenz zugegeben und die Zellen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des Solubilisationsreagenz wurden die Absorptionen im ELISA-Reader bei 590 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem die Mittelwerte der unbehandelten Proben auf 100 % und die anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt wurden. Anschließend wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 3).

Die Zellen MEF und HUVEC reagieren am wenigsten empfindlich auf steigende Melittinkonzentrationen (Abbildung 4.2). Die Konzentrationen 0,5 μM und 1 μM Melittin zeigen auch bei den HaCaT-Keratinocyten nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität. 2 μM Melittin führen bei HaCaT-Keratinocyten schon zu einer deutlichen Abnahme der Reduktion von MTT auf etwa 50 %, wohingegen MEFs und HUVECs auch bei dieser Konzentration keinen großen Verlust der Viabilität zeigen. Bei einer Konzentration von 4 μM Melittin treten toxische Effekte bei allen Zellen auf.

4.2 Einfluss von Melittin auf die durch ADAM10 und ADAM17 induzierte Proteolyse

Die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 bewirken die Spaltung einer Vielzahl unterschiedlicher Membranproteine (*Ectodomain Shedding*). Der Einfluss von Melittin auf diesen Prozess sollte in verschiedenen Zellen untersucht werden.

4.2.1 Melittin führt zu vermehrtem *Ectodomain Shedding* von TNF-alpha durch ADAM17 in Monozyten

Um zu untersuchen, ob Melittin Auswirkungen auf das durch ADAM17 induzierte *Ectodomain Shedding* von TNF-alpha in Monozyten hat, wurden diese mit Melittin inkubiert. Die Konzentrationen an TNF-alpha im Zellüberstand wurden anschließend mittels ELISA bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Versuchen zur Zellviabilität wurde Melittin in den Konzentrationen 2, 1 und 0,5 μM verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Monozyten mit PMA (0,1 μM) behandelt, was innerhalb weniger Minuten zur Proteolyse von TNF-alpha führt (Zhang *et al.* 2000).

Wie Abbildung 4.3 zeigt, kommt es mit Melittin zu einem deutlichen Anstieg von TNF-alpha im Überstand. Durch die Verwendung des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors Tapi-0 (10 μM) kann das durch Melittin provozierte *Shedding* von TNF-alpha durch ADAM17 komplett inhibiert werden.

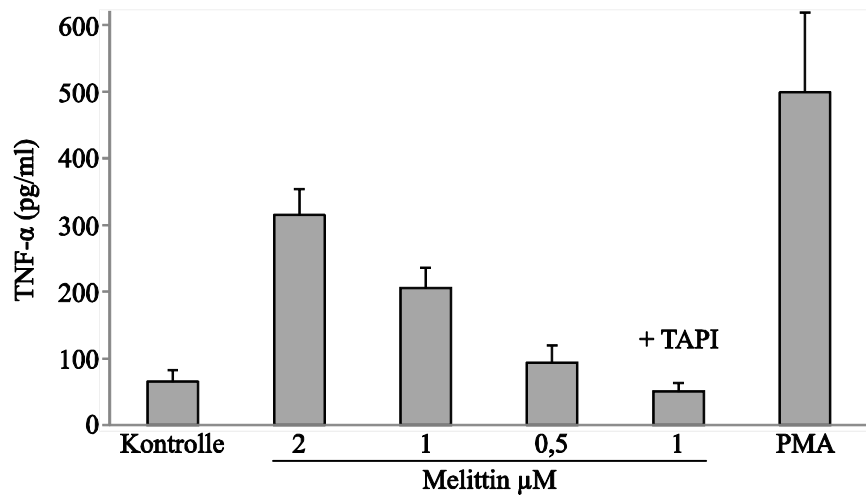


Abbildung 4.3: Melittin induziertes *Ectodomain Shedding* von TNF-alpha durch ADAM17 in Monozyten

Monozyten wurden für 30 Minuten bei 37°C mit Melittin (0,5 - 2 μ M) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA (0,1 μ M) behandelt. Durch Zugabe des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors TAPI-0 (10 μ M) konnte das *Shedding* von TNF-alpha inhibiert werden. Aus dem Überstand der Proben wurde mittels ELISA die Konzentration an TNF-alpha ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Melittin führt zu vermehrtem *Shedding* von L-Selektin durch ADAM17 in Granulozyten

Im nachfolgenden Versuch sollte untersucht werden, ob das in Granulozyten vorkommende Zelladhäsionsmolekül L-Selektin, auch CD62L genannt, unter dem Einfluss von Melittin vermehrt von ADAM17 gespalten wird. Dazu wurden Granulozyten mit einem FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Antikörper gegen CD62L gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 μ M Melittin in An- oder Abwesenheit des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors Marimastat (MM) oder Tapi-0 behandelt. Die durch *Shedding* induzierte Abnahme der CD62L-Fluoreszenz wurde durch FACS-Analyse ermittelt.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt es mit Melittin zu einem vermehrten *Shedding* von L-Selektin, was durch eine Linksverschiebung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer zu erkennen ist (Abbildung 4.4). Mit den beiden Metalloproteinase-Inhibitoren kann das durch Melittin induzierte *Shedding* von L-Selektin fast komplett inhibiert werden.

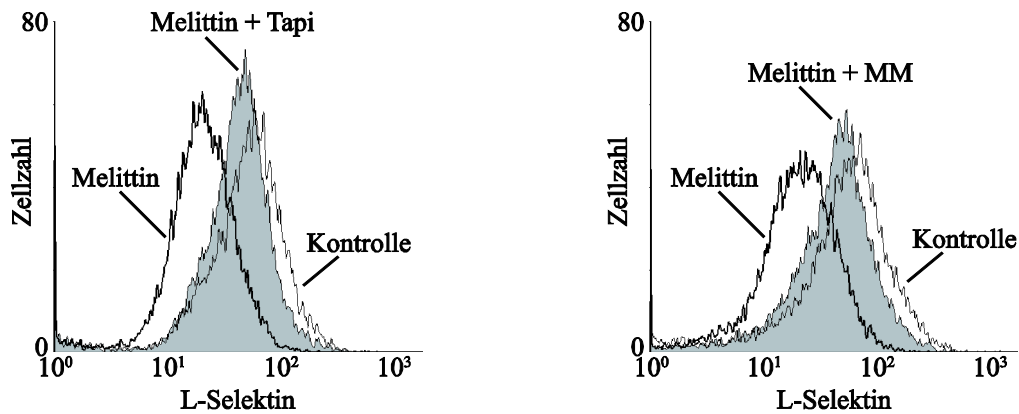


Abbildung 4.4: Einfluss von Melittin auf das *Shedding* von L-Selektin in Granulozyten

Granulozyten wurden nach ihrer Isolation für 30 Minuten auf Eis mit einem FITC-markierten Antikörper gegen CD62L gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Melittin (0,5 μ M) in An- und Abwesenheit von Tapi-0 (10 μ M) und Marimastat (10 μ M) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Das *Shedding* von L-Selektin wurde dann im Durchflusszytometer im FL-1-Kanal bei einer Wellenlänge von 595 nm analysiert.

4.2.3 Melittin führt in MEFs zu vermehrtem *Shedding* von N-Cadherin durch ADAM10

Das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin wird in MEFs von ADAM10 gespalten. Es wurde geprüft, ob Melittin auch einen Einfluss auf diesen Vorgang hat. Dazu wurden sowohl Wildtyp-MEFs als auch ADAM10-defiziente Zellen mit Melittin behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem Leervektor (mock) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Spaltung von N-Cadherin mit einem monoklonalen Antikörper gegen das cytoplasmatische Fragment von N-Cadherin im Western-Blot detektiert. Mit diesem Antikörper konnte sowohl das 130 kDa große Volllängenprotein (VL) als auch das 37 kDa große C-terminale Fragment (CTF) nachgewiesen werden.

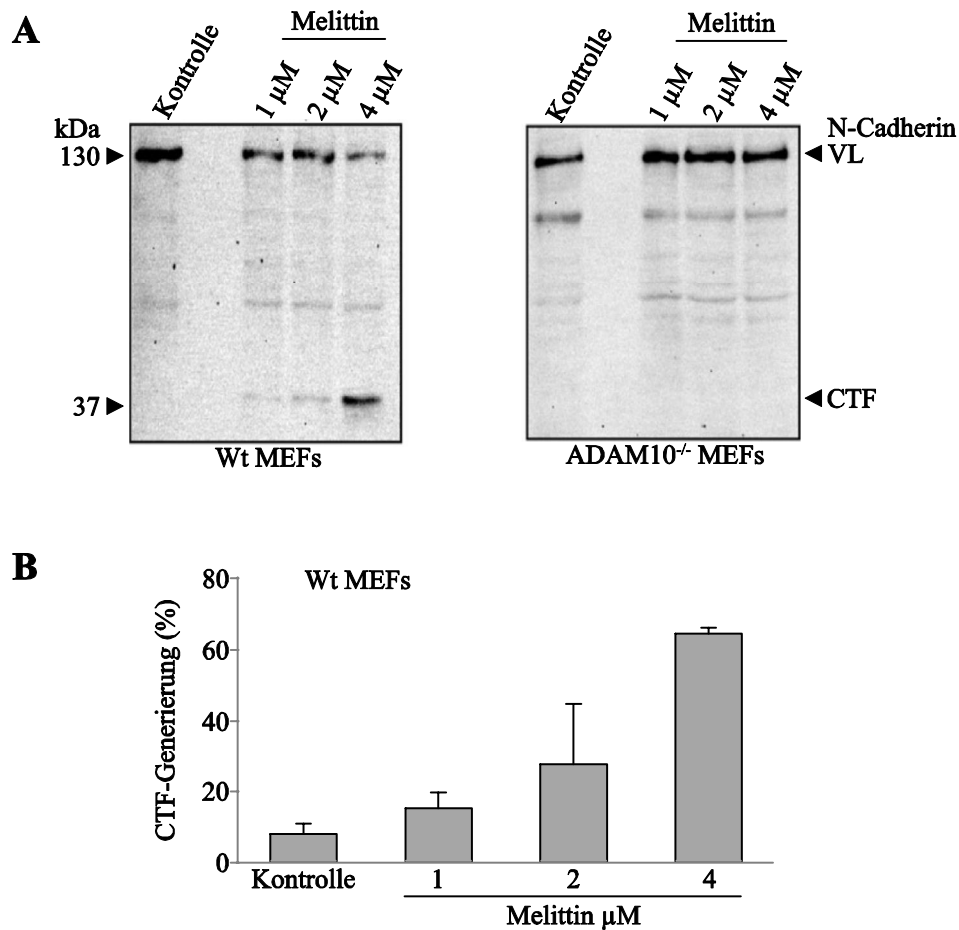


Abbildung 4.5: Melittin induziertes *Shedding* von N-Cadherin durch ADAM10 in MEFs

(A) Wildtyp-MEFs und ADAM10-defiziente MEFs wurden für die Dauer von 30 Minuten mit Melittin (1 - 4 μM) inkubiert. Als Kontrolle dienten mock (Leervektor)-behandelte Zellen. Die Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und diese mit einem gegen den C-Terminus von N-Cadherin gerichteten monoklonalen Antikörper inkubiert. (B) Die CTF (C-terminales Fragment)-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von CTF und der Summe aus Volllängenprotein (VL) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten.

Abbildung 4.5 A zeigt, dass die Zelllysate der Wildtyp-MEFs, welche mit Melittin behandelt wurden, im Vergleich zu den mit dem Leervektor behandelten Zellen eine Generierung des C-terminalen Fragmentes von N-Cadherin aufweisen. Dabei nimmt die Bildung des CTF mit steigender Melittinkonzentration zu. Dagegen weist der Western Blot der ADAM10-defizienten MEFs nach Melittinbehandlung keine Generierung des CTF auf. In Abbildung 4.5 B ist die densitometrische Auswertung der CTF-Generierung der Wildtyp-MEFs dargestellt.

4.2.4 Melittin führt zu einem vermehrten *Shedding* von VE-Cadherin in HUVECs

In HUVECs wird das Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin ebenfalls von der Metalloproteinase ADAM10 gespalten. Um auch hier zu untersuchen, ob Melittin zu einem vermehrten *Shedding* von VE-Cadherin führt, wurden die Zellen mit Melittin alleine und in Gegenwart des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors Marimastat MM (10 μ M) inkubiert. Die Detektion von VE-Cadherin erfolgte mit einem C-terminalen Antikörper gegen VE-Cadherin.

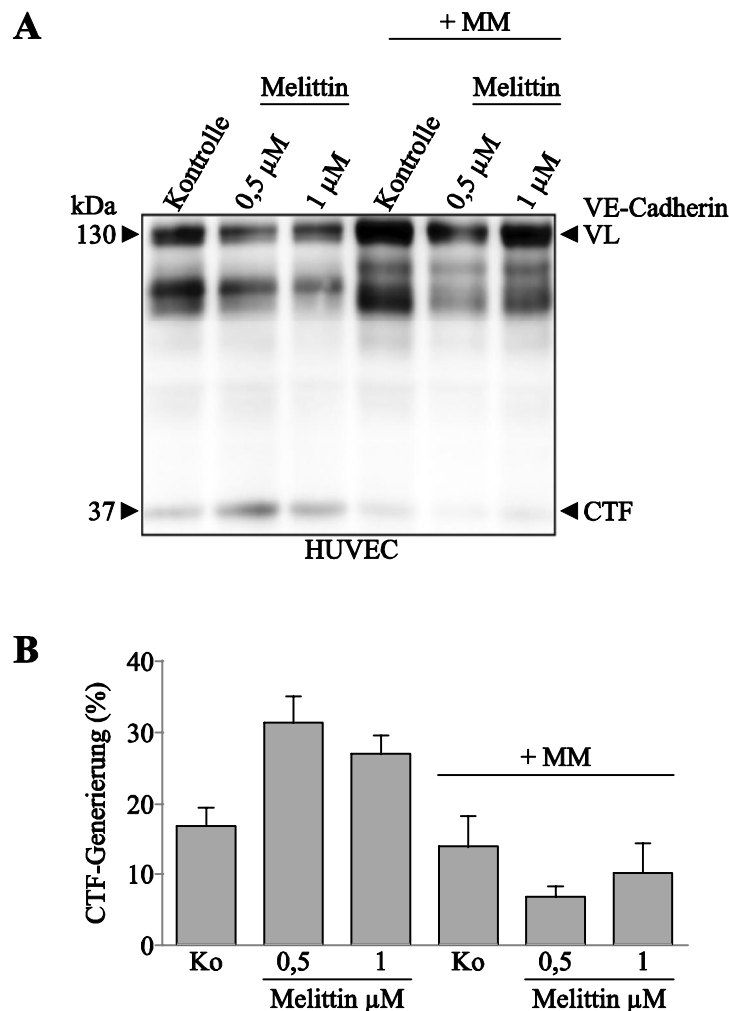


Abbildung 4.6: Einfluss von Melittin auf das *Shedding* von VE-Cadherin in HUVECs

(A) HUVECs wurden für 30 Minuten mit Melittin (0,5 und 1 μ M) in Gegenwart des Inhibitors Marimastat (10 μ M) inkubiert und die Spaltung von VE-Cadherin im Western Blot nachgewiesen. (B) Die CTF-Generierung wurde aus 4 unabhängigen Experimenten prozentual aus dem Quotienten von CTF und der Summe aus VL und CTF bestimmt und graphisch dargestellt.

Der Western Blot (Abbildung 4.6 A) zeigt, dass es bei den Melittin-Konzentrationen 0,5 μ M und 1 μ M im Vergleich zur Kontrolle zu einer vermehrten CTF-Generierung von VE-Cadherin kommt. In Gegenwart von Marimastat kann die Spaltung von VE-Cadherin vollständig inhibiert werden. Abbildung 4.6 B zeigt die densitometrische Auswertung der CTF-Generierung.

4.2.5 In HaCaT-Keratinocyten führt Melittin zu einem vermehrten *Shedding* von E-Cadherin und TGF-alpha

In HaCaT-Keratinocyten spaltet ADAM10 das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin und ADAM17 den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*)-Liganden TGF-alpha (*Transforming Growth Factor*). Zuerst wurde untersucht, ob es auch bei HaCaT-Keratinocyten durch Melittin zu einer Aktivierung von ADAM10 und somit zu einem Melittin-abhängigen *Shedding* von E-Cadherin kommt. Für diesen Versuch wurden die Zellen mit Melittin behandelt. Als Kontrolle dienten mock-behandelte Zellen. Um die Beteiligung von ADAM10 zu prüfen, wurden verschiedene Metalloproteinasen-Inhibitoren verwendet. Zum Einsatz kamen der Inhibitor GI254023X, der ADAM10 mit einer 100-fach höheren Präferenz inhibiert als ADAM17 (Ludwig *et al.* 2005), der Inhibitor GW280264X, ein Inhibitor für ADAM17, der aber auch in geringem Maße ADAM10 hemmt und der Breitbandmetalloproteinase-Inhibitor Marimastat. Der Nachweis der Spaltung des C-terminalen Fragments erfolgte durch die Inkubation des Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das CTF von E-Cadherin.

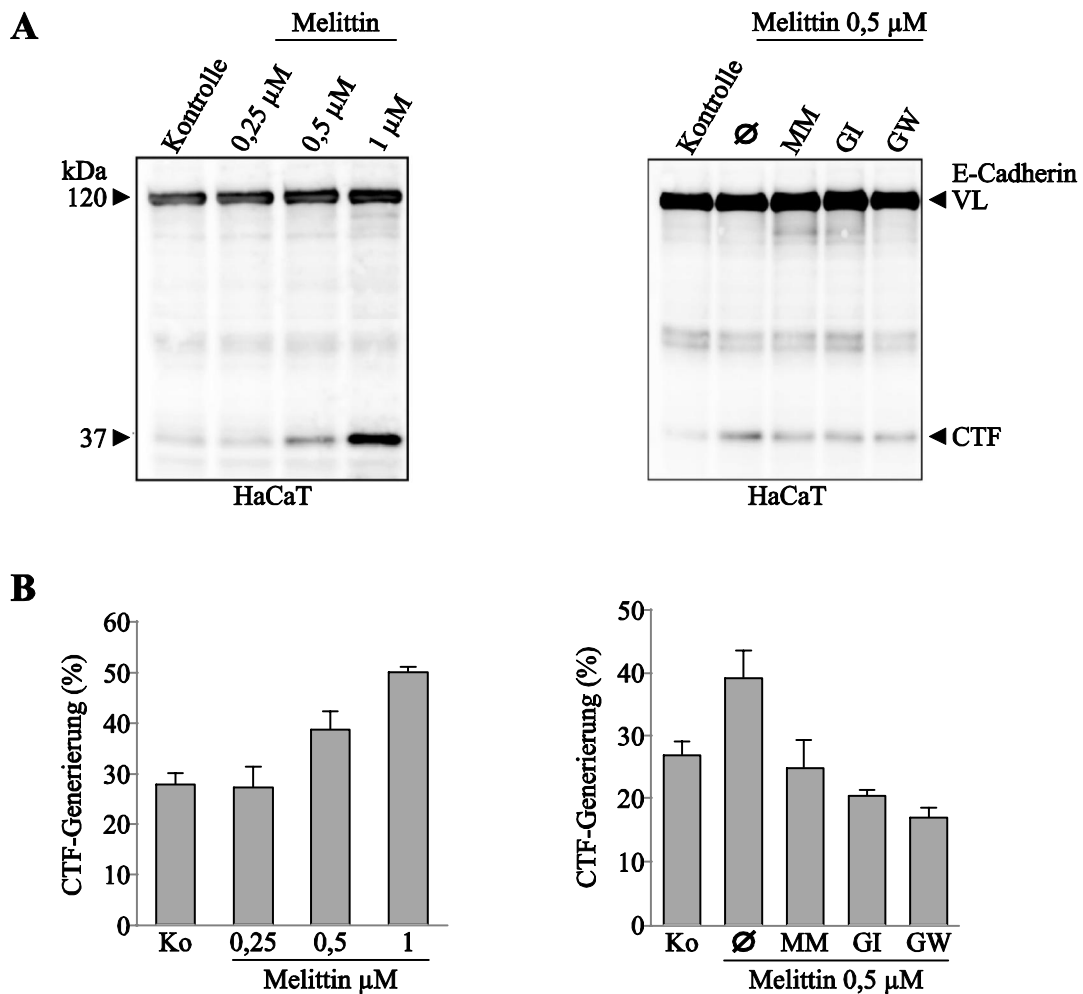


Abbildung 4.7: Melittin induziertes *Shedding* von E-Cadherin in HaCaT-Keratinocyten

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten mit steigenden Melittinkonzentrationen (0,25 - 1 µM) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Leervektor behandelt. Um die Beteiligung von ADAM10 zu zeigen, wurden die Zellen mit 0,5 µM Melittin in Anwesenheit des ADAM10-Inhibitors GI254023X (GI 3 µM), des ADAM17/ADAM10-Inhibitors GW280264X (GW 3 µM) und des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors MM (10 µM) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper. (B) Die CTF-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von CTF und der Summe aus Vollängenprotein (VL) und CTF bestimmt und graphisch dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zu den mock-behandelten Zellen kommt es mit steigender Melittinkonzentration zu einer erhöhten Proteolyse von E-Cadherin (Abbildung 4.7 A). Die Metalloproteinase-Inhibitoren GI, GW und MM führen zu einer verminderten Generierung des 37 kDa großen C-terminalen Fragments. In Abbildung 4.7 B ist die entsprechende densitometrische Bestimmung des C-terminalen Fragments dargestellt.

Der EGF-Rezeptor-Ligand TGF-alpha wird, wie oben bereits erwähnt, von ADAM17 gespalten. Daher wurden die Zellen mit Melittin in Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Inhibitoren behandelt und anschließend die in den Überstand abgegebene Konzentration von löslichem TGF-alpha (s-TGF-alpha) bestimmt. Neben TGF-alpha werden sechs weitere EGFR-Liganden durch ADAM10 und/oder ADAM17 proteolytisch gespalten. Daher wurde untersucht, ob die Behandlung mit Melittin zu einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und damit zu einer *downstream* Aktivierung der Kinase ERK1/2 führt.

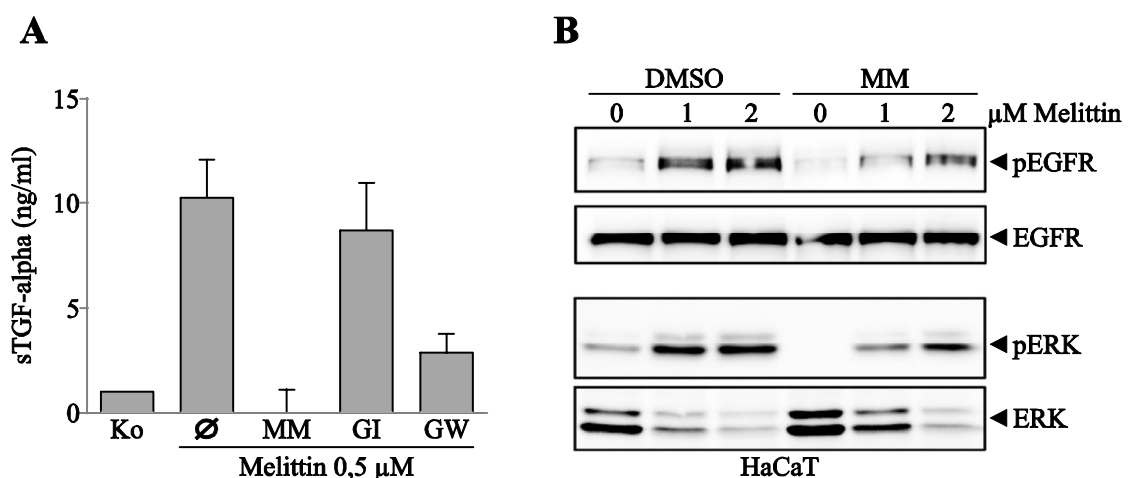


Abbildung 4.8: Shedding von TGF-alpha und EGFR-Aktivierung in HaCaT-Keratinocyten

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten mit Melittin (0,5 µM) in An- und Abwesenheit der ADAM-Inhibitoren MM (10 µM), GI254023X (GI 3 µM) und GW280264X (GW 3 µM) inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration von sTGF-alpha im Überstand mittels ELISA bestimmt. (B) HaCaT-Keratinocyten wurden mit Melittin (1 und 2 µM) in An- und Abwesenheit von Marimastat (MM 10 µM) für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte der Nachweis der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors sowie die Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 im Western-Blot.

Wie in Abbildung 4.8 A zu erkennen ist, steigt mit Melittin die Konzentration von sTGF-alpha im Überstand der Zellen signifikant an. Bei gleichzeitiger Inkubation des Breitbandmetalloproteinase-Inhibitors Marimastat konnte das *Shedding* von TGF-alpha komplett inhibiert werden. Erwartungsgemäß konnte auch mit dem ADAM17/ADAM10-Inhibitor GW280264X eine deutliche Reduktion von sTGF-alpha erzielt werden, wohingegen mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X kaum eine Inhibition erreicht wurde. Im Western Blot (Abbildung 4.8 B) ist zu sehen, dass es mit steigender

Melittinkonzentration zu einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und einer *downstream* Phosphorylierung von ERK1/2 kommt, welche durch MM gehemmt werden kann.

4.3 Melittin-provoziertes *Shedding* wird nicht durch den zytosolischen Calciumanstieg beeinflusst

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob Melittin einen zytosolischen Calciumanstieg induziert und dieser an der Aktivierung der ADAMs beteiligt ist. HaCaT-Keratinocyten wurden zum einen in Calcium-haltigen Medium und zum anderen in Calcium-freiem Medium mit Melittin inkubiert. Dann wurde die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit dem fluoreszierenden Farbstoff Indo-1-AM bestimmt.

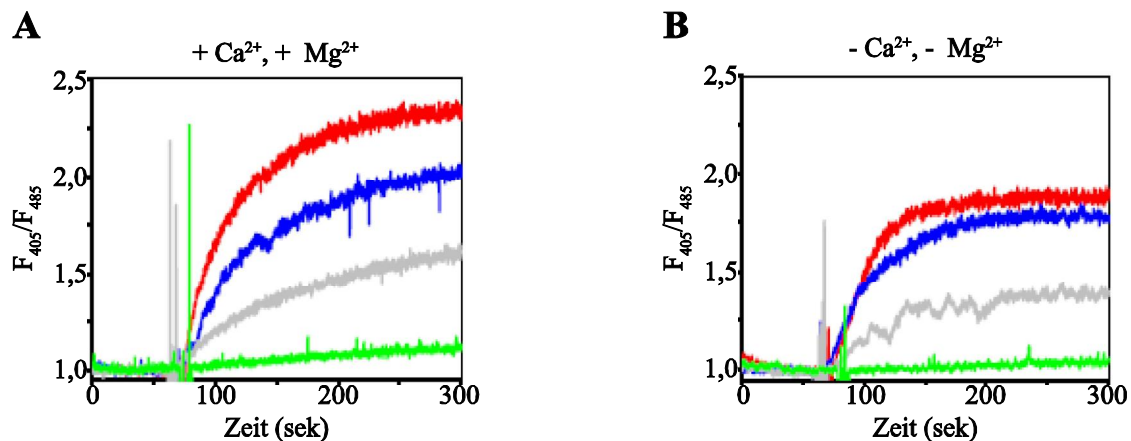


Abbildung 4.9: Melittin-induzierter Calciumanstieg in HaCaT-Keratinocyten

HaCaT-Keratinocyten wurden für 45 Minuten mit dem fluoreszierenden Farbstoff Indo-1-AM in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen Medium (A) und in Medium ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (B) inkubiert. Die Messung des freien intrazellulären Ca^{2+} erfolgte in einem Fluoreszenzspektrometer. Die Zugabe von Melittin in den Konzentrationen 0,2 µM (grün), 0,4 µM (grau), 0,8 µM (blau) und 1 µM (rot) erfolgte jeweils nach einer Minute und die Ca^{2+} -Fluoreszenzmessung wurde über einen Zeitraum von 4 Minuten durchgeführt.

Abbildung 4.9 A zeigt, dass nach Zugabe von Melittin dosisabhängig die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen Medium schnell ansteigt. Im Medium

ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Abbildung 4.9 B) ist der durch Zugabe von 1 μM Melittin bedingte Ca^{2+} -Anstieg lediglich um etwa 20 % verringert. Bei den übrigen Melittinkonzentrationen bleibt die Zunahme von freiem intrazellulärem Ca^{2+} vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass Melittin sowohl einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom als auch eine Öffnung der intrazellulären Calciumionenspeicher induziert.

Da Calcium als sekundärer Botenstoff an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt ist, unter anderem auch an dem *Shedding* einiger ADAM10 Substrate wie E-Cadherin und N-Cadherin (Maretzky *et al.* 2005, Uemura *et al.* 2006) wurde untersucht, ob auch das durch Melittin induzierte *Shedding* durch Calcium beeinflusst wird. Dazu wurden HaCaT-Keratinocyten zum einem mit EGTA, einem extrazellulären Ca^{2+} -Chelator, und zum anderen mit Bapta-AM, einem membranpermeablen und somit intrazellulären Ca^{2+} -Chelator, inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate auf die durch Melittin induzierte Entstehung des CTF von E-Cadherin hin analysiert.

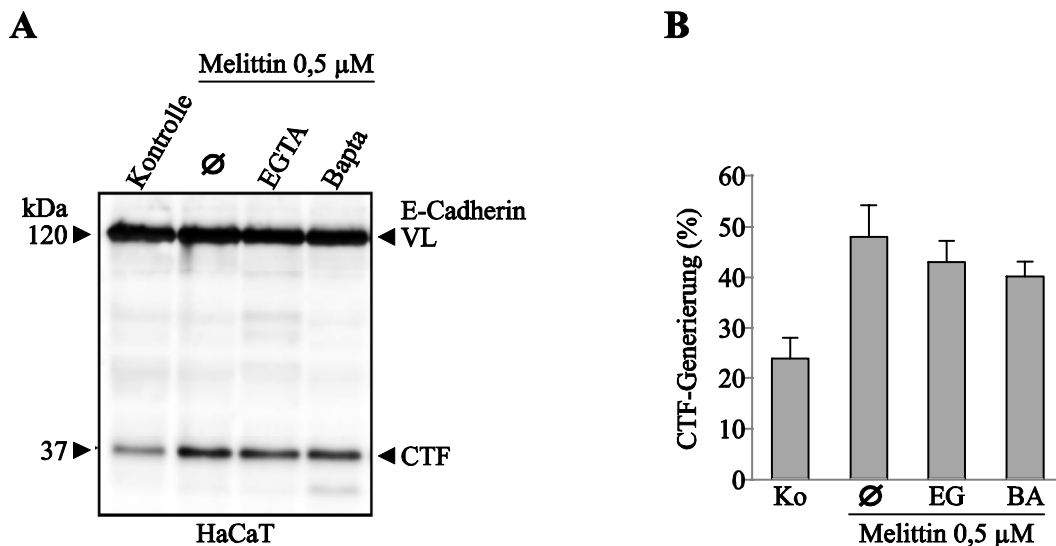


Abbildung 4.10: Melittin-induziertes *Shedding* von E-Cadherin in Anwesenheit der Ca^{2+} -Ionenchelatoren EGTA und Bapta-AM

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten mit Melittin (0,5 μM), in Gegenwart des extrazellulären Ca^{2+} -Chelators EGTA (5 mM) und des intrazellulären Ca^{2+} -Chelators Bapta-AM (50 μM), inkubiert. Anschließend wurde im Western Blot die CTF-Generierung von E-Cadherin nachgewiesen. (B) Die CTF-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von CTF und der Summe aus VL und CTF bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

4 Ergebnisse

Der Western Blot in Abbildung 4.10 zeigt, dass weder EGTA noch Bapta-AM einen Einfluss auf die durch Melittin induzierte Bildung des C-terminalen Fragments von E-Cadherin haben.

Des Weiteren wurde die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und ERK1/2 in Gegenwart von EGTA und Bapta-AM untersucht. Auch hier zeigt sich (Abbildung 4.11), dass Calcium keinen Einfluss auf die Aktivierung des EGFR und der weiteren *downstream* Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin aufweist.

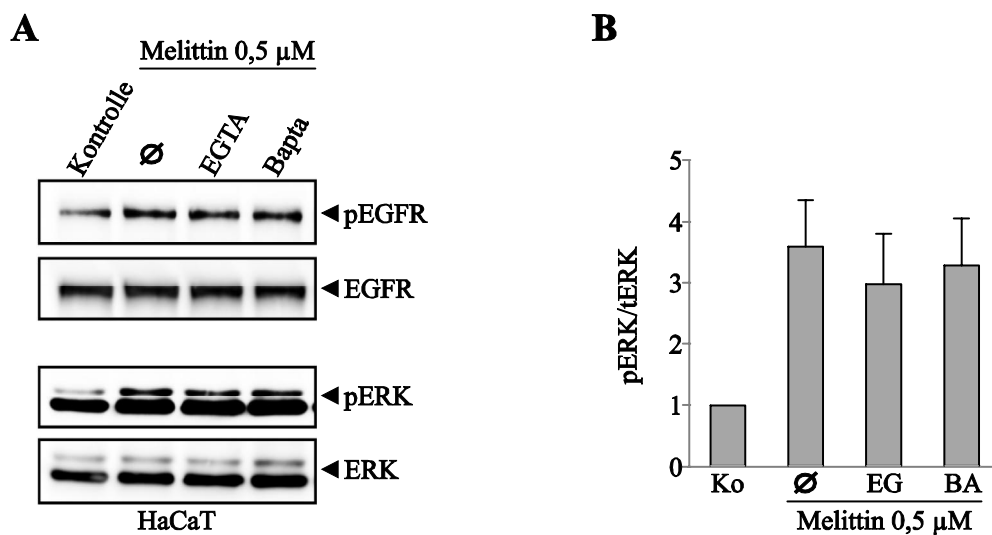


Abbildung 4.11: Phosphorylierung des EGFR und ERK1/2 durch Melittin in Anwesenheit von EGTA und Bapta-AM

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten in Gegenwart von EGTA (5 mM) und Bapta-AM (50 µM) mit Melittin (0,5 µM) behandelt und anschließend auf Aktivierung des EGFR und Phosphorylierung von ERK1/2 hin untersucht. (B) Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung der densitometrischen Auswertung des Verhältnisses von phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) und Gesamt-ERK1/2 (tERK1/2).

4.4. Melittin führt zu keiner Änderung der Membranfluidität von HaCaT-Keratinocyten-Membranen

In einer früheren Arbeit der Gruppe wurde gezeigt, dass ungesättigte Fettsäuren zu einer gesteigerten Membranfluidität führen, welche wiederum eine vermehrte Proteolyse von ADAM-Substraten zur Folge hat (Reiss *et al.* 2011). Überdies zeigten Needham *et al.* (1987) eine durch Melittin verringerte Membranfluidität in Leberzellen. Daher wurde die Membranfluidität von HaCaT-Keratinocyten-Membranen nach Zugabe von Melittin mittels Fluoreszenz-Anisotropie im statischen Verfahren (*steady state*) bestimmt. Als Fluoreszenzsonde diente der Fluoreszenzfarbstoff DPH (Diphenylhexatrien), welcher auf Grund seiner linearen Struktur und seiner hohen Lipophilie in Membranen spontan interkaliert. Nach Bestrahlen der Probe mit monochromatischem Licht und Zugabe von Melittin wurde die entstehende Emission gemessen. Die Anisotropie verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Membranfluidität. Als Positivkontrolle wurde Ölsäure zu den Zellen gegeben.

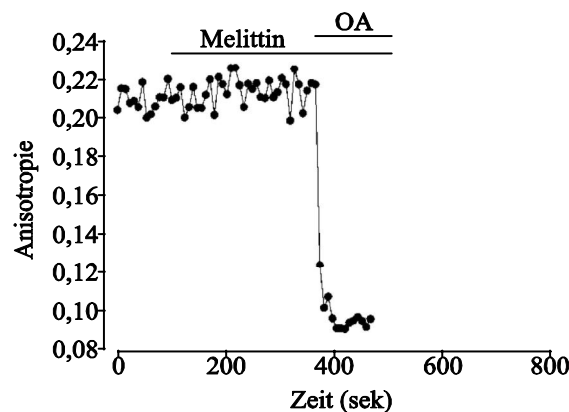


Abbildung 4.12: Messung der Anisotropie

Membranen von HaCaT-Keratinocyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DPH inkubiert. Anschließend wurde die Membranfluidität mittels *steady state* Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt. Die Membranen wurden mit monochromatischem Licht bestrahlt und nach 100 Sekunden wurde Melittin (10 μ M) zugegeben. Als Positivkontrolle wurde nach 400 Sekunden Ölsäure OA (100 μ M) zugegeben.

Nach Zugabe von Melittin zeigt sich über einen Zeitraum von 300 Sekunden keine Änderung der Anisotropie (Abbildung 4.12). Dagegen kommt es bei Zugabe von OA zu einem sofortigen Abfall der Anisotropie. Da die Anisotropie sich umgekehrt proportional zur Membranfluidität verhält, zeigt dieser Versuch, dass Melittin keinen Einfluss auf die Membranfluidität von HaCaT-Keratinocyten hat und somit die durch Melittin induzierte ADAM-Aktivierung nicht auf einer Änderung der Fluidität der Membran basiert.

4.5 Melittin führt zur Aktivierung von P2-Rezeptoren

Die P2-Rezeptoren werden in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt. Bei P2X-Rezeptoren handelt es sich um ATP-gesteuerte Kationenkanäle, während die P2Y-Rezeptoren zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Eine Beteiligung von P2-Rezeptoren an der ADAM-Aktivierung wurde bereits in der Literatur diskutiert (Gu *et al.* 1998, Camden *et al.* 2005, Ratchford *et al.* 2010). Wie in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, ist die durch Melittin induzierte ADAM-Aktivität weder über die Membranfluidität zu erklären, noch spielt eine Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration eine Rolle. Daher galt es in den folgenden Versuchen die Frage nach dem möglichen Einfluss von Melittin auf die Aktivierung von P2-Rezeptoren und der damit verbundenen Aktivierung der ADAMs zu klären.

4.5.1 Einfluss von P2-Rezeptor-Inhibitoren auf das durch Melittin induzierte *Shedding*

Da es durch die Behandlung von Zellen mit Melittin zu einem Ausstrom von ATP kommt, wurde im Folgenden untersucht, ob P2-Rezeptoren an der durch Melittin induzierten ADAM-Aktivierung beteiligt sind. Dazu wurden HaCaT-Keratinocyten, die sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit dem nicht selektiven P2X-Rezeptor Antagonisten PPADS (*pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure*) in Gegenwart von Melittin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf die Generierung des C-terminalen Fragments von E-Cadherin durch ADAM10 untersucht. Um eine Aussage über die Stärke der Inhibition von ADAM10 treffen zu können, wurden zum Vergleich Zellen mit Marimastat inkubiert. Des Weiteren wurde der

Einfluss verschiedener Konzentrationen von PPADS auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hin analysiert.

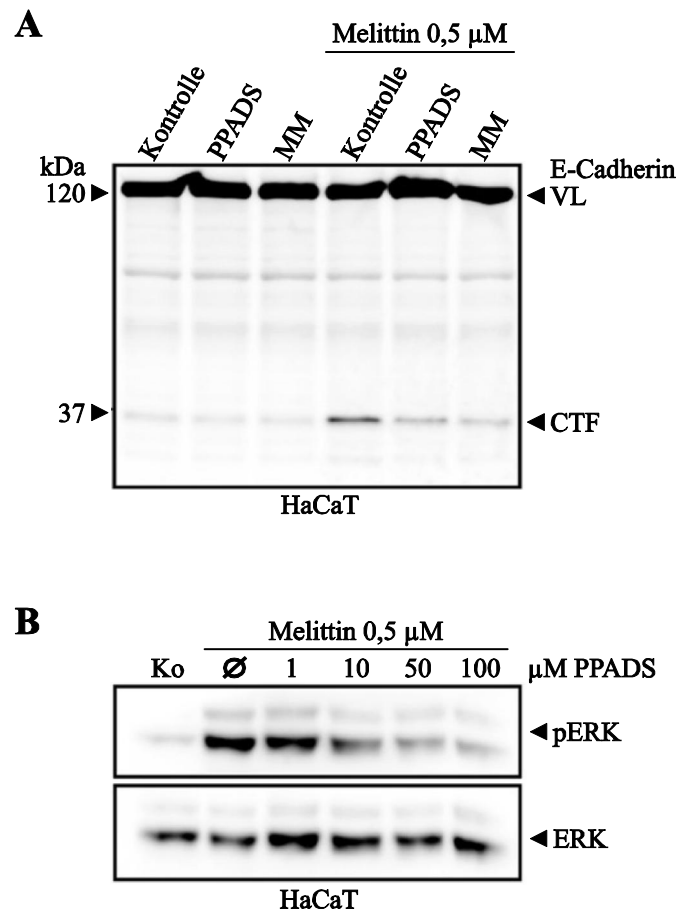


Abbildung 4.13: Einfluss von PPADS auf das *Shedding* von E-Cadherin und die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten bei 37°C mit Melittin (0,5 μ M) in Gegenwart des P2X-Rezeptor-Inhibitors PPADS (100 μ M) und in Gegenwart des ADAM-Inhibitors MM (10 μ M) inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit den Inhibitoren ohne Melittin inkubiert. Anschließend wurde im Western Blot die Generierung des CTF von E-Cadherin analysiert. (B) HaCaT-Keratinocyten wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen PPADS (1 - 100 μ M) in Anwesenheit von Melittin (0,5 μ M) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Western Blot zeigt die Phosphorylierung von ERK1/2. Als Ladungskontrolle diente die Gesamtmenge an ERK.

4 Ergebnisse

Die mit PPADS (100 μM) behandelten Zellen zeigen eine deutliche Verringerung der Bildung von CTF durch Melittin (Abbildung 4.13 A). Das Ausmaß der Inhibition ist vergleichbar mit dem, welches man mit Marimastat (10 μM) erhält. Der Western Blot in Abbildung 4.13 B zeigt mit zunehmender Konzentration von PPADS eine Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Versuche mit Suramin, einem weiteren nicht selektiven P2-Rezeptor-Inhibitor, durchgeführt. HaCaT-Keratinocyten wurden mit Melittin und steigenden Konzentrationen von Suramin behandelt. Im Western Blot wurden dann zum einen die Bildung des C-terminalen Fragments von E-Cadherin und zum anderen die Phosphorylierung von ERK1/2 bestimmt.

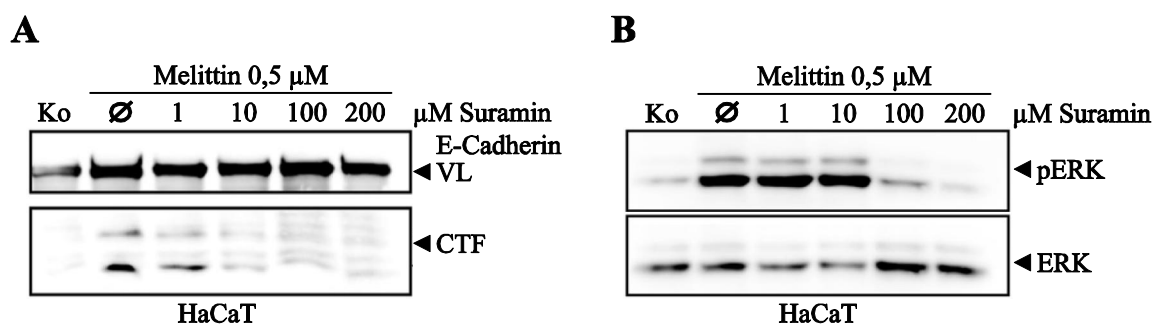


Abbildung 4.14: Einfluss von Suramin auf das *Shedding* von E-Cadherin und der Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten mit Melittin (0,5 μM) in Anwesenheit steigender Konzentrationen des nicht selektiven Inhibitors für P2-Rezeptoren Suramin (1 - 200 μM) inkubiert. Anschließend wurde die CTF-Generierung im Western Blot analysiert. (B) HaCaT-Keratinocyten wurden mit Melittin (0,5 μM) und steigender Suramin-Konzentrationen (1 - 200 μM) für 30 Minuten inkubiert. Im Western Blot erfolgte dann die Untersuchung auf die Phosphorylierung von ERK1/2.

Mit steigenden Konzentrationen von Suramin ist, ebenso wie mit PPADS, eine zunehmende Inhibition der Generierung des CTF von E-Cadherin zu beobachten. Auch zeigt sich eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 mit zunehmenden Suramin-Konzentrationen (Abbildung 4.14 A und B).

4.5.2 Einfluss der ATPase Hexokinase

Um zu prüfen, ob bei der Aktivierung der P2-Rezeptoren durch Melittin ATP eine Rolle spielt, wurden HaCaT-Keratinocyten in Gegenwart der ATPase Hexokinase mit Melittin inkubiert. Dann wurde erneut die CTF-Bildung von E-Cadherin und die Phosphorylierung von ERK1/2 im Western Blot analysiert.

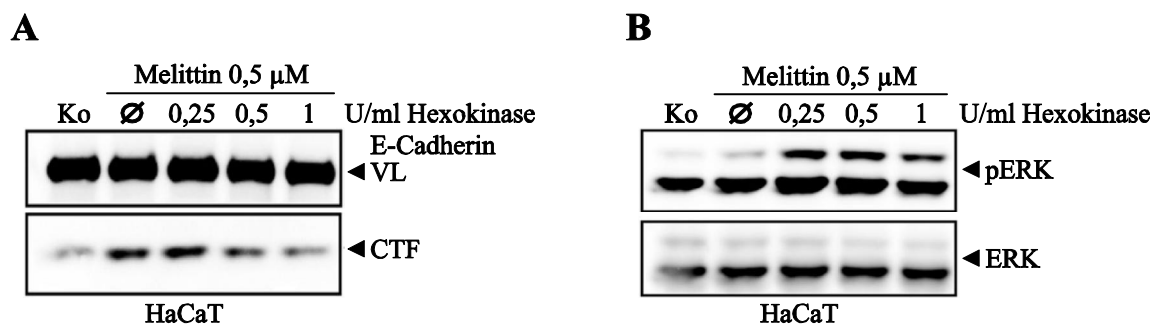


Abbildung 4.15: Einfluss der Hexokinase auf das *Shedding* von E-Cadherin und die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin

(A) HaCaT-Keratinocyten wurden für 30 Minuten mit Melittin (0,5 µM) in Gegenwart der ATPase Hexokinase in unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 - 1 U/ml) inkubiert. Die Bildung des C-terminalen Fragments von E-Cadherin wurde im Western Blot detektiert. (B) In einem weiteren Western Blot wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 analysiert.

Abbildung 4.15 A zeigt, dass mit den Konzentrationen 0,5 und 1 U/ml im Vergleich zu 0,25 U/ml Hexokinase und Melittin (0,5 µM) zwar eine Abnahme der CTF-Generierung von E-Cadherin erfolgt, diese aber im Vergleich zu den P2-Rezeptor-Inhibitoren PPADS und Suramin nicht so ausgeprägt ist. Auch die Phosphorylierung von ERK1/2 in Abbildung 4.15 B wird bei einer Konzentration von 1 U/ml Hexokinase leicht gehemmt. Dies deutet darauf hin, dass ATP zwar an der durch P2-Rezeptor Aktivierung induzierten ADAM-Aktivierung beteiligt ist, aber vermutlich noch zusätzlich andere Faktoren eine Rolle spielen.

4.5.3 Direkter Nachweis der Beteiligung des P2X7-Rezeptors an der Melittin-induzierten ADAM-Aktivität

HEK293T-Zellen (*Human Embryonic Kidney cells*) exprimieren nur geringe Mengen an P2Y-Rezeptoren und keine P2X-Rezeptoren (Schachter *et al.* 1997). Durch gezielte Transfektion dieser Zellen kann die Beteiligung der entsprechenden Rezeptoren zu verschiedenen zellulären Vorgängen direkt nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurden HEK293-Zellen mit dem P2X7-Rezeptor transient transfiziert, mit Melittin behandelt und auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hin untersucht. Als Vergleich dienten Zellen, welche mit mock-DNA transfiziert wurden. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit bz-ATP (2'-(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate), dem selektiven P2X7-Rezeptor Agonisten inkubiert. Um den Einfluss von ADAM auf die Phosphorylierung von ERK1/2 zu verdeutlichen, wurden die Zellen in Gegenwart von Marimastat inkubiert. Um die Beteiligung der P2X-Rezeptoren zu prüfen, wurde die ATPase Apyrase verwendet.

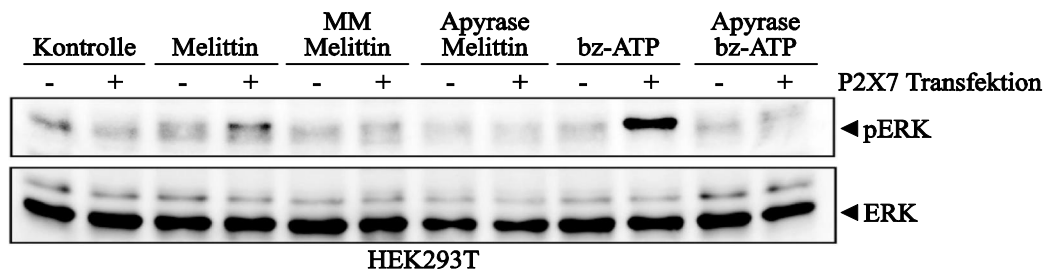


Abbildung 4.16: Einfluss der Expression von P2X7-Rezeptoren auf die Phosphorylierung von ERK1/1 nach der Behandlung von Melittin

HEK293T-Zellen wurden transient mit dem P2X7-Rezeptor transfiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit mock-DNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit Melittin (0,5 μ M) in Gegenwart von Marimastat (10 μ M) oder der ATPase Apyrase (2 U/ml) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem selektiven P2X7-Rezeptor Agonisten bz-ATP (300 μ M) in Anwesenheit der ATPase Apyrase (2 U/ml) inkubiert. Im Anschluß daran wurde im Western Blot die Phosphorylierung von ERK1/2 analysiert.

Nur in den transfizierten Zellen konnte durch bz-ATP eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2 induziert werden, welche durch die ATPase Apyrase vollständig aufgehoben

wurde (Abbildung 4.16). Mit Melittin wurde ebenfalls transfektionsabhängig eine Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet, die sowohl durch den ADAM-Inhibitor MM als auch durch die ATPase Apyrase inhibiert werden konnte.

4.6 Das Kaninchenerythrozyten-Modell

Das Kaninchenerythrozyten-Modell wurde bereits in früheren Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bhakdi entwickelt (Reiss *et al.* 2011). Dabei wird das porenbildende Cytolysin *Vibrio cholerae* cytolysin VCC (65 kDa) in seiner Proform pVCC (79 kDa) an die Erythrozytenmembran gebunden und durch ADAM10, das Kaninchenerythrozyten auf ihrer Oberfläche tragen (Wilke and Bubeck Wardenburg 2010), in die porenbildende Form gespalten (Valeva *et al.* 2004, Wilke and Bubeck Wardenburg 2010). Die VCC Pore führt zur Hämolyse der Erythrozyten. Somit besteht bei diesem Modell die Möglichkeit, anhand zweier *readouts* die Aktivität von ADAM10 zu untersuchen. Zum einen kann die Hämolyse gemessen werden und zum anderen kann im Western Blot die Spaltung von pVCC zu VCC nachgewiesen werden. Abbildung 4.17 zeigt eine schematische Darstellung der Spaltung von pVCC und der Porenbildung von VCC.

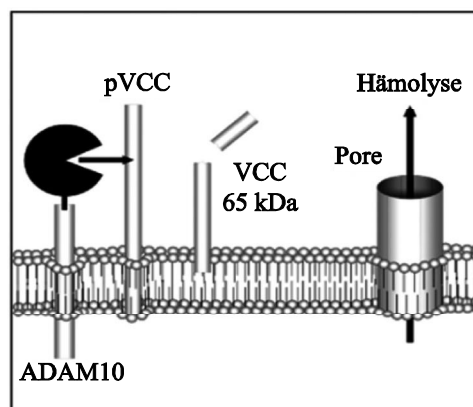


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Porenbildung durch VCC

Das an die Erythrozytenmembran gebundene pVCC wird von ADAM10 in die aktive Form (VCC) gespalten. VCC bildet in der Membran eine Pore, wodurch es zur Hämolyse der Zellen kommt. Dieses Modell ermöglicht die Untersuchung der Aktivität von ADAM10 zum einen durch die Messung der entstehenden Hämolyse und zum anderen durch den Nachweis der Spaltung von pVCC in VCC mittels Western Blot.

Ein wesentlicher Vorteil dieses Modells besteht darin, dass eine direkte Aussage über die Aktivität von ADAM10 getroffen werden kann, da es in Erythrozyten keine vesikulär gespeicherten Enzyme gibt und Signaltransduktionswege fehlen, die die Enzymaktivität auf sekundäre Weise, z.B. durch Phosphorylierungsvorgänge, beeinflussen könnten.

4.6.1 Einfluss von Melittin und bz-ATP auf die Spaltung von pVCC an Kaninchenerythrozyten

4.6.1.1 Einfluss von Melittin auf die Spaltung von pVCC

Wie bei den kernhaltigen Zellen schon gezeigt werden konnte, kommt es durch Melittin zu einer erhöhten ADAM-Aktivität, die über eine Aktivierung der P2X-Rezeptoren erklärt werden kann. Im Folgenden wurden Versuche zur Aktivität von ADAM10 anhand des Kaninchenerythrozyten-Modells durchgeführt.

Die Erythrozyten wurden zuerst mit pVCC beladen und anschließend mit Melittin inkubiert. Um zu untersuchen, ob die Spaltung von pVCC in VCC durch ADAM10 erfolgt, wurden die Erythrozyten mit Melittin in Anwesenheit von Marimastat inkubiert. Die Beladung der Erythrozyten mit dem Protoxin erfolgte auf Eis, um eine konstitutive Spaltung von pVCC durch ADAM10 zu vermeiden. Die Inkubation mit Melittin wurde dann bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Erythrozyten zentrifugiert und die Hämolyse ermittelt. Aus den Proben wurden Erythrozyten-Membranen hergestellt. Die Membranproteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Die Detektion von pVCC und VCC erfolgte im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen VCC.

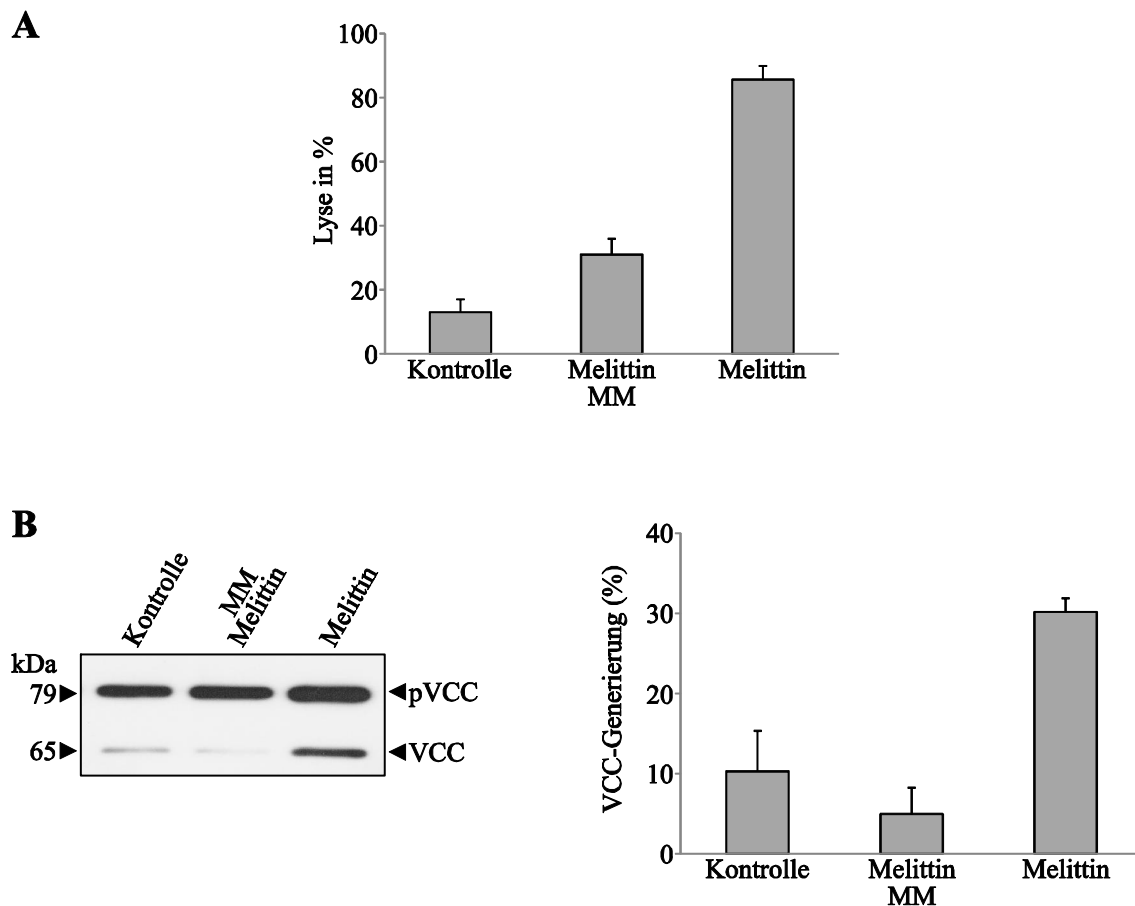


Abbildung 4.18: Einfluss von Melittin auf die Spaltung von pVCC zu VCC in Kaninchenerythrozyten durch ADAM10

(A) Kaninchenerythrozyten wurden für 30 Minuten auf Eis mit pVCC (3 $\mu\text{g/ml}$) beladen. Dann wurden die Erythrozyten mit Melittin (4 μM) in An- oder Abwesenheit von MM (10 μM) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und die Lyse bestimmt. (B) Aus den Proben wurden Membranen hergestellt. Im Western Blot wurde die pVCC-Spaltung detektiert (links). Die VCC-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von VCC und der Summe aus pVCC und VCC bestimmt und graphisch dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Behandlung der Kaninchenerythrozyten mit Melittin kommt es im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einer deutlichen Zunahme der Hämolyse (Abbildung 4.18 A). Diese kann durch den ADAM-Inhibitor MM fast komplett reduziert werden. Im Western Blot in Abbildung 4.18 B spiegelt sich dieses Ergebnis wider. Die densitometrische Auswertung des Western Blots weist eine deutliche Generierung von VCC durch Melittin auf. Dieser Effekt wird in Gegenwart von MM vollständig inhibiert.

Um zu untersuchen, ob auch bei den Erythrozyten die P2X-Rezeptoren an der Zunahme der ADAM-Aktivität beteiligt sind, wurden in einem weiteren Versuch Kaninchenerythrozyten mit dem P2X-Rezeptor-Inhibitor PPADS und Melittin inkubiert. Zum Vergleich wurde eine Probe mit Marimastat behandelt.

Wie in Abbildung 4.19 A zu sehen ist, kann auch die Hämolyse durch Melittin mit Hilfe von PPADS konzentrationsabhängig inhibiert werden, wobei die Inhibition bei einer Konzentration von 100 μ M PPADS mit der durch Marimastat vergleichbar ist. Mit abnehmender Konzentration von PPADS nimmt die hämolytische Wirkung von Melittin zu. Der Western Blot spiegelt diese Ergebnisse wieder (Abbildung 4.19 B).

4.6.1.2 Einfluss von bz-ATP auf die Spaltung von pVCC

Des Weiteren wurden Versuche mit dem für den P2X7-Rezeptor selektiven Agonisten bz-ATP durchgeführt. Die Erythrozyten wurden mit bz-ATP in An- und Abwesenheit von PPADS inkubiert und zu den Zeitpunkten 15, 30 und 45 Minuten wurden Proben entnommen. Von diesen Proben wurde die Lyse bestimmt und die Membranen im Western Blot auf die Spaltung von VCC analysiert.

Die Analyse der Hämolyse und des Western Blots zeigen, dass bz-ATP schon nach 15 Minuten eine vermehrte Spaltung von pVCC bewirkt, welche mit andauernder Inkubationszeit weiter zunimmt. Die Hemmung des P2X7-Rezeptors durch PPADS bewirkt eine vollständige Inhibition der Hämolyse und der Spaltung von pVCC durch ADAM10 (Abbildung 4.20 A und B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aktivierung des P2X7-Rezeptors eine Zunahme der Aktivität von ADAM10 zur Folge hat.

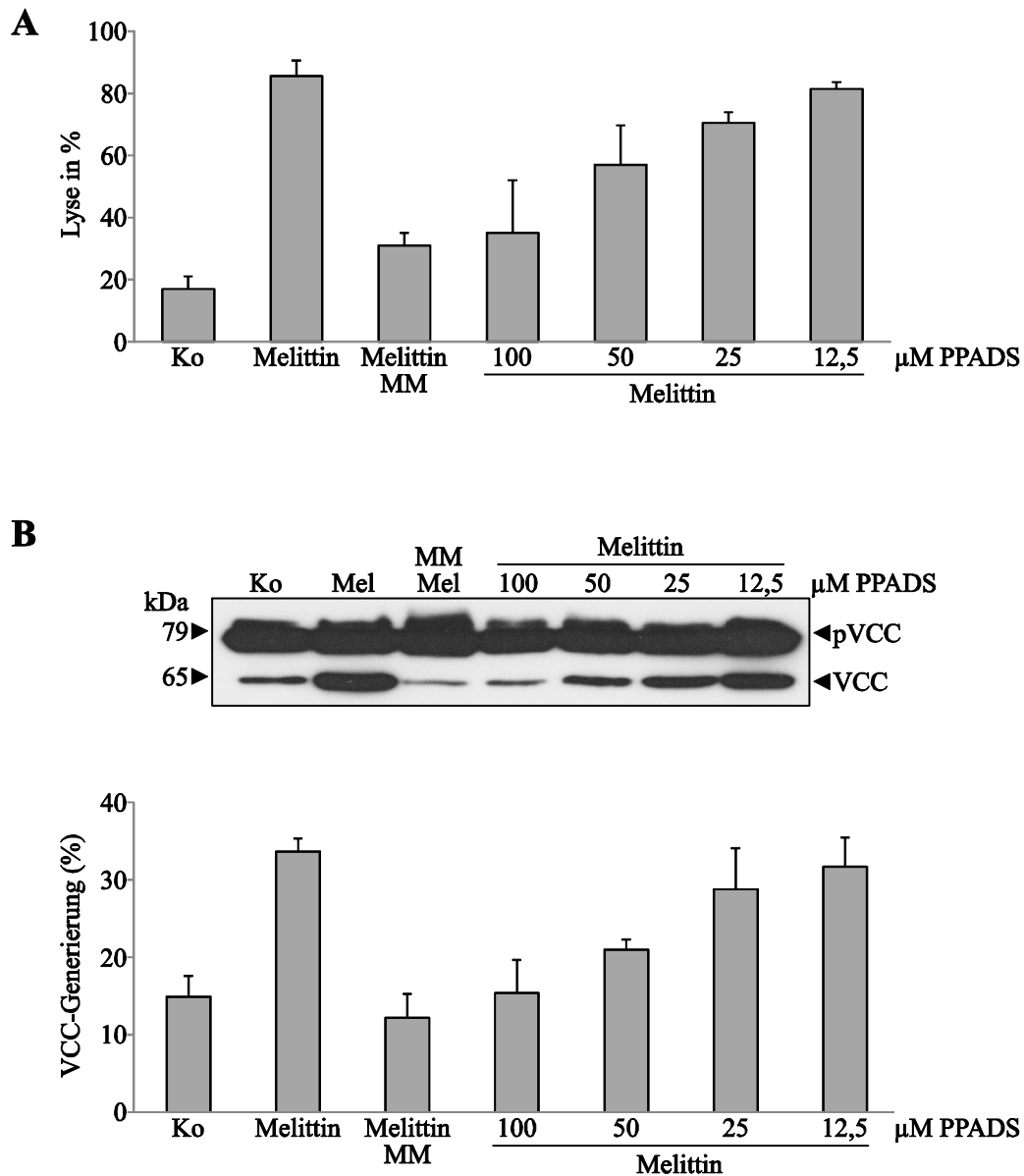


Abbildung 4.19: Der P2X-Rezeptor-Inhibitor PPADS unterdrückt die Melittin-induzierte Prozessierung von pVCC

(A) Kaninchenerythrozyten wurden für 30 Minuten auf Eis mit pVCC (3 $\mu\text{g/ml}$) beladen, anschließend für 30 Minuten mit Melittin (4 μM) in der Gegenwart von 0 – 100 μM PPADS bei 37°C inkubiert und die Hämolyse bestimmt. Zum Vergleich wurden Zellen mit Marimastat (10 μM) inkubiert (B). Der Nachweis der Spaltung von pVCC zu VCC erfolgte im Western Blot. Die VCC-Generierung wurde prozentual aus dem Quotienten von VCC und der Summe aus pVCC und VCC bestimmt und graphisch dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

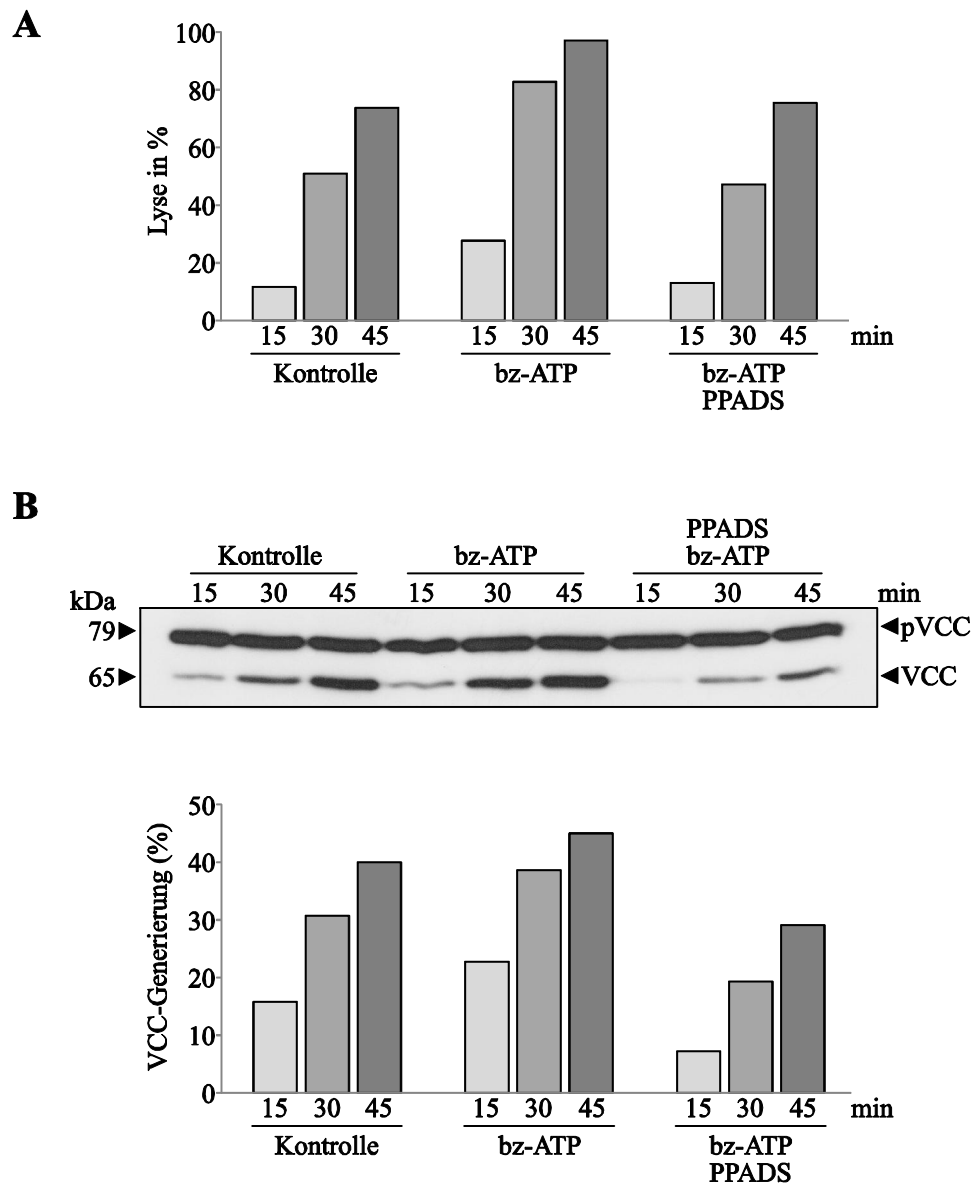


Abbildung 4.20: Einfluss von bz-ATP auf pVCC-Spaltung

(A) Die mit pVCC (3 $\mu\text{g/ml}$) beladenen Kaninchenerthrozyten wurden mit dem selektiven P2X7-Rezeptor Agonisten bz-ATP (500 μM) in Gegenwart des P2-Rezeptor-Inhibitors PPADS (100 μM) bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (15, 30 und 45 Minuten) wurden je 200 μl der Proben entnommen und die Hämolyse bestimmt. (B) Die Membranen wurden im Western Blot auf die Spaltung von VCC hin analysiert. Die VCC-Generierung ist graphisch dargestellt.

4.6.2 Gesteigerte ADAM-Aktivität korreliert mit Phosphatidylserin-Translokation

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit galt es zu klären, was der vermehrten Aktivität der ADAMs durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zu Grunde liegt. In der Literatur wird sowohl für Melittin (Pandey *et al.* 2010) als auch für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch bz-ATP (Sluyter *et al.* 2007) eine Exposition von Phosphatidylserin PS von der inneren zur äußeren Membranschicht (fortan an als „PS-Flip“ bezeichnet) in humanen Erythrozyten beschrieben. In den folgenden Versuchen wurde der Vermutung nachgegangen, dass dieser PS-Flip mit der gesteigerten ADAM-Aktivität in kausalen Zusammenhang stehen könnte.

Die Versuche zum PS-Flip durch Melittin konnten allerdings nicht vorgenommen werden, da die Kaninchenerythrozyten durch Melittin lysierten. Versuche mit bz-ATP wurden hingegen erfolgreich durchgeführt.

4.6.2.1 Aktivierung des P2X7-Rezeptors in Kaninchenerythrozyten induziert PS-Flip

Um zu untersuchen, ob es durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zu einem PS-Flip kommt, wurden die Erythrozyten mit bz-ATP inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V gefärbt. Das Annexin V bindet an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran. Diese Bindung kann im Durchflusszytometer analysiert werden.

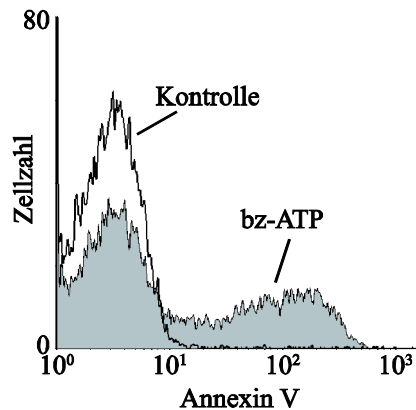


Abbildung 4.21: Phosphatidylserin-Flip in Kaninchenerythrozyten durch bz-ATP

Kaninchenerythrozyten wurden für 30 Minuten mit bz-ATP (500 μ M) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Probe entnommen und für 15 Minuten mit Annexin V gefärbt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Analyse der Erythrozyten erfolgte im Durchflusszytometer im FL-1-Kanal bei einer Wellenlänge von 595nm.

Bei den mit bz-ATP inkubierten Erythrozyten kann eine Bindung von Annexin V nach 30 Minuten bei ungefähr 50 % der Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.21). Unbehandelte Erythrozyten bleiben ungefärbt. Somit wird deutlich, dass die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch bz-ATP zu einem Phosphatidylserin-Flip in der Membran der Erythrozyten führt.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden Inhibitionsversuche durchgeführt. Erythrozyten wurden mit bz-ATP in Gegenwart des nicht selektiven P2X-Rezeptor-Inhibitors PPADS und des selektiven P2X7-Rezeptor-Inhibitors oATP inkubiert. Eine 2-stündige Vorinkubation der Zellen mit dem selektiven Inhibitor oATP führt zu einer irreversiblen Hemmung des Rezeptors. Des Weiteren wurden Erythrozyten mit ATP γ S inkubiert. ATP γ S hat keine Wirkung auf den P2X7-Rezeptor und sollte somit nicht zu einem PS-Flip führen.

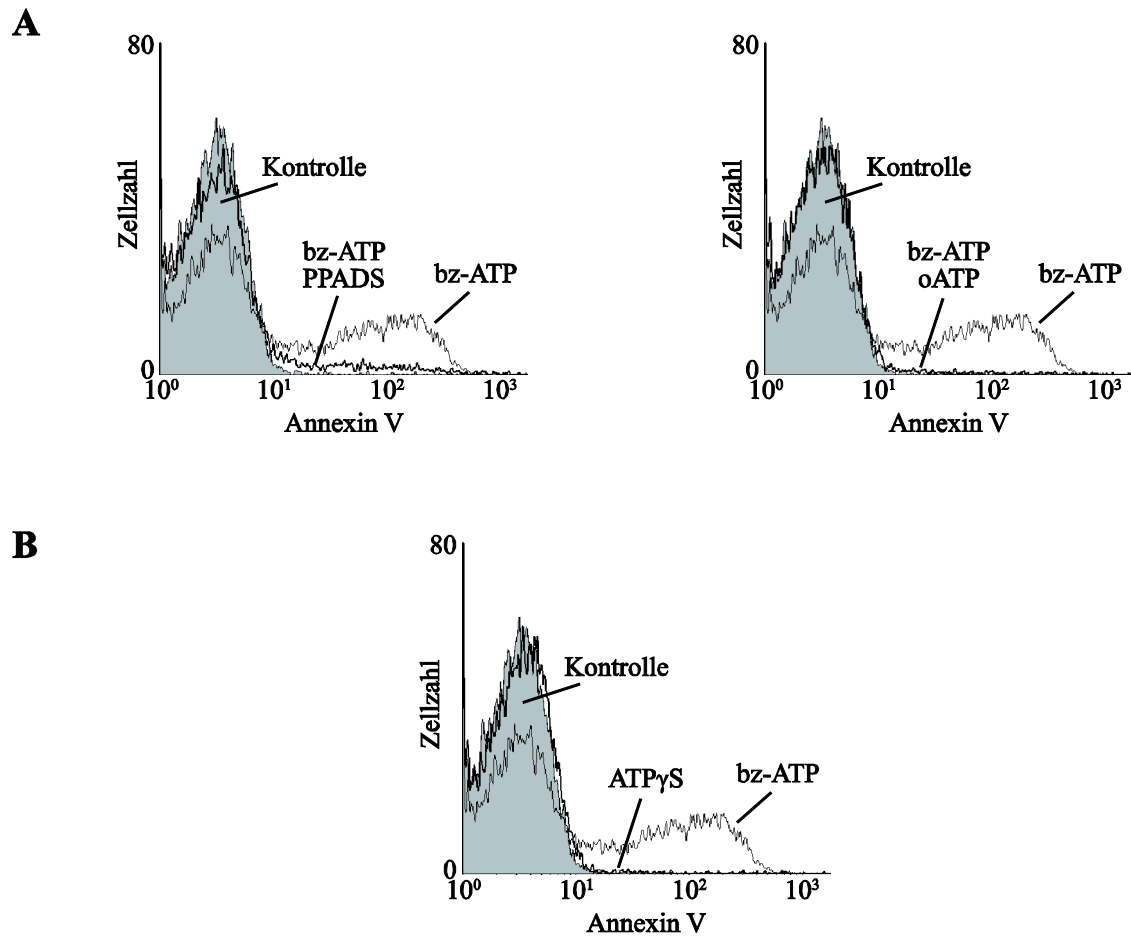


Abbildung 4.22: Inhibition des durch den P2X7-Rezeptor induzierten PS-Flips

(A) Erythrozyten wurden für 30 Minuten mit bz-ATP (500 μ M) in Gegenwart des nicht selektiven P2X7-Rezeptor-Inhibitors PPADS (100 μ M) und des selektiven P2X7-Rezeptor-Inhibitors oATP (500 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (B) Erythrozyten wurden mit ATP_γS (500 μ M) für 30 Minuten inkubiert und im Durchflusszytometer auf die Bindung von Annexin V untersucht.

Wie erwartet verhindern die beiden Inhibitoren PPADS und oATP den durch bz-ATP induzierten PS-Flip in den Erythrozyten (Abbildung 4.22 A). Werden Erythrozyten mit ATP_γS inkubiert, ist ebenfalls kein PS-Flip zu beobachten (Abbildung 4.22 B).

Zur Untersuchung, ob der PS-Flip unmittelbar mit einer gesteigerten Aktivität von ADAM10 korreliert, wurde bei gleichzeitiger Unterdrückung der ADAM-Aktivität durch Marimastat der PS-Flip induziert bzw. gehemmt. Anschließend wurden alle Aktivatoren und Inhibitoren entfernt und die Aktivität von ADAM10 untersucht. Abbildung 4.23 zeigt ein Schema zu dieser experimentellen Strategie.

1. Induktion bzw. Hemmung von PS-Flip in Gegenwart von MM
2. Waschen
3. Untersuchung der ADAM10-induzierten Spaltung von pVCC

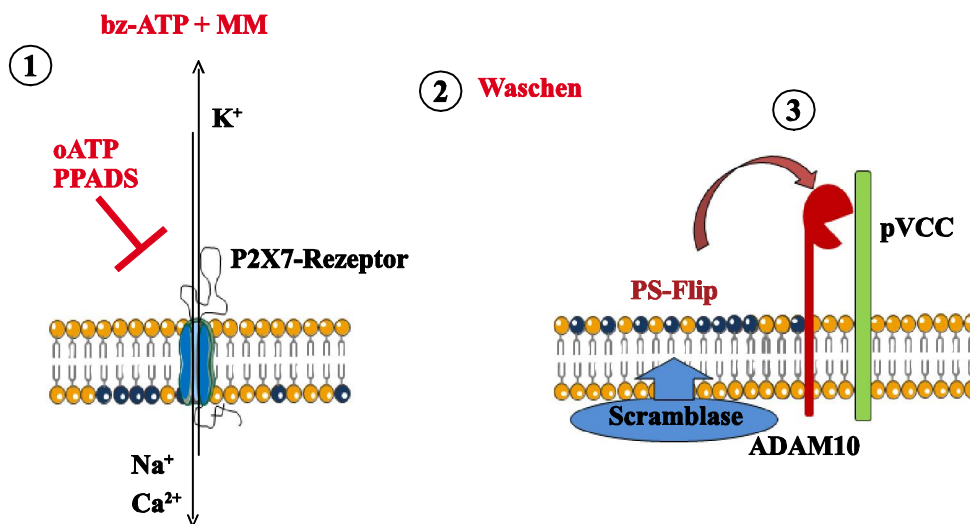


Abbildung 4.23: Schema zur gesteigerten Aktivität von ADAM10 durch den aus der Aktivierung des P2X7-Rezeptors resultierenden PS-Flips

Im ersten Schritt wird ADAM10 durch Marimastat inhibiert. Anschließend wird der PS-Flip durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch bz-ATP induziert bzw. durch oATP oder PPADS gehemmt. Durch mehrfaches Waschen werden MM, bz-ATP, PPADS und oATP entfernt. Die ADAM10-Aktivität wird durch Messung der Hämolyse der Erythrozyten und Spaltung von pVCC im Western Blot untersucht.

Die Erythrozyten wurden zuerst mit Marimastat inkubiert und anschließend mit bz-ATP in An- und Abwesenheit der Inhibitoren PPADS bzw. oATP. Durch mehrmaliges Waschen wurden bz-ATP und die Inhibitoren entfernt. Um sicher zu stellen, dass es zu einem PS-Flip gekommen ist, wurde an dieser Stelle eine Probe entnommen, mit Annexin V gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden dann zur Spaltung von pVCC inkubiert. Die Hämolyse der Erythrozyten wurde bestimmt und die Membranen im Western Blot auf die Generierung von VCC untersucht.

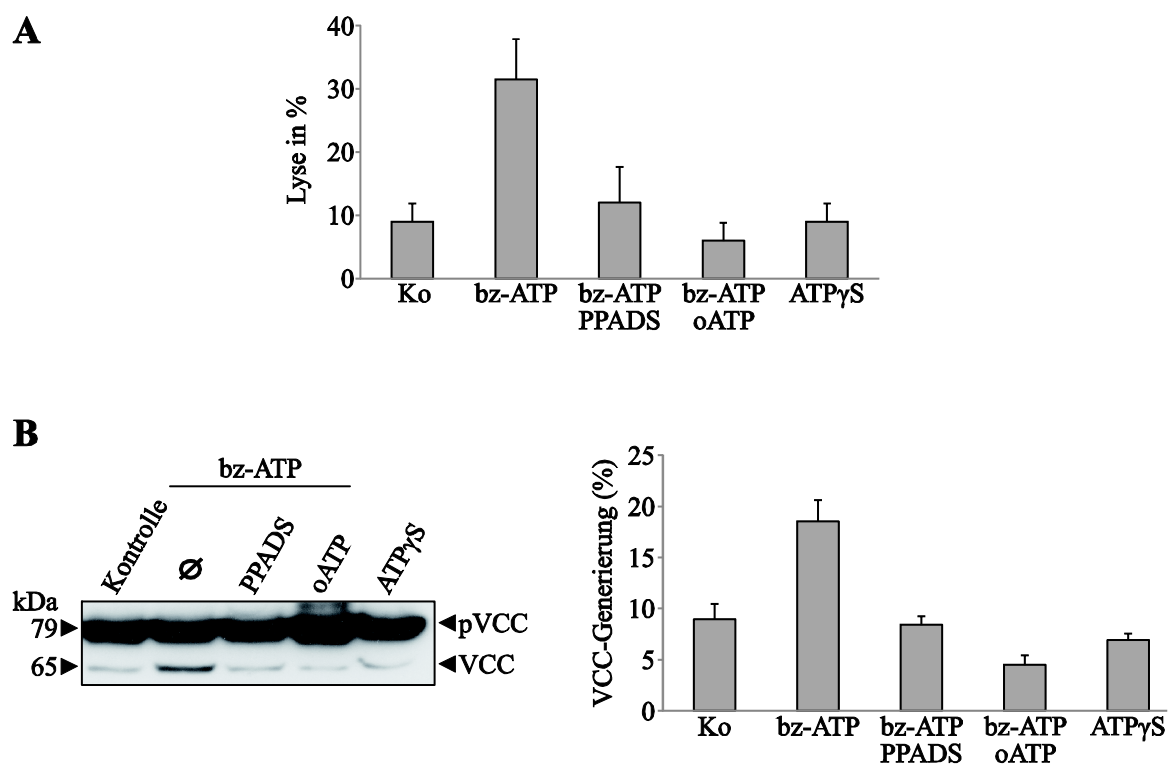


Abbildung 4.24: Induktion des PS-Flips mit bz-ATP und anschließende Spaltung von pVCC

Kaninchenerythozyten wurden für 30 Minuten mit pVCC (3 μ g/ml) auf Eis beladen und zur Inhibition von ADAM10 mit Marimastat (10 μ M) vorinkubiert. Zur Induktion des PS-Flips wurden die Zellen mit bz-ATP (500 μ M) bei 37°C inkubiert. Zur Hemmung der Aktivierung des Rezeptors wurden die Zellen mit bz-ATP in Gegenwart des nicht selektiven P2X7-Rezeptor-Inhibitor PPADS (100 μ M) und des selektiven Inhibitors oATP (500 μ M) behandelt. Eine weitere Kontrolle war die Inkubation mit ATP γ S. Nach 30minütiger Induktion bzw. Hemmung des PS-Flips wurden die Erythrozyten zur Entfernung von MM, bz-ATP und den Inhibitoren sowie von ATP γ S 5mal gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten in PBS aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Spaltung von pVCC durch ADAM10. (A) Hämolyse. (B) Western Blot der Spaltung von pVCC zu VCC und densitometrische Auswertung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Fluorozytometrisch konnte bestätigt werden, dass ein PS-Flip durch bz-ATP induziert wurde und in Anwesenheit der Inhibitoren sowie mit ATP γ S blieb der Flip aus. Einzig bei den Erythrozyten mit PS-Flip ist eine vermehrte Lyse der Zellen zu beobachten (Abbildung 4.24 A). Die Ergebnisse des Western Blots in Abbildung 4.24 B stimmen mit denen der Lyse überein. Eine verstärkte VCC-Generierung ist ebenfalls nur bei der Probe mit induziertem PS-Flip zu sehen. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass der PS-Flip mit der ADAM10-Aktivität korreliert.

Im Folgenden galt es zu klären, ob eine Inhibition des P2X7-Rezeptors nach zuvor induziertem PS-Flip eine Auswirkung auf die Aktivität von ADAM10 hat. Der PS-Flip wurde wie im vorgehenden Versuchsansatz mit bz-ATP induziert. Anschließend wurde die ADAM-Aktivität in An- und Abwesenheit von PPADS verfolgt.

Die Inhibition des P2X7-Rezeptors nach erfolgtem PS-Flip zeigt nunmehr keinen Einfluss auf die vermehrte Aktivität von ADAM10. Sowohl die Lyse der Erythrozyten als auch die Generierung von VCC im Western Blot zeigen keinen Unterschied zwischen den Proben mit provoziertem PS-Flip mit und ohne nachträglicher Inhibition des P2X7-Rezeptors. Wird der P2X7-Rezeptor dagegen von Beginn an inhibiert und somit der PS-Flip verhindert, sind die Lyse der Zellen und die VCC-Generierung deutlich vermindert (Abbildung 4.25 A und B).

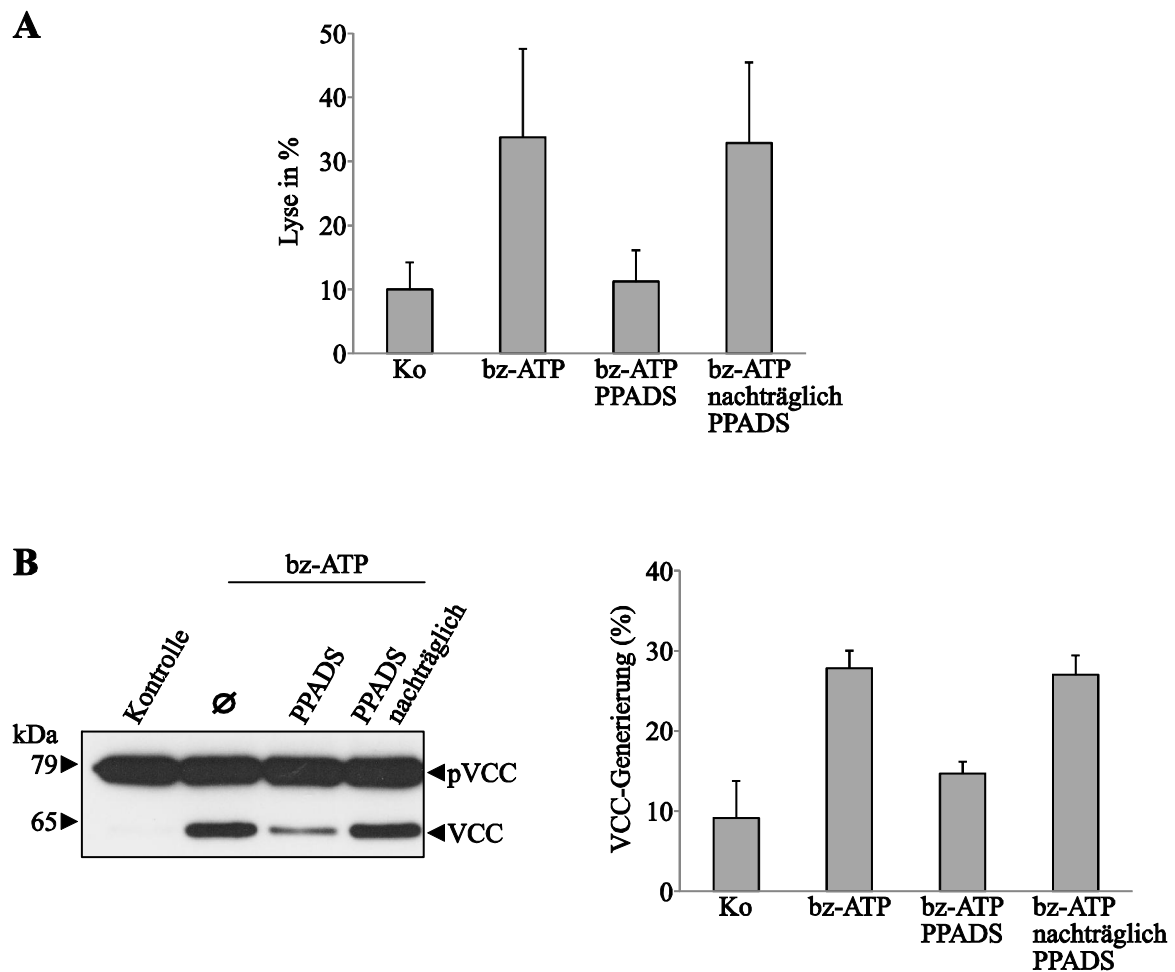


Abbildung 4.25: Inhibition des P2X7-Rezeptors nach induziertem PS-Flip

Die mit pVCC (3 µg/ml) beladenen Erythrozyten wurden mit Marimastat (10 µM) inkubiert und der PS-Flip mit bz-ATP (500 µM) induziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und die Inhibition des P2X7-Rezeptors durch PPADS (100 µM). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Erythrozyten in PBS aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zu einer Probe mit induzierten PS-Flip wurde während dieser Inkubationszeit PPADS (100 µM) hinzugefügt. (A) Bestimmung der Lyse der Erythrozyten im Überstand. (B) Western Blot der Membranen zum Nachweis der Generierung von VCC und densitometrische Auswertung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

4.6.2.2 Durch das Ionophor A23187 induzierter PS-Flip korreliert ebenfalls mit erhöhter ADAM-Aktivität

Die obigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass der PS-Flip in direktem Zusammenhang mit der vermehrten Aktivität von ADAM10 steht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden im Folgenden Versuche mit dem Ionophor A23187 durchgeführt. Das Ionophor A23187 bildet mit Ca^{2+} membrangängige Komplexe (Reed and Lardy 1972) und führt somit zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese wiederum bewirkt eine Aktivierung der membranständigen *Scramblase*, wodurch es zu einem Zusammenbruch der Membranasymmetrie und zur Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Membranschicht kommt (Zhou *et al.* 1997). Des Weiteren induziert der Einstrom von Ca^{2+} eine Öffnung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle und eine Öffnung von Cl^- -Kanälen. Der Ausstrom von K^+ und Cl^- verstärkt den PS-Flip (Lang *et al.* 2003).

Somit eröffnete sich die Möglichkeit, in einem zweiten Modell die These zu prüfen, ob die Steigerung der ADAM-Aktivität mit der Translokation von PS in einem kausalen Zusammenhang steht. Durch die Behandlung der Erythrozyten mit A23187 sollte ein PS-Flip induzierbar sein. Dieser wiederum dürfte durch Ca^{2+} -Chelation und Hemmung der Ionenfluxe unterdrückbar sein. Daher wurden Versuche unternommen, bei denen einerseits der intrazelluläre Ca^{2+} -Chelator Bapta-AM verwendet und andererseits die extrazelluläre K^+ -Konzentration erhöht wurde, um dem K^+ -Ausstrom entgegenzuwirken.

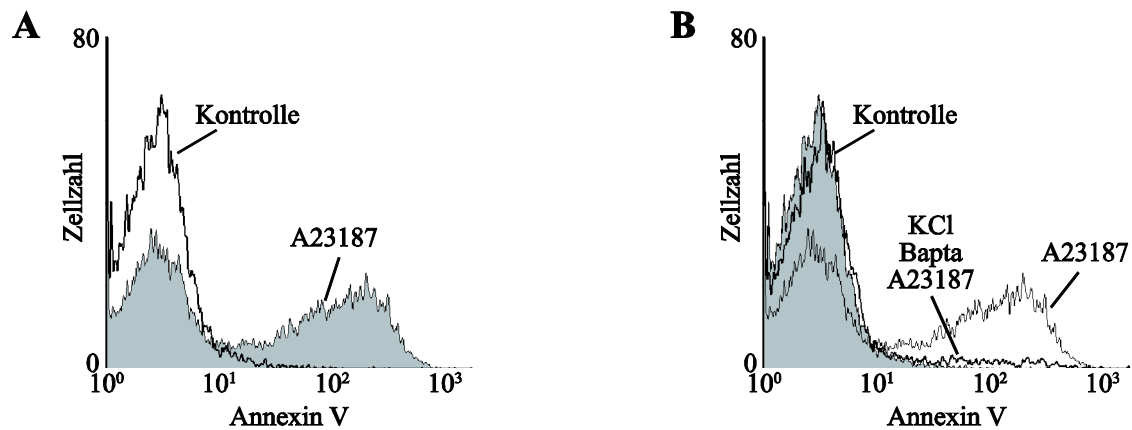


Abbildung 4.26: Induktion des Phosphatidylserin-Flips in Kaninchenerythrozyten durch Ionophor A23187

(A) Kaninchenerythrozyten wurden für 30 Minuten mit dem Ionophor A23187 (0,3 μM) in Ca^{2+} -haltigem Medium bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V gefärbt und im Durchflusszytometer auf die Bindung des Annexin V an Phosphatidylserin hin untersucht. (B) Erythrozyten wurden mit dem Ionophor A23187 (0,3 μM) in Gegenwart des membranpermeablen Ca^{2+} -Chelators Bapta-AM (10 μM) und KCl (135 mM) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Bindung von FITC-Annexin analysiert.

Wie in Abbildung 4.26 A und B zu sehen ist, führt die Behandlung der Kaninchenerythrozyten mit dem Ionophor A23187 in Gegenwart von Ca^{2+} zur Exposition von Phosphatidylserin. Die Translokation von PS auf die äußere Membranseite wird erwartungsgemäß durch Bapta-AM und extrazelluläres K^+ unterdrückt.

Im folgenden Versuch sollte geprüft werden, ob auch A23187 die Aktivität von ADAM10 beeinflusst, und ob dieser Vorgang von der Translokation von PS abhängt. Dazu wurde die Spaltung von pVCC unter dem Einfluss von A23187 in An- und Abwesenheit von KCl und Bapta-AM untersucht.

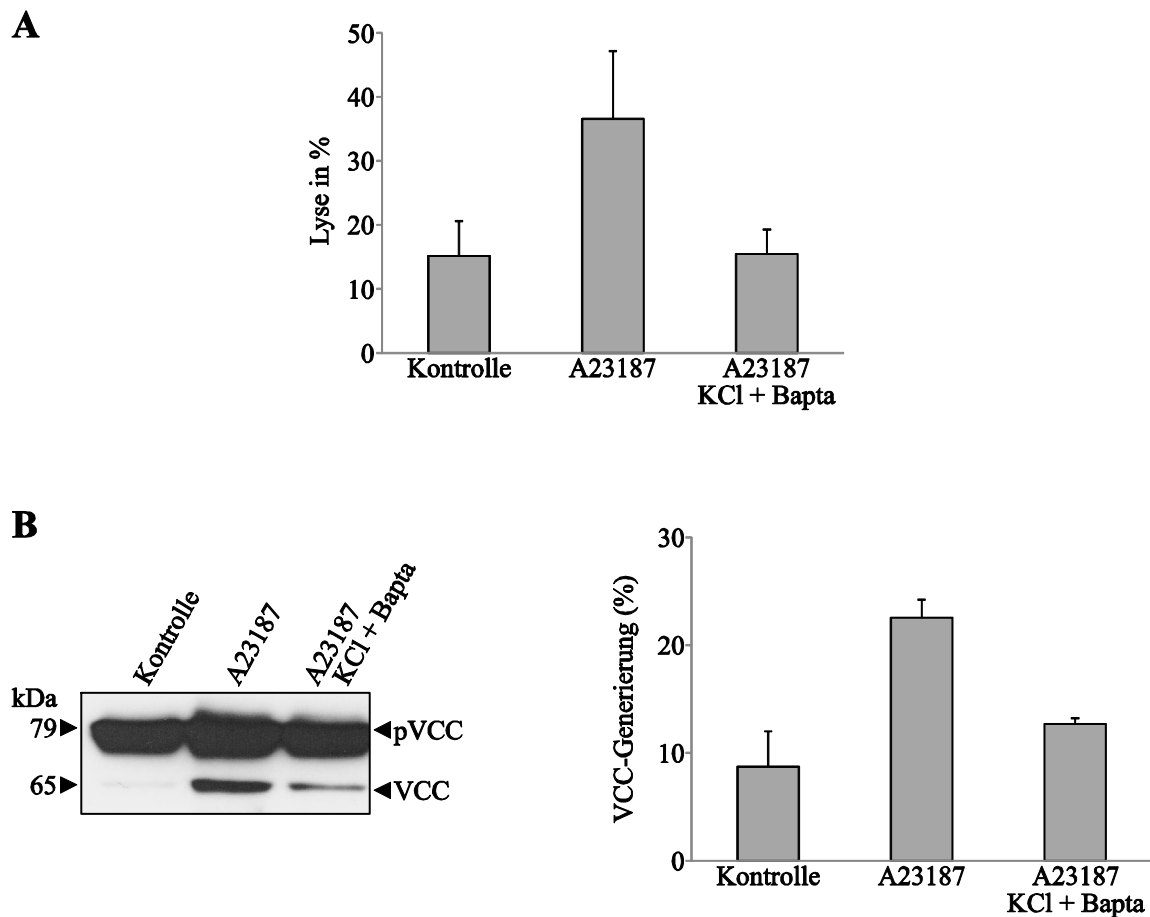


Abbildung 4.27: Einfluss des Ionophor A23187 auf die Spaltung von pVCC in VCC

(A) Kaninchenerythrozyten wurden mit pVCC (3 µg/ml) beladen und für 30 Minuten bei 37°C mit A23187 (0,3 µM) in Ab- und Anwesenheit von Bapta-AM (10 µM) und KCl (135 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten zentrifugiert und die Lyse bestimmt. (B) Im Western Blot wurden die Membranen auf die Spaltung von VCC hin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Die Behandlung mit dem Ionophor A23187 führt zu einer vermehrten Hämolyse der Erythrozyten, welche durch Bapta-AM und KCl unterdrückt werden kann. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Western Blot, der eine vermehrte Generierung von VCC unter dem Einfluss des Ionophor A23187 zeigt. In Gegenwart von KCl und Bapta-AM bleibt dieser Effekt fast völlig aus (Abbildung 4.27 A und B).

Es eröffnete sich somit eine weitere Möglichkeit zu prüfen, ob der PS-Flip tatsächlich mit der vermehrten Aktivität von ADAM10 korreliert. Die Translokation von Phosphatidylserin durch A23187 wurde unter Hemmung von ADAM10 induziert. Nach Wegwaschen des ADAM-Inhibitors wurde anschließend die Aktivität von ADAM10 untersucht. Ein Schema zur Verdeutlichung der experimentellen Strategie ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

1. Induktion bzw. Hemmung von PS-Flip in Gegenwart von MM
2. Waschen
3. Untersuchung der ADAM10-induzierten Spaltung von pVCC

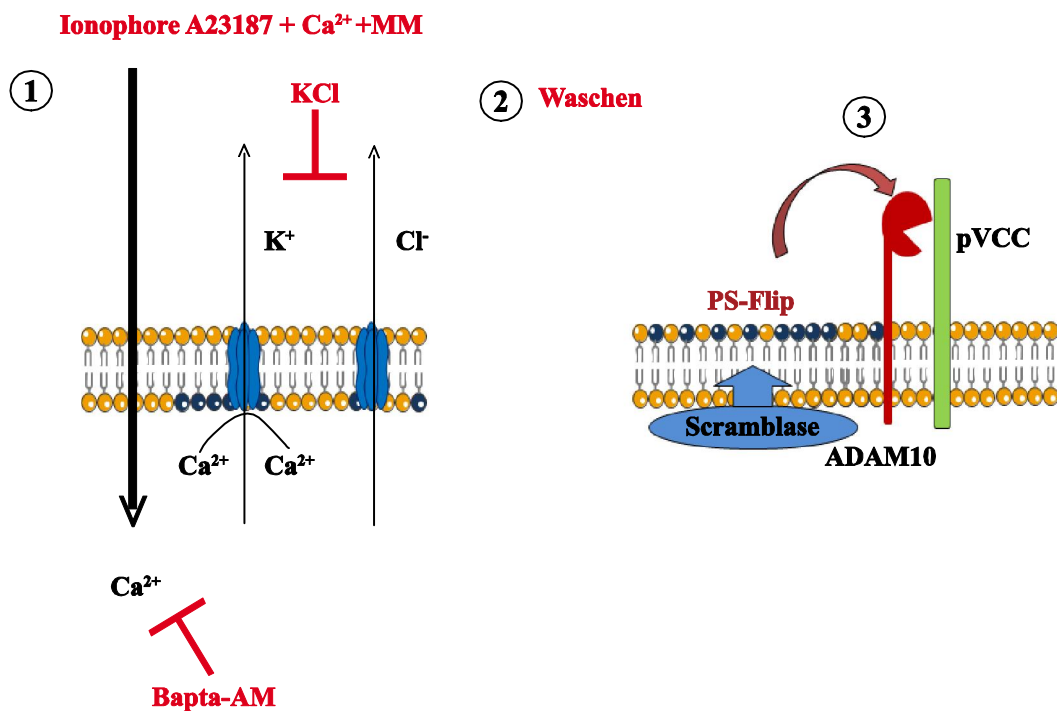


Abbildung 4.28: Schema des Versuchsaufbaus mit Ionophor A23187

Im ersten Schritt wird ADAM10 durch Marimastat inhibiert. Anschließend wird der PS-Flip durch die Zugabe des Ionophors A23187 in Ca^{2+} -haltigen Medium induziert oder durch die Zugabe von Bapta-AM und KCl gehemmt. Durch Waschen werden MM, A23187, Ca^{2+} , Bapta-AM und KCl anschließend entfernt und die Aktivität von ADAM10 wird untersucht.

4 Ergebnisse

Zur Unterdrückung der ADAM10-Aktivität wurden die Erythrozyten mit Marimastat inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Translokation von Phosphatidylserin durch Zugabe des Ionophors A23187 induziert. In einem Parallelansatz wurde der PS-Flip durch Bapta-AM und KCl gehemmt. Es wurden Proben entnommen und auf die Bindung von Annexin V hin untersucht. Die Erythrozyten wurden mehrmals gewaschen und die ADAM-Aktivität nachfolgend analysiert.

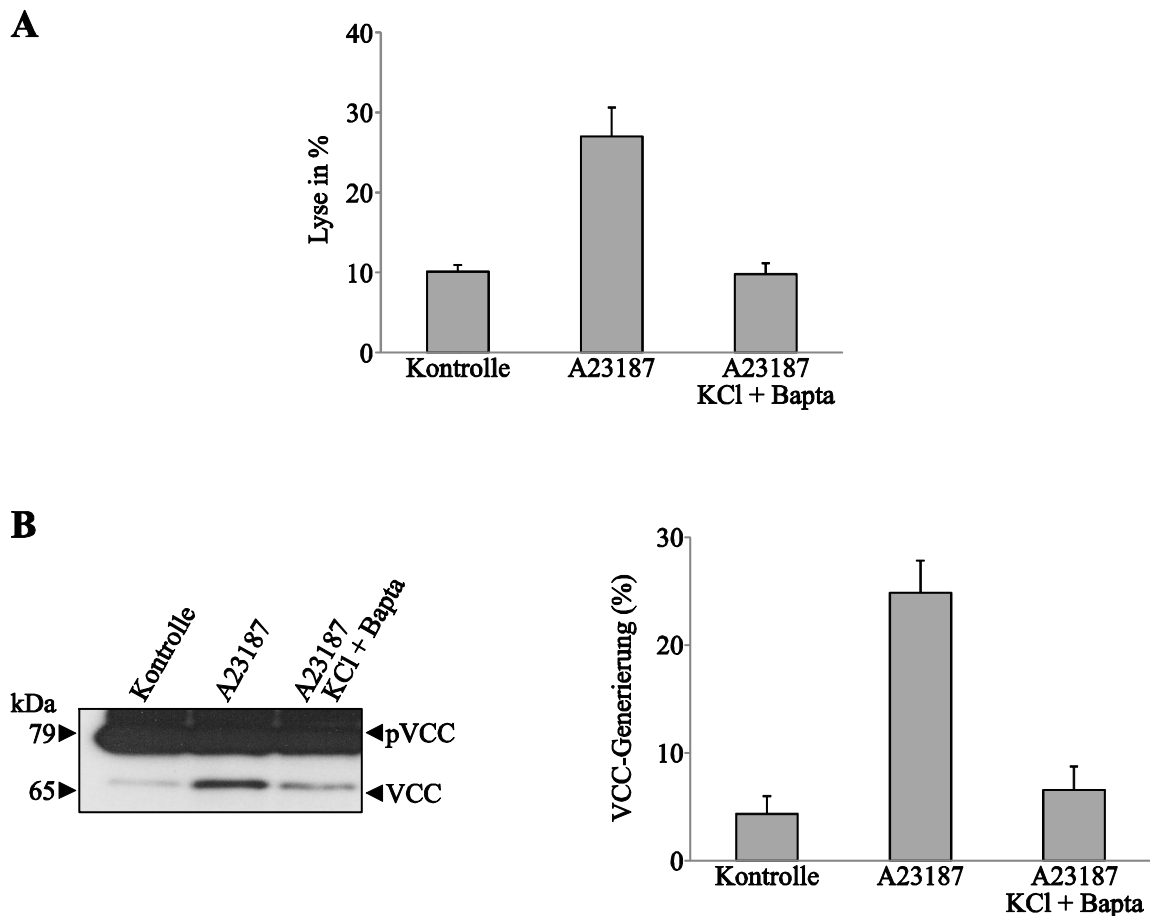


Abbildung 4.29: Induktion des PS-Flips mit dem Ionophor A23187 und anschließende Spaltung von pVCC

Die mit pVCC (3 µg/ml) beladenen Kaninchenerythrozyten wurden zur Inhibition von ADAM10 mit Marimastat (10 µM) inkubiert. Dann wurde mit dem Ionophor A23187 (0,3 µM) der PS-Flip induziert. In einem Parallelansatz wurde der Ionophor-induzierte PS-Flip durch Bapta-AM (10 µM) und KCl (135 mM) gehemmt. Anschließend wurden die Erythrozyten gewaschen, in PBS aufgenommen und zur Spaltung von pVCC für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. (A) Messung der Lyse der Erythrozyten. (B) Analyse der Generierung von VCC im Western Blot und densitometrische Auswertung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

In der Tat konnte die Hypothese, dass die Exposition von Phosphatidylserin unmittelbar mit einer gesteigerten ADAM10-Aktivität korreliert, abermals untermauert werden. Die FACS-Analyse weist den durch das Ionophor A23187 induzierten PS-Flip und seine Hemmung durch Bapta-AM und KCl nach. Die Abbildung 4.29 A zeigt eine gesteigerte Lyse der Erythrozyten nach induziertem PS-Flip. Entsprechend zeigt der Western Blot eine deutlich gesteigerte Generierung von VCC in dieser Probe, wohingegen die Hemmung des PS-Flips auch mit der Hemmung der pVCC-Spaltung einhergeht (Abbildung 4.29 B).

Zur weiteren Prüfung der Hypothese wurden Versuche durchgeführt, bei denen KCl und Bapta-AM erst nach erfolgtem PS-Flip während der Spaltung von pVCC hinzugefügt wurden. Die ersten Proben stellten eine Wiederholung des vorherigen Versuchs dar: Vorinkubation von pVCC-beladenen Zellen mit A23187 steigerte Hämolyse und pVCC-Spaltung. Diese Wirkung wurde in Anwesenheit von Bapta-AM und KCl während der Inkubation mit Ionophor unterbunden. Wurde jedoch der PS-Flip zuerst durch A23187 induziert, vermochte die nachträgliche Zugabe von Bapta-AM und KCl keine Hemmung der ADAM-Aktivität zu bewirken (Abbildung 4.30).

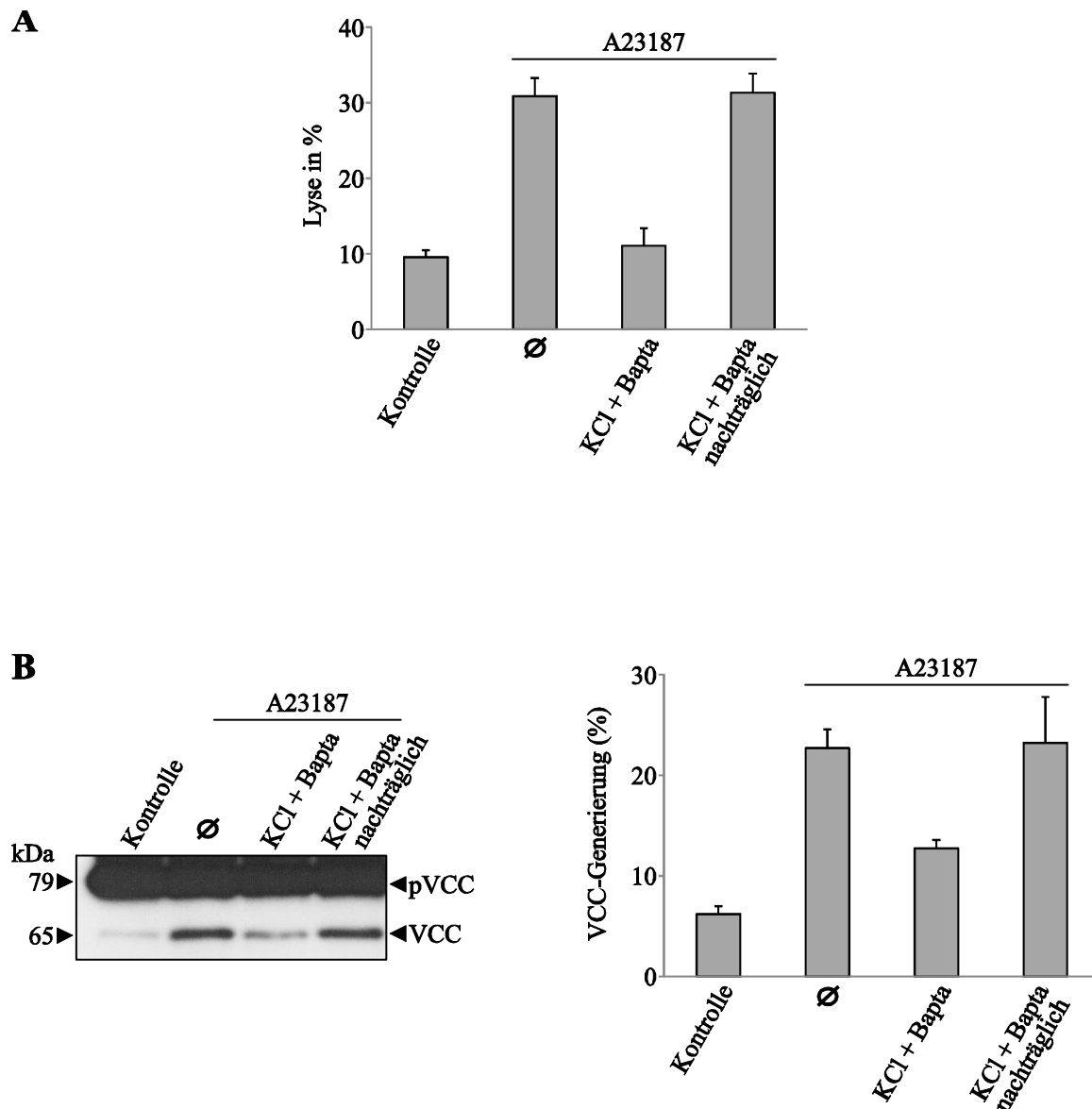


Abbildung 4.30: Einfluss von Bapta-AM und KCl während der Lyse nach induziertem PS-Flip

Kaninchenerythrozyten wurden mit pVCC (3 µg/ml) beladen und mit Marimastat (10 µM) zur Inhibition von ADAM10 vorinkubiert. Anschließend wurde der PS-Flip mit A23187 (0,3 µM) induziert. Zur Hemmung des PS-Flips wurden die Zellen mit A23187 (0,3 µM) in Gegenwart von Bapta-AM (10 µM) und KCl (135 mM) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Erythrozyten 5mal gewaschen, in PBS aufgenommen und auf die Spaltung von pVCC hin untersucht. Zu einer Probe mit induziertem PS-Flip wurde während der Spaltung von pVCC Bapta-AM (10 µM) und KCl (135 mM) zugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Hämolyse der Erythrozyten gemessen (A). Die Membranen wurden im Western Blot auf die Generierung von VCC hin untersucht und densitometrisch ausgewertet (B). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

5 Diskussion

Melittin, der Hauptbestandteil des Bienengifts, hat auf Zellen unterschiedliche Auswirkungen. Es ist in der Lage, die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran zu beeinflussen (Dawson *et al.* 1978, Schoch and Sargent 1980). Neben den Interaktionen mit der Zellmembran könnte Melittin durch Aktivierung von *downstream* Signalwegen auch einen direkten Einfluss auf zelluläre Funktionen haben. Melittin gehört zur Familie der antimikrobiellen Peptide (AMPs) und neben der Wirkung als Antibiotikum und Anti-Krebsmittel (Duclohier 2010, Orsolic 2012) wird ihm eine anti-rheumatische, anti-arthritische, entzündungshemmende und schmerzlindernde Wirkung zugeschrieben (Son *et al.* 2007). Die anti-rheumatische Wirkung von Melittin wird auf eine Hemmung der Expression der Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP-3) zurückgeführt (Nah *et al.* 2008). Des Weiteren konnte auch die Expression und Aktivität von MMP-9 in MCF-7 Zellen (*Michigan Cancer Foundation – 7*) durch die Behandlung mit Melittin inhibiert werden (Cho *et al.* 2010). Ein zellulärer Rezeptor, an den Melittin binden könnte, ist nicht bekannt und der genaue Wirkmechanismus bis jetzt noch nicht aufgeklärt.

Die ADAMs spielen Schlüsselrollen bei Entwicklungs- und Regulationsprozessen aber auch bei Entzündungsprozessen sowie bei der Krebsentstehung. Die Aufklärung ihres Aktivierungsmechanismus ist daher von großer Bedeutung. Dieser ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und wird zudem in der Literatur kontrovers diskutiert. Das durch die ADAMs vermittelte *Ectodomain Shedding* geschieht sowohl konstitutiv wie auch nach Aktivierung durch eine Vielzahl variabler Stimuli. Der Shedding-Prozess kann dabei an unterschiedlichen Stellen reguliert werden, wie beispielsweise durch transkriptionelle Kontrolle, posttranslationale Modifikationen, Enzymstabilität und zelluläre Lokalisationen (Edwards *et al.* 2008, Murphy 2009). ADAM10 und ADAM17 gehören dabei zu den wichtigsten Metalloproteinasen, die für die Spaltung einer Vielzahl von membranverankerten Molekülen verantwortlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Melittin auf die ADAMs, insbesondere ADAM10 und ADAM17, untersucht werden mit dem Ziel neue Erkenntnisse über ihre Aktivierungsmechanismen zu gewinnen.

5.1 Melittin induziert gesteigerte ADAM17- und ADAM10-Aktivität

5.1.1 Melittin induziert *Shedding* von ADAM17-Substraten

ADAM17 ist für das *Shedding* verschiedener Oberflächenproteine, wie beispielsweise dem Zytokin TNF- α , dem Adhäsionsmolekül L-Selektin und dem Wachstumsfaktor TGF- α , verantwortlich (Le Gall *et al.* 2009). Im Zellüberstand von LPS-geprimten Monozyten konnte nachgewiesen werden, dass Melittin in nicht zytotoxischen Konzentrationen zu einem Anstieg von TNF- α führt. Ebenso wurde in Granulozyten eine Abnahme von L-Selektin, nach der Behandlung der Zellen mit Melittin beobachtet. Mit Hilfe von Breitbandmetalloproteinase-Inhibitoren konnte in beiden Fällen gezeigt werden, dass diese Proteolyse von TNF- α und L-Selektin auf die Aktivität von ADAM17 zurückzuführen ist.

TGF- α ist ein Ligand für den EGF-Rezeptor, dessen wichtigste Signaltransduktionswege der MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Signalweg und der PI3K/Akt Signalweg (Phosphatidylinositol-3-Kinase) sind. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Zellmigration (Bazley and Gullick 2005, Oda *et al.* 2005, Koivisto *et al.* 2006). Die Behandlung von HaCaT-Keratinocyten mit Melittin führte zu einer vermehrten Spaltung von TGF- α . Durch den Einsatz von sowohl Breitbandmetalloproteinase-Inhibitoren als auch spezifischen Inhibitoren für ADAM10 und ADAM17 konnte auch hier eine Beteiligung von ADAM17 nachgewiesen werden. Da neben TGF- α sechs weitere Liganden des EGF-Rezeptors durch Proteolyse freigesetzt werden, ist es durchaus wahrscheinlich, dass das *Shedding* dieser Liganden zu einer Aktivierung des EGFR-Signalweges beiträgt. Da Melittin eine Wirkung als Anti-Krebsmittel zugeschrieben wird, stellte sich die Frage, ob die durch Melittin induzierte Freisetzung von TGF- α zu der Aktivierung des MAPK-Weges führt und in Folge dessen zur Proliferation und Migration der Zellen. In der Tat war eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und der Kinase ERK1/2 nach Behandlung von HaCaT-Keratinocyten mit Melittin nachweisbar. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass es zu einer Stimulation der Proliferation und zur Migration von HaCaT-Keratinocyten kommt (Sommer *et al.* 2012). Diese Ergebnisse sind mit denen von Maher *and* McClean 2008 in Einklang zu bringen, die eine durch Melittin hervorgerufene Proliferation von gastrointestinalen Zellen zeigen konnten (Maher *and* McClean 2008).

Diese Befunde stellen jedoch die Wirkungen von Melittin als Anti-Krebsmittel in Frage (Liu *et al.* 2008, Orsolic 2012).

5.1.2 Melittin induziert *Shedding* von ADAM10-Substraten

Die zu den Zelladhäsionsmolekülen gehörenden klassischen Cadherine wie N-Cadherin, VE-Cadherin und E-Cadherin werden hauptsächlich von ADAM10 gespalten. Daher wurden Zellen mit Melittin behandelt und das *Shedding* von N-Cadherin in murinen Fibroblasten, VE-Cadherin in humanen Endothelzellen und E-Cadherin in humanen HaCaT-Keratinocyten untersucht. Melittin führte in allen Fällen zu einer schnellen und vermehrten Spaltung der Zelladhäsionsmoleküle. Die Spaltung von VE-Cadherin führt zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität (Schulz *et al.* 2008). Die Proteolyse von E-Cadherin verursacht wahrscheinlich den Verlust von epithelialen Zell-Zell-Kontakten und kann so zu der ekzematösen Dermatitis beitragen (Maretzky *et al.* 2008). Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit denen von Maher *et al.* 2007, die zeigen konnten, dass Melittin zu einer gesteigerten Permeabilität eines Zellmonolayers von CaCo-2 Epithelzellen führt (Maher *et al.* 2007). Durch die hier erhaltenen Ergebnisse kann Melittin durchaus als ein Aktivator für die ADAMs angesehen werden.

5.2 Melittin-induzierte Aktivität der ADAMs ist calciumunabhängig

Calcium ist ein sekundärer Botenstoff und an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt. Es ist bekannt, dass Calcium an der Proteolyse von N-Cadherin und E-Cadherin durch ADAM10 beteiligt ist (Maretzky *et al.* 2005, Uemura *et al.* 2006). Melittin führte sowohl zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium als auch zu einer Öffnung der intrazellulären Calciumionenspeicher. Dieser Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration war allerdings nicht an dem Aktivierungsmechanismus der ADAMs durch Melittin beteiligt. Dies konnte durch die Verwendung von EGTA und Bapta-AM gezeigt werden. Weder das *Shedding* von E-Cadherin noch die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und ERK1/2 in HaCaT-Keratinocyten konnten durch EGTA oder Bapta-AM inhibiert werden. Sommer *et al.* 2012 konnten nachweisen, dass auch die Verwendung konventioneller

Inhibitoren intrazellulärer Signalwege die Melittin-induzierte Aktivität der ADAMs in keinsten Weise beeinflussen (Sommer *et al.* 2012).

5.3 Melittin induziert keine Änderung der Membranfluidität

Neueste Untersuchungen von Reiss *et al.* 2011 zeigen eine Beteiligung der physikalischen Eigenschaften der Zellmembran an der Funktion der ADAMs. Diese ist auf eine Beeinflussung der Bewegung der Enzyme und Substrate in der Lipiddoppelschicht zurückzuführen. Die Zugabe von ungesättigten Fettsäuren führte zu einer gesteigerten Membranfluidität, mit der Folge einer vermehrten Spaltung von ADAM-Substraten (Reiss *et al.* 2011). Daher galt es zu klären, ob das durch Melittin hervorgerufene schnelle *Shedding* von Oberflächenproteinen ebenfalls durch eine erhöhte Membranfluidität zu erklären ist. Die hier durchgeführten Versuche an HaCaT-Keratinocyten zeigten jedoch überhaupt keine Veränderungen der Fluidität durch Melittin. Jedenfalls ist klar geworden, dass die durch Melittin bedingte Änderung der proteolytischen Aktivität der ADAMs nicht auf einer Änderung der Membranfluidität beruhte.

5.4 Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch Melittin

Auf Grund der Tatsache, dass die Melittin-vermittelte Aktivität von ADAM10 und ADAM17 weder durch die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration noch über eine Änderung der Membranfluidität erklärt werden konnte, wurde das Hauptaugenmerk auf eine mögliche Beteiligung der P2-Rezeptoren gelegt. In der Literatur wurde eine Beteiligung der P2-Rezeptoren an der ADAM-Aktivität nachgewiesen (Gu *et al.* 1998, Camden *et al.* 2005, Ratchford *et al.* 2010). So induziert extrazelluläres ATP die durch ADAM hervorgerufene Spaltung von L-Selektin in humanen leukämischen B-Zellen (Jamieson *et al.* 1996, Gu *et al.* 1998). In Mäusen ist das *Shedding* dieses Adhäsionsmoleküls von dem P2X7-Rezeptor abhängig (Elliott *et al.* 2005). Die Proteolyse von CD23 und CD27, zweier wichtiger Mediatoren des Immunsystems, wird ebenfalls durch P2X7-Rezeptor-Aktivierung induziert (Sluyter and Wiley 2002, Moon *et al.* 2006b).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an der durch Melittin induzierten Aktivität der ADAMs der P2X7-Rezeptor beteiligt ist. Mit Hilfe der P2-Rezeptor-Inhibitoren PPADS und Suramin wurden sowohl das *Shedding* von E-Cadherin als auch die *downstream* Phosphorylierung von ERK1/2 inhibiert. Um die Beteiligung des P2X7-Rezeptors zu bestätigen wurden HEK293-Zellen mit dem P2X7-Rezeptor transfiziert. Eine Phosphorylierung von ERK1/2, die sowohl durch Marimastat als auch durch die ATPase Apyrase aufgehoben wurde, konnte beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Freisetzung von ATP eine wichtige Rolle bei der ADAM-Aktivierung durch den P2X7-Rezeptor spielt. Angesichts der Komplexität und Redundanz der P2-Rezeptor-Familie wurden keine Versuche zur Identifikation weiterer Mitglieder, die an der ADAM-Aktivität beteiligt sein könnten, durchgeführt.

In Bezug auf die oben aufgeführten Daten scheint ATP bei der durch Melittin induzierten Aktivierung des P2X7-Rezeptors eine wesentliche Rolle zu spielen. Es ist jedoch nicht klar, ob und wie ausreichende ATP-Konzentrationen freigesetzt werden damit der P2X7-Rezeptor aktiviert wird. Intrazelluläres ATP wird durch unterschiedliche Stimuli, wie beispielsweise oxidativer Stress oder Veränderung der Osmolarität freigesetzt (Schwiebert and Zsembery 2003). Eigene MTT-Assays zeigten, dass Melittin in nicht-toxischen Konzentrationen zu einer ATP-Freisetzung führt. Daher wird davon ausgegangen, dass dieser Prozess eine physiologische Antwort der Zellen auf Melittin ist. Das antimikrobielle Peptid LL-37, aus der Gruppe der Cathelicidine, das in den Granula neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen sowie in Epithelzellen der Haut und Schleimhaut gespeichert wird, führt zur Permeabilisierung mikrobieller Membranen, ähnlich wie andere AMPs (Lee *et al.* 2011, Reiss and Bhakdi 2012). Elssner *et al.* 2004 berichteten, dass LL-37 ähnlich wie Melittin zu einer Freisetzung von ATP führt (Elssner *et al.* 2004).

Somit könnten Interaktionen von Melittin mit der Zellmembran zu einer ATP-Freisetzung führen. Darüberhinaus kommt es durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur Öffnung von Pannexin-1-Kanälen, die ebenfalls einen Efflux von ATP bewirken würden (Pelegryn and Surprenant 2006). In den Überständen der Zellen konnte ATP allerdings nur in nanomolaren Konzentrationen nachgewiesen werden (Sommer *et al.* 2012). Die durch P2X7-Rezeptor induzierte ADAM-Aktivierung wird somit wahrscheinlich durch weitaus komplexere Ereignisse hervorgerufen. Diese Vermutungen stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass die ATPase Hexokinase zwar zu einer Reduktion des *Sheddings* von

E-Cadherin und verminderter Phosphorylierung von ERK1/2 führte, aber diese Reduktionen nicht besonders stark ausgeprägt waren. Vor kurzem konnte eine Interaktion von Melittin mit Membranproteinen wie dem Dopamintransporter an der Zelloberfläche gezeigt werden (Keith *et al.* 2011). Des Weiteren konnten auch direkte Interaktionen von Melittin mit den Ionenpumpen H^+/K^+ -ATPase (Cuppoletti *et al.* 1989, Cuppoletti 1990, Cuppoletti and Malinowska 1992), Ca^{2+} -ATPase (Mahaney and Thomas 1991, Voss *et al.* 1991) und Na^+/K^+ -ATPase (Cuppoletti and Abbott 1990) beobachtet werden. Diese Ergebnisse führten zu der Erwägung, dass Melittin auch direkt an den P2X7-Rezeptor binden und so eine Aktivierung des Rezeptors induzieren könnte. Eine solche direkte Interaktion mit dem P2X7-Rezeptor wurde ebenfalls für das antimikrobielle Peptid LL-37 vorgeschlagen (Elssner *et al.* 2004). LL37 kann über eine Aktivierung des P2X7-Rezeptors die Proliferationsrate von Fibroblasten steigern (Tomasinsig *et al.* 2008). LL-37 führt auch, ähnlich wie Melittin, zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors (Tokumaru *et al.* 2005, Tomasinsig *et al.* 2008). Es gibt auch Hinweise, dass LL-37 in LPS-geprimten Monozyten durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur Freisetzung von IL-1 β führt (Elssner *et al.* 2004). Ebenso scheint der Rezeptor auch mitogene Effekte des Peptids auf Epithelzellen zu vermitteln. Diese Beobachtungen können mit Studien in Einklang gebracht werden, bei denen gezeigt wurde, dass ATP die Zellproliferation stimuliert (Dixon *et al.* 1999, Greig *et al.* 2003). Diese Stimulation der Zellproliferation beruht vermutlich auf der Aktivierung der ADAMs.

In Abbildung 5.1 ist eine schematische Skizze Melittin-induzierter Effekte dargestellt.

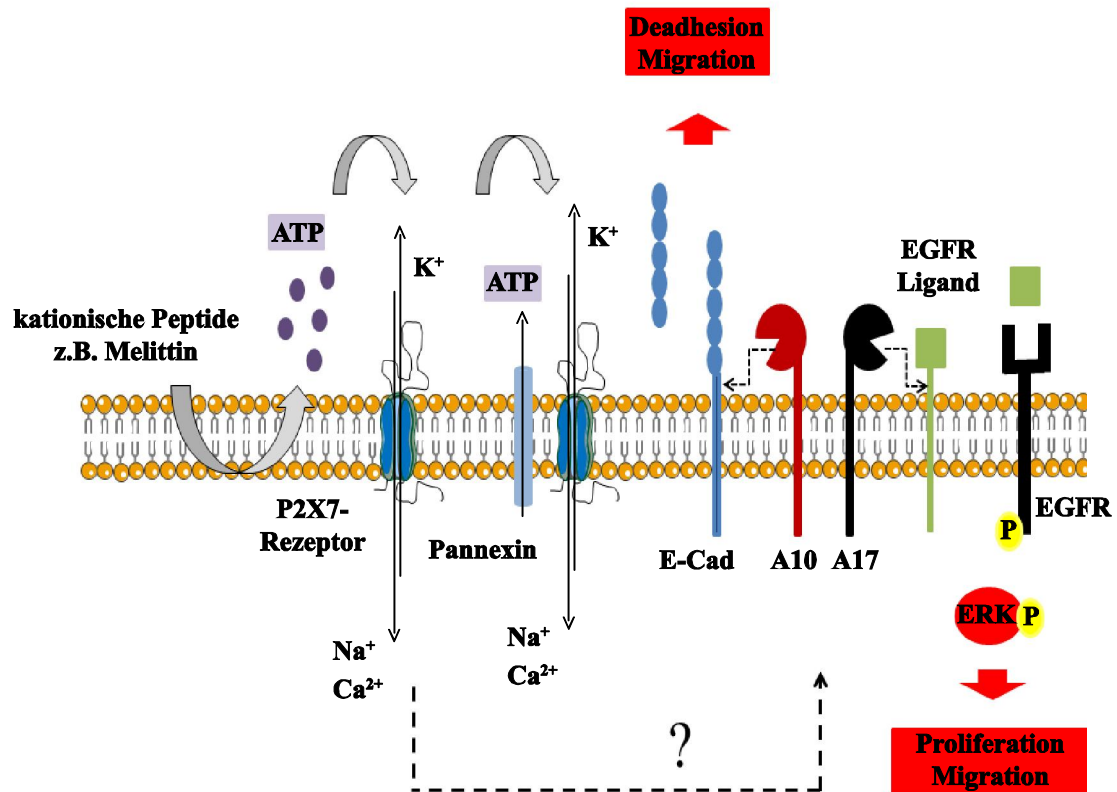


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung Melittin-induzierter Effekte

Durch Interaktionen von Melittin mit der Zellmembran kommt es zur Freisetzung von ATP, die zu einer Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt woraufhin die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 gesteigert wird. Durch ein vermehrtes *Shedding* von E-Cadherin kommt es zur Deadhesion und Migration der Zellen. Die Spaltung von EGF-Rezeptor-Liganden führt zur Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und der Kinase ERK1/2 mit der Folge der Zellproliferation.

5.5 Das Kaninchenerythrozyten-Modell

Aufgrund der in kernhaltigen Zellen vorkommenden Komplexität von Signaltransduktionskaskaden und deren vielfältigen Interaktionen untereinander sind Untersuchungen und Aussagen über Aktivierungsmechanismen von Rezeptoren und Enzymen schwierig. Ein einfacheres Modell zur Untersuchung der Spaltung membranverankerter Substrate durch die jeweiligen Enzyme in der Zellmembran stellen die kernlosen Erythrozyten dar. Der Vorteil der Erythrozyten ist, dass sie keine vesikulär gespeicherten Enzyme haben und Signaltransduktionswege fehlen, die über Phosphorylierungsvorgänge die Aktivität der Enzyme auf sekundäre Weise beeinflussen könnten. Da Kaninchenerythrozyten auf ihrer Zellmembran ADAM10 exprimieren (Wilke and Bubeck-Wardenburg 2010), wurde von Reiss *et al.* 2011 ein Modell zur Untersuchung der Enzymregulation von ADAM10 entwickelt (Reiss *et al.* 2011). Als Substrat zur Spaltung durch ADAM10 wurden die Erythrozyten mit dem porenbildenden Toxin pVCC beladen, durch dessen Spaltung in die aktive VCC-Form eine Hämolyse der Erythrozyten ausgelöst wird. Im Folgenden sind die Vorteile dieses Kaninchenerythrozyten-Modells noch einmal zusammengefasst: Erstens können die durch ADAM-Aktivierung ausgelösten klassischen Signalwege ausgeschlossen werden. Zweitens ist die Untersuchung der ADAM-Aktivität ausschließlich auf die Zelloberfläche begrenzt. Drittens ist die Aktivität von ADAM10 unabhängig von der Zellviabilität, da die Spaltung von pVCC auch an Membranen bereits lysierter Zellen bestimmt werden kann. Viertens liefert dieses Modell durch die Messung der Hämolyse der Erythrozyten und dem Nachweis der Spaltung von pVCC im Western Blot gleich zwei klare *readouts*.

5.5.1 Melittin und bz-ATP induzieren Spaltung von pVCC

Zunächst musste geklärt werden, ob Melittin auch in Kaninchenerythrozyten zu einer gesteigerten Aktivität von ADAM10 führt. In der Tat konnte eine vermehrte Lyse der Toxin-beladenen Zellen durch Melittin beobachtet werden, die durch den ADAM-Inhibitor Marimastat gehemmt wurde. Eine vollständige Inhibition der Hämolyse durch Marimastat konnte nicht erreicht werden, da Melittin selbst an die Membran der Erythrozyten bindet und zu einem Austritt von Hämoglobin führt (Raghuraman and Chattopadhyay 2007). Anhand des Western Blots war zu erkennen, dass Marimastat eine

komplette Inhibition der durch Melittin induzierten Spaltung von pVCC in VCC bewirkte. In kernhaltigen Zellen wurde eine gesteigerte ADAM-Aktivität durch eine Melittin-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors beobachtet. Der P2X7-Rezeptor kommt in einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen vor (Di Virgilio *et al.* 2001) und konnte auch auf humanen Erythrozyten nachgewiesen werden (Sluyter *et al.* 2004). Somit wurde eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors auch bei den Kaninchenerythrozyten untersucht. Die Inhibition des Rezeptors mit PPADS zeigte sowohl eine durch Melittin verminderte Hämolyse der Erythrozyten als auch eine vollständige Inhibition der Spaltung von pVCC.

Zur weiteren Bestätigung, dass der P2X7-Rezeptor an einer gesteigerten Aktivität von ADAM10 beteiligt war, wurden die Erythrozyten mit bz-ATP, einem selektiven P2X7-Rezeptor Agonisten, inkubiert und die ADAM10-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine durch bz-ATP gesteigerte Hämolyse der Erythrozyten und Spaltung von pVCC, welche in Gegenwart von PPADS vollständig gehemmt wurde.

5.5.2 PS-Flip als gemeinsames Merkmal einer gesteigerten ADAM-Aktivität

Aufgrund der in Erythrozyten fehlenden Signaltransduktionswegen kann die erhöhte Aktivität von ADAM10 in Erythrozyten nicht durch Signalkaskaden des P2X7-Rezeptors ausgelöst werden. Im Erythrozyten-Modell können die Ursachen einer veränderten Enzymaktivität hauptsächlich auf Änderungen der Eigenschaften der Lipiddoppelschicht zurückgeführt werden. Die bisher erzielten Ergebnisse deuteten in der Tat auf eine Aktivierung von ADAM10 ausgelöst durch Änderungen in der Membran hin. In der Literatur ist berichtet worden, dass die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Membran sowohl in Thymozyten (Courageot *et al.* 2004) als auch in Erythrozyten führt (Sluyter *et al.* 2007). Im Einklang hierzu steht die Beobachtung, dass Melittin einen Phosphatidylserin-Flip in humanen Erythrozyten induziert (Pandey *et al.* 2010).

Ein schneller Transfer von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran wird bei einer Aktivierung von Blutplättchen und durch die Behandlung von Zellen mit Ca^{2+} -Ionophoren beobachtet, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt (Zwaal and Schroit 1997). Durch diesen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration werden die Scramblase

aktiviert und die Flippase inhibiert (Bratton *et al.* 1997, Zwaal and Schroit 1997). Des Weiteren werden Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle geöffnet, wodurch die Translokation von PS verstärkt wird (Lang *et al.* 2003a). Mit Hilfe von Ca^{2+} -Ionophoren konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Einstrom bei Erythrozyten zu einer Translokation von PS führt (Bratosin *et al.* 2001, Lang *et al.* 2003a). Hypertonischer Schock und oxidativer Stress induzieren ebenfalls einen PS-Flip in Erythrozyten, da beide Stressfaktoren zu einer Öffnung von Ca^{2+} -permeablen Kanälen in der Membran führen (Lang *et al.* 2003a).

Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ATP-gesteuerte Kationenkanäle, die unselektiv zu einem Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} sowie einem Ausstrom von K^+ führen (North 2002). Die Beteiligung des P2X7-Rezeptors an der Apoptose hämatopoetischer Zellen wurde bereits nachgewiesen (Di Virgilio *et al.* 2001). Die Translokation von Phosphatidylserin, hervorgerufen durch P2X7-Rezeptor-Aktivierung kann zur Phagozytose von Erythrozyten durch Makrophagen führen. Dieser Mechanismus wurde auch bei Erythrozyten, die oxidativem Stress ausgesetzt oder mit einem Ca^{2+} -Ionophor behandelt wurden, beobachtet (Bratosin *et al.* 2001, Mandal *et al.* 2002).

Courageot *et al.* 2004 konnten zeigen, dass in Thymozyten der durch P2X7-Rezeptor ausgelöste PS-Flip nicht nur durch den Einstrom von Ca^{2+} hervorgerufen wird, sondern dass der Einstrom von Na^+ ebenso an der Translokation von PS beteiligt ist. Überraschenderweise induzierte Na^+ in physiologischen Konzentrationen wirksamer den PS-Flip als Ca^{2+} (Courageot *et al.* 2004). Diese Beobachtungen wurden von Sluyter *et al.* bestätigt, die eine Exposition von Phosphatidylserin durch eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des P2X7-Rezeptors in Erythrozyten nachweisen konnten (Sluyter *et al.* 2004, Sluyter *et al.* 2007). Möglicherweise werden die Funktionen der Scramblase und der Flippase durch Na^+ genauso beeinflusst wie durch Ca^{2+} (Bratton *et al.* 1997, Zwaal and Schroit 1997). Die Flippase transportiert Phosphatidylserin nur gegen den Konzentrationsgradienten von der Außen-zur Innenseite der Membran. Eine Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration trägt zur Inhibition der Flippase bei (Beleznay *et al.* 1993). Die intrazelluläre Abnahme von ATP resultiert auch aus dem ATP-Verbrauch der Na^+/K^+ -ATPase und der Ca^{2+} -ATPase, die dem vermehrten Ioneneinstrom entgegenwirken.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass ein durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors hervorgerufener PS-Flip auch in Kaninchenerythrozyten stattfindet. Dieser ist ebenfalls

Ca^{2+} -unabhängig und kann durch PPADS sowie dem selektiven P2X7-Rezeptor-Inhibitor oATP gehemmt werden.

Basierend auf den Ergebnissen, dass P2X7-Rezeptor-Aktivierung zu einer gesteigerten ADAM-Aktivität (Gu *et al.* 1998) und zu einer Translokation von PS führt (Sluyter *et al.* 2007), lag die Vermutung nahe, dass der PS-Flip mit einer gesteigerten Aktivität von ADAM in einem kausalen Zusammenhang steht. Daher wurden Versuche durchgeführt, bei denen zuerst ein PS-Flip induziert und anschließend die ADAM10-Aktivität untersucht wurde. In der Tat wurde beobachtet, dass in den Erythrozyten, in denen ein PS-Flip stattgefunden hatte, eine vermehrte Hämolyse der Erythrozyten und Spaltung von pVCC zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war bei Inhibition der Translokation von PS keine gesteigerte Aktivität von ADAM10 nachweisbar. Versuche, bei denen zuerst der PS-Flip induziert und nachträglich der P2X7-Rezeptor durch PPADS inhibiert wurde, zeigten keinen Einfluss auf die ADAM10-Aktivität.

Aufgrund der Tatsache, dass mit Hilfe von Ca^{2+} -Ionophoren eine Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite induziert werden kann (Zwaal and Schroit 1997), eröffnete sich die Möglichkeit, in einem zweiten Modell die Hypothese der gesteigerten ADAM-Aktivität durch PS zu prüfen. Zunächst wurde nachgewiesen, dass das Ionophor A23187 in Kaninchenerythrozyten einen PS-Flip induziert und ADAM10 vermehrt aktiviert wird. Diese Ergebnisse wurden in Anwesenheit von Bapta-AM und KCl unterdrückt. Anhand dieser Befunde wurde der PS-Flip durch A23187 erst induziert und im Anschluss die Aktivität von ADAM10 untersucht. Auch hier zeigten die Ergebnisse eine gesteigerte ADAM10-Aktivität in den Proben mit zuvor induzierter Translokation von PS. In Gegenwart von Bapta-AM und KCl blieb sowohl der PS-Flip als auch die vermehrte Aktivität von ADAM10 aus. Wurde Bapta-AM und KCl nach Exposition von PS hinzugefügt, zeigte dies keine Auswirkungen auf die vermehrte ADAM10-Aktivität.

Abbildung 5.2 zeigt eine schematische Darstellung der erhaltenen Ergebnisse.

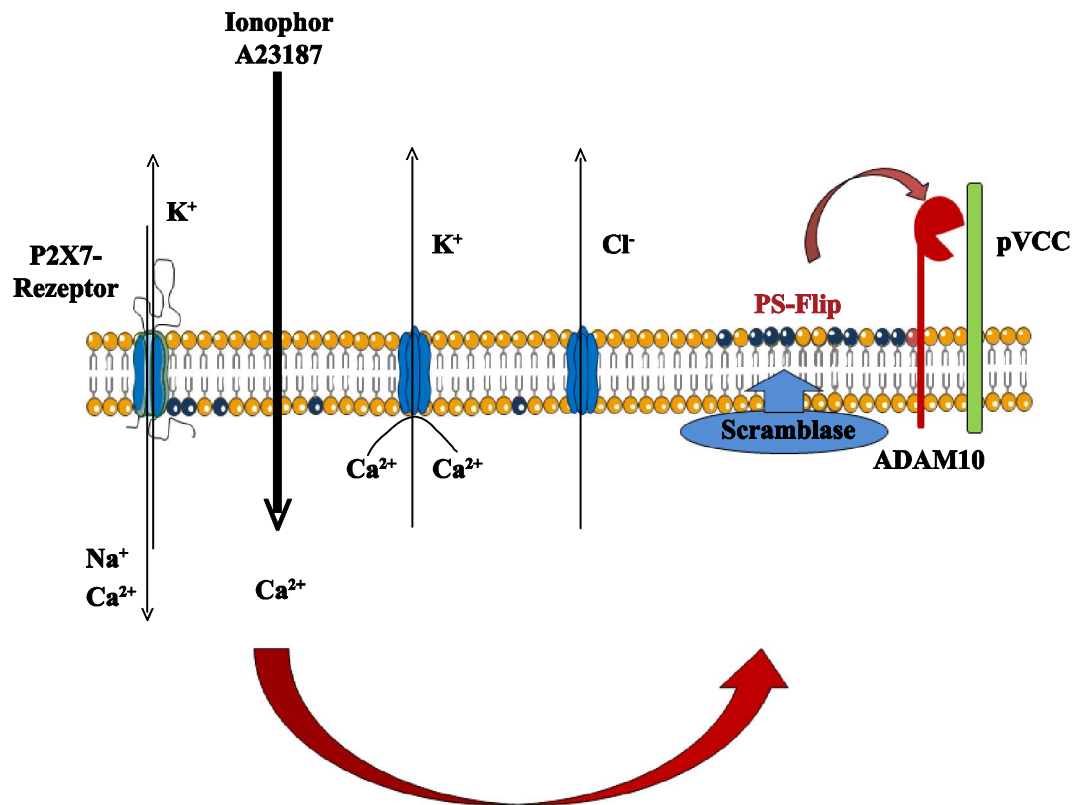


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der ADAM-Aktivierung

Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ sowie zu einem Ausstrom von K^+ . Durch das Ionophor A23187 wird ebenfalls ein Ca^{2+} -Einstrom in das Zellinnere induziert. Durch den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration wird die Scramblase aktiviert und es kommt zu einer Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Membran. Dieser PS-Flip führt zu einer gesteigerten Aktivität von ADAM10.

Mit Hilfe des Kaninchenerythrozyten-Modells war es somit möglich nachzuweisen, dass eine Translokation von Phosphatidylserin unmittelbar mit einer erhöhten ADAM-Aktivität korreliert.

6 Zusammenfassung

Melittin, Hauptbestandteil des Bienengifts, ist ein kationisches Peptid, welches in der Lage ist, die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran zu beeinflussen. Melittin werden unter anderem auch entzündungshemmende, schmerzlindernde, anti-rheumatische und anti-arthritische Wirkungen zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Melittin die Proteolyse von ADAM10- und ADAM17-Substraten in verschiedenen Zellen stimuliert. Durch das *Shedding* von TGF- α wurde in HaCaT-Keratinocyten eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors und eine daraus resultierende Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 beobachtet. Die durch Melittin gesteigerte Aktivität der ADAMs ist calciumunabhängig und wird nicht durch Änderungen in der Membranfluidität verursacht. Eine Beteiligung der P2-Rezeptoren an der Melittin-induzierten ADAM-Aktivierung konnte sowohl durch Inhibition der Rezeptoren als auch durch Transfektion von HEK-Zellen mit dem P2X7-Rezeptor nachgewiesen werden. In diesen wurde nach der Behandlung mit Melittin eine Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet, welche durch ATPasen und P2-Rezeptor-Inhibitoren unterdrückt werden konnte.

Mit Hilfe des Kaninchenerythrozyten-Modells wurde nachgewiesen, dass eine Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite der Membran unmittelbar mit einer erhöhten ADAM-Aktivität korreliert. Sowohl durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors als auch durch die Behandlung der Zellen mit dem Ionophor A23187 konnte ein Phosphatidylserin-Flip induziert werden. Dieser Flip führte zu einer erhöhten Aktivität von ADAM10, die durch eine gesteigerte Hämolyse und Spaltung von pVCC nachgewiesen werden konnte. Wurde der Phosphatidylserin-Flip durch Inhibitoren des P2X7-Rezeptors bzw. die Chelation von Ca^{2+} und Hemmung der Ionenfluxe unterdrückt, blieb auch die erhöhte ADAM-Aktivität aus. Wurde dagegen der Phosphatidylserin-Flip erst induziert und nachträglich die Inhibition des P2X7-Rezeptors bzw. die Chelation von Ca^{2+} und Hemmung der Ionenfluxe durchgeführt, zeigte dies keine Inhibition der ADAM-Aktivität.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran in einem kausalen Zusammenhang mit einer gesteigerten ADAM-Aktivität steht.

7 Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1994. Purinoceptors: Are there families of p2x and p2y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64 (3), 445-75.
- Allen, T.M., Williamson, P., Schlegel, R.A., 1988. Phosphatidylserine as a determinant of reticuloendothelial recognition of liposome models of the erythrocyte surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (21), 8067-71.
- Allende, D., Simon, S.A., McIntosh, T.J., 2005. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: Evidence for toroidal pores. *Biophys J* 88 (3), 1828-37.
- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2003. Adams family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74 (3), 342-52.
- Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S., Mullberg, J., 2000. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 267 (9), 2624-31.
- Anderson, D., Terwilliger, T.C., Wickner, W., Eisenberg, D., 1980. Melittin forms crystals which are suitable for high resolution x-ray structural analysis and which reveal a molecular 2-fold axis of symmetry. *J Biol Chem* 255 (6), 2578-82.
- Andrick, C., Broring, K., Deuticke, B., Haest, C.W., 1991. Fast translocation of phosphatidylcholine to the outer membrane leaflet after its synthesis at the inner membrane surface in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1064 (2), 235-41.
- Barrera, N.P., Ormond, S.J., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., Edwardson, J.M., 2005. Atomic force microscopy imaging demonstrates that p2x2 receptors are trimers but that p2x6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280 (11), 10759-65.
- Bazley, L.A., Gullick, W.J., 2005. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12 Suppl 1, S17-27.
- Bechinger, B., Lohner, K., 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758 (9), 1529-39.
- Beleznay, Z., Zachowski, A., Devaux, P.F., Navazo, M.P., Ott, P., 1993. Atp-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: Stoichiometry of transport. *Biochemistry* 32 (12), 3146-52.
- Beschiaschvili, G., Seelig, J., 1990. Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* 29 (1), 52-8.

- Bitbol, M., Devaux, P.F., 1988. Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (18), 6783-7.
- 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., Cerretti, D.P., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385 (6618), 729-33.
- Blobel, C.P., 2005. Adams: Key components in egfr signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (1), 32-43.
- Blobel, C.P., Carpenter, G., Freeman, M., 2009. The role of protease activity in erbb biology. *Exp Cell Res* 315 (4), 671-82.
- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M., 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356 (6366), 248-52.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X., Stockler, W., 1993. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (hexhxxgxxh and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331 (1-2), 134-40.
- Bonomini, M., Sirolli, V., Reale, M., Arduini, A., 2001. Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. *Am J Kidney Dis* 37 (4), 807-14.
- Borenstain-Ben Yashar, V., Barenholz, Y., Hy-Am, E., Rachmilewitz, E.A., Eldor, A., 1993. Phosphatidylserine in the outer leaflet of red blood cells from beta-thalassemia patients may explain the chronic hypercoagulable state and thrombotic episodes. *Am J Hematol* 44 (1), 63-5.
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J.P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.J., Montreuil, J., Ameisen, J.C., 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: A model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8 (12), 1143-56.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., Henson, P.M., 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272 (42), 26159-65.
- Burnstock, G., 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64 (12), 1471-83.
- Burnstock, G., Kennedy, C., 1985. Is there a basis for distinguishing two types of p2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16 (5), 433-40.

- Camden, J.M., Schrader, A.M., Camden, R.E., Gonzalez, F.A., Erb, L., Seye, C.I., Weisman, G.A., 2005. P2y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 280 (19), 18696-702.
- Chan, D.I., Prenner, E.J., Vogel, H.J., 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1758 (9), 1184-202.
- Chantry, A., Gregson, N.A., Glynn, P., 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 264 (36), 21603-7.
- Chiu, D., Lubin, B., Shohet, S.B., 1979. Erythrocyte membrane lipid reorganization during the sickling process. *Br J Haematol* 41 (2), 223-34.
- Cho, H.J., Jeong, Y.J., Park, K.K., Park, Y.Y., Chung, I.K., Lee, K.G., Yeo, J.H., Han, S.M., Bae, Y.S., Chang, Y.C., 2010. Bee venom suppresses pma-mediated mmp-9 gene activation via jnk/p38 and nf-kappab-dependent mechanisms. *J Ethnopharmacol* 127 (3), 662-8.
- Chonn, A., Cullis, P.R., Devine, D.V., 1991. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 146 (12), 4234-41.
- Clague, M.J., Cherry, R.J., 1988. Comparison of p25 presequence peptide and melittin. Red blood cell haemolysis and band 3 aggregation. *Biochem J* 252 (3), 791-4.
- Connor, J., Pak, C.C., Schroit, A.J., 1994. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem* 269 (4), 2399-404.
- Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F., Schroit, A.J., 1992. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an atp-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem* 267 (27), 19412-7.
- Courageot, M.P., Lepine, S., Hours, M., Giraud, F., Sulpice, J.C., 2004. Involvement of sodium in early phosphatidylserine exposure and phospholipid scrambling induced by p2x7 purinoceptor activation in thymocytes. *J Biol Chem* 279 (21), 21815-23.
- Cuppoletti, J., 1990. [125i]azidosalicylyl melittin binding domains: Evidence for a polypeptide receptor on the gastric (h⁺ + k⁺)atpase. *Arch Biochem Biophys* 278 (2), 409-15.
- Cuppoletti, J., Abbott, A.J., 1990. Interaction of melittin with the (na⁺ + k⁺)atpase: Evidence for a melittin-induced conformational change. *Arch Biochem Biophys* 283 (2), 249-57.

- Cuppoletti, J., Blumenthal, K.M., Malinowska, D.H., 1989. Melittin inhibition of the gastric ($\text{h}^+ + \text{k}^+$) atpase and photoaffinity labeling with $[^{125}\text{i}]$ azidosalicylyl melittin. *Arch Biochem Biophys* 275 (1), 263-70.
- Cuppoletti, J., Malinowska, D.H., 1992. Interaction of polypeptides with the gastric ($\text{h}^+ + \text{k}^+$)atpase: Melittin, synthetic analogs, and a potential intracellular regulatory protein. *Mol Cell Biochem* 114 (1-2), 57-63.
- Dathe, M., Wieprecht, T., 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462 (1-2), 71-87.
- Dawson, C.R., Drake, A.F., Helliwell, J., Hider, R.C., 1978. The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 510 (1), 75-86.
- De Jong, K., Rettig, M.P., Low, P.S., Kuypers, F.A., 2002. Protein kinase c activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry* 41 (41), 12562-7.
- Degrado, W.F., Musso, G.F., Lieber, M., Kaiser, E.T., Kezdy, F.J., 1982. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophys J* 37 (1), 329-38.
- Dempsey, C.E., 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1031 (2), 143-61.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O.R., 2001. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97 (3), 587-600.
- Diaz-Rodriguez, E., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., Pandiella, A., 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: A potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13 (6), 2031-44.
- Dixon, C.J., Bowler, W.B., Littlewood-Evans, A., Dillon, J.P., Bilbe, G., Sharpe, G.R., Gallagher, J.A., 1999. Regulation of epidermal homeostasis through p2y2 receptors. *Br J Pharmacol* 127 (7), 1680-6.
- Doedens, J.R., Mahimkar, R.M., Black, R.A., 2003. Tace/adam-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (2), 331-8.
- Duclohier, H., 2010. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics. *Curr Pharm Des* 16 (28), 3212-23.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., Pennington, C.J., 2008. The adam metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29 (5), 258-89.

- Elliott, J.I., Surprenant, A., Marelli-Berg, F.M., Cooper, J.C., Cassady-Cain, R.L., Wooding, C., Linton, K., Alexander, D.R., Higgins, C.F., 2005. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* 7 (8), 808-16.
- Elssner, A., Duncan, M., Gavrilin, M., Wewers, M.D., 2004. A novel p2x7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide ll37, induces il-1 beta processing and release. *J Immunol* 172 (8), 4987-94.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., Postina, R., 2003. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* 270 (11), 2386-93.
- Evans, J.P., 1999. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci* 4, D114-31.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., Henson, P.M., 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405 (6782), 85-90.
- Fan, H., Derynck, R., 1999. Ectodomain shedding of tgf-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and map kinase signaling cascades. *EMBO J* 18 (24), 6962-72.
- Fan, H., Turck, C.W., Derynck, R., 2003. Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem* 278 (20), 18617-27.
- Frago, L.M., Leon, Y., De La Rosa, E.J., Gomez-Munoz, A., Varela-Nieto, I., 1998. Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci* 111 (Pt 5), 549-56.
- Gavert, N., Sheffer, M., Raveh, S., Spaderna, S., Shtutman, M., Brabletz, T., Barany, F., Paty, P., Notterman, D., Domany, E., Ben-Ze'ev, A., 2007. Expression of l1-cam and adam10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* 67 (16), 7703-12.
- Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E., Klagsbrun, M., 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem* 274 (40), 28828-35.
- Giovambattista, N., Lopez, C.F., Rossky, P.J., Debenedetti, P.G., 2008. Hydrophobicity of protein surfaces: Separating geometry from chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (7), 2274-9.

- Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., Chan, C., 1998. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3209-20.
- Gooz, M., 2010. Adam-17: The enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45 (2), 146-69.
- Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T.F., Holt, J.C., Cook, J.J., Niewiarowski, S., 1990. Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 195 (2), 168-71.
- Greig, A.V., Linge, C., Terenghi, G., Mcgrouter, D.A., Burnstock, G., 2003. Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120 (6), 1007-15.
- Gu, B., Bendall, L.J., Wiley, J.S., 1998. Adenosine triphosphate-induced shedding of cd23 and l-selectin (cd62l) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92 (3), 946-51.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O.S., Murrell-Lagnado, R.D., 2007. Evidence for functional p2x₄/p2x₇ heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72 (6), 1447-56.
- Habermann, E., 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177 (4046), 314-22.
- Hansen, M.A., Barden, J.A., Balcar, V.J., Keay, K.A., Bennett, M.R., 1997. Structural motif and characteristics of the extracellular domain of p2x receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 236 (3), 670-5.
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., Von Figura, K., Saftig, P., 2002. The disintegrin/metalloprotease adam 10 is essential for notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11 (21), 2615-24.
- Hoffman, D.R., Shipman, W.H., 1976. Allergens in bee venom. I. Separation and identification of the major allergens. *J Allergy Clin Immunol* 58 (5), 551-62.
- Honda, T., Finkelstein, R.A., 1979. Purification and characterization of a hemolysin produced by vibrio cholerae biotype el tor: Another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect Immun* 26 (3), 1020-7.
- Hooper, N.M., 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* 354 (1), 1-6.
- Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C.P., 2007. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol Biol Cell* 18 (1), 176-88.

- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., Glynn, P., 1996. Molecular cloning of madm: A catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317 (Pt 1), 45-50.
- Huang, X., Huang, P., Robinson, M.K., Stern, M.J., Jin, Y., 2003. Unc-71, a disintegrin and metalloprotease (adam) protein, regulates motor axon guidance and sex myoblast migration in *c. Elegans*. *Development* 130 (14), 3147-61.
- Ikigai, H., Akatsuka, A., Tsujiyama, H., Nakae, T., Shimamura, T., 1996. Mechanism of membrane damage by el tor hemolysin of *vibrio cholerae* o1. *Infect Immun* 64 (8), 2968-73.
- Jamieson, G.P., Snook, M.B., Thurlow, P.J., Wiley, J.S., 1996. Extracellular atp causes of loss of l-selectin from human lymphocytes via occupancy of p2z purinoceptors. *J Cell Physiol* 166 (3), 637-42.
- Kalafatis, M., Swords, N.A., Rand, M.D., Mann, K.G., 1994. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: Role of the vitamin k-dependent enzyme complexes. *Biochim Biophys Acta* 1227 (3), 113-29.
- Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M., Huovila, A.P., 2000. Metalloprotease-disintegrin (adam) genes are widely and differentially expressed in the adult cns. *Mol Cell Neurosci* 15 (6), 547-60.
- Katsu, T., Ninomiya, C., Kuroko, M., Kobayashi, H., Hirota, T., Fujita, Y., 1988. Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin s and melittin on erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 939 (1), 57-63.
- Keith, D.J., Eshleman, A.J., Janowsky, A., 2011. Melittin stimulates fatty acid release through non-phospholipase-mediated mechanisms and interacts with the dopamine transporter and other membrane-spanning proteins. *Eur J Pharmacol* 650 (2-3), 501-10.
- Killock, D.J., Ivetic, A., 2010. The cytoplasmic domains of tnfa-converting enzyme (tace/adam17) and l-selectin are regulated differently by p38 mapk and pkc to promote ectodomain shedding. *Biochem J* 428 (2), 293-304.
- Ko, S.Y., Lin, S.C., Wong, Y.K., Liu, C.J., Chang, K.W., Liu, T.Y., 2007. Increase of disintegrin metalloprotease 10 (adam10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 245 (1-2), 33-43.
- Koivisto, L., Jiang, G., Hakkinen, L., Chan, B., Larjava, H., 2006. Haca keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha. *Exp Cell Res* 312 (15), 2791-805.
- Kolesnick, R., Fuks, Z., 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22 (37), 5897-906.
- Kuypers, F.A., 1998. Phospholipid asymmetry in health and disease. *Curr Opin Hematol* 5 (2), 122-31.

- Ladokhin, A.S., Selsted, M.E., White, S.H., 1997. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: Pore formation by melittin. *Biophys J* 72 (4), 1762-6.
- Ladokhin, A.S., White, S.H., 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim Biophys Acta* 1514 (2), 253-60.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F., 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (7), 3922-7.
- Lang, K.S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., Wieder, T., Huber, S.M., 2003a. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 10 (2), 249-56.
- Lang, K.S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P.A., Berchtold, S., Huber, S.M., Lang, F., Wieder, T., 2004. Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 11 (2), 231-43.
- Lang, P.A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., Huber, S.M., 2003b. Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285 (6), C1553-60.
- Laohachai, K.N., Bahadi, R., Hardo, M.B., Hardo, P.G., Kourie, J.I., 2003. The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: Implications for diarrhea. *Toxicon* 42 (7), 687-707.
- Le Gall, S.M., Bobe, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.D., Lundell, D., Gibb, D.R., Conrad, D., Saftig, P., 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 alpha, l-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20 (6), 1785-94.
- Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D., Niu, X.D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., Blobel, C.P., 2010. Adam17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci* 123 (Pt 22), 3913-22.
- Lee, C.C., Sun, Y., Qian, S., Huang, H.W., 2011. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide ll-37. *Biophys J* 100 (7), 1688-96.
- Lieber, T., Kidd, S., Young, M.W., 2002. Kuzbanian-mediated cleavage of drosophila notch. *Genes Dev* 16 (2), 209-21.
- Liu, S., Yu, M., He, Y., Xiao, L., Wang, F., Song, C., Sun, S., Ling, C., Xu, Z., 2008. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the rac1-dependent pathway. *Hepatology* 47 (6), 1964-73.

- Lorenzen, I., Trad, A., Grotzinger, J., 2011. Multimerisation of a disintegrin and metalloprotease protein-17 (adam17) is mediated by its egf-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* 415 (2), 330-6.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., Becherer, J.D., 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 (2), 161-71.
- Mackler, B.F., Kreil, G., 1977. Honey bee venom melittin: Correlation of nonspecific inflammatory activities with amino acid sequences. *Inflammation* 2 (1), 55-65.
- Mahaney, J.E., Thomas, D.D., 1991. Effects of melittin on molecular dynamics and ca-atpase activity in sarcoplasmic reticulum membranes: Electron paramagnetic resonance. *Biochemistry* 30 (29), 7171-80.
- Maher, S., Feighery, L., Brayden, D.J., Mcclean, S., 2007. Melittin as an epithelial permeability enhancer i: Investigation of its mechanism of action in caco-2 monolayers. *Pharm Res* 24 (7), 1336-45.
- Maher, S., Mcclean, S., 2008. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. *Biochem Pharmacol* 75 (5), 1104-14.
- Mandal, D., Moitra, P.K., Saha, S., Basu, J., 2002. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 513 (2-3), 184-8.
- Mann, K.G., Nesheim, M.E., Church, W.R., Haley, P., Krishnaswamy, S., 1990. Surface-dependent reactions of the vitamin k-dependent enzyme complexes. *Blood* 76 (1), 1-16.
- Maretzky, T., Evers, A., Zhou, W., Swendeman, S.L., Wong, P.M., Rafii, S., Reiss, K., Blobel, C.P., 2011. Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on egfr transactivation by adam17. *Nat Commun* 2, 229.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., De Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P., 2005. Adam10 mediates e-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (26), 9182-7.
- Maretzky, T., Scholz, F., Koten, B., Proksch, E., Saftig, P., Reiss, K., 2008. Adam10-mediated e-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol* 128 (7), 1737-46.
- Matthews, V., Schuster, B., Schutze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.J., Rose-John, S., 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by adam10 and adam17 (tace). *J Biol Chem* 278 (40), 38829-39.

- Mcculloch, D.R., Akl, P., Samaratunga, H., Herington, A.C., Odorico, D.M., 2004. Expression of the disintegrin metalloprotease, adam-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor i, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model lncap. *Clin Cancer Res* 10 (1 Pt 1), 314-23.
- Mclane, M.A., Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., Wierzbicka-Patynowski, I., Niewiarowski, S., 1998. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc Soc Exp Biol Med* 219 (2), 109-19.
- Mollay, C., Kreil, G., 1974. Enhancement of bee venom phospholipase a2 activity by melittin, direct lytic factor from cobra venom and polymyxin b. *FEBS Lett* 46 (1), 141-4.
- Monette, M., Lafleur, M., 1995. Modulation of melittin-induced lysis by surface charge density of membranes. *Biophys J* 68 (1), 187-95.
- Moon, D.O., Park, S.Y., Heo, M.S., Kim, K.C., Park, C., Ko, W.S., Choi, Y.H., Kim, G.Y., 2006a. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are bcl-2 and caspase-3 in human leukemic u937 cells through downregulation of erk and akt. *Int Immunopharmacol* 6 (12), 1796-807.
- Moon, H., Na, H.Y., Chong, K.H., Kim, T.J., 2006b. P2x7 receptor-dependent atp-induced shedding of cd27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett* 102 (1), 98-105.
- Morrot, G., Herve, P., Zachowski, A., Fellmann, P., Devaux, P.F., 1989. Aminophospholipid translocase of human erythrocytes: Phospholipid substrate specificity and effect of cholesterol. *Biochemistry* 28 (8), 3456-62.
- Murphy, G., 2009. Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'shedases'. *Semin Cell Dev Biol* 20 (2), 138-45.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M., Saya, H., 2004. Cell-matrix interaction via cd44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular ca(2+) influx and pkc activation. *J Cell Biol* 165 (6), 893-902.
- Nah, S.S., Ha, E., Mun, S.H., Won, H.J., Chung, J.H., 2008. Effects of melittin on the production of matrix metalloproteinase-1 and -3 in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes. *J Pharmacol Sci* 106 (1), 162-6.
- North, R.A., 2002. Molecular physiology of p2x receptors. *Physiol Rev* 82 (4), 1013-67.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., Kitano, H., 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1, 2005 0010.
- Olson, R., Gouaux, E., 2005. Crystal structure of the vibrio cholerae cytolysin (vcc) protoxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J Mol Biol* 350 (5), 997-1016.

- Orsolic, N., 2012. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 31 (1-2), 173-94.
- Pan, D., Rubin, G.M., 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of notch and mediates lateral inhibition during drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90 (2), 271-80.
- Pandey, B.K., Ahmad, A., Asthana, N., Azmi, S., Srivastava, R.M., Srivastava, S., Verma, R., Vishwakarma, A.L., Ghosh, J.K., 2010. Cell-selective lysis by novel analogues of melittin against human red blood cells and escherichia coli. *Biochemistry* 49 (36), 7920-9.
- Park, H.J., Son, D.J., Lee, C.W., Choi, M.S., Lee, U.S., Song, H.S., Lee, J.M., Hong, J.T., 2007. Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with ikappab kinase. *Biochem Pharmacol* 73 (2), 237-47.
- Paull, B.R., Yunginger, J.W., Gleich, G.J., 1977. Melittin: An allergen of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 59 (4), 334-8.
- Pelegriin, P., Surprenant, A., 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the atp-gated p2x7 receptor. *EMBO J* 25 (21), 5071-82.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J., Black, R.A., 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282 (5392), 1281-4.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A., 1999. Egf receptor transactivation by g-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of prohb-egf. *Nature* 402 (6764), 884-8.
- Primakoff, P., Hyatt, H., Tredick-Kline, J., 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* 104 (1), 141-9.
- Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2004. Interaction of melittin with membrane cholesterol: A fluorescence approach. *Biophys J* 87 (4), 2419-32.
- Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2005. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 134 (2), 183-9.
- Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2007. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 27 (4-5), 189-223.
- Rassendren, F., Buell, G.N., Virginio, C., Collo, G., North, R.A., Surprenant, A., 1997. The permeabilizing atp receptor, p2x7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272 (9), 5482-6.

- Ratchford, A.M., Baker, O.J., Camden, J.M., Rikka, S., Petris, M.J., Seye, C.I., Erb, L., Weisman, G.A., 2010. P2y2 nucleotide receptors mediate metalloprotease-dependent phosphorylation of epidermal growth factor receptor and erbb3 in human salivary gland cells. *J Biol Chem* 285 (10), 7545-55.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* 248, 183-228.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J., Black, R.A., 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275 (19), 14608-14.
- Reed, P.W., Lardy, H.A., 1972. A23187: A divalent cation ionophore. *J Biol Chem* 247 (21), 6970-7.
- Reiss, K., Bhakdi, S., 2012. Pore-forming bacterial toxins and antimicrobial peptides as modulators of adam function. *Med Microbiol Immunol* 201 (4), 419-26.
- Reiss, K., Cornelsen, I., Husmann, M., Gimpl, G., Bhakdi, S., 2011. Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (adam)-dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity. *J Biol Chem* 286 (30), 26931-42.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., De Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P., 2005. Adam10 cleavage of n-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24 (4), 742-52.
- Rex, S., Schwarz, G., 1998. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. *Biochemistry* 37 (8), 2336-45.
- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., Blobel, C.P., 1999. Metalloprotease-disintegrin mdc9: Intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274 (6), 3531-40.
- Rose-John, S., Heinrich, P.C., 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: Generation and biological function. *Biochem J* 300 (Pt 2), 281-90.
- Rothman, J.E., Lenard, J., 1977. Membrane asymmetry. *Science* 195 (4280), 743-53.
- Russell, P.J., Hewish, D., Carter, T., Sterling-Levis, K., Ow, K., Hattarki, M., Doughty, L., Guthrie, R., Shapira, D., Molloy, P.L., Werkmeister, J.A., Kortt, A.A., 2004. Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: In vitro and in vivo studies. *Cancer Immunol Immunother* 53 (5), 411-21.
- Sachs, F., Brownell, W., Petrov, A., 2009. Membrane electromechanics in biology, with a focus on hearing. *MRS Bull* 34 (9), 665.

- Sansom, M.S., 1991. The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog Biophys Mol Biol* 55 (3), 139-235.
- Schachter, J.B., Sromek, S.M., Nicholas, R.A., Harden, T.K., 1997. Hek293 human embryonic kidney cells endogenously express the p2y1 and p2y2 receptors. *Neuropharmacology* 36 (9), 1181-7.
- Schlegel, R.A., Williamson, P., 2001. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 8 (6), 551-63.
- Schoch, P., Sargent, D.F., 1980. Quantitative analysis of the binding of melittin to planar lipid bilayers allowing for the discrete-charge effect. *Biochim Biophys Acta* 602 (2), 234-47.
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P., Reiss, K., 2008. Adam10 regulates endothelial permeability and t-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 102 (10), 1192-201.
- Schwiebert, E.M., Zsembery, A., 2003. Extracellular atp as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1615 (1-2), 7-32.
- Seals, D.F., Courtneidge, S.A., 2003. The adams family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17 (1), 7-30.
- Shai, Y., 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66 (4), 236-48.
- Shiratsuchi, A., Osada, S., Kanazawa, S., Nakanishi, Y., 1998. Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 246 (2), 549-55.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (4023), 720-31.
- Sluyter, R., Shemon, A.N., Barden, J.A., Wiley, J.S., 2004. Extracellular atp increases cation fluxes in human erythrocytes by activation of the p2x7 receptor. *J Biol Chem* 279 (43), 44749-55.
- Sluyter, R., Shemon, A.N., Wiley, J.S., 2007. P2x(7) receptor activation causes phosphatidylserine exposure in human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 355 (1), 169-73.
- Sluyter, R., Wiley, J.S., 2002. Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of cd23 from human dendritic cells via activation of p2x7 receptors. *Int Immunol* 14 (12), 1415-21.
- Smeets, E.F., Comfurius, P., Bevers, E.M., Zwaal, R.F., 1994. Calcium-induced transbilayer scrambling of fluorescent phospholipid analogs in platelets and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1195 (2), 281-6.

- Sobotka, A.K., Franklin, R.M., Adkinson, N.F., Jr., Valentine, M., Baer, H., Lichtenstein, L.M., 1976. Allergy to insect stings. Ii. Phospholipase a: The major allergen in honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 57 (1), 29-40.
- Soman, N.R., Baldwin, S.L., Hu, G., Marsh, J.N., Lanza, G.M., Heuser, J.E., Arbeit, J.M., Wickline, S.A., Schlesinger, P.H., 2009. Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *J Clin Invest* 119 (9), 2830-42.
- Sommer, A., Fries, A., Cornelsen, I., Speck, N., Koch-Nolte, F., Gimpl, G., Andra, J., Bhakdi, S., Reiss, K., 2012. Melittin modulates keratinocyte function through p2 receptor-dependent adam activation. *J Biol Chem* 287 (28), 23678-89.
- Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T., 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 115 (2), 246-70.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W., Murphy, G., 2005. Erk-mediated phosphorylation of thr735 in tnfa-converting enzyme and its potential role in tace protein trafficking. *J Cell Sci* 118 (Pt 11), 2371-80.
- Stocker, W., Bode, W., 1995. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: The metzincins. *Curr Opin Struct Biol* 5 (3), 383-90.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., Bode, W., 1995. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4 (5), 823-40.
- Stone, A.L., Kroeger, M., Sang, Q.X., 1999. Structure-function analysis of the adam family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem* 18 (4), 447-65.
- Tait, J.F., Gibson, D., 1994. Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin v binding. *J Lab Clin Med* 123 (5), 741-8.
- Terwilliger, T.C., Eisenberg, D., 1982a. The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J Biol Chem* 257 (11), 6010-5.
- Terwilliger, T.C., Eisenberg, D., 1982b. The structure of melittin. Ii. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* 257 (11), 6016-22.
- Terwilliger, T.C., Weissman, L., Eisenberg, D., 1982. The structure of melittin in the form i crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophys J* 37 (1), 353-61.
- Tilly, R.H., Senden, J.M., Comfurius, P., Bevers, E.M., Zwaal, R.F., 1990. Increased aminophospholipid translocase activity in human platelets during secretion. *Biochim Biophys Acta* 1029 (1), 188-90.

- Tokumaru, S., Sayama, K., Shirakata, Y., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Hanakawa, Y., Yahata, Y., Dai, X., Tohyama, M., Nagai, H., Yang, L., Higashiyama, S., Yoshimura, A., Sugai, M., Hashimoto, K., 2005. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide ll-37. *J Immunol* 175 (7), 4662-8.
- Tomasinsig, L., Pizzirani, C., Skerlavaj, B., Pellegatti, P., Gulinelli, S., Tossi, A., Di Virgilio, F., Zanetti, M., 2008. The human cathelicidin ll-37 modulates the activities of the p2x7 receptor in a structure-dependent manner. *J Biol Chem* 283 (45), 30471-81.
- Tosteson, M.T., Holmes, S.J., Razin, M., Tosteson, D.C., 1985. Melittin lysis of red cells. *J Membr Biol* 87 (1), 35-44.
- Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A., Shimohama, S., 2006. Characterization of sequential n-cadherin cleavage by adam10 and ps1. *Neurosci Lett* 402 (3), 278-83.
- Valeva, A., Walev, I., Weis, S., Boukhalouk, F., Wassenaar, T.M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S., Zitzer, A., 2004. A cellular metalloproteinase activates vibrio cholerae pro-cytolysin. *J Biol Chem* 279 (24), 25143-8.
- Van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P., 1998. Annexin v-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31 (1), 1-9.
- Vernon, L.P., Bell, J.D., 1992. Membrane structure, toxins and phospholipase a2 activity. *Pharmacol Ther* 54 (3), 269-95.
- Vogel, H., Jahnig, F., 1986. The structure of melittin in membranes. *Biophys J* 50 (4), 573-82.
- Voss, J., Birmachu, W., Hussey, D.M., Thomas, D.D., 1991. Effects of melittin on molecular dynamics and ca-atpase activity in sarcoplasmic reticulum membranes: Time-resolved optical anisotropy. *Biochemistry* 30 (30), 7498-506.
- Wang, R.H., Phillips, G., Jr., Medof, M.E., Mold, C., 1993. Activation of the alternative complement pathway by exposure of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on erythrocytes from sickle cell disease patients. *J Clin Invest* 92 (3), 1326-35.
- Wilke, G.A., Bubeck Wardenburg, J., 2010. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (30), 13473-8.
- Williamson, P., Bevers, E.M., Smeets, E.F., Comfurius, P., Schlegel, R.A., Zwaal, R.F., 1995. Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* 34 (33), 10448-55.

- Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G., White, J.M., 1995. Adam, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: Multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 131 (2), 275-8.
- Xu, P., Derynck, R., 2010. Direct activation of tace-mediated ectodomain shedding by p38 map kinase regulates egf receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 37 (4), 551-66.
- Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., Derynck, R., 2012. Tace activation by mapk-mediated regulation of cell surface dimerization and timp3 association. *Sci Signal* 5 (222), ra34.
- Yamamoto, K., Ichinose, Y., Nakasone, N., Tanabe, M., Nagahama, M., Sakurai, J., Iwanaga, M., 1986. Identity of hemolysins produced by vibrio cholerae non-o1 and v. Cholerae o1, biotype el tor. *Infect Immun* 51 (3), 927-31.
- Yamamoto, K., Wright, A.C., Kaper, J.B., Morris, J.G., Jr., 1990. The cytolysin gene of vibrio vulnificus: Sequence and relationship to the vibrio cholerae e1 tor hemolysin gene. *Infect Immun* 58 (8), 2706-9.
- Yan, Y., Shirakabe, K., Werb, Z., 2002. The metalloprotease kuzbanian (adam10) mediates the transactivation of egf receptor by g protein-coupled receptors. *J Cell Biol* 158 (2), 221-6.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W., 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81 (3), 1475-85.
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M., Xu, T., 1998. Human metalloprotease-disintegrin kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum Mol Genet* 7 (7), 1161-7.
- Zhang, Z., Cork, J., Ye, P., Lei, D., Schwarzenberger, P.O., Summer, W.R., Shellito, J.E., Nelson, S., Kolls, J.K., 2000. Inhibition of tnfr-alpha processing and tace-mediated ectodomain shedding by ethanol. *J Leukoc Biol* 67 (6), 856-62.
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J.G., Luhm, R.A., Wiedmer, T., Sims, P.J., 1997. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 272 (29), 18240-4.
- Zitzer, A., Bittman, R., Verbicky, C.A., Erukulla, R.K., Bhakdi, S., Weis, S., Valeva, A., Palmer, M., 2001. Coupling of cholesterol and cone-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxins streptolysin o and vibrio cholerae cytolysin. *J Biol Chem* 276 (18), 14628-33.
- Zitzer, A., Palmer, M., Weller, U., Wassenaar, T., Biermann, C., Tranum-Jensen, J., Bhakdi, S., 1997. Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by vibrio cholerae cytolysin (hemolysin). *Eur J Biochem* 247 (1), 209-16.

- Zitzer, A., Walev, I., Palmer, M., Bhakdi, S., 1995. Characterization of vibrio cholerae el tor cytolsin as an oligomerizing pore-forming toxin. *Med Microbiol Immunol* 184 (1), 37-44.
- Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S., Palmer, M., 1999. Oligomerization of vibrio cholerae cytolsin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J Biol Chem* 274 (3), 1375-80.
- Zwaal, R.F., Comfurius, P., Bevers, E.M., 2004. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1636 (2-3), 119-28.
- Zwaal, R.F., Schroit, A.J., 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89 (4), 1121-32.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Proteinfamilie der Zink-abhängigen Metalloproteinasen.....	1
Abbildung 1.2: Darstellung der Domänenstruktur der ADAMs im Vergleich zu SVMPS..	3
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Zinkbindungsmotivs und des Met-turns....	4
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Ektodomän- <i>Sheddings</i>	5
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der P2X- und P2Y-Rezeptoren.....	9
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des <i>fluid mosaic model</i> nach Singer und Nicolson.....	12
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Translokase, Floppase und Scramblase....	14
Abbildung 1.8: Regulation und physiologische Prozesse der Exposition von Phosphatidylserin.....	16
Abbildung 1.9: Primär- und Sekundärstruktur von Melittin.....	17
Abbildung 1.10: Kristallstruktur der Melittin-Tetramere.....	18
Abbildung 1.11: Schematische Darstellung des (A) <i>barrel-stave</i> -Modells und des (B) <i>toroidal</i> -Modells.....	19
Abbildung 1.12: Schematische Darstellung des <i>detergent-like</i> -Modells.....	20
Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Porenbildung von VCC durch ADAM10.....	24
Abbildung 3.1: Reduktion von XTT zu dem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan.....	41
Abbildung 3.2: Reaktionsschema der ATP-Messung.....	42

Abbildung 4.1: Einfluss von Melittin auf die Zellviabilität von Monozyten und Granulozyten.....	54
Abbildung 4.2: Einfluss von Melittin auf die Viabilität von MEF, HUVEC und HaCaT-Keratinocyten.....	55
Abbildung 4.3: Melittin induziertes <i>Ectodomain Shedding</i> von TNF-alpha durch ADAM17 in Monozyten.....	57
Abbildung 4.4: Einfluss von Melittin auf das <i>Shedding</i> von L-Selektin in Granulozyten.	58
Abbildung 4.5: Melittin induziertes <i>Shedding</i> von N-Cadherin durch ADAM10 in MEFs.....	59
Abbildung 4.6: Einfluss von Melittin auf das <i>Shedding</i> von VE-Cadherin in HUVECs..	60
Abbildung 4.7: Melittin induziertes <i>Shedding</i> von E-Cadherin in HaCaT-Keratinocyten.....	62
Abbildung 4.8: <i>Shedding</i> von TGF-alpha und EGFR-Aktivierung in HaCaT-Keratinocyten.....	63
Abbildung 4.9: Melittin-induzierter Calciumanstieg in HaCaT-Keratinocyten.....	64
Abbildung 4.10: Melittin-induziertes <i>Shedding</i> von E-Cadherin in Anwesenheit der Ca^{2+} -Ionenchelatoren EGTA und Bapta-AM.....	65
Abbildung 4.11: Phosphorylierung des EGFR und ERK1/2 durch Melittin in Anwesenheit von EGTA und Bapta-AM.....	66
Abbildung 4.12: Messung der Anisotropie.....	67
Abbildung 4.13: Einfluss von PPADS auf das <i>Shedding</i> von E-Cadherin und die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin.....	69
Abbildung 4.14: Einfluss von Suramin auf das <i>Sheddings</i> von E-Cadherin und der Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin.....	70
Abbildung 4.15: Einfluss der Hexokinase auf das <i>Shedding</i> von E-Cadherin und die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Melittin.....	71

Abbildung 4.16: Einfluss der Expression von P2X7-Rezeptoren auf die Phosphorylierung von ERK1/1 nach der Behandlung von Melittin.....	72
Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Porenbildung durch VCC.....	73
Abbildung 4.18: Einfluss von Melittin auf die Spaltung von pVCC zu VCC in Kaninchenerythrozyten durch ADAM10.....	75
Abbildung 4.19: Der P2X-Rezeptor-Inhibitor PPADS unterdrückt die Melittin-induzierte Prozessierung von pVCC.....	77
Abbildung 4.20: Einfluss von bz-ATP auf pVCC-Spaltung.....	78
Abbildung 4.21: Phosphatidylserin-Flip in Kaninchenerythrozyten durch bz-ATP.....	80
Abbildung 4.22: Inhibition des durch den P2X7-Rezeptor induzierten PS-Flips.....	81
Abbildung 4.23: Schema zur gesteigerten Aktivität von ADAM10 durch den aus der Aktivierung des P2X7-Rezeptors resultierenden PS-Flips.....	82
Abbildung 4.24: Induktion des PS-Flips mit bz-ATP und anschließende Spaltung von pVCC.....	83
Abbildung 4.25: Inhibition des P2X7-Rezeptors nach induziertem PS-Flip.....	85
Abbildung 4.26: Induktion des Phosphatidylserin-Flips in Kaninchenerythrozyten durch Ionophor A23187.....	87
Abbildung 4.27: Einfluss des Ionophor A23187 auf die Spaltung von pVCC in VCC.....	88
Abbildung 4.28: Schema des Versuchsaufbau mit Ionophor A23187.....	89
Abbildung 4.29: Induktion des PS-Flips mit dem Ionophor A23187 und anschließende Spaltung von pVCC.....	90
Abbildung 4.30: Einfluss von Bapta-AM und KCl während der Lyse nach induziertem PS-Flip.....	92
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung Melittin-induzierter Effekte.....	99
Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der ADAM-Aktivierung.....	104

8.2 Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
A β	<i>beta-Amyloid-Peptid</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AMP	antimikrobielles Peptid
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bapta-AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)
BSA	Bovines Serumalbumin
bz-ATP	2',3'-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP
CD23	Fc epsilon RII, Fc ϵ RII, <i>cluster of differentiation</i> 23
CD44	H-CAM, Pgp-1, <i>cluster of differentiation</i> 44
C-Terminal	Carboxyterminales Ende des Peptides
CTF	C-terminale Fragment
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	Diphenylhexatrien
E-Cadherin	epitheliales-Cadherin

EDTA	N, N, N', N'-Ethyldiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	Forward Scatter
HB-EGF	<i>Heparin-Binding - Epidermal Growth Factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IL-6	Interleukin-6
KUZ	Kuzbanian
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
LPS	Lipopolysaccharid
MADM	<i>Mammalian Disintegrin Metalloproteinase</i>
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MBP	Myelin Basic Protein
MCD-Peptid	Mastzelldegranulierendes Peptid
MEF	<i>murine embryonic fibroblast</i>
mM	Millimolar
MM	Marimastat

MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
N-Cadherin	neuronal-Cadherin
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
N-Terminal	Aminoterminal Ende des Peptides
P2-Rezeptoren	<i>purinergic</i> Rezeptoren
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A2
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMS	Phenazinmethosulfat
PPADS	<i>pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure</i>
PS	Phosphatidylserin
pVCC	pro- <i>Vibrio Cholerae</i> Cytolysin
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rotation per minutes</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
SSC	Sidewards Scatter

SVMP	<i>Snake Venome Metalloproteinase</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor Converting Enzym</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor-alpha</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteases</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tripeptid RGD	Tripeptid Arginin, Glycin, Aspartat
U	Unit
VCC	<i>vibrio cholerae</i> cytolysin
VE-Cadherin	vaskuläres endotheliales-Cadherin
WB	Western Blot
XTT	(2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium-5-carboxanilid)

8.3 Lebenslauf

9 Danksagung