

Aus dem Bereich Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**ADAM8 in der Niere - Untersuchungen zur Expression der  
Metalloproteinase Adam8 in IMCD3 Zellen und histologischen  
Mauspräparaten**

**Dissertation zum Erlangen des akademischen Grades  
Doktorin der Medizin  
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

vorgelegt von Thea Katharina Funke  
geb. am: 16.10.1998 in Bühl

Tag der Promotion: 17.07.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Yildiz

Prof. Dr. med. Danilo Fliser

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Die chronische Niereninsuffizienz</b>	<b>3</b>
2.1.1	Pathogenese der Nierenfibrose	5
<b>2.2</b>	<b>Die ADAM-Proteasen</b>	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>ADAM8</b>	<b>8</b>
2.3.1	Aufbau, Substratspektrum und Aktivierung	8
2.3.2	Bedeutung von ADAM8 in Entzündungsprozessen	9
<b>2.4</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	12
3.1.2	Geräte und Computerprogramme	13
3.1.3	Chemikalien	14
3.1.4	Antikörper und Kits	16
3.1.5	Puffer und Lösungen	17
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
3.2.1	Zellkultur und Subkultivierung	22
3.2.2	Passagieren und Aussäen der Zellen	22
3.2.3	Kryokonservierung und Auftauen	23
3.2.4	Stimulation	24
3.2.5	Zilieninduktion und Stimulation	24
3.2.6	Proteinextraktion durch Zellyse	25
3.2.7	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay	25
3.2.8	Auftrennung der Proteine durch die SDS-Page	26
3.2.9	Fluoreszenzmikroskopie – Kontrolle Zilienbildung	29
3.2.10	PrAMA – Aktivitätsmessung im Überstand	30
3.2.11	Adenin-induzierte-Nephropathie	31
3.2.12	Immunhistochemische Färbung	31
3.2.13	Darstellung der Daten und statistische Auswertung	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation der Adam8 Proteinexpression</b>	<b>36</b>

4.2	Aktivität von Adam8 im extrazellulären Raum.....	40
4.3	Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Adam8.....	41
5	Diskussion .....	45
6	Literaturverzeichnis .....	49
7	Publikationen.....	52
8	Dank.....	53
9	Lebenslauf .....	54

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Ursachen für chronische Nierenschäden .....	3
Abbildung 2	GFR-Kategorien nach der KDIGO.....	4
Abbildung 3	Domänenstruktur der ADAM-Proteasen (Giebeler, Zigrino, 2016).....	7
Abbildung 4	Domänenstruktur von ADAM8 (Romagnoli et al., 2014) .....	8
Abbildung 5	Autokatalyse und Aktivierung der ADAM8-Protease (Schlomann et al., 2015).....	8
Abbildung 6	ADAM8 im Serum nierenkranker Patienten .....	10
Abbildung 7	Versuchsablauf des Simulationsversuchs .....	24
Abbildung 8	Gefärbter und digitalisierter Schnitt .....	33
Abbildung 9	Ablauf des Messprogramms zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit AxioVision .....	34
Abbildung 10	Immunzytochemische Färbungen gegen Adam8 und Arl13b .....	36
Abbildung 11	Adam8 Expression nach Entzündungsstimulation mit TNF- $\alpha$ .....	38
Abbildung 12	Adam8 Expression nach Zilieninduktion und Entzündungsstimulation mit TNF- $\alpha$ .....	39
Abbildung 13	PrAMA-Aktivitätsmessungen von Adam8.....	40
Abbildung 14	Adam8 Expression in Mausnieren nach Adenin-induzierter Nephropathie .....	42
Abbildung 15	Spezifitätskontrolle der Adam8-Antikörper .....	43
Abbildung 16	Adam8-Expression in Mausnieren nach Adenin-induzierter Nephropathie mit optimiertem Antikörper .....	44

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 2	Verwendete Geräte.....	13
Tabelle 3	Chemikalien .....	14
Tabelle 4	Antikörper .....	16
Tabelle 5	Kits.....	16
Tabelle 6	PBS-Puffer (1x und 10x).....	17
Tabelle 7	ADAM-Lysepuffer .....	17
Tabelle 8	Verdünnungsreihe der BSA-Standardlösung.....	18
Tabelle 9	Sammelgel- und Trenngel .....	18
Tabelle 10	Western blot - Puffer.....	19
Tabelle 11	Western blot - Antikörper- und Magermilchlösungen.....	20
Tabelle 12	Stripping-Puffer pH 2,2 .....	20
Tabelle 13	Blocking Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung .....	21
Tabelle 14	Aktivitätspuffer .....	21
Tabelle 15	Citratpuffer pH 6,0 .....	21

## Abkürzungsverzeichnis

a-SMA	<i>a-Smooth muscle actin</i>
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADAM8	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase 8 (human)</i>
Adam8	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase 8 (murin)</i>
APP	<i>Amyloid-beta precursor protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD23	<i>Clusters of designation 23</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Elektrochemilumineszenz
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSP1	Fibroblasten-spezifisches Protein-1
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
LLC-PK1	<i>Lilly Laboratories Culture-Porcine Kidney 1</i>
MBP	Myelin-Basisches Protein
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MMP-2	Matrix Metallopeptidase 2 / Gelatinase A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatrium-hydrogenphosphat-Lösung
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Natriumorthovanadat
$\text{NaCl}$	Natriumchlorid
$\text{NaN}_3$	Natriumazid
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
p.a.	<i>Pro analysis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PrAMA	<i>Proteolytic Activity Matrix Analysis</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNC	Tenascin-C
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TSP-1	Thrombospondin-1
WT	Wildtyp
$\text{ZnCl}_2$	Zinkchlorid

## 1 Zusammenfassung

Bislang wurden zahlreiche Studien zur Rolle von ADAM8 in akuten und chronischen Entzündungsprozessen durchgeführt. Allerdings fehlen bisher Untersuchungen zur möglichen Bedeutung dieses Enzyms in Bezug auf akute und chronische Nierenerkrankungen. Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand zellbasierter und histologischer Mauspräparate die Regulation der Adam8-Expression im Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen in der Niere zu analysieren.

Durch zellassoziierte Experimente mit IMCD3-Zellen konnte eine tendenzielle Abnahme sowohl der Pro-Form als auch der maturen Form von Adam8 nach einer entzündlichen Stimulation beobachtet werden. Interessanterweise führte die zusätzliche Induktion primärer Zilien zu einer tendenziellen Zunahme der maturen Form von Adam8. Außerdem bewirkte die Zilieninduktion eine signifikante Abnahme der Maturierung als Maß für eine mögliche Aktivierung von Adam8. Darüber hinaus stieg das Aktivitätsniveau von Adam8 nach einer entzündlichen Stimulation über einen Zeitraum von 480 Minuten deutlich an. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten in der frühen Phase der adenininduzierten Nephropathie einen Einstrom von Adam8-exprimierenden Entzündungszellen. In der späten Phase dieser Nephropathie zeigte sich eine Expression von Adam8 im tubulären Bereich.

Erhöhte ADAM8-Proteinlevel im Serum nierenkranker Patienten lieferten erste Anhaltspunkte für einen möglichen Zusammenhang zwischen entzündlichen Prozessen in der Niere und der Regulation von ADAM8. In dieser Arbeit konnten weitere Hinweise für eine krankheitsbedingte Regulation von ADAM8 in der Niere gewonnen werden. Dies könnte potenziell neue Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankungen eröffnen, was in weiterführenden *in vitro* und präklinischen Studien analysiert werden sollte.

## Summary

Numerous studies have been conducted to investigate the role of ADAM8 in acute and chronic inflammatory processes. However, there is a lack of research regarding the potential significance of this enzyme in relation to acute and chronic kidney diseases. The aim of this study was therefore to analyze the regulation of Adam8 expression in the context of inflammatory changes in the kidney using cell-based and histological mouse preparations.

Through cell-associated experiments with IMCD3 cells, a tentative decrease in both the pro-form and mature form of Adam8 was observed after inflammatory stimulation. Interestingly, the additional induction of primary cilia led to an increase in the mature form of Adam8. Furthermore, cilia induction caused a significant decrease in maturation. Additionally, the activity level of Adam8 significantly increased after inflammatory stimulation over a period of 480 minutes. Immunohistochemical investigations revealed an influx of inflammatory cells expressing Adam8 in the early phase of adenine-induced nephropathy. In the late phase of this nephropathy, there was an expression of Adam8 in the tubular area.

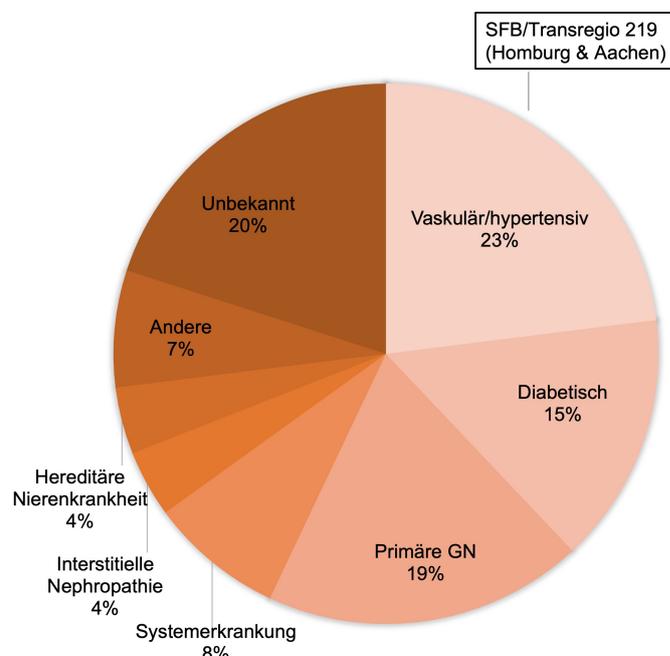
Elevated levels of ADAM8 in the serum of kidney-disease patients provided initial evidence of a potential connection between inflammatory processes in the kidney and the regulation of ADAM8. This study provided further evidence for disease-related regulation of ADAM8 in the kidney. This could potentially open up new avenues for the diagnosis and treatment of chronic kidney diseases, which should be further analyzed in *in vitro* and preclinical studies.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die chronische Niereninsuffizienz

Weltweit leiden mehr als 10% der Bevölkerung an einer chronischen Nierenerkrankung (Hill et al., 2016). Mit wachsenden Zahlen stellt die chronische Niereninsuffizienz eine klinische und ökonomische Herausforderung dar. Primär aber steht der Patient mit eingeschränkter Lebensqualität und schlechter Prognose im Mittelpunkt der Erkrankung: ein erhöhtes Sterberisiko, kardiovaskuläre Ereignisse und eine hohe Hospitalisierungsrate sind mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate (GFR) assoziiert (Go et al., 2004; Perlman et al., 2005). Die Optimierung frühzeitiger Diagnostik und Therapiemöglichkeiten der chronischen Nierenerkrankungen sind ein zentraler Punkt der Forschung. Ziel ist es, den Patienten vor den Folgen der Krankheit zu bewahren.

Die Relevanz der chronischen Niereninsuffizienz ergibt sich aber nicht nur aus der Häufigkeit, schlechten Prognose und limitierten Therapiemöglichkeiten, sondern auch aus der hohen Relevanz für Erkrankungen anderer Organsysteme. Häufig resultiert die chronische Niereninsuffizienz aus systemischen Grunderkrankungen, bei denen die Nieren mitbetroffen sind. 2015 hat die German-Chronic-Kidney-Disease-Studie die Ursachen für chronische Nierenschäden bei 5.217 Patienten untersucht (Abbildung 1). Dabei konnte festgestellt werden, dass vor Allem zwei systemische Volkserkrankungen im Vordergrund stehen: die



**Abbildung 1 Ursachen für chronische Nierenschäden**

In der German-Chronic-Kidney-Disease-Studie wurden bei 5.217 Patienten die Ursachen für chronische Nierenschäden untersucht. Vor Allem die arterielle Hypertonie und der Diabetes Mellitus stehen im Vordergrund (Titze et al., 2015). Primäre GN, primäre Glomerulonephritis.

arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus (Titze et al., 2015). Die häufigste Todesursache bei Patienten mit einer GFR unter 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> sind kardiovaskuläre Ereignisse. So scheint es einen wesentlichen Zusammenhang zwischen chronischen Nierenerkrankungen und kardiovaskulären Ereignissen zu geben (Thompson et al., 2015).

Bei der chronischen Niereninsuffizienz kommt es zu einem Verlust der exkretorischen und inkretorischen Nierenfunktion. Im Blut lässt sich dies durch den Anstieg harnpflichtiger Substanzen wie z.B. Harnstoff oder Kreatinin messen. Die chronische Niereninsuffizienz wurde 2012 durch die internationale Organisation „Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)“ genau definiert. Folgende Kriterien müssen erfüllt sein: 1) Anomalien der Nierenstruktur oder -funktion über mindestens drei Monate und 2) Auswirkung auf die Gesundheit des Patienten (Group., 2013). Voraussetzung für die Diagnosestellung sind entweder ein oder mehrere Marker für einen Nierenschaden oder eine verminderte GFR < 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. Zu diesen Markern zählen Anomalien im Urinsediment, strukturelle Auffälligkeiten in der Bildgebung oder der Zustand nach einer Nierentransplantation. Es wird empfohlen, die chronische Nierenerkrankung anhand bestimmter Kriterien einzuteilen. Dabei werden die Ursache der GFR-Veränderung und der Albuminurie-Status berücksichtigt. Diese Klassifikation wird als „CGA-Staging“ bezeichnet und erlaubt Aussagen über den klinischen Zustand und die Prognose. Die GFR-Kategorien sind für das weitere Verständnis der Arbeit wichtig (Abbildung 2), weshalb sie in folgender Tabelle dargestellt werden.

<b>GFR-Kategorie</b>	<b>GFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>	<b>Nierenfunktion</b>
G1	≥ 90	Normal oder hoch
G2	60 – 89	Leicht vermindert
G3a	45 – 59	Leicht bis moderat vermindert
G3b	30 – 44	Moderat bis stark vermindert
G4	15 – 29	Stark vermindert
G5	< 15	Nierenversagen

**Abbildung 2 GFR-Kategorien nach der KDIGO**

Anhand des GFR-Status können Aussagen über die Nierenfunktion gemacht werden. Ab einer GFR < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> leidet der Patient unter einem Nierenversagen (Group., 2013).

### 2.1.1 Pathogenese der Nierenfibrose

Bei einem Ausfall funktionstüchtiger Nephrone werden die noch funktionsfähigen Filtrationseinheiten vermehrt beansprucht: Der Versuch, die GFR aufrecht zu erhalten, endet in einer glomerulären Hyperfiltration. Dieser Mechanismus ist assoziiert mit einer glomerulären Hypertrophie und einem gleichzeitigen Verlust der Podozytenfusion. Die Funktionsfähigkeit der Blut-Harn-Schranke nimmt ab. Es kommt schließlich zu einer Albuminurie und glomerulären Sklerose bis hin zum Nephronverlust (Edeling et al., 2016). Durch diese Prozesse werden auch die noch intakten Filtrationseinheiten irreversibel zerstört. Durch die Notwendigkeit der Niere, Proteine auszuscheiden, wird die Hyperfiltration der Glomeruli zusätzlich begünstigt. Bei sinkender Nephronenanzahl steigt die Konzentration der Proteinmetabolite in den noch intakten Nephrone. Proteinurien führen direkt zu tubulotoxischen Effekten wie der Apoptose, Ablösung und Dedifferenzierung epithelialer Zellen. Auch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wird gesteigert. Schlussendlich folgt eine pathologische Ablagerung extrazellulärer Matrix, histologisch gekennzeichnet durch die Fibrosierung des Tubulointerstitiums. Bei diesem dynamischen Prozess sind Proteine der Extrazellulärmembran direkt involviert (Bulow, Boor, 2019; Zeisberg, Neilson, 2010).

Eines der wichtigsten Signalmoleküle in der Genese der chronischen Nierenerkrankung stellt der *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) dar. Dieser liegt inaktiv in einem latenten Komplex aus einem Signalpeptid, einem Latenz-assoziiertem Peptid und der aktiven TGF- $\beta$ -Form vor (Moses et al., 2016). Der TGF- $\beta$ -Komplex fungiert als Sensor für Veränderungen des extrazellulären Raums, welche z.B. Verschiebungen des pHs oder der Temperatur beinhalten. Des Weiteren erfolgen Wechselwirkungen mit Komponenten der ECM, zu welchen MMPs und Plasmin gehören. Die Interaktion mit Integrinen führen zur Aktivierung dieses Sensors, wodurch die aktive TGF- $\beta$ -Form aus dem latenten Komplex herausgelöst wird (Annes et al., 2003; Robertson, Rifkin, 2016). Das lösliche TGF- $\beta$  bindet an seinen Rezeptor (TGFR) und aktiviert intrazelluläre Signale wie den Smad-, Jagged/Notch-, Proteinkinase B- (Akt-), *B-cell lymphoma 2-* (Bcl-2-) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B-)-Weg (Boor et al., 2010). Die nachgeschaltete Aufregulation der Genexpression führt beispielsweise zu einer vermehrten Synthese von Kollagenen, Proteoglykanen und Glykoproteinen (Okuda et al., 1990). Des Weiteren wird die Expression spezifischer Matrixproteine in humanen proximalen Tubuluszellen induziert. Hierzu zählen der *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), *Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine* (SPARC), Thrombospondin-1 (TSP-1) und Tenascin-C (TNC) (Sarkozi et al., 2011). Zelluläre Folgen dieser Veränderungen sind eine gesteigerte Proliferation und Transformation epithelialer Zellen in Myofibroblasten (Wu et al., 2013). Dieser Prozess der Umwandlung differenzierter Epithelzellen in matrixproduzierende Fibroblasten und Myofibroblasten wird als epitheliale-

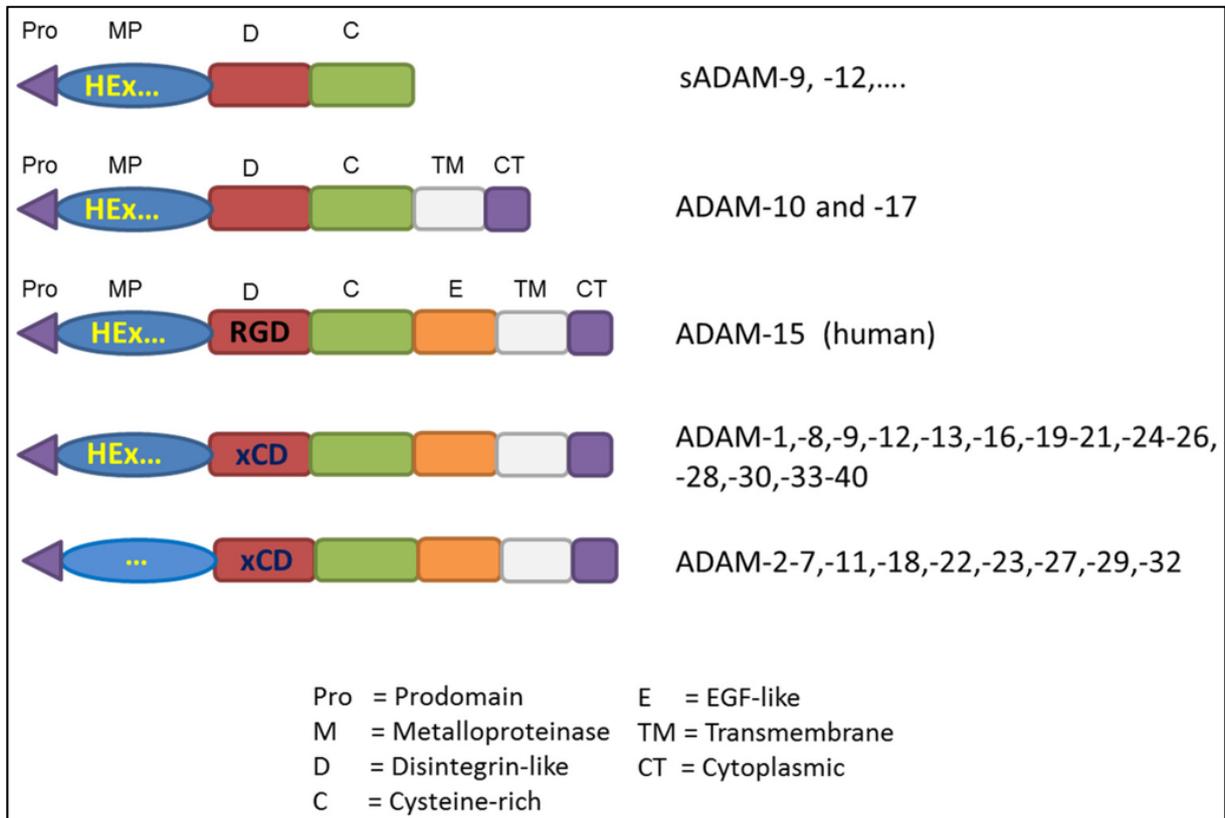
mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Charakteristisch für diese Umwandlung ist der Verlust epithelialer Proteine wie zum Beispiel E-Cadherin, Zonula Occludens-1 und Zytokeratin und gleichzeitig der Anstieg neuer mesenchymaler Marker wie Vimentin, *alpha-Smooth muscle actin* (alpha-SMA), Fibroblasten-spezifisches Protein-1 (FSP1) und interstitieller Matrixkomponenten wie Typ-I-Kollagen und Fibronectin (Liu, 2010). Die EMT wird neben den beschriebenen Signalwegen durch viele weitere intra- und extrazelluläre Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen in der tubulären und kapillären Mikroumgebung der Niere beeinflusst. Ein Zytokinmix aus IL-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) verstärkte die TGF- $\beta$ -induzierte EMT und führte zu einer signifikanten Hochregulierung der Expression des TGF- $\beta$ -1-Rezeptors (Liu, 2008). Neben dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  ist auch Angiotensin-II an der Induktion der EMT beteiligt. In TGF- $\beta$  unabhängigen Prozessen konnte Angiotensin-II den Smad-Signaltransduktionsweg und somit fibrotische Abläufe initiieren (Carvajal et al., 2008). Studien deuten darauf hin, dass auch einzelne Metalloproteinasen wie zum Beispiel die Gelatinase A (Matrix-Metalloproteinase-2) durch komplexe genetische Strukturveränderungen eine wichtige Rolle in der EMT spielen (Cheng, Lovett, 2003). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Pathogenese der Nierenfibrose ein komplexer, dynamischer Prozess ist, auf welchen viele einzelne Faktoren einwirken. Zu den Proteinen, die sich auf der Extrazellulärmembran vieler Zellen befinden, zählen die Mitglieder der Familie der ‚*a disintegrin and metalloproteinases*‘ (ADAMs), welche zahlreiche Mediatoren der Entzündungsreaktion proteolytisch freisetzen.

## 2.2 Die ADAM-Proteasen

ADAM-Proteasen sind Transmembranmoleküle, die für das sogenannte *ectodomain shedding* bekannt sind. Bei diesem Prozess werden andere Transmembranmoleküle proteolytisch gespalten und in den Extrazellulärraum freigegeben. Diese katalytische Funktion ist ein Schlüssel in der Regulierung physiologischer und pathologischer Prozesse wie beispielsweise der Immunmodulation, der Zelladhäsion und von Entzündungsprozessen (Dreymueller et al., 2012).

Die ADAM-Proteasen werden alle als Typ-1-Transmembranmolekül mit einer N-terminalen Signalsequenz, einer Prodomäne, einer extrazellulären Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrindomäne und einer zysteinreichen Region gefolgt von einer *Epidermal Growth Factor* (EGF)-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Teil exprimiert. Durch die individuelle Domänenstrukturzusammensetzung unterscheiden sich die einzelnen ADAM-Proteasen (Abbildung 3) (Giebeler, Zigrino, 2016). Im Gegensatz zu allen anderen ADAM-Proteasen besitzen ADAM10 und ADAM17 keine EGF-ähnliche Domäne, sondern einen sogenannten membranproximalen Bereich. Zusätzlich können einige ADAM-

Proteasen proteolytisch oder autokatalytisch prozessiert und als lösliche Formen abgespalten werden. Hierzu gehören unter anderem ADAM8, 9, 10, 12 und 17 (Edwards et al., 2008).



**Abbildung 3 Domänenstruktur der ADAM-Proteasen (Giebeler, Zigrino, 2016)**

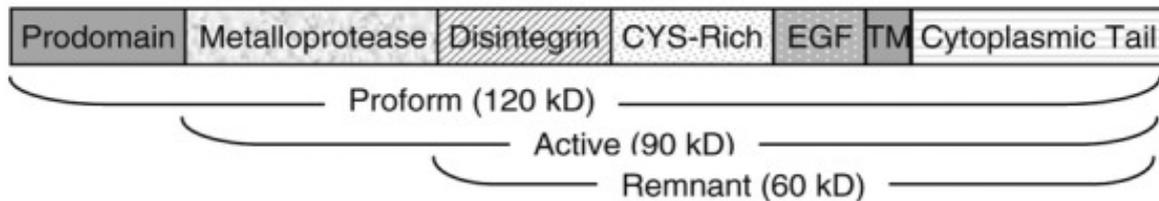
Die einzelnen ADAM-Proteasen unterscheiden sich in ihren Domänenstrukturen. ADAMs mit einer Metalloprotease-Domäne mit der Sequenz HEX ... (HEXGHXXGXX) sind proteolytisch aktiv. ADAM10 und ADAM17 unterscheiden sich durch das Fehlen der EGF-ähnlichen Domäne. sADAMs sind lösliche Formen der ADAM-Proteasen. Sie weisen keine Transmembran- und zytoplasmatische Komponente auf und werden durch extrazelluläre proteolytische Spaltung freigesetzt.

Für die proteolytische Aktivität ist die Expression der HEXGHXXGXX Sequenz in der Metalloprotease-Domäne verantwortlich. 13 der insgesamt 21 humanen ADAM-Proteasen codieren diese charakteristische Sequenz. Diese zeichnet sich durch eine Zink-Bindungsstelle aus. Über einen Cysteinswitch-Mechanismus kann die Latenz des Enzyms aufrechterhalten werden (Bode et al., 1993).

## 2.3 ADAM8

### 2.3.1 Aufbau, Substratspektrum und Aktivierung

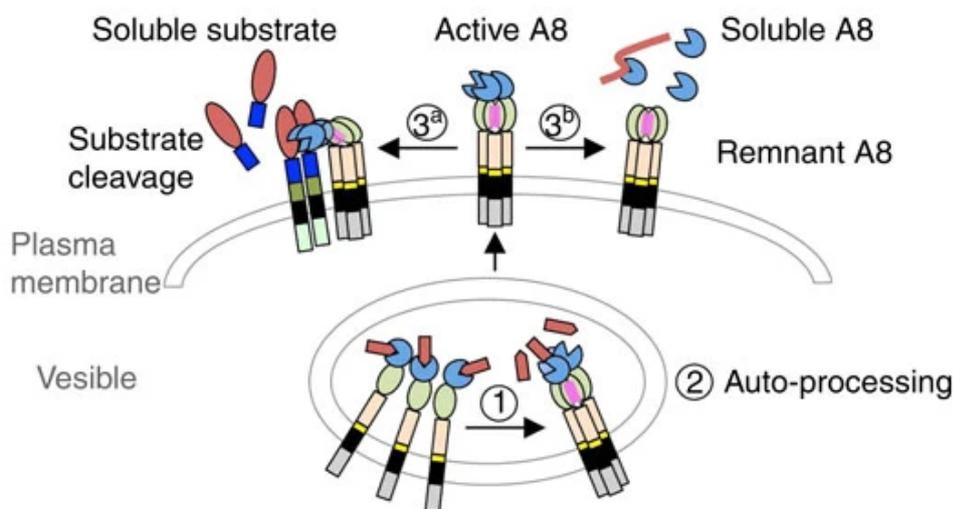
ADAM8 wurde ursprünglich als MS2- oder CD156-Antigen in murinen Makrophagen identifiziert (Yoshiyama et al., 1997). ADAM8 gehört zu den 13 der 21 humanen ADAM-Proteinen, die proteolytisch aktiv sind, und zeigt die charakteristische Domänenstruktur (Abbildung 4). Abhängig von der Zusammensetzung bzw. Prozessierung werden drei Formen unterschieden: die Pro-Form, die aktive (mature) und die remnant-Form. Differenziert werden können die drei Formen im Western blot anhand unterschiedlicher Proteinmassen (Koller et al., 2009).



**Abbildung 4 Domänenstruktur von ADAM8 (Romagnoli et al., 2014)**

ADAM8 kann in drei unterschiedlichen Proteinformen vorliegen. Durch autokatalytische Abspaltung der Prodomäne wird aus der Pro-Form die aktive Form, welche andere Transmembranmoleküle oder Proteine der extrazellulären Matrix proteolytisch spalten kann. Wird die Metalloprotease-Domäne abgespalten, wird die lösliche Form freigesetzt, und die remnant Form verbleibt in der Membran.

Durch einen autokatalytischen Prozess in endogenen Vesikeln wird die Pro-Domäne abgespalten (Schlomann et al., 2002). Die proteolytisch aktive (mature) Form wird an die Zelloberfläche transportiert, wo sie andere Membranproteine spalten kann. Durch einen weiteren autokatalytischen Prozess kann der Metalloprotease-Teil abgespalten und in den Extrazellulärraum abgegeben werden (Abbildung 5) (Schlomann et al., 2015). Die so



**Abbildung 5 Autokatalyse und Aktivierung der ADAM8-Protease (Schlomann et al., 2015)**

In endogenen Vesikeln wird die Prodomäne durch einen autokatalytischen Prozess abgespalten. Aktiviertes ADAM8 kann an der Zellmembran andere Transmembranmoleküle proteolytisch spalten. Alternativ kann durch einen weiteren autokatalytischen Prozess die Metalloproteasedomäne abgespalten werden, welche als lösliche Form proteolytisch aktiv ist. Hierdurch entsteht zusätzlich die remnant-Form, welche in der Membran verbleibt.

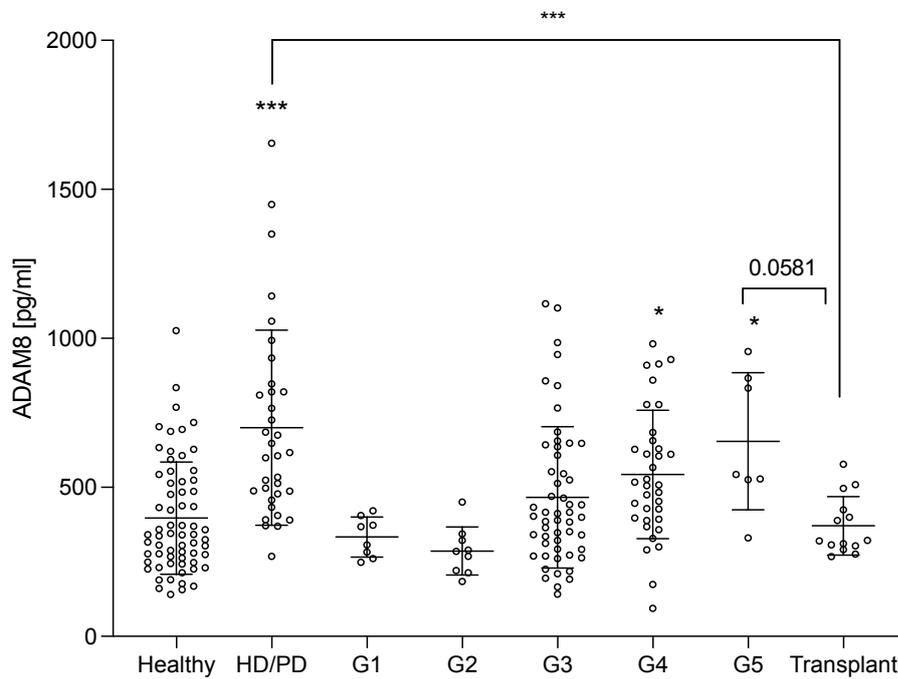
entstandene remnant Form verbleibt in der Zellmembran, während der Metalloprotease-Teil als lösliche Form von ADAM8 im Überstand aktiv sein kann. Für ADAM8 wurden spezifische Substrate identifiziert: *clusters of designation 23* (CD23), L-Selektin, *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1), ADAM17, *Amyloid-beta precursor protein* (APP), Interleukin-1 (IL-1 R-II), Myelin-Basisches Protein (MBP) sowie TNF- $\alpha$ . Involviert sind diese Substrate in Entzündungsprozessen, neurodegenerativen und vaskulären Erkrankungen (Naus et al., 2006). Bisher wurden die meisten Substrate in Peptidspaltungs-Versuchen identifiziert, so dass bisher nur für L-Selektin und PSGL-1 dies auch auf zellulärer Ebene bestätigt werden konnte. Das Vorhandensein von membrangebundenem und aktivem ADAM8 war mit einer vermehrten Abspaltung von L-Selektin in Brustzellen assoziiert (Gomez-Gavira et al., 2007). Experimente mit Neutrophilen, die mit aktiviertem löslichen ADAM8 inkubiert wurden, zeigten eine signifikante Verringerung der Membranexpression von PSGL-1. Auch wurde bei der gemeinsamen Expression von PSGL-1 und ADAM8 durch J77-transfizierte-Zellen eine deutliche Verringerung der PSGL-1-Expression festgestellt (Dominguez-Luis et al., 2011).

### **2.3.2 Bedeutung von ADAM8 in Entzündungsprozessen**

TNF- $\alpha$ , Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Zytokine als Substrate von ADAM8 sind als Mediatoren an inflammatorischen Prozessen beteiligt. ADAM8 förderte die Anreicherung von Leukozyten in den Alveolen durch einen generellen Einfluss auf die Migration sowie die Beeinflussung der Integrinregulation und trug somit zum Voranschreiten akuter Lungenerkrankungen bei (Dreymueller et al., 2017). Ebenso konnten bei chronischen Lungenerkrankungen wie COPD und Asthma eine ADAM8 abhängige Regulation beschrieben werden (King et al., 2004; Poverino et al., 2018). Des Weiteren war die Expression von ADAM8 mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose sowohl im humanen als auch murinen Modellsystem assoziiert. Freigesetztes CXCL16 als löslicher Marker der endothelialen Entzündung und Leukozytenrekrutierung korrelierte mit einem erhöhtem ADAM8 Level im Serum. Eine starke Korrelation zwischen löslichem ADAM8 und einem SAPS II-Score, der den akuten physiologischen Zustand eines Patienten nach Bypass-Operation beschreibt, deutete auch auf einen Zusammenhang mit postoperativen Organdysfunktionen hin (Schick et al., 2019). Adam8 wurde darüber hinaus in Leberentzündungen hochreguliert. Es kam zu einer Überexpression von Adam8 in Mausmodellen einer Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Leberentzündung und einer Steatohepatitis (Awan et al., 2021).

Die Regulation von ADAM8 in Nierenerkrankungen wurde bisher nur wenig beleuchtet. Die Ausprägung der Nierenerkrankung wird anhand der GFR-Kategorien (G1 – G5) differenziert. In Untersuchungen des Serums nierenkranker Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten konnte ein erhöhter Serumspiegel von ADAM8 bei nierenkranken Patienten detektiert werden (Abbildung 6, unveröffentlichte Daten AG Yildiz). Erhöhte ADAM8 Konzentrationen traten bei

dialysepflichtigen Patienten und bei Patienten mit einer verminderten GFR auf. Nach einer Nierentransplantation sank das ADAM8 Level wieder auf das Niveau gesunder Personen.



**Abbildung 6 ADAM8 im Serum nierenkranker Patienten**

Das Serum nierenkranker sowie gesunder Personen wurde mit dem *enzyme-linked immunosorbent assay*- (ELISA) Verfahren untersucht (R&D System). Erhöhte ADAM8-Level konnten bei Dialyse-Patienten (HD/PD) und fortgeschrittener Niereninsuffizienz (G3, G4, G5) nachgewiesen werden. Nach Nierentransplantation sank das Level wieder. HD, Hämodialyse; PD, Peritonealdialyse. Die Proben wurden von der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikum des Saarlandes, Prof. Thimotheus Speer zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Fragestellung

Erhöhte ADAM8 Level im Serum nierenkranker Patienten lassen auf einen Zusammenhang zwischen inflammatorischen Prozessen in der Niere und der Regulation von ADAM8 schließen. Da bisher keine tiefergehenden Untersuchungen in diesem Bereich durchgeführt wurden, sollten anhand immunhistochemischer Färbungen sowie zellbasierter Experimente folgende spezifische Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie verändert sich das Proteinlevel von Adam8 in Nierenzellen nach entzündlicher Stimulation?
- Wie verändert sich das Aktivitätslevel von Adam8 in Nierenzellen nach entzündlicher Stimulation?
- Wie sehen die Lokalisation und Veränderung auf histologischer Ebene aus?
- Ist die Erhöhung von ADAM8 im Serum der chronisch nierenkranken Patienten auf die Entzündung in der Niere zurückzuführen oder auf Veränderungen im Gefäßsystem?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle 1 sind alle in den Versuchen verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt, welche über die herkömmliche Laborausstattung hinausgehen.

**Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
6-, 12- und 24-Well-Platte	Sarstedt (Deutschland)
96-Well-Platte (durchscheinend)	Sarstedt (Deutschland)
96-Well-Platte (schwarz)	PerkinElmer (USA)
CELLSTAR-Tubes (15 ml, 50 ml)	greiner-bio-one (Deutschland)
Deckgläser 24 x 50 mm	R. Langenbrinck (Deutschland)
Deckgläser 1.5 H 25 mm	R. Langenbrinck (Deutschland)
Eindeckmedium Fluoromount	SouthernBiotech (USA)
Elektrophoresekammer, Gelhalter, -kassette	Bio-Rad (USA)
Glasküvetten	Glaswerk Wertheim (Deutschland)
Kryoröhrchen	Fisher Scientific (Deutschland)
Mini Pap Pen	Fisher Scientific (Deutschland)
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Fisher Scientific (Deutschland)
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad (USA)
Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	R. Langenbrinck GmbH (Deutschland)
Parafilm	Fisher Scientific (Deutschland)
Pasteurpipetten	Labsolute (Deutschland)
Pipettenspitzen (10 ml)	Ratiolab (Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Deutschland)
Präzisionswischtücher Kimtech	Kimberly Clark GmbH (Deutschland)
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Deutschland)
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt (Deutschland)
T75 Zellkulturlasche	Sarstedt (Deutschland)
Tank Lids	Promega (USA)
Whatman Papier	Sigma/Merck (Deutschland)

### 3.1.2 Geräte und Computerprogramme

In der folgenden Tabelle 2 sind alle in den Versuchen verwendeten Geräte aufgeführt, welche über die herkömmliche Laborausstattung hinausgehen.

Folgende Computerprogramme wurden verwendet: Aida Image Analyzer, AxioVision, Zen Blue, GraphPadPrism und Microsoft Excel.

**Tabelle 2          Verwendete Geräte**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences (Deutschland)
Einhandzähler	Infactory (Deutschland)
Fluoreszenz-Mikroplattenreader	Tecan (Schweiz)
Groß-Zentrifuge	Beckmann Coulter (Deutschland)
Heizblock	Hettich (Schweiz)
Inkubator	Binder (Deutschland)
Kühlzentrifuge	Eppendorf (Deutschland)
Lumineszenz Bildanalysegerät	Fujifilm (Deutschland)
Mikroskop	Helmut Hund (Deutschland)
Mikrowelle	Severin (Deutschland)
Multipipette	Carl roth (Deutschland)
Pipetierhelfer „Pipetboy“	Integra Biosciences (Deutschland)
Pipetten	Brand (Deutschland)
Schaukler	Edmund Bühler (Deutschland)
SDS-Page-Elektrophorese-Gerät	Consort (Belgien)
Stickstofftank	Thermo Fisher Scientific (USA)
Reagenzglasschüttler (Vortex)	Fisher Scientific (Deutschland)
Wasserbad	Lauda (Deutschland)
Western blot Transfergerät	PowerPac (Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Deutschland)
ZEISS Axio Observer Z1	Carl Zeiss (Deutschland)
Zellbank	Köttermann 8511 (Deutschland)

### 3.1.3 Chemikalien

In der folgenden Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet. Alle allgemein gebräuchlichen Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Carl roth und E. Merck bezogen und besaßen mindestens den Reinheitsgrad *pro analysis* (p.a.).

**Tabelle 3 Chemikalien**

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
1,10-Phenanthrolin [1 M]	VWR Chemicals (USA)
Acrylamid	Fisher Bioreagents (USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Deutschland)
Brij-35	E. Merck (Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	E. Merck (Deutschland)
Complete 50 Protease Inhibitor	Roche (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Deutschland)
Di-Natrium-hydrogenphosphat-Lösung (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O) [800 mM]	Carl Roth (Deutschland)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> / Nährstoffmischung F12 (DMEM/ F12)	ThermoFisher Scientific (USA)
Ethanol	ZChI (Deutschland)
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA) [100 mM]	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Formaldehyd [16%]	Fisher Scientific (Deutschland)
Glycerin	Carl Roth (Deutschland)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [30%]	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Hämalaun	E. Merck KG
Isopropanol	Fisher Scientific (Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl) [270 mM]	Grüssing (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) [147 mM]	Grüssing (Deutschland)
Magermilchpulver	TSI (Deutschland)
Mercaptoethanol	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Methanol	ZChI (Deutschland)

Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) [13,6 M]	Grüssing (Deutschland)
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Carl Roth (Deutschland)
PEPDAB13001	BioZyme inc (USA)
Phenolrotfreies Medium	ThermoFisher Scientific (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) [100 mM]	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Proteinmarker (EZrun prestained Protein Ladder)	Fisher scientific (Deutschland)
Saccharose [342,30 g/mmol]	Carl Roth (Deutschland)
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) ultrapure	AppliChem BioChemica (Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Deutschland)
Tris	Carl Roth (Deutschland)
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth (Deutschland)
TritonX-100	Carl Roth (Deutschland)
Trypsin	PromoCell (Deutschland)
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-a)	Peprtech (Deutschland)
Tween-20	Carl Roth (Deutschland)
Xylol	Carl Roth (Deutschland)
Zinkchlorid ( $\text{ZnCl}_2$ )	Sigma Aldrich (Deutschland)

### 3.1.4 Antikörper und Kits

Für die Western blot-Analysen und immunhistologischen Färbungen wurden die in Tabelle 4 und Tabelle 5 angegebenen Antikörper und Kits verwendet.

**Tabelle 4 Antikörper**

Target	Species	Konzentration Western blot [µg/ml]	Konzentration Immunhistochemie [µg/ml]	Konzentration Immunfluoreszenz [µg/ml]
Primäre Antikörper				
Adam8	Kaninchen	1	5	1
β-Aktin	Kaninchen	0,67	-	-
Immunglobulin G (IgG) Isotypkontrolle	Kaninchen	-	5	-
ARL13b	Maus	-	-	1
Sekundärer Antikörper				
Anti-rabbit IgG		0,025	-	-
Anti-mouse IgG2a AF488	Ziege	-	-	2
Anti-rabbit IgG Cy3	Ziege	-	-	2

**Tabelle 5 Kits**

BCA, Bicinchoninsäure-Assay; ECL, Elektrochemilumineszenz; DAB, 3,3'-Diaminobenzidin.

Produkt	Katalognummer	Hersteller
BCA-Protein-Assay	23225	ThermoFisher
ECL Western blotting Substrate	32109	Fisher Scientific
Vecta Stain Elite Kit	PK-6101	Vector Laboratories
DAB-Lösung	SK-4100	Vector Laboratories

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

In den folgenden Tabellen sind alle in den Versuchen verwendeten Puffer und Lösungen inklusive Zusammensetzung aufgeführt, welche über die herkömmliche Laborausstattung hinausgehen. Die gebräuchlichen Puffer wurden durch die technischen Assistentinnen Maria Rieseweber und Nina Schnellbach hergestellt und zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 6**      **PBS-Puffer (1x und 10x)**

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Menge / Endkonzentration</b>
10x PBS pH 7,4		
	KCl	2,00 g / 27 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,40 g / 14,7 mM
	NaCl	80,00 g / 1360 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O	14,40 g / 80 mM
	H <sub>2</sub> O	1 l
1x PBS pH 7,4		
	10x PBS	100 ml
	H <sub>2</sub> O	900 ml

**Tabelle 7**      **ADAM-Lysepuffer**

<b>Bestandteil</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris-HCL	5 mM
EGTA	1 mM
SDS	0,1%
Triton	1%
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
PMSF	1 mM
1,10-Phenanthrolin	10 mM
Saccharose	250 mM
Complete 50	1x
H <sub>2</sub> O	100 %

**Tabelle 8      Verdünnungsreihe der BSA-Standardlösung**

<b>BSA-Standardlösung (2 µg/µl) in µl</b>	<b>H<sub>2</sub>O in µl</b>	<b>Endkonzentration in µg/ml</b>
0	1000	0
5	995	10
10	990	20
20	980	40
30	970	60
40	960	80
50	950	100

**Tabelle 9      Sammelgel- und Trenngel**

	<b>Sammelgel (4%)</b>	<b>Trenngel (10%)</b>
4 x Sammelgel – Puffer	1,25 ml	-
4 x Trenngel - Puffer	-	2,5 ml
40% Acrylamid 29:1	0,50 ml	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	3,21 ml	4,91 ml
10% APS	37,5 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	15 µl

**Tabelle 10 Western blot - Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Menge/ Endkonzentration</b>
5x Lämmli-Puffer		
	SDS	0,5 g
	Glycin	4,5 ml
	Tris-HCl / 0,5 M, pH 6,8	1,75 ml / 87,5 mM
	Bromphenolblau 25 %	0,5 ml
	Mercaptoethanol	1,25 ml
	H <sub>2</sub> O	2 ml
10x SDS pH 8,3		
	Tris	30 g / 250 mM
	Glycin	144 g / 1,92 M
	SDS	10 g / 1 %
	H <sub>2</sub> O	1 l
1x SDS		
	10x SDS	100 ml
	H <sub>2</sub> O	900 ml
Transferpuffer		
	10x SDS	100 ml
	Methanol	200 ml
	H <sub>2</sub> O	700 ml
10x TBS pH 7,5		
	Tris	60,5 g / 500 mM
	NaCl	87,6 g / 1,5 M
	H <sub>2</sub> O	1 l
1x TBS		
	10xTBS	100 ml
	H <sub>2</sub> O	900 ml
TBS-T		
	1x TBS	200 ml
	Tween-20	20 g / 10 %

**Tabelle 11 Western blot - Antikörper- und Magermilchlösungen**

Lösung	Bestandteile	Menge/ Endkonzentration
Primäre Antikörperlösung		
	Primärer Antikörper (z.B. 1:1.000)	10 µl
	5 % BSA	2 ml / 1 %
	8 % NaN <sub>3</sub>	62,5 µl / 0,05 %
	1xTBS	8 ml
5 % BSA		
	BSA	5 g [5 %]
	1xTBS	100 ml
	NaN <sub>3</sub> / 8 %	625 µl / 0,05 %
8 % NaN <sub>3</sub>		
	NaN <sub>3</sub>	8 g / 8 %
	H <sub>2</sub> O	100 ml
Sekundäre Antikörperlösung		
	Sekundärer Antikörper (z.B. 1:40.000)	1 µl
	Magermilchlösung	40 ml
Magermilchlösung		
	Magermilchpulver	50 g / 5 %
	1xTBS	1 l

**Tabelle 12 Stripping-Puffer pH 2,2**

Bestandteile	Menge/Endkonzentration
Glycin	0,2 M
SDS	1 g / 0,1 %
H <sub>2</sub> O	1 l

**Tabelle 13      Blocking Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung**

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge/Endkonzentration</b>
FKS	2,5 ml / 5 %
BSA	1,5 g / 3 %
H <sub>2</sub> O	42,5 ml
10 x PBS	5 ml

**Tabelle 14      Aktivitätspuffer**

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge/Endkonzentration</b>
ZnCl <sub>2</sub>	0,136 g / 1 mM
Tris (0,5 M, pH 8)	40 ml / 20 mM
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	10 ml / 10 mM
NaCl (1,5 M)	100 ml / 150 mM
Brij-35 (0,5 %)	1,2 ml / 0,0006 %
H <sub>2</sub> O	848,8 ml

**Tabelle 15      Citratpuffer pH 6,0**

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge/Endkonzentration</b>
Zitronensäure	2,1014 g / 10 mM
Tween-20	0,5 ml / 0,05 %
H <sub>2</sub> O	999,5 ml

## 3.2 Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Methoden beschrieben. In der Zellkultur, der Subkultivierung, dem Passagieren und Aussäen der Zellen sowie bei der Kryokonservierung und dem Auftauen wurde ich zu Beginn der Arbeit durch die technischen Assistentinnen Maria Rieseweber und Nina Schnellbach unterstützt. Die praktischen Arbeiten wurden, wenn nicht anders aufgeführt, selbstständig durchgeführt.

### 3.2.1 Zellkultur und Subkultivierung

Für die Experimente wurden mIMCD3-Zellen (engl. = *murine inner medullary collecting duct*; ATCC® CRL2123TM) verwendet. Dabei handelt es sich um adhärenz Epithelzellen des renalen Sammelrohrs. Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. David Mick aus Homburg ohne *material transfer agreement* zur Verfügung gestellt.

Kultiviert wurden die Zellen in einem befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung in DMEM-F12, dem 10 % FKS zugesetzt wurde. Die Zellen wurden standardmäßig in 75 cm<sup>2</sup> Polystyrol Kulturflaschen kultiviert. Jeder Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank durchgeführt. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Medium gewechselt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 ml *phosphate buffered saline* (PBS) (Tabelle 6) gewaschen und 13 ml frisches Medium hinzugegeben.

### 3.2.2 Passagieren und Aussäen der Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70 - 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Nach Absaugen des alten Mediums wurde einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen von der Kulturflasche zu lösen, wurden 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und ca. 2 min inkubiert. Durch die Serinprotease Trypsin werden Adhäsionsmoleküle gespalten, so dass es zum Ablösen der adhärenz Zellen von der Kulturflasche kommt. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Ablösens des Zellrasens und der Vereinzelung der Zellen. Nach Zugabe von 7 ml frischem Medium wurde die Zellsuspension durch mehrfaches Auf- und Abziehen mit einer serologischen Pipette resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Abhängig von der gewünschten Zellkonzentration wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5, 1:10 oder 1:20 in neue Kulturflaschen mit 13 ml frischem Medium ausgesät. Für die Versuche wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl in der Zellsuspension erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension auf die Kammer aufgetragen. Über die Fläche und Höhe der Kammer wurde die Zellzahl pro Milliliter berechnet. Dazu wurden die Zellen in den jeweils vier Eckquadranten ausgezählt und der Mittelwert dieser vier Werte bestimmt. Dieser Wert wurde dann mit dem Faktor 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Die

gewünschte Zellzahl wurde durch die berechnete Zellzahl pro Milliliter dividiert. So ergab sich das Volumen der Zellsuspension für die gewünschte Zellzahl. Die folgende Berechnung dient als Beispiel zur Berechnung des Volumens, in welchem eine Zellzahl von 500.000 enthalten ist:

$$500.000 / (((139 + 176 + 187 + 154) / 4) \times 10.000/\text{ml}) = 0,305 \text{ ml}$$

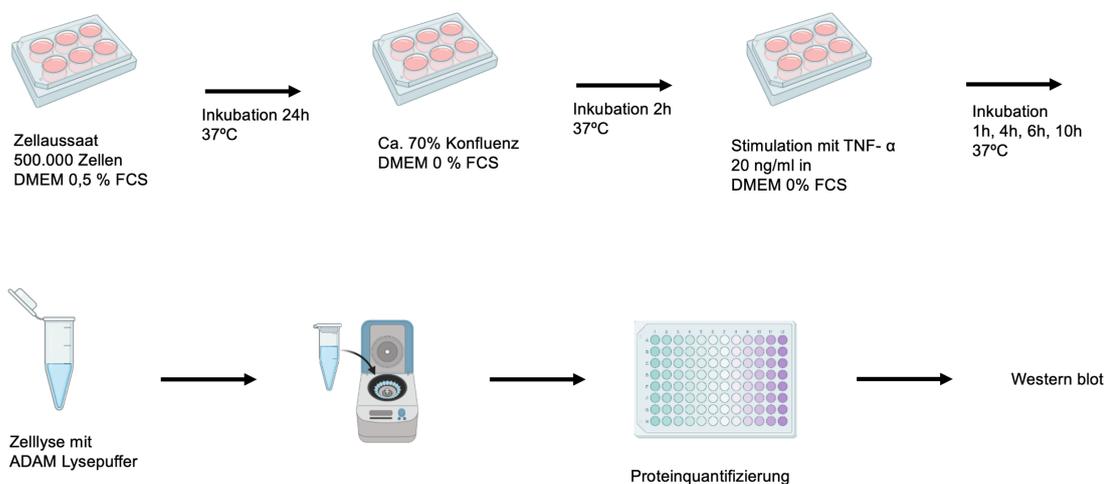
### **3.2.3 Kryokonservierung und Auftauen**

Für das Aufbewahren der Zellen über eine unbegrenzte Lagerungsdauer mit gleichzeitigem Erhalt der Vitalität, wurden niedrige Zellpassagen kryokonserviert. Dazu wurde eine Zellsuspension hergestellt. Verwendet wurden Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte zwischen 70 und 80 %, also Zellen in ihrer proliferativen Phase. Die Schritte sind dem vorherigen Abschnitt „Passagieren und Aussäen der Zellen“ zu entnehmen. Die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen wurde bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vom entstandenen Zellpellet abgesaugt. Je nach Größe des Zellpellets wurde dieses in 5 bis 10 ml Kryomedium (DMSO 1:10 in DMEM/F-12) resuspendiert. Als Gefrierschutzmittel verhindert DMSO während des Einfrierprozesses die Bildung von Eiskristallen. Diese können Zellorganellen zerstören und infolgedessen zum Absterben der Zellen führen. In jedes Kryoröhrchen wurden 1 ml Zellsuspension überführt. Die befüllten Kryoröhrchen wurden in den zuvor mit 100 % Isopropanol gefüllten „Mr. Frosty“ Gefrierbehälter eingestellt. Nach 24 Stunden Lagerung bei -80 °C wurden die Röhrchen in den Stickstofftank für eine unbegrenzte Lagerungsdauer platziert.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde zunächst eine Kulturflasche mit 10 ml DMEM/F-12 befüllt und für 15 min im Inkubator equilibriert. Das Kryoröhrchen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der Inhalt wurde unter der Sterilbank mit einer serologischen Pipette entnommen und in die vorbereitete Kulturflasche überführt. Im Anschluss wurde die Medien-Zell-Mischung unter dem Mikroskop kontrolliert und im Brutschrank inkubiert. Der erste Medienwechsel erfolgte am nächsten Tag.

### 3.2.4 Stimulation

Für die Stimulation der IMCD3 Zellen mit TNF- $\alpha$  wurden 500.000 Zellen in Wells einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium (DMEM/F-12) mit 0,5 % FKS ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurde für zwei Stunden nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS auf serumfreies Medium gewechselt. Danach wurden die Zellen erneut mit 2 ml PBS gewaschen. Für eine, vier, sechs und zehn Stunden wurden die Zellen mit 2 ml serumfreiem Medium und TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit serumfreiem Medium ohne TNF- $\alpha$  inkubiert wurden. Nach den Stimulationszeiträumen wurden die Zellen für die Proteinextraktion lysiert. Zur Demonstration des Versuchsablaufs am Stimulationstag soll Abbildung 6 dienen.

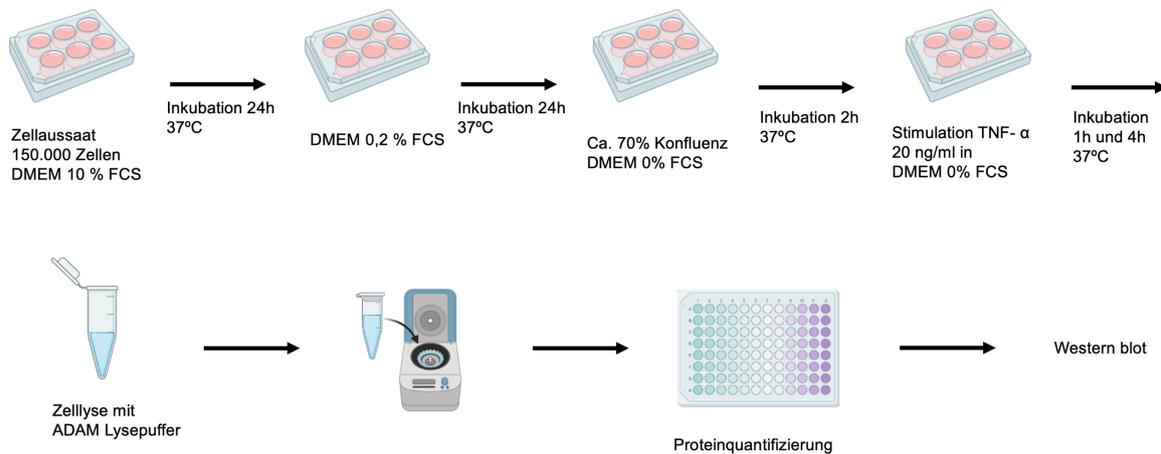


**Abbildung 7** Versuchsablauf des Simulationsversuchs (*created with BioRender*)

500.000 Zellen pro Well wurden für 24 Stunden in DMEM/F-12 + 0,5 % FKS kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS wurde auf serumfreies Medium gewechselt. Nach zwei Stunden Inkubation folgte die Stimulation mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) über eine, vier, sechs und zehn Stunden. Es folgten die Zellyse, die Proteinquantifizierung und der Western blot.

### 3.2.5 Zilieninduktion und Stimulation

Nierenepithelzellen sind durch die Ausbildung primärer Zilien gekennzeichnet. Zur Induktion des Zilienwachstums wurden 150.000 Zellen in Wells einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium mit 10 % FKS ausgesät. Nach 24 Stunden (50 - 60 % Konfluenz) folgte eine Serumreduktion auf 0,2 % FKS nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS, gefolgt von einer Inkubation in selbigem Medium für 24 Stunden. Als Kontrolle dienten Zellen, deren Serum nicht reduziert wurde und weiterhin in Medium mit 10 % FKS kultiviert wurden. Für zwei Stunden wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS mit serumfreiem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 2 ml PBS gewaschen und für eine und vier Stunden mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten jeweils Zellen, die nur mit serumfreiem Medium ohne TNF- $\alpha$  versetzt wurden. Nach den Stimulationszeiträumen folgte die Proteinextraktion durch Zellyse. Zur Demonstration des Versuchsablaufs soll Abbildung 7 dienen.



**Abbildung 7 Versuchsablauf des Zilieninduktions- und Simulationsversuchs (created with BioRender)**

150.000 Zellen pro Well wurden für 24 Stunden in 10 % FCS kultiviert. Das Medium der Zellen, die Zilien ausbilden sollten, wurde nach 24 Stunden auf 0,2 % FCS gewechselt. Die anderen Zellen wurden weiter in 10 % FCS kultiviert. Nach insgesamt 48 Stunden Kultivierung wurden alle Zellen mit PBS gewaschen und für zwei Stunden auf serumfreies Medium gesetzt. Nach zwei Stunden startete die Stimulation mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) für eine und vier Stunden. Es folgten eine Zellyse, die Proteinquantifizierung und der Western blot.

### 3.2.6 Proteinextraktion durch Zellyse

Für den Nachweis der Adam8-Expression mittels Western blot müssen die Proteine frei in Suspension vorliegen. Um nach den Inkubationszeiträumen weitere Veränderungen der Proteinexpression und -modifikation zu verhindern, wurden die 6-Well-Platten umgehend auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und letztlich in 200  $\mu$ l Lysepuffer (Tabelle 7) lysiert. Um einer autokatalytischen Spaltung entgegenzuwirken, enthielt der Lysepuffer eine hohe Menge an Proteaseinhibitoren (EGTA, PMSF, 1,10-Phenanthrolin, Complete 50). Die Pufferzusammensetzung wurden in Bezug auf Detergentien und Trägerstoffe hin optimiert, um ein Herauslösen von Adam8 aus spezialisierten Membrandomänen zu gewährleisten. Die Lysate wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, 20 min auf Eis inkubiert, nach 10 min gevortext und für 15 min bei 4 °C und 14.000 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig vom entstandenen Pellet abpipettiert und in neue, vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate konnten direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

### 3.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay

Mithilfe des Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay) wurde die Konzentration der Proteine in den Lysatproben bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch die Proteine in alkalischer Lösung (Biuretreaktion). Mit der BSA-Standardlösung (2 mg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe (Tabelle 8) für die spätere Bestimmung einer BSA-Kalibrierungsgeraden hergestellt.

Für die BSA-Kalibrierungsgerade wurden jeweils 50 µl jeder Verdünnungsprobe in jeweils zwei Reaktionsgefäße pipettiert. 5 µl jeder Lysatprobe wurden mit 45 µl destilliertem Wasser verdünnt. Aus dieser 1:10 Verdünnung wurde dann eine 1:20 und 1:40 Verdünnung hergestellt. Jeweils 5 µl der 1:10, 1:20 und 1:40 Verdünnungen wurden mit jeweils 45 µl destilliertem Wasser für die endgültigen 1:100, 1:200 und 1:400 Verdünnungen verdünnt. Die BCA-Protein-Assay A-Lösung wurde mit der BCA-Protein-Assay B-Lösung im Verhältnis 50:1 (A:B) gemischt. 300 µl der angesetzten Mischung wurden in jede Probenverdünnung pipettiert, gevortext und für 30 min bei 60 °C im Heizblock inkubiert. In dieser Zeit war abhängig von der enthaltenen Proteinkonzentration ein Farbumschlag von grün zu violett erkennbar (Biuretreaktion). Je 300 µl jeder Probe wurde in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Adsorption wurde bei 540 nm am Mikrotiterplattenphotometer (Tecan) gemessen. Aus den pro Probe pipettierten zwei Ansätzen der Standardreihe wurde mit Microsoft Excel der Mittelwert berechnet und eine Kalibrierungsgerade erstellt. Aus den Werten der Proben wurden ebenfalls Mittelwerte berechnet und die Proteinkonzentration jeder Probe mithilfe der Kalibrierungsgeraden bestimmt.

### **3.2.8 Auftrennung der Proteine durch die SDS-Page**

Die Auftrennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) dient der Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dazu wurden die Proteine denaturiert, auf ein Gel aufgetragen und im Spannungsfeld aufgetrennt. Die verwendeten Puffer und Lösungen mit ihren Bestandteilen sind dem jeweiligen Abschnitt zugeordnet.

#### Herstellung des Proteingels

Zunächst wurden die Glasplatten mit 70 % Ethanol gesäubert und in den Gießstand eingebaut. Das Trenn- und Sammelgel wurden bis auf die Zugabe des APS und TEMED vorbereitet (Tabelle 9). Diese zwei Substanzen dienen der Polymerisation der Gele, weshalb die Zugabe jeweils kurz vor Einguss in die Glasplatten erfolgte. Das Trenngel (10 %) wurde bis 1 cm unter die Kammkante gegossen und für ca. 20 min auspolymerisiert. Zur Entfernung entstandener Luftblasen und zum Erzielen einer glatten Trennfront wurde die Gelkante mit Isopropanol bedeckt. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und alle Flüssigkeitsreste mit Filterpapier entfernt. Das Sammelgel (4 %) wurde auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Bildung gleichgroßer Geltaschen hineingesteckt, welcher nach vollständiger Auspolymerisation vorsichtig hinausgezogen werden.

### Probenvorbereitung und Separation

Abhängig von der Proteinkonzentration der Proben wurden zwischen 15 und 35 µg Protein pro Geltasche aufgetragen. Für die Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit fünffach Lämmli (Tabelle 10) verdünnt und eine halbe Stunde bei 60 °C im Heizblock inkubiert. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und vollständig mit Laufpuffer (1x SDS) (Tabelle 10) übergossen. Die Proben wurden nach Auftragsschema in die Taschen des Sammelgels pipettiert, wobei die erste Tasche immer mit 5 µl Proteinmarker und die zweite Tasche mit 5 µl Adam8-HEK-Zellprobe zur Kontrolle der Antikörperbindung beladen wurde. Bei letzterem handelt es sich um Lysate von Adam8 überexprimierenden Zellen. Nach Anschluss an die Spannungsquelle startete die Separation der Proteine: bis zum Erreichen des Trenngels durch die Ladefront betrug die Spannung 80 V, danach wurde auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wurde kurz vor Herauslaufen der Ladefront gestoppt.

### Western blot

Für den Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurden folgende Schritte durchgeführt: Das Gel wurde vorsichtig aus den Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgetrennt und verworfen und das Trenngel in eine mit Transferpuffer befüllte Schale gelegt. Die Gelhalterkassette wurde mit der schwarzen Seite nach unten auf eine saubere Arbeitsfläche platziert, ein *Fiber pad* in Transferpuffer eingetaucht und auf die schwarze Seite der Kassette gelegt. Zwei Whatman-Papiere wurden in Transferpuffer getaucht und auf das *Fiber pad* gelegt. Das Gel wurde mit dem Marker nach rechts auf die Papiere gelegt und mit getränkter Nitrocellulose-Membran beladen. Zwei nasse Whatman-Papiere wurden auf die Membran gelegt. Luftblasen wurden entfernt. Nach Platzierung eines weiteren, getränkten *Fiber pads* auf das „Sandwich“ konnte die Kassette vorsichtig zusammengeklappt, verschlossen und in das Elektroden-Modul gesteckt werden. Das gesamte Elektroden-Modul wurde in den Puffer-Tank gestellt, mit einer Eiskühleinheit aus dem -80 °C Schrank versehen und vollständig mit Transferpuffer (Tabelle 10) befüllt. Im Kühlraum (4 °C) wurde der Blot für eineinhalb Stunden bei 350 mA an die Spannungsquelle angeschlossen. Nach Abbau des Blots wurden die Markerlinien mit einem Kugelschreiber auf die Membran gezeichnet. Die verwendete Form des Blots nennt man Wet-Blot-Verfahren.

### Inkubation mit 1. und 2. Antikörper

Alle Wasch- und Inkubationsdurchläufe wurden auf dem Taumelschüttler durchgeführt. Nach 5 min Waschen der Membran in *Tris-buffered saline with Tween20* (TBS-T), wurde diese für eine Stunde mit 5 % Magermilch in *Tris-buffered saline* (TBS) (Tabelle 11) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Die Magermilchlösung wurde verworfen,

die Membran einmal mit TBS-T gewaschen, die Antikörperlösung mit dem primären Antikörper (Tabelle 11) dazugegeben und über Nacht im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Tabelle 11) wurde in Magermilchlösung verdünnt und für eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf die Membran gegossen. Die zweite Antikörperlösung wurde verworfen. Die Membran wurde zweimal für 10 min mit TBS-T und einmal für 10 min mit TBS gewaschen.

#### Sichtbarmachen der Proteinbanden mit Elektrochemilumineszenz (ECL)

Grundsätzlich bedeutet Chemilumineszenz das Freiwerden von Licht durch das Absinken des Energieniveaus einer vorher angeregten Substanz mittels chemischer Reaktion. Angewandt auf diese spezifische Methode wurde das zyklische Diacylhydrazid Luminol mit einer durch die Peroxidase katalysierte Oxidation auf ein höheres Energieniveau angehoben. Nach Abfall des Energieniveaus des Luminols auf den Ursprung wurde Licht frei. Durch die Zugabe von Phenol konnte die durch die Peroxidase vermittelte Oxidation von Luminol und die damit verbundene Lichtemission um den Faktor 1.000 verstärkt werden.

Die Membran wurde nach dem letzten Waschgang in eine Reaktionshülle überführt. Auf die Membran wurden jeweils 0,5 ml der Enhanced Luminol Lösung und der Peroxidase-Lösung (Tabelle 5) pipettiert, die Hülle zugeschweißt und die Lösungen für eine Minute durch langsames Streichen mit einem Tuch inkubiert. Eine Seite der Hülle wurde aufgeschnitten, möglichst alle Flüssigkeitsreste ausgestrichen und die Hülle wieder zugeschweißt. Die Hülle inklusive Membran wurde mit der proteinbeladenen Seite nach oben in das Chemilumineszenz-Aufnahmegerät (LAS-3000) gelegt und das Programm zur Bildentwicklung gestartet. Die Expositionszeiten betragen für Adam8 60 min und für die  $\beta$ -Aktin-Ladkontrolle 5 min.

#### Membranstripping

Für die Detektion weiterer Proteine war es nötig, die bereits gebundenen Antikörperkomplexe aus Primär- und Sekundäntikörper von der Membran zu entfernen. Dazu wurde die Membran einmal 10 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte für 10 min eine Inkubation mit dem Stripping-Puffer (Tabelle 12). Der Stripping-Puffer wurde verworfen und die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, erneut für eine Stunde mit Magermilchlösung geblockt und die Inkubation mit den entsprechenden Primär- und Sekundäntikörperpaaren gestartet.

#### Quantifizierung der Proteinbanden

Ausgewertet wurden die Bilder mit der Software AIDA Image Analyzer v.4.14. Dazu wurden die einzelnen Proteinbanden sowie eine Stelle ohne Protein als Definition des Hintergrundes markiert. Das Programm konnte so die Intensität der einzelnen Banden bezogen auf den

Hintergrund berechnen. Die einzelnen Werte der berechneten Intensitäten wurden auf die jeweilige  $\beta$ -Aktin-Ladekontrolle bezogen und in Bezug auf die Werte der nicht stimulierten Zellen normalisiert.

### **3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie – Kontrolle Zilienbildung**

Für die Kontrolle der Zilienbildung wurde eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. 50.000 IMCD3 Zellen wurden jeweils auf ein Well einer mit Deckgläsern ausgekleideten 24-Well-Platte in 0,5 ml DMEM/F-12 mit 10 % FKS ausgesät. Nach 24 Stunden wurde nach einmaligem Waschen mit PBS das Medium gewechselt. Für die Zilienbildung wurde bei 12 Wells das Serum auf 0,2 % reduziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde das alte Medium abgesaugt und jeweils 300  $\mu$ l 4 % Formaldehyd für die Fixation der Zellen aufgetragen. Nach 10 min Inkubation wurde das Formaldehyd verworfen und die fixierten Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellen wurden 300  $\mu$ l 0,2 %-iges Triton-X100 in PBS auf jedes Well gegeben und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette aus den Wells in eine mit dehnbare Verschlussfolie belegte und Alufolie umschlossene Petrischale transferiert. Jedes Deckglas wurde auf einen Tropfen PBS mit der zellbeschichteten Seite nach oben zeigend gelegt. Die Tritonlösung wurde aspiriert. 100  $\mu$ l Blocking Puffer (Tabelle 13) wurden auf jedes Deckglas pipettiert. Nach 45 min Inkubation wurde der Puffer abgesaugt und 40  $\mu$ l Primärantikörperlösung aufgetragen. Drei verschiedene Antikörperlösungen wurden verwendet. Eine enthielt den Antikörper gegen das zilienspezifische Protein ARL13b, eine gegen die Metalloproteinase Adam8 (Tabelle 4) und eine beide Antikörper kombiniert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 4 °C wurden die Primärantikörperlösungen aspiriert und die Deckgläser jeweils dreimal 10 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit jeweils 40  $\mu$ l fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörperlösungen. Für den zilienspezifischen Primärantikörper wurde der goat-anti-mouse IgG2a AF488 Sekundärantikörper verwendet, für den Adam8 Primärantikörper der goat-anti-rabbit Cy3 Sekundärantikörper (Tabelle 4). Nach 45 min wurden die Lösungen abgesaugt und erneut jeweils dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1  $\mu$ g/ml) genutzt. 40  $\mu$ l der DAPI-Lösung wurden auf die Deckgläser pipettiert und 45 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit einer Pinzette auf jeweils einen Tropfen Eindeckmedium auf Objektträger mit der zellbesetzten Seite nach unten zeigend transferiert. Für mindestens zwei Tage trockneten diese im Kühlschrank bei 4 °C. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Mikroskop (ZEISS Axio Observer Z1) und einer Mikroskopie-Software (Zen blue).

### 3.2.10 PrAMA – Aktivitätsmessung im Überstand

Zur Bestimmung der Aktivität der extrazellulär freigesetzten Varianten von Adam8 (lösliche Ektodomäne und membranassoziierte Form auf Exosomen) wurde auf die *Proteolytic Activity Matrix Analysis* (PrAMA) zurückgegriffen. Das Prinzip der Messung beruht auf folgender Grundlage: Das Antigen CD23 ist ein Substrat, welches durch aktives Adam8 proteolytisch gespalten werden kann (Fourie et al., 2003). Eine ähnliche Spaltseite wie das CD23 Antigen besitzt das Polypeptid-Protease-Substrat PEPDab013 (Schlomann et al., 2015). Das Polypeptid-Protease-Substrat besteht zusätzlich aus einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Donor und einem Quencher-Fluorophor. Ein Quencher bewirkt eine Fluoreszenzlöschung durch Energieaufnahme. Diese beiden Substanzen sind über eine charakteristische Aminosäuresequenz, die in diesem Fall der Spaltseite des CD23 Antigens ähnelt, getrennt. Bei der Spaltung durch die spezifische Protease, in diesem Fall Adam8, trennt sich der FRET-Donor vom Quencher. Die Fluoreszenz wird durch den Quencher nicht weiter gelöscht und nimmt zu. Durch die PrAMA-Messung kann die Metalloproteinase-Aktivität auf nicht-invasive Weise und in Echtzeit bestimmt werden (Miller et al., 2011).

#### Zellkulturüberstände

Ca. 66.000 Zellen wurden auf Wells einer 12-Well-Platte in jeweils 0,5 ml DMEM-F12 mit 10 % FKS ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Für die Zilienbildung wurde das Serum auf 0,2 % FKS reduziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden alle Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS für eine Stunde mit serumfreiem, phenolrotfreiem Medium versetzt und im Anschluss für 30 min, 60 min, 120 min, 240 min bzw. 480 min mit TNF-a (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit serumfreiem Medium ohne TNF-a versetzt wurden. Nach Beendigung der Stimulationszeiträume wurden die Überstände in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und 4.000 g für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Für die Lagerung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C aufbewahrt.

#### Aktivitätsmessung

Zur Durchführung der Messung wurden die Proben 1:2 in phenolrotfreiem Medium verdünnt und in Triplikaten mit jeweils 50 µl auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Mikrotiterplatte befand sich bei allen Schritten auf einer eisgefüllten Box, um die Enzymaktivität zu bremsen. Für die Positivkontrolle wurde Trypsin 1:200 und 1:1.000 im Aktivitätspuffer (Tabelle 14) verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden jeweils 1 µl mit 49 µl Aktivitätspuffer in die Mikrotiterplatte pipettiert. Als Negativkontrolle diente zum einen ein Triplikat einer 1:2 Verdünnung des phenolrotfreien Mediums in Aktivitätspuffer sowie eine Einzelmessung des

unverdünnten Aktivitätspuffers (*blank*). 60 µl einer 1:500 Verdünnung des FRET-Polypeptid-Substrates (PEPDab013) im Aktivitätspuffer wurden in einer zweiten Mikrotiterplatte vorgelegt. 50 µl dieser Substratverdünnung wurden mit der Multipipette auf die Probenmikrotiterplatte transferiert. Mittels Multimode-Mikroplattenlesegerät Fluostar BMG Optima, welches vorher auf 37 °C vorgeheizt wurde, wurden die Fluoreszenzeinheiten alle zwei Minuten für 4 Stunden bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

### **3.2.11 Adenin-induzierte-Nephropathie**

Paraffinschnitte als Material für die immunhistochemischen Färbungen wurden von der Arbeitsgruppe Speer (ehemals Klinik für Innere Medizin IV, Homburg) bereitgestellt. Diese Versuche wurden nicht eigens für diese Arbeit durchgeführt, sondern auf Material vorheriger Tierversuchsvorhaben zurückgegriffen. Für die Induktion einer chronischen Nierenerkrankung wurde eine Adenin-Diät eingesetzt. Dafür wurden Mäuse zwei oder vier Wochen mit einer 0,2 % adeninhaltigen Spezialnahrung gefüttert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse zwei oder vier Wochen mit Standardnahrung gefüttert.

Adenin wird über den „Purin-Salvage-Pathway“ durch das Enzym Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) zu Adenosinmonophosphat umgesetzt. Bei einem Überschuss an Adenin kommt es zu einer Substratsättigung des Enzyms. Anfallendes Adenin wird durch die Xanthindehydrogenase zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert. Dihydroxyadenin ist schlecht löslich und präzipitiert als Kristallkörper im Tubulus und Interstitium, wodurch die Niere direkt geschädigt wird. Der gleiche Pathomechanismus läuft bei der APRT-Defizienz ab (Engle et al., 1996). Als typische Zeichen einer chronischen Nierenschädigung zeigen sich histopathologisch eine Tubulusatrophie und eine interstitielle Fibrose (Ali et al., 2013; Yokozawa et al., 1986).

### **3.2.12 Immunhistochemische Färbung**

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Untersuchungen zur Detektion von Adam8 in den bereitgestellten Paraffinschnitten der Mausnieren erläutert.

#### Vorbehandlung der Objektträger

Die Schnitte wurden zunächst für 45 min auf dem Heizblock bei 60 °C inkubiert und zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert. Rehydriert wurde für jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe: zweimal in 100 % Ethanol, zweimal in 96 % Ethanol und zweimal in 70 % Ethanol. Die Objektträger wurden für 5 min in destilliertem Wasser und zweimal für 5 min in

PBS gewaschen. Für die Demaskierung der Antigene (*Antigen Retrieval*) wurden die Schnitte für 20 min in Citratpuffer (Tabelle 15) in einer Mikrowelle gekocht. Nach ca. 2 min Kochen bei 600 W wurde die Wattzahl auf 150 – 200 vermindert, um ein Überkochen des Puffers zu verhindern. Nach Abkühlen der Schnitte im Citratpuffer für etwa 10 min wurden die endogenen Peroxidasen für 30 min in 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol blockiert. Es wurde zweimal 5 min mit PBS gewaschen.

#### Blocken und Inkubation mit 1. Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Nachweis wurde das Vecta Stain Elite ABC Kit (Tabelle 5) verwendet.

Vorsichtig wurden alle Flüssigkeitsreste mit einem fusselfreien Tuch entfernt und die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Für 20 min wurde mit 1,5 % Ziegen Serum in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörper-Interaktionen zu verhindern. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (Tabelle 4) bei 4 °C in einer feuchten Petrischale. Auf den Gewebsschnitt an der Beschriftungsseite wurde die IgG Isotypkontrolle pipettiert, auf den Gewebsschnitt auf der anderen Seite der Adam8-Antikörper. Die Konzentration der Antikörper in 1,5%igem Ziegen Serum in PBS betrug 5 µg/ml.

#### Inkubation mit 2. Antikörper und Kopplung mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)

Die Objektträger wurden zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Inkubiert wurde mit dem biotinylierten anti-rabbit Antikörper aus dem Vecta-Stain-Kit (Tabelle 5) für 45 min bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min folgte die Inkubation mit dem Avidin-Enzym-Komplex für 30 min, welcher 30 min zuvor für die Kopplung zwischen Avidin und HRP angesetzt wurde. Für 5 min wurde einmal mit PBS gewaschen.

#### DAB-Färbung und Gegenfärbung

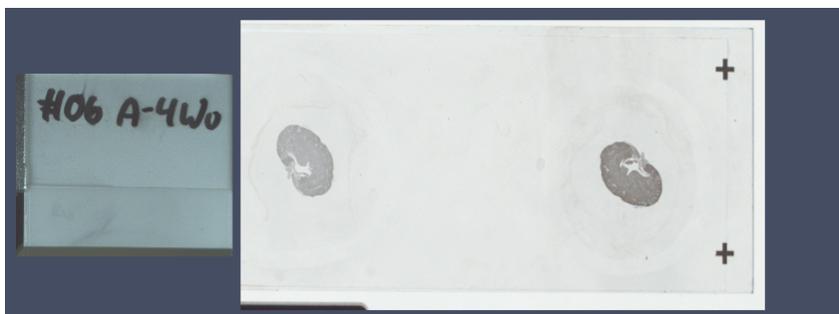
Als chromogenes Substrat für die Detektion wurde DAB aus dem DAB-Kit SK-4100 (Tabelle 5) genutzt. Für 2 min wurden die Schnitte mit der kurz zuvor angesetzten Lösung gefärbt und für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 2 min mit Hämalaun. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Objektträger für 10 min gewaschen.

#### Eindecken

Vorsichtig wurden alle Flüssigkeitsreste mit einem fusselfreien Tuch entfernt. Drei bis vier Tropfen Eindeckmedium wurden auf die Objektträger gegeben und mit einem Eindeckglas abgedeckt. Für mindestens zwei Tage trockneten die Schnitte im Kühlschrank bei 4 °C.

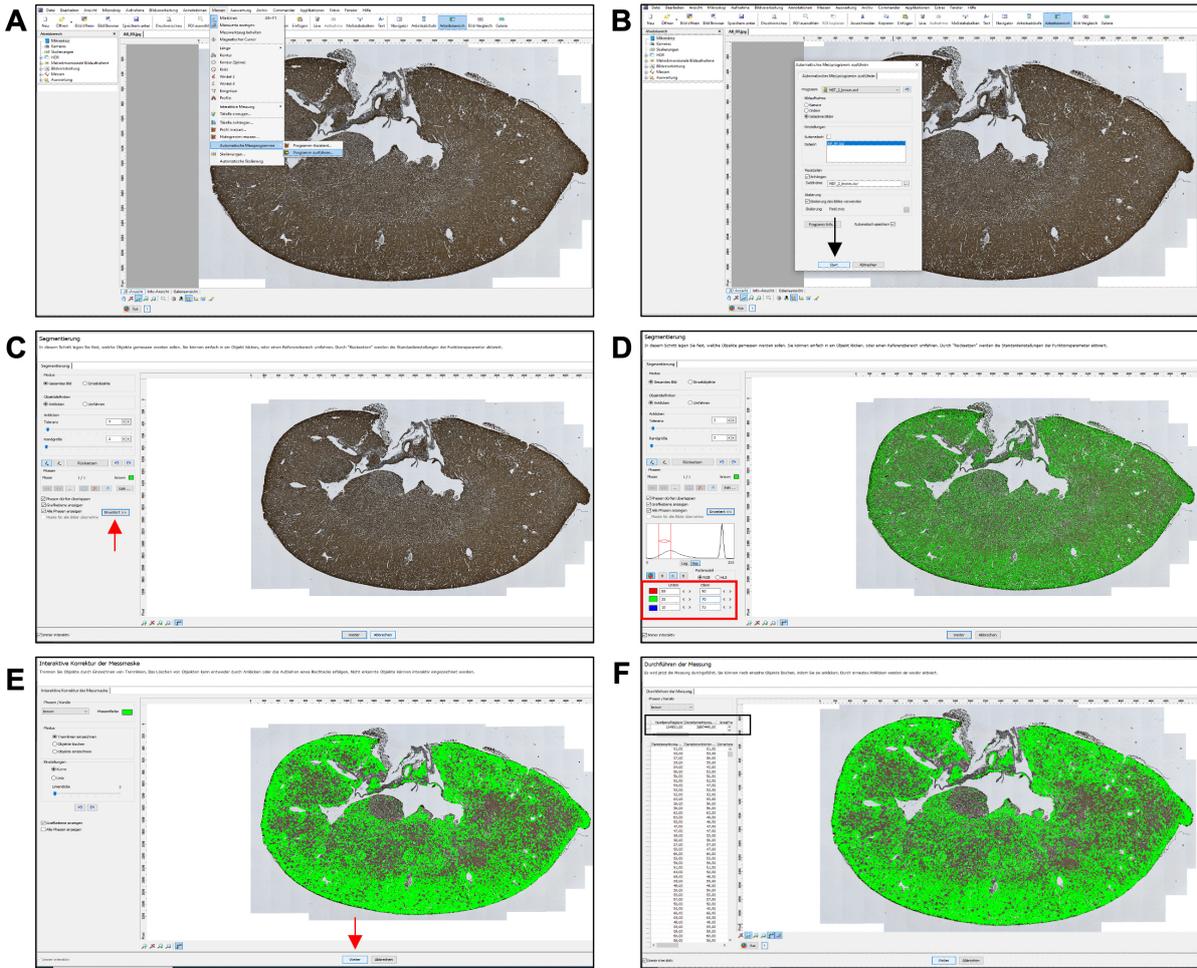
### Quantitative Auswertung der gefärbten Schnitte

Digitalisiert wurden die gefärbten Schnitte mit dem ZEISS AxioScan bei 10-facher Vergrößerung. In Abbildung 8 ist ein Beispiel eines digitalisierten Schnittes dargestellt. Alle digitalisierten TIFF-Dateien wurden mit dem Programm Zen Blue in JPEG-Dateien konvertiert. Schnitte, bei denen die Antigendemaskierung nur partiell funktionierte, wurden zugeschnitten, um die Auswertung nicht zu verfälschen. Es wurde ein automatisches Messprogramm, mit dem die gefärbten Areale detektiert werden konnten, erstellt. Für die Quantifizierung (Abbildung 9) wurde das Programm AxioVision sowie die auszuwertende Datei geöffnet. Das zuvor erstellte Messprogramm wurde ausgeführt. Für alle Bilder wurde eine einheitlich zu detektierende Intensitätsschwelle festgelegt. Die Schwelle für den Rotwert lag zwischen 55 und 90, für den Grünwert zwischen 35 und 70 und für den Blauwert zwischen 10 und 55. Mit diesen Schwellenwerten wurden die Farbtintensitäten aller Bilder erfasst. Für jedes Bild wurde so ein *Densitometry count* [Pixel<sup>2</sup>] und ein *Area Frame* [Pixel<sup>2</sup>] Wert berechnet. Für jedes Bild wurde der densitometrische Wert durch die Fläche dividiert:  $Densitometry\ count/Area\ Frame$ . Aus den IgG-Kontroll-Färbungswerten wurde ein Mittelwert berechnet, welcher 0,01 betrug. Von den einzelnen Adam8-Färbungswerten wurde der Mittelwert der Kontrollen subtrahiert. Pro Gruppe wurden Schnitte von fünf Tieren gefärbt und ausgewertet. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte in GraphPadPrism.



**Abbildung 8** Gefärbter und digitalisierter Schnitt

Dargestellt ist ein Beispiel eines mit dem AxioScan digitalisierten Schnittes. An der Beschriftungsseite ist der IgG-Kontrollfärbeschnitt zu sehen, an der Seite mit den zwei + + der Adam8-Färbeschnitt.



**Abbildung 9 Ablauf des Messprogramms zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit AxioVision**

A: Nachdem das Programm AxioVision und die zu messende Datei (JPEG-Format) geöffnet wurde, wurde das automatische Messprogramm ausgewählt. B: Die zu messende Datei wurde ausgewählt und das Programm (MST\_2\_brown) gestartet. C: Die Segmentierung öffnete sich und das Feld „Erweitert“ wurde ausgewählt. D: Die Farbschwellenwerte für die Intensitätsmessung wurden wie folgt begrenzt: R 55 – 90, G 35 – 70, B 10 – 55. Es wurde das Feld „Weiter“ ausgewählt. E: Die interaktive Korrektur der Messmaske öffnete sich. Es wurde das Feld „Weiter“ ausgewählt. F: Die Farbintensitäten wurden gemessen (grüne Bereiche). Für jedes Bild wurde ein *Densitometry count* [Pixel<sup>2</sup>] und ein *Area Frame* [Pixel<sup>2</sup>] Wert berechnet.

### 3.2.13 Darstellung der Daten und statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde das Programm GraphPadPrism verwendet. Die Quantifizierung der Western blot Membranen erfolgte mittels Densitometrie. Dazu wurden die Bandenintensitäten der Western blots mit dem AIDA Image Programm quantifiziert und zur  $\beta$ -Aktin-Ladekontrolle normalisiert. Die Daten der unabhängigen Experimente wurden als Mittelwerte *plus-/minus-standard deviation* (+/- SD) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-Test.

Die Daten der PrAMA-Aktivitätsmessungen wurden als Differenz zwischen Messwert und Negativkontrolle berechnet. Die Auftragung der Ergebnisse erfolgte als delta-Fluoreszenz (Fluoreszenzänderung) über die Zeit. Es wurde eine lineare Regression der Graphen erstellt. Anhand der Steigungen dieser Ausgleichsgeraden konnte die Aktivität von Adam8 nach verschiedene Stimulationszeiträumen miteinander verglichen werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA Varianzanalyse.

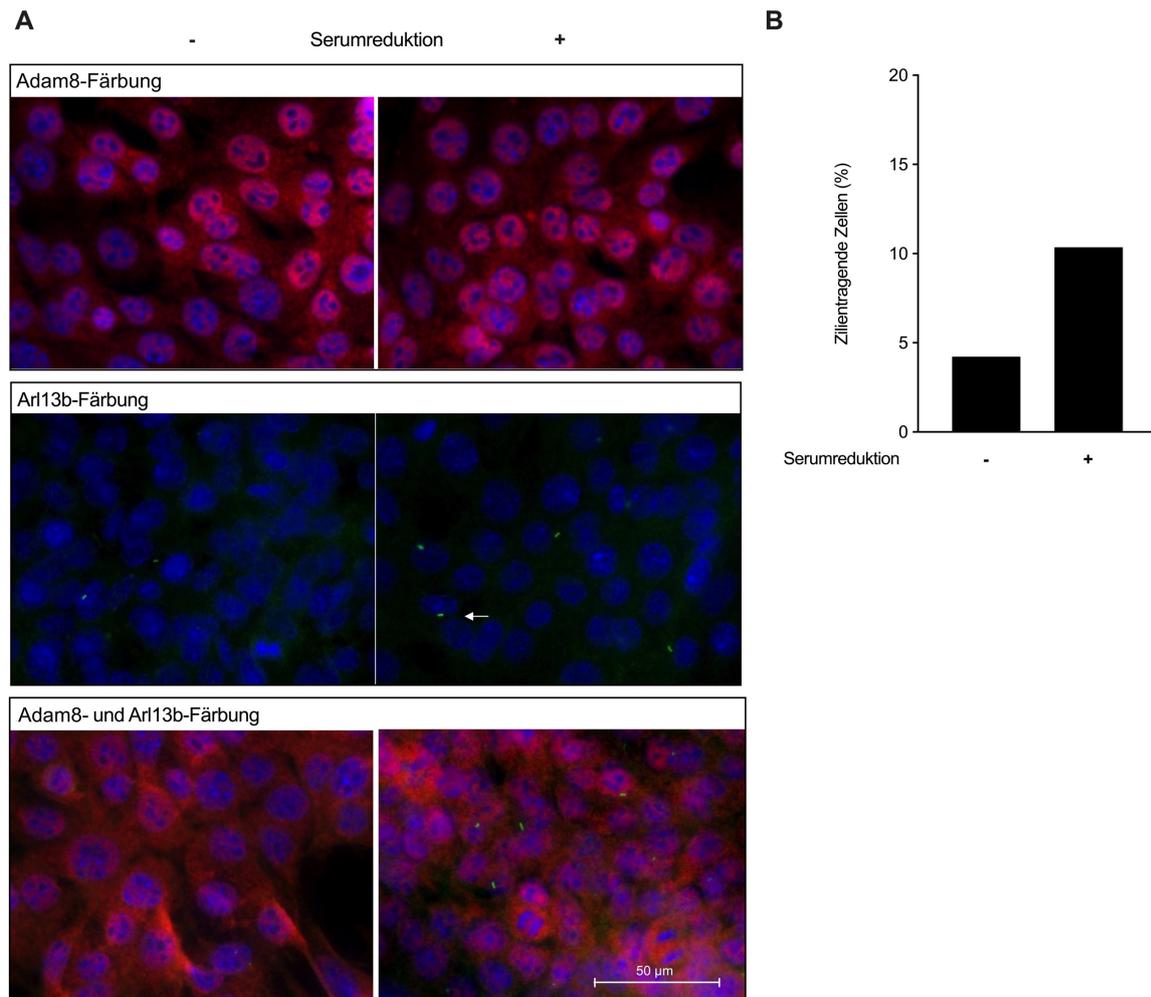
Für die Analyse der immunhistochemischen Experimente wurden vier Gruppen (zwei bzw. vier Wochen Adenindiät, zwei bzw. vier Wochen Normaldiät) miteinander verglichen. Mit dem Programm GraphPadPrism wurden die Mittelwerte +/- SD der vier Gruppen berechnet und in Graphen übersetzt. Die verschiedenen Gruppen wurden mit der one-way ANOVA Varianzanalyse verglichen.

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden durch Sternchen markiert und Vergleiche zwischen einzelnen Behandlungsgruppen zusätzlich durch Linien gekennzeichnet. Ein Signifikanzwert  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant angenommen (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Regulation der Adam8 Proteinexpression

Um einen ersten Hinweis auf die Regulation von Adam8 in Nierenzellen zu gewinnen, wurden IMCD3 Zellen ohne und mit Ausbildung von Zilien nach entzündlicher Stimulation mittels TNF- $\alpha$  analysiert. Zur Kontrolle der Induktion der Zilienbildung sowie der generellen Präsenz einer Adam8-Proteinexpression in IMCD3-Zellen wurden immunzytochemische Färbungen gegen Adam8 und das zilienspezifische Protein Arl13b durchgeführt (Abbildung 10).



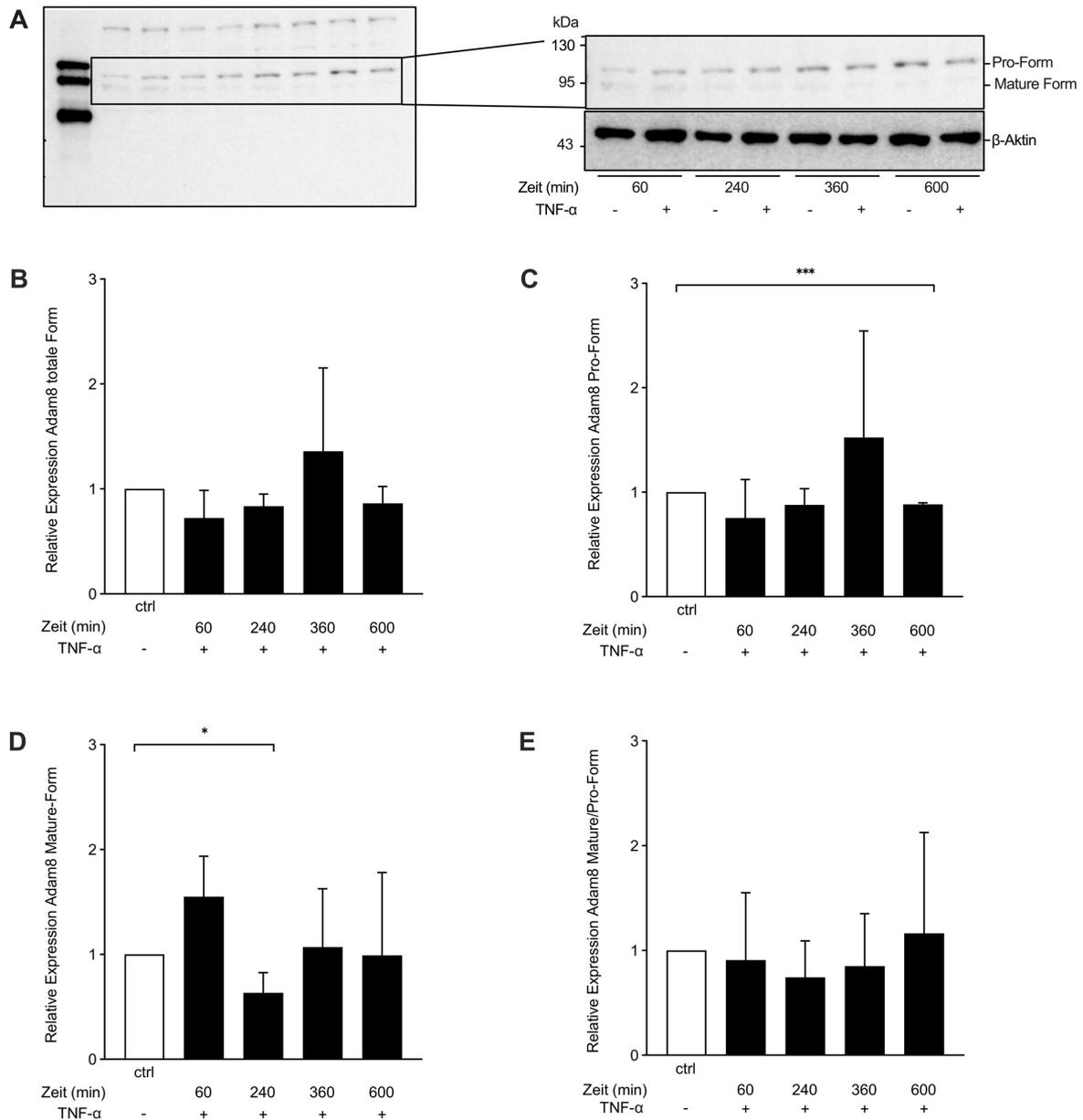
**Abbildung 10 Immunzytochemische Färbungen gegen Adam8 und Arl13b**

50.000 IMCD3-Zellen wurden jeweils auf ein Well einer mit Deckgläsern ausgekleideten 24-Well-Platte in 0,5 ml DMEM/F-12 mit 10% FKS ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Für die Zilienbildung wurde das Serum auf 0,2% FKS reduziert. Als Kontrolle dienten die Zellen, denen kein Serum entzogen wurde (10% FKS). Es erfolgte eine immunzytochemische Färbung. Die Detektion von Adam8 erfolgte durch die Inkubation mit einem rabbit-anti-mouse Adam8 Primärantikörper (1  $\mu\text{g/ml}$ ) gefolgt von einem fluoreszenzgekoppelten goat-anti-rabbit Cy3 Sekundärantikörper (2  $\mu\text{g/ml}$ ) (rot). Die Detektion der Zilien erfolgte durch die Inkubation mit einem mouse-anti-mouse Arl13b Primärantikörper (1  $\mu\text{g/ml}$ ) gefolgt von einem fluoreszenzgekoppelten goat-anti-mouse IgG2a AF488 Sekundärantikörper (2  $\mu\text{g/ml}$ ) (grün). Für die Zellkernfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (blau) genutzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop. A: Exemplarische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen. Der weiße Pfeil markiert beispielhaft eine Zilie. B: Graphische Darstellung der Anteile zilientragender Zellen mit (induzierte Zilienbildung) und ohne (spontane Zilienbildung) Serumreduktion.

In den Fluoreszenzaufnahmen zeigte sich eine zytoplasmatische und vesikuläre Lokalisation von Adam8 mit einer schwachen membranständigen Färbung. Die Darstellung erfolgte hier als Magenta dem Farbspektrum von Cy3 entsprechend. In Zellen unter Normalbedingungen konnte eine spontane Zilienbildung detektiert werden, nachgewiesen durch die Anfärbung des zilienspezifischen Proteins Arl13b. Die Reduktion der Serumkonzentration führte zu einer Verdoppelung des Anteils zilientragender Zellen (Abbildung 10B).

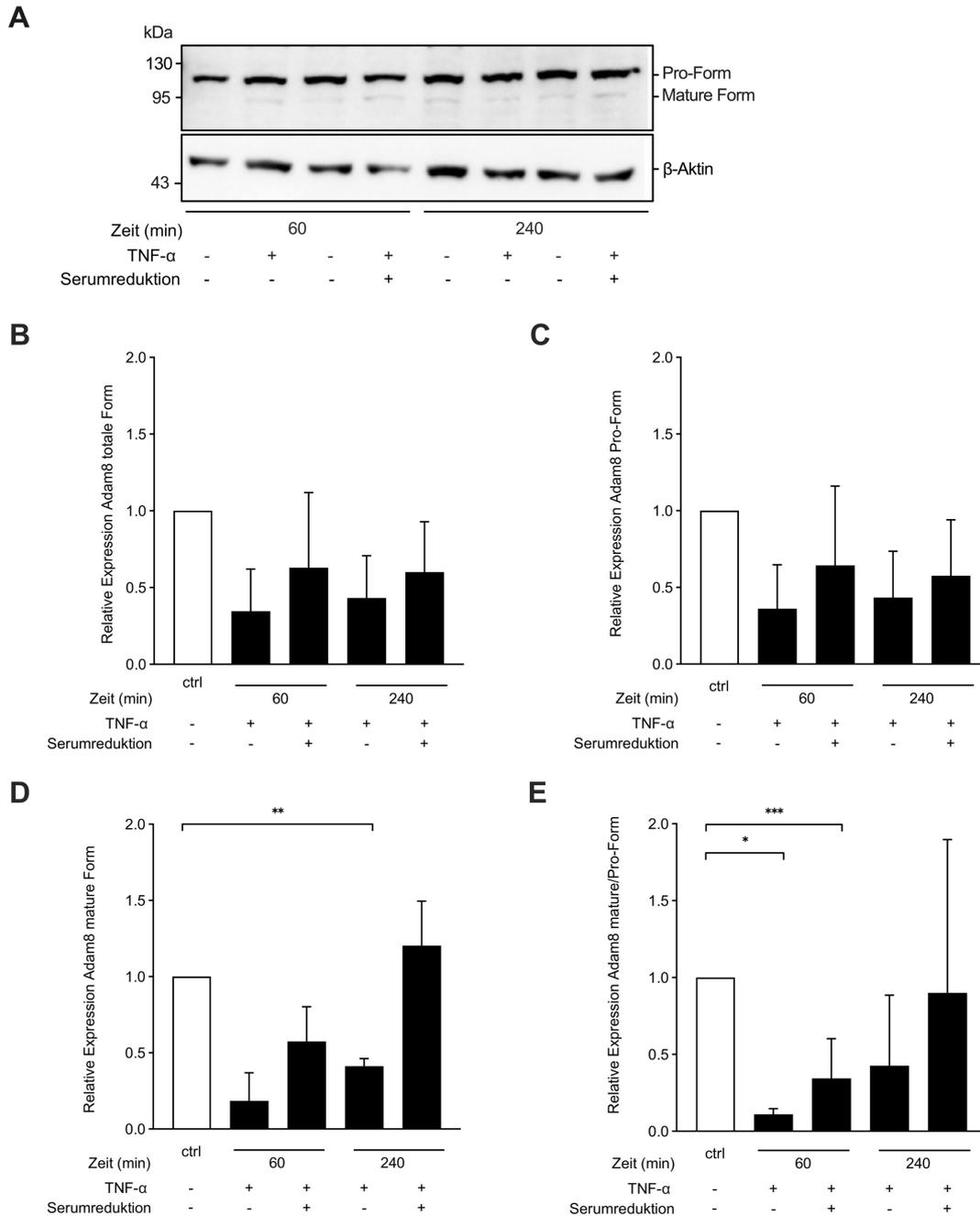
Murines Adam8 liegt membranassoziiert in drei verschiedenen Varianten vor, die anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichts als Banden auf den Western blot-Membranen identifiziert werden können: die Pro-Form bei 110 kDa, die mature/aktive Form bei 90 kDa (nach autokatalytischer Abspaltung der inhibitorischen Prodomäne) und die remnant Form bei 60 kDa (nach Abspaltung der löslichen Ektodomäne). IMCD3-Zellen zeigten eine deutliche Expression der Pro-Form und der maturen Form, wobei keine remnant Form nachweisbar war. Generell lag eine 8-fach höhere Expression der Pro-Form vor. Eine entzündliche Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte in den ersten 240 Minuten zu einer tendenziellen Abnahme der Pro-Form und der maturen Form (Abbildung 11C, D). Nach 600-minütiger Entzündungsstimulation kam es zu einer geringen, aber signifikanten ( $p < 0,001$ ) Abnahme der Pro-Form (Abbildung 11C). Ein Maß für eine mögliche Aktivierung von Adam8 ist die Maturierung, die über das Verhältnis der maturen Form und Pro-Form bestimmt werden kann. Diese zeigte unter den untersuchten Bedingungen keine Veränderung (Abbildung 11E). Nach längeren Stimulationszeiträumen in serumfreien Medium zeigten die Proteinexpressionswerte eine generell höhere Variabilität, so dass für die Zeitpunkte 360 und 600 Minuten keine eindeutigen Aussagen möglich sind. Aufgrund dessen wurden für den Vergleich zwischen Zellen mit und ohne Zilienausbildung die Zeitpunkte 60 und 240 Minuten gewählt.

Nicht nur eine entzündliche Stimulation mit TNF- $\alpha$ , auch eine zusätzliche Serumreduktion bzw. Zilieninduktion führte in den ersten 240 Minuten zu einer tendenziellen Abnahme der Pro-Form und maturen Form (Abbildung 12C, D). Eine entzündliche Stimulation und zusätzliche Serumreduktion bzw. Zilieninduktion führte im Vergleich zur reinen entzündlichen Stimulation zu einer geringeren Abnahme der Pro-Form und maturen Form. Nach 240-minütiger entzündlicher Stimulation und gleichzeitiger Serumreduktion bzw. Zilieninduktion kam es zu einer Zunahme der maturen Form (Abbildung 12D). Insgesamt zeigte sich eine Abnahme der Maturierung. Signifikant war die Abnahme nach 60-minütiger Entzündungsstimulation mit ( $p < 0,001$ ) und ohne ( $p < 0,05$ ) Serumreduktion bzw. Zilieninduktion (Abbildung 12E).



**Abbildung 11 Adam8 Expression nach Entzündungsstimulation mit TNF- $\alpha$**

IMCD3 Zellen wurden für 60, 240, 360 und 600 Minuten mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden. Die Proteinmengen der Zelllysate wurden mittels BCA-Assay bestimmt und gleiche Proteinmengen pro Probe auf eine SDS-Page aufgetragen. Die Detektion der Adam8 Proteinexpression im Western blot erfolgte durch die Inkubation mit einem rabbit anti-mouse Adam8 (1  $\mu$ g/ml) Primärantikörper gefolgt von einem anti-rabbit IgG (0,025  $\mu$ g/ml) als Sekundärantikörper und anschließender Detektion mittels Elektrochemilumineszenz. Als Ladekontrolle fungierte  $\beta$ -Aktin (0,67  $\mu$ g/ml). Die Quantifizierung der Bandenstärken erfolgte mittels Densitometrie. Es erfolgte eine Normalisierung zur jeweiligen Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin. A: Exemplarischer Western blot. B – E: Graphische Darstellung der quantifizierten Adam8 Proteinexpressionen. Die Daten sind als Mittelwerte + SD dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-Test zur unstimulierten Kontrolle (=1). Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). ctrl = unstimulierte Kontrolle.

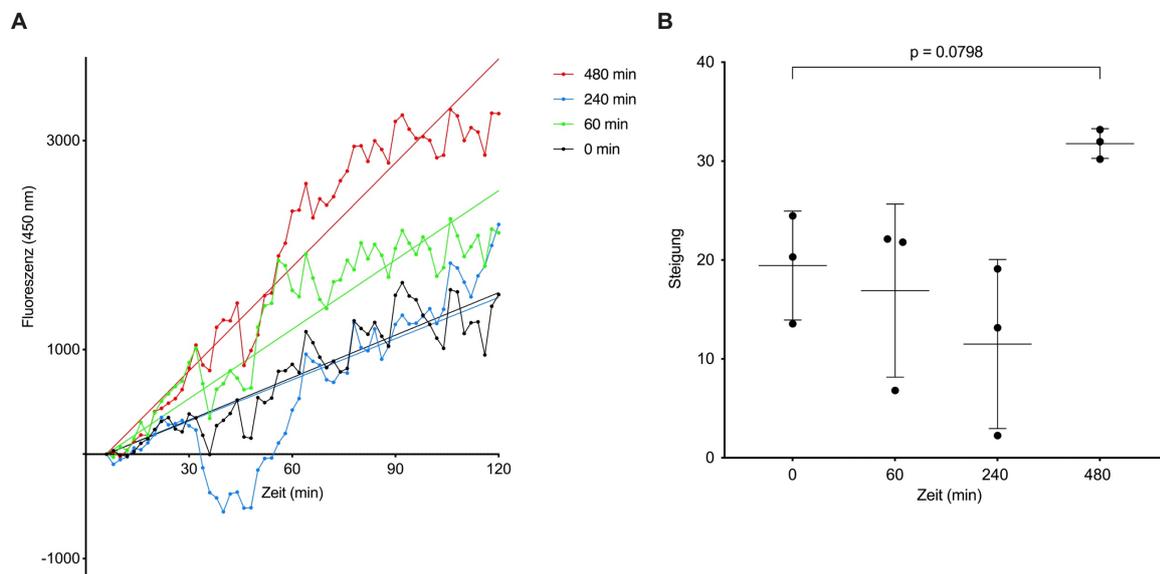


**Abbildung 12 Adam8 Expression nach Zilieninduktion und Entzündungsstimulation mit TNF- $\alpha$**

Zur Demonstration physiologischer Prozesse in der Niere wurden in IMCD3 Zellen Zilien induziert. 24 h wurde den Zellen Serum entzogen. Zusätzlich wurden die Zellen über 60 und 240 Minuten mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden. Die Proteinmengen der Zelllysate wurden mittels BCA-Assay bestimmt und zur Trennung auf eine SDS-Page aufgetragen. Die Detektion der Adam8 Proteinexpression im Western blot erfolgte durch die Inkubation mit einem rabbit anti-mouse Adam8 (1  $\mu$ g/ml) Primärantikörper gefolgt von einem anti-rabbit IgG (0,025  $\mu$ g/ml) als Sekundärantikörper und anschließender Detektion mittels Elektrochemilumineszenz. Als Ladekontrolle fungierte  $\beta$ -Aktin (0,67  $\mu$ g/ml). Die Quantifizierung der Bandenstärken erfolgte mittels Densitometrie. Es erfolgte eine Normalisierung zur Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin. A: Exemplarischer Western blot. B – E: Graphische Darstellung der quantifizierten Adam8 Proteinexpressionen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-Test zur unstimulierten Kontrolle (=1). Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). ctrl = unstimulierte Kontrolle.

## 4.2 Aktivität von Adam8 im extrazellulären Raum

Die Western blot Analyse erlaubt eine Aussage über die zell-assoziierte Expression von Adam8 und den Maturierungsprozess, ist aber kein direktes Maß für die proteolytische Aktivität. Adam8 kann sowohl als aktive, lösliche Ektodomäne als auch auf Exosomen freigesetzt werden. Um die extrazelluläre proteolytische Aktivität von Adam8 beurteilen zu können, wurde eine PrAMA-Messung durchgeführt. Grundlage dieser Versuchsreihe waren IMCD-Zellkulturen, die -äquivalent zu den Regulationsversuchen – für 60, 240 und 480 min mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden. Eine Stimulation für 480 Minuten führte zu einem deutlichen Anstieg der Adam8-Aktivität ( $p = 0.0798$ ). Kürzere Stimulationen zeigten eine hohe Varianz, mit einer Abnahme der Aktivität in einem Datensatz nach 60 und 240 Minuten, wohingegen die anderen Datensätze eine eher gleichbleibende Aktivität zeigten (Abbildung 13).

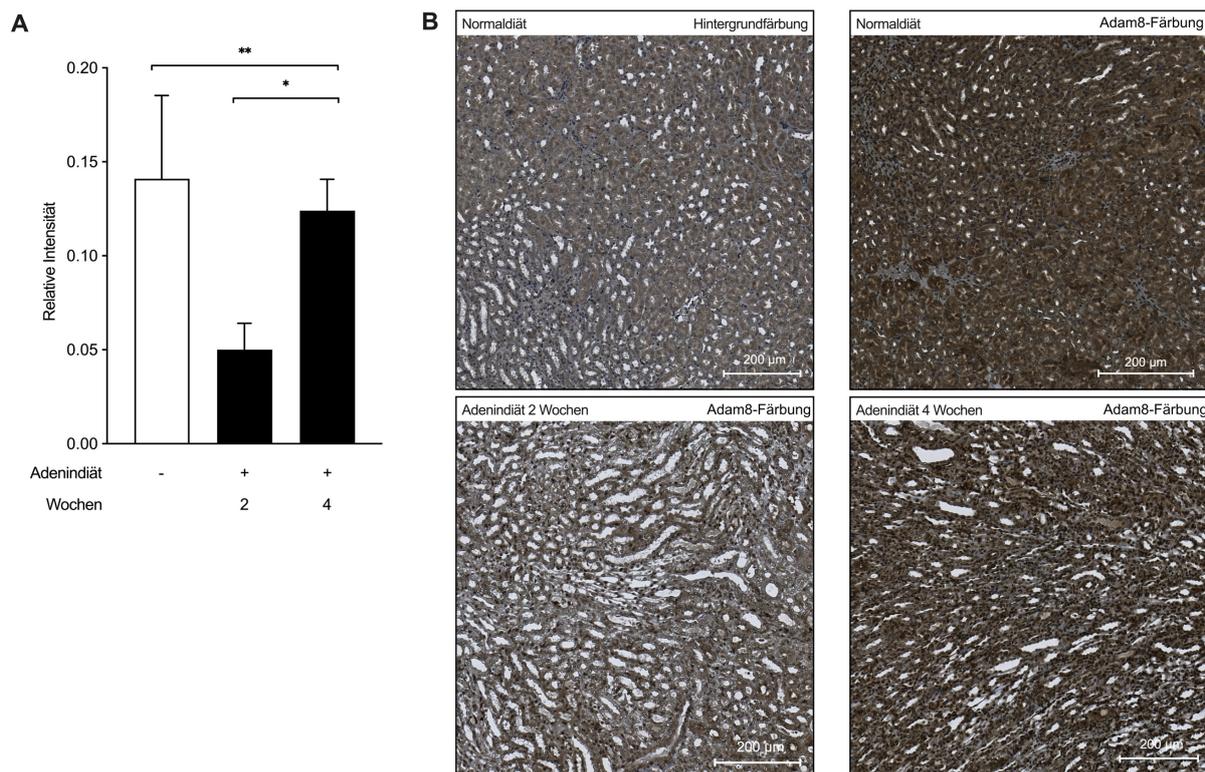


**Abbildung 13 PrAMA-Aktivitätsmessungen von Adam8**

IMCD-3 wurden für 30, 60, 120, 240, und 480 min mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert. Die Überstände wurden als Proben für die darauffolgende PrAMA-Messung verwendet. Als FRET-Substrat diente das Polypeptid PEPDab013. Mittels Multimode-Mikroplattenlesegerät Fluostar BMG Optima wurden die Fluoreszenzeinheiten alle zwei Minuten für 240 Minuten bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Die Daten der Messungen wurden als Differenz zwischen Messwert und Negativkontrolle berechnet. Die Auftragung der Ergebnisse erfolgte als delta-Fluoreszenz über die Zeit. Es wurde eine lineare Regression der Graphen erstellt. A: exemplarische Änderung der Fluoreszenzintensität. B: Graphische Darstellung der berechnete Steigungen. Quantitative Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA (Dunnett's-Test).

### **4.3 Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Adam8**

Die Analyse der zell-assoziierten Expression von Adam8 (4.1) zeigte die Tendenz einer negativen Korrelation zwischen der zellassoziierten Expression der Protease und einer Entzündungsstimulation. Die proteolytische Aktivität von Adam8 im Überstand zeigte eine positive Korrelation zwischen der Aktivität der Protease und der Dauer der Entzündungsstimulation. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine positive Korrelation mit dem Schweregrad der Nierenerkrankung nachgewiesen werden (Abbildung 6). Um einen näheren Aufschluss über die Lokalisation einer möglichen Veränderung der Adam8-Expression in der Niere sowie Hinweise auf die Krankheitsbeteiligung zu gewinnen, wurden immunhistochemische Färbungen an Mausnieren durchgeführt. Hierzu wurden Mausnieren nach normaler Diät und Mausnieren nach einer Adenindiät als Modell einer chronischen Niereninsuffizienz miteinander verglichen. Für die Detektion von Adam8 wurde zunächst der polyklonale rabbit anti-mouse Antikörper verwendet, welcher bereits in früheren Studien zur spezifischen Detektion von ADAM8 in immunhistologischen Färbungen des Herzens und der Carotiden eingesetzt wurde (Schick et al., 2019). Nach zweiwöchiger Adenin-Diät wurde eine signifikante Abnahme der Adam8-Proteinexpression im Nierengewebe beobachtet (Abbildung 14). Gleichzeitig war eine deutliche Atrophie der Tubulus Zellen und des Interstitiums als Zeichen der adenininduzierten Nephropathie erkennbar. Interessanterweise zeigten Tiere mit einer Adenin-Diät für vier Wochen keinen Unterschied in der Adam8-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren mit Normaldiät. Aufgrund der diffusen Verteilung der Färbung war eine spezifische Lokalisation zu bestimmten Arealen nicht möglich.

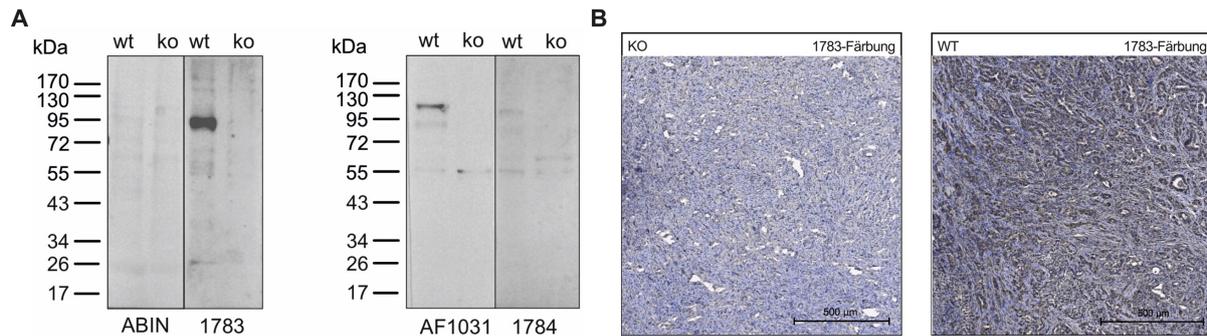


**Abbildung 14 Adam8 Expression in Mausnieren nach Adenin-induzierter Nephropathie**

Mausnieren wurden für Untersuchungen der Lokalisation von Adam8 immunhistochemisch gefärbt. Unterschieden wurde zwischen Mäusen, die normal gefüttert wurden und zuvor eine zwei- oder vierwöchige Adenindiät erhalten haben. Für die Hintergrundfärbungen wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper (5 µg/ml) verwendet. Für die Färbung von Adam8 wurde der gekaufte ABIN-Antikörper (5 µg/ml) verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein goat anti-rabbit IgG. Für die Detektion der Antikörper erfolgte nach Inkubation mit einem Avidin-Enzymkomplex eine DAB-Färbung und Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Digitalisierung der Schnitte erfolgte mit dem ZEISS AxioScan. A: Graphische Darstellung der Adam8-Färbeintensität als Maß für die Adam8 Expression. Die Intensitäten der Adam8-Färbungen wurden mit einem automatischen Messprogramm quantifiziert. Für die IgG-Kontrollfärbungen wurde ein Mittelwert berechnet, welcher von den Werten der Adam8-Färbung subtrahiert wurde. Die berechneten Mittelwerte +/- SD wurden in Graphen übersetzt und mit der one-way-Anova Varianzanalyse verglichen. Signifikante Unterschiede wurden durch Sternchen gekennzeichnet (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001). B: Exemplarische Darstellung digitalisierter, muriner Nierenschnitte nach normaler Diät bzw. zwei- oder vierwöchiger Adenindiät mit einer unspezifischen IgG-Hintergrundfärbung und Adam8-Färbungen.

Dies könnte möglicherweise auf einer geringeren Sensitivität des genutzten Antikörpers bzw. seiner Anlagerung an die Ektodomäne basieren. Daher wurden mit Unterstützung der AG Martin Jung (UdS) eigene Antikörper generiert, die nicht gegen die extrazellulären Bereiche, sondern gegen die intrazellulären Domänen von murinem (1783) bzw. humanem (1784) Adam8 gerichtet sind. Die entsprechend produzierten Antikörper wurden durch die technische Assistentin Nina Schnellbach (Arbeitsgruppe Yildiz) aus den Kaninchenseren aufgereinigt. Für eine Sensitivitäts- und Spezifitätskontrolle wurde dieser Antikörper mit den kommerziellen Antikörpern im Western blot verglichen und gleiche Expositionszeiten gewählt. Der gegen Adam8 gerichtete Antikörper zeigte in Knochenmarkszellen aus Knockout-Zellen keine Detektion von Banden, wohingegen deutliche Signale in Zellen in entsprechenden Wildtypzellen detektiert werden konnten. Dasselbe wurde für den gegen ADAM8 gerichteten Antikörper im Vergleich von MDA-MB-231 Zellen mit und ohne ADAM8-Knockout festgestellt.

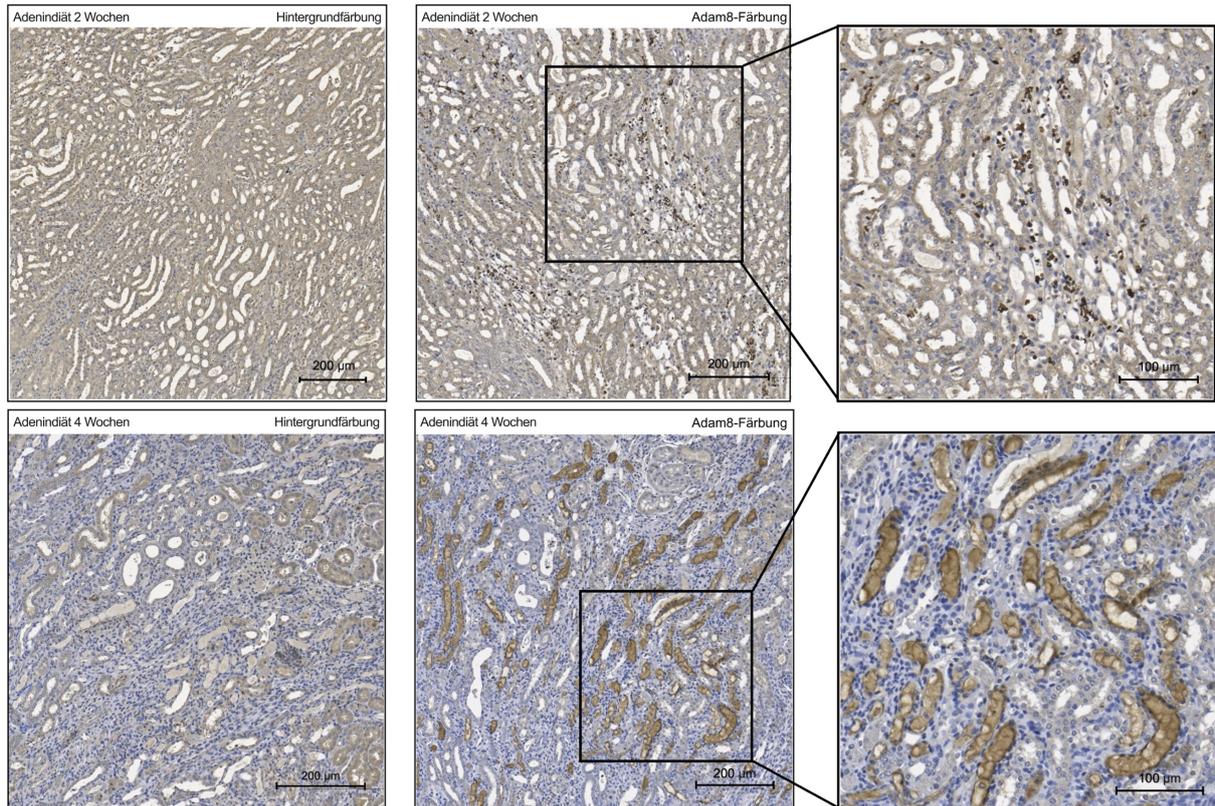
Der Nachweis durch die kommerziellen Antikörper fiel in beiden Fällen deutlich schwächer aus (Abbildung 15A). Um die Spezifität des 1783-Antikörpers zusätzlich zu testen, wurden Färbungen an histologischen Präparaten von Wildtyp- und Knockout-Pankreasschnitte verglichen. Pankreasschnitte wurden gewählt, da hier basal eine hohe Expression vorliegt, welche bei Erkrankungen, wie z.B. Tumoren, zusätzlich gesteigert wird. Es ist zu sehen, dass in den Knockout-Schnitten nur die Gegenfärbung zu erkennen war, wohingegen in Wildtyp-Schnitten eine deutliche Adam8-Expression detektiert werden konnte (Abbildung 15B).



**Abbildung 15 Spezifitätskontrolle der Adam8-Antikörper**

Mit Unterstützung der AG Martin Jung (UdS) wurden eigene Antikörper generiert, die nicht gegen die extrazellulären Bereiche, sondern gegen die intrazellulären Domänen von murinem (1783) bzw. humanem (1784) Adam8 gerichtet sind. Die entsprechend produzierten Antikörper wurden durch die technische Assistentin Nina Schnellbach (Arbeitsgruppe Yildiz) aus den Kaninchenseren aufgereinigt. Für die Testung der Antikörper gegen murines Adam8 wurden Knochenmarkszellen verwendet. Für die Testung der Antikörper gegen humanes ADAM8 wurden MDA-MB-231 Zellen verwendet. A: Western blots zur Darstellung der verschiedenen Adam8-Antikörper. Für eine Sensitivitäts- und Spezifitätskontrolle wurden die eigens hergestellten Antikörper (1783, 1784) mit den kommerziellen Antikörpern (ABIN, AF1031) im Western blot verglichen und gleiche Expositionszeiten gewählt. B: Exemplarische Darstellung jeweils eines digitalisierten, murinen KO- und WT-Pankreasschnittes. Für die Färbung wurde der eigens hergestellte 1783-Antikörper gegen murines Adam8 als Primärintikörper verwendet. Als Sekundärintikörper diente ein goat anti-rabbit IgG. Für die Detektion des Antikörpers erfolgte nach Inkubation mit einem Avidin-Enzymkomplex eine DAB-Färbung und Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Digitalisierung der Schnitte erfolgte mit dem ZEISS AxioScan. KO: Knockout; WT: Wildtyp.

Mit dem Ziel, genauere Aussagen über die Lokalisation der Entzündungsprozesse und Adam8-Expression in der Niere zu treffen, wurden die Färbungen der Mausnieren daher mit dem 1783-Antikörper wiederholt. In der frühen Phase der adenininduzierten Nephropathie, also nach zweiwöchiger Adenindiät, zeigte sich ein Influx von Entzündungszellen, in welchen Adam8 exprimiert wurde. In der späten Phase der adenininduzierten Nephropathie, also nach vierwöchiger Adenindiät, zeigte sich eine Expression von Adam8 im tubulären Bereich (Abbildung 16).



**Abbildung 16 Adam8-Expression in Mausnieren nach Adenin-induzierter Nephropathie mit optimiertem Antikörper**

Für Untersuchungen der genauen Lokalisation von Adam8 wurden die immunhistochemischen Färbungen der Mausnieren mit dem eigens hergestellten Antikörper wiederholt. Unterschieden wurde zwischen Mäusen, die normal gefüttert wurden und zuvor eine zwei- oder vierwöchige Adenindiät erhalten haben. Für die Hintergrundfärbungen wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper (5 µg/ml) als Primärintikörper verwendet. Für die Färbung von Adam8 wurde der eigens hergestellte 1783-Antikörper gegen murines Adam8 (5 µg/ml) als Primärintikörper verwendet. Als Sekundärintikörper diente ein goat anti-rabbit IgG. Für die Detektion der Antikörper erfolgte nach Inkubation mit einem Avidin-Enzymkomplex eine DAB-Färbung und Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Digitalisierung der Schnitte erfolgte mit dem ZEISS AxioScan.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die basale Proteinexpression, die Regulation bei Entzündung und die Aktivität von Adam8 in der Niere untersucht. Erhöhte ADAM8-Level im Serum nierenkranker Patienten lieferten erstmalige Anhaltspunkte für einen möglichen Zusammenhang zwischen entzündlichen Prozessen in der Niere und der Regulation von ADAM8. Anhand der Untersuchung der zellassozierten Expression in IMCD3 Zellen wurde eine tendenzielle Abnahme der Pro-Form und maturen Form nach entzündlicher Stimulation beobachtet. Eine zusätzliche Induktion primärer Zilien bewirkte trotz initialer Zunahme der maturen Form eine signifikante Abnahme der zellassozierten Maturierung als Maß für eine mögliche Aktivierung und Freisetzung von Adam8. Das Aktivitätslevel von Adam8 im zellfreien Überstand stieg nach einer entzündlichen Stimulation über 480 Minuten deutlich an. Immunhistochemisch zeigte sich in der frühen Phase der adenininduzierten Nephropathie ein Influx von Entzündungszellen, in denen Adam8 exprimiert wurde. In der späten Phase der adenininduzierten Nephropathie zeigte sich eine Expression von Adam8 im tubulären Bereich.

Für die Untersuchung der zellassozierten Expression wurden IMCD3 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich nicht um Zellen des distalen oder proximalen Tubulus, sondern um adhärenzte Epithelzellen aus dem Sammelrohr. Neben den IMCD3-Zellen hätten *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) Zellen und *Lilly Laboratories Culture-Porcine Kidney 1* (LLC-PK1) Zellen verwendet werden können (Raychowdhury et al., 2005; Rodriguez-Boulan et al., 2005). Bei diesen Zellen ist jedoch die Differenzierung und auch die physiologische Funktion nicht eindeutig belegt und häufig widersprüchlich (Lechner et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit wurden daher IMCD3 Zellen gewählt, da dieser aufgrund ihrer verbreiteten Nutzung zu Studien an primären Zilien sehr gut charakterisiert wurden (Sun et al., 2019). Jede Epithelzelle in den Organen von Säugetieren wie z.B. der Niere, Leber oder Pankreas trägt eine einzelne, primäre Zilie. Die Funktion der Primärzilie kann als mechanosensitiver Sensor beschrieben werden, der extrazelluläre Signale an das Zellinnere kommuniziert (Sun et al., 2019). Eine Auslenkung der Zilie auf Nierenepithelzellen führte beispielsweise zu einem kurzfristigen Kalziumeinstrom (Praetorius, 2009). Dass Funktionsstörungen in der Ziliogenese zu Ziliopathien und somit zum Voranschreiten von Zystenbildungen und akutem Nierenversagen führen können, unterstreicht die fundamentale Rolle der Primärzilie in physiologischen sowie pathophysiologischen Abläufen (Bai et al., 2022). Um die Zellkulturbedingungen in dieser Studie möglichst physiologisch zu gestalten, wurde für die Induktion einer Zilienausbildung das Serum der Zellkultur der IMCD3 Zellen auf 0,2 % FKS reduziert (Sun et al., 2019). Im tubulären System und auch final im Sammelrohr sind die Epithelzellen einem Flüssigkeitsstrom ausgesetzt. Hierdurch entstehen Scherkräfte, welche beispielsweise auch zur Auslenkung der

Zilien führen. Für weitere Untersuchungen mit IMCD3-Zellen könnten diese Bedingungen beispielsweise durch die Anwendung eines Fluss-Kammersystems optimiert werden.

Die Zilienbildung sowie Expression von Adam8 in IMCD3 Zellen konnte in dieser Studie durch immunzytochemische Färbungen kontrolliert und untersucht werden. ADAM8 ist ein Transmembranmolekül, das aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt ist. Drei Formen werden unterschieden: die Pro-Form, die aktive (mature) und die remnant-Form. Differenziert werden können die drei Formen im Western blot anhand unterschiedlicher Proteinmassen (Koller et al., 2009). In dieser Arbeit zeigte sich im Western blot eine deutliche Expression der Pro-Form und eine schwächere Expression der maturen Form. Eine remnant Form ließ sich nicht nachweisen. Die zusätzliche Induktion primärer Zilien bewirkte eine Zunahme der maturen Form. Es ist somit möglich, dass die beobachteten Veränderungen sich auch aus einer Überlagerung der Effekte durch Zilienbildung und Zellstress durch Serumentzug ergeben. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mögliche Ursachen für die Veränderungen zu differenzieren.

Wird in einem weiteren autokatalytischen Prozess die Metalloprotease-Domäne abgespalten, entsteht die membrangebundene remnant Form und eine lösliche, aktive Ektodomäne. In früheren Studien wurde gezeigt, dass lösliches ADAM8 weiterhin aktiv war (Amour et al., 2002; Schlomann et al., 2015). Darüber hinaus kann ADAM8 als membrangebundene Form auf Exosomen freigesetzt werden. Da in dieser Studie eine tendenzielle Abnahme der zellassoziierten Pro-Form und maturen Form gemessen wurde, muss Adam8 entweder direkt nach Ektodomänenfreisetzung abgebaut oder in geringeren Mengen produziert worden sein. Ein Hinweis für eine schnellere oder verstärkte Freisetzung wäre eine höhere Aktivität von Adam8 im Überstand. Diese Freisetzung könnte entweder als lösliche Ektodomäne oder als Exosomen-gebundenes Adam8 erfolgen. Für die Beurteilung der extrazellulären proteolytischen Aktivität von ADAM8 wurde eine PrAMA-Messung durchgeführt. Dabei wurde die Fluoreszenz gemessen, die durch Peptidfragmente des PEPDab013-Substrates, gespalten von Adam8, freigesetzt wurde. Nach entzündlicher Stimulation über 480 Minuten konnte eine eindeutige Aktivitätssteigerung festgestellt werden. Kürzere Stimulationen zeigten eine hohe Varianz. Es wäre denkbar, dass nach 480 Minuten eine einheitliche Freisetzung von Adam8 auf Exosomen erfolgte. Zuvor könnte die Freisetzung unterschiedlich reguliert worden sein. Um diese Spekulationen zu überprüfen, sollte in weiteren Studien eine Exosomenisolation und ein anschließender Nachweis von Adam8 mit Western blots durchgeführt werden. Zusätzliche Zeitraffer-Analysen mit Adam8-Markierungen könnten Aufschlüsse zu der Regulierung von Exosomen-gebundenem-Adam8 sowie einer möglichen

Internalisierung mit anschließender Degradation in Abhängigkeit von der Entzündungsdauer geben.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisation der Entzündungsprozesse und Adam8-Expression in der Niere zeigten in der frühen Phase der adenininduzierten Nephropathie einen Influx von Entzündungszellen, in denen Adam8 exprimiert wurde. In der späten Phase der adenininduzierten Nephropathie zeigte sich eine Expression von Adam8 im tubulären Bereich. Die ersten Schnitte wurden mit dem polyklonalen rabbit anti-mouse Antikörper als Primärantikörper gefärbt. Dieser zeigte in vorherigen Studien eine spezifische Bindung an Adam8 in histologischen, murinen Präparaten (Schick et al., 2019). Diese hohe Spezifität und Trennschärfe konnte in den in dieser Arbeit verwendeten Organen nicht bestätigt werden. Deshalb wurden die murinen Nierenfärbungen mit dem eigens hergestellten Antikörper, deren spezifische Bindung in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, wiederholt. Die Generierung der eigenen Antikörper basierte auf der Annahme, dass der zuvor verwendete Antikörper möglicherweise unspezifisch an die Ektodomäne bindet. Es bleibt jedoch möglich, dass die diffusen Färbungen auf die Gewebsbeschaffenheit der histologischen Schnitte zurückzuführen sind und nicht auf die geringe Sensitivität und Spezifität des Antikörpers. Zukünftige Studien sollten daher immunhistochemische Färbungen an verschiedenen Gewebeproben durchführen. Weitere immunhistochemische Untersuchungen wären nicht nur für die Differenzierung der Antikörperspezifität, sondern auch für eine Zelldifferenzierung interessant. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zeigten in der frühen Phase der adenininduzierten Nephropathie einen Adam8-abhängigen Leukozyteninflux. Dieses Phänomen konnte auch in früheren Studien beobachtet werden: ADAM8 förderte die Anreicherung von Leukozyten in Alveolen und trug somit zum Voranschreiten akuter Lungenentzündungen bei (Dreymueller et al., 2017). Aufgrund der Zellgröße wäre es möglich, dass es sich entweder um neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten handelte, jedoch sollte diese Annahme überprüft werden. Dafür könnten Co-Färbungen gegen Adam8 durchgeführt und zellspezifische Marker eingesetzt werden. Dies könnte sowohl immunhistologisch oder durchflusszytometrisch nach Gewebedesintegration analysiert werden.

In der späten Phase der adenininduzierten Nephropathie zeigte sich eine Expression von Adam8 im tubulären Bereich. In früheren Studien wurde ebenfalls eine erhöhte ADAM8-Expression in verschiedenen chronischen Erkrankungen wie beispielsweise der Lunge und Leber festgestellt (Awan et al., 2021; King et al., 2004; Polverino et al., 2018). Es wäre denkbar, dass die erhöhte Expression von Adam8 im tubulären Bereich nicht nur auf die Entzündung und die fibrotischen Umbauprozesse in der Niere selbst zurückzuführen sind,

sondern auch auf Veränderungen in den Gefäßen. Mit 20 % des Herz-Zeit-Volumens sind die Nieren im Verhältnis zu ihrem Gewicht die bestdurchbluteten Organe des Menschen. Gefäßveränderungen haben dementsprechend einen großen Einfluss auf das Nierengewebe. Die arterielle Hypertonie als kardiovaskuläre Erkrankung ist mit 23 % die häufigste Ursache für chronische Nierenschäden (Titze et al., 2015). Auch die Expression von ADAM8 war mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose sowohl im humanen als auch murinen Modellsystem assoziiert (Schick et al., 2019). Es könnte daher in Betracht gezogen werden, dass ADAM8 in chronischen Nierenerkrankungen eher eine passive Rolle spielt und die abhängige Regulation durch die gleichzeitig ablaufenden Veränderungen im Gefäßsystem zu erklären sind. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Zusammenhang zwischen ADAM8, den entzündlichen Prozessen im Nierengewebe sowie den ablaufenden Gefäßveränderungen zu verstehen. Interessant dafür wären zellbasierte Experimente in einem Flusskammersystem. Auch könnten immunhistochemische Färbungen mit zellspezifischen Markern weitere Ergebnisse zur genauen Lokalisation von ADAM8 im Nierengewebe liefern. So wäre zum Beispiel die Differenzierung zwischen der Expression in Nierenparenchymzellen und Endothelzellen möglich. Ob eine Herunterregulierung von ADAM8 zu einem verzögerten Krankheitsprozess in der Niere führt, könnte mit ADAM8 KO- und WT-Tiermodellen untersucht werden. Vorstellbar wäre dies mithilfe eines transgenetischen *cyclization recombination locus of crossing over of P1- system* (CreloxP-System), bei dem transgenetische KO-Mäuse hergestellt werden. Mit diesem System konnte ADAM8 beispielsweise für Untersuchungen in entzündlichen Knochenumbauprozessen gezielt ausgeschaltet werden (Ishizuka et al., 2011).

## 6 Literaturverzeichnis

1. ALI BH, AL-SALAM S, AL ZA'ABI M, WALY MI, RAMKUMAR A, BEEGAM S, AL-LAWATI I, ADHAM SA, NEMMAR A (2013) New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: comparison with rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:384-393
2. AMOUR A, KNIGHT CG, ENGLISH WR, WEBSTER A, SLOCOMBE PM, KNAUPER V, DOCHERTY AJ, BECHERER JD, BLOBEL CP, MURPHY G (2002) The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett* 524:154-158
3. ANNES JP, MUNGER JS, RIFKIN DB (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116:217-224
4. AWAN T, BABENDREYER A, WOZNAK J, ALVI AM, STERZER V, COOK L, BARTSCH JW, LIEDTKE C, YILDIZ D, LUDWIG A (2021) Expression of the Metalloproteinase ADAM8 Is Upregulated in Liver Inflammation Models and Enhances Cytokine Release In Vitro. *Mediators Inflamm* 2021:6665028
5. BAI Y, WEI C, LI P, SUN X, CAI G, CHEN X, HONG Q (2022) Primary cilium in kidney development, function and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:952055
6. BODE W, GOMIS-RUTH FX, STOCKLER W (1993) Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331:134-140
7. BOOR P, OSTENDORF T, FLOEGE J (2010) Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6:643-656
8. BULOW RD, BOOR P (2019) Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem* 67:643-661
9. CARVAJAL G, RODRIGUEZ-VITA J, RODRIGUES-DIEZ R, SANCHEZ-LOPEZ E, RUPEREZ M, CARTIER C, ESTEBAN V, ORTIZ A, EGIDO J, MEZZANO SA, RUIZ-ORTEGA M (2008) Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int* 74:585-595
10. CHENG S, LOVETT DH (2003) Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 162:1937-1949
11. DOMINGUEZ-LUIS M, LAMANA A, VAZQUEZ J, GARCIA-NAVAS R, MOLLINEDO F, SANCHEZ-MADRID F, DIAZ-GONZALEZ F, URZAINQUI A (2011) The metalloprotease ADAM8 is associated with and regulates the function of the adhesion receptor PSGL-1 through ERM proteins. *Eur J Immunol* 41:3436-3442
12. DREYMUELLER D, PRUESSMEYER J, GROTH E, LUDWIG A (2012) The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol* 91:472-485
13. DREYMUELLER D, PRUESSMEYER J, SCHUMACHER J, FELLENDORF S, HESS FM, SEIFERT A, BABENDREYER A, BARTSCH JW, LUDWIG A (2017) The metalloproteinase ADAM8 promotes leukocyte recruitment in vitro and in acute lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 313:L602-L614
14. EDELING M, RAGI G, HUANG S, PAVENSTADT H, SUSZTAK K (2016) Developmental signalling pathways in renal fibrosis: the roles of Notch, Wnt and Hedgehog. *Nat Rev Nephrol* 12:426-439
15. EDWARDS DR, HANDSLEY MM, PENNINGTON CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:258-289
16. ENGLE SJ, STOCKELMAN MG, CHEN J, BOIVIN G, YUM MN, DAVIES PM, YING MY, SAHOTA A, SIMMONDS HA, STAMBROOK PJ, TISCHFIELD JA (1996) Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5307-5312
17. FOURIE AM, COLES F, MORENO V, KARLSSON L (2003) Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *J Biol Chem* 278:30469-30477

18. GIEBELER N, ZIGRINO P (2016) A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel)* 8:122
19. GO AS, CHERTOW GM, FAN D, MCCULLOCH CE, HSU CY (2004) Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296-1305
20. GOMEZ-GAVIRO M, DOMINGUEZ-LUIS M, CANCHADO J, CALAFAT J, JANSSEN H, LARA-PEZZI E, FOURIE A, TUGORES A, VALENZUELA-FERNANDEZ A, MOLLINEDO F, SANCHEZ-MADRID F, DIAZ-GONZALEZ F (2007) Expression and regulation of the metalloproteinase ADAM-8 during human neutrophil pathophysiological activation and its catalytic activity on L-selectin shedding. *J Immunol* 178:8053-8063
21. GROUP. KDIGOKCW (2013) KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter, Suppl* 3:1-150
22. HILL NR, FATOBA ST, OKE JL, HIRST JA, O'CALLAGHAN CA, LASSERSON DS, HOBBS FD (2016) Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11:e0158765
23. ISHIZUKA H, GARCIA-PALACIOS V, LU G, SUBLER MA, ZHANG H, BOYKIN CS, CHOI SJ, ZHAO L, PATRENE K, GALSON DL, BLAIR HC, HADI TM, WINDLE JJ, KURIHARA N, ROODMAN GD (2011) ADAM8 enhances osteoclast precursor fusion and osteoclast formation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 26:169-181
24. KING NE, ZIMMERMANN N, POPE SM, FULKERSON PC, NIKOLAIDIS NM, MISHRA A, WITTE DP, ROTHENBERG ME (2004) Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 8 in experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:257-265
25. KOLLER G, SCHLOMANN U, GOLFI P, FERDOUS T, NAUS S, BARTSCH JW (2009) ADAM8/MS2/CD156, an emerging drug target in the treatment of inflammatory and invasive pathologies. *Curr Pharm Des* 15:2272-2281
26. LECHNER C, MONNING U, REICHEL A, FRICKER G (2021) Potential and Limits of Kidney Cells for Evaluation of Renal Excretion. *Pharmaceuticals (Basel)* 14
27. LIU X (2008) Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:935-944
28. LIU Y (2010) New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21:212-222
29. MILLER MA, BARKAL L, JENG K, HERRLICH A, MOSS M, GRIFFITH LG, LAUFFENBURGER DA (2011) Proteolytic Activity Matrix Analysis (PrAMA) for simultaneous determination of multiple protease activities. *Integr Biol (Camb)* 3:422-438
30. MOSES HL, ROBERTS AB, DERYNCK R (2016) The Discovery and Early Days of TGF-beta: A Historical Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8
31. NAUS S, REIPSCHLAGER S, WILDEBOER D, LICHTENTHALER SF, MITTERREITER S, GUAN Z, MOSS ML, BARTSCH JW (2006) Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin ADAM8. *Biol Chem* 387:337-346
32. OKUDA S, LANGUINO LR, RUOSLAHTI E, BORDER WA (1990) Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 86:453-462
33. PERLMAN RL, FINKELSTEIN FO, LIU L, ROYS E, KISER M, EISELE G, BURROWS-HUDSON S, MESSANA JM, LEVIN N, RAJAGOPALAN S, PORT FK, WOLFE RA, SARAN R (2005) Quality of life in chronic kidney disease (CKD): a cross-sectional analysis in the Renal Research Institute-CKD study. *Am J Kidney Dis* 45:658-666
34. POLVERINO F, ROJAS-QUINTERO J, WANG X, PETERSEN H, ZHANG L, GAI X, HIGHAM A, ZHANG D, GUPTA K, ROUT A, YAMBAYEV I, PINTO-PLATA V, SHOLL LM, CUNOOSAMY D, CELLI BR, GOLDRING J, SINGH D, TESFAIGZI Y, WEDZICHA

- J, OLSSON H, OWEN CA (2018) A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-8: A Novel Protective Proteinase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 198:1254-1267
35. PRAETORIUS HA (2009) Measuring cilium-induced Ca<sup>2+</sup> increases in cultured renal epithelia. *Methods Cell Biol* 91:299-313
  36. RAYCHOWDHURY MK, MCLAUGHLIN M, RAMOS AJ, MONTALBETTI N, BOULEY R, AUSIELLO DA, CANTIELLO HF (2005) Characterization of single channel currents from primary cilia of renal epithelial cells. *J Biol Chem* 280:34718-34722
  37. ROBERTSON IB, RIFKIN DB (2016) Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8
  38. RODRIGUEZ-BOULAN E, KREITZER G, MUSCH A (2005) Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:233-247
  39. ROMAGNOLI M, MINEVA ND, POLMEAR M, CONRAD C, SRINIVASAN S, LOUSSOUARN D, BARILLE-NION S, GEORGAKOUDI I, DAGG A, MCDERMOTT EW, DUFFY MJ, MCGOWAN PM, SCHLOMANN U, PARSONS M, BARTSCH JW, SONENSHEIN GE (2014) ADAM8 expression in invasive breast cancer promotes tumor dissemination and metastasis. *EMBO Mol Med* 6:278-294
  40. SARKOZI R, HAUSER C, NOPPERT SJ, KRONBICHLER A, PIRKLBAUER M, HALLER VM, GRILLARI J, GRILLARI-VOGLAUER R, MAYER G, SCHRAMEK H (2011) Oncostatin M is a novel inhibitor of TGF-beta1-induced matricellular protein expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:F1014-1025
  41. SCHICK D, BABENDREYER A, WOZNIAK J, AWAN T, NOELS H, LIEHN E, BARTSCH JW, VLACIL AK, GROTE K, ZAYAT R, GOETZENICH A, LUDWIG A, DREYMUELLER D (2019) Elevated expression of the metalloproteinase ADAM8 associates with vascular diseases in mice and humans. *Atherosclerosis* 286:163-171
  42. SCHLOMANN U, WILDEBOER D, WEBSTER A, ANTROPOVA O, ZEUSCHNER D, KNIGHT CG, DOCHERTY AJ, LAMBERT M, SKELTON L, JOCKUSCH H, BARTSCH JW (2002) The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* 277:48210-48219
  43. SCHLOMANN U, KOLLER G, CONRAD C, FERDOUS T, GOLFI P, GARCIA AM, HOFLING S, PARSONS M, COSTA P, SOPER R, BOSSARD M, HAGEMANN T, ROSHANI R, SEWALD N, KETCHEM RR, MOSS ML, RASMUSSEN FH, MILLER MA, LAUFFENBURGER DA, TUVESON DA, NIMSKY C, BARTSCH JW (2015) ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat Commun* 6:6175
  44. SUN S, FISHER RL, BOWSER SS, PENTECOST BT, SUI H (2019) Three-dimensional architecture of epithelial primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:9370-9379
  45. THOMPSON S, JAMES M, WIEBE N, HEMMELGARN B, MANNS B, KLARENBACH S, TONELLI M, ALBERTA KIDNEY DISEASE N (2015) Cause of Death in Patients with Reduced Kidney Function. *J Am Soc Nephrol* 26:2504-2511
  46. TITZE S, SCHMID M, KOTTGEN A, BUSCH M, FLOEGE J, WANNER C, KRONENBERG F, ECKARDT KU, INVESTIGATORS GS (2015) Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant* 30:441-451
  47. WU CF, CHIANG WC, LAI CF, CHANG FC, CHEN YT, CHOU YH, WU TH, LINN GR, LING H, WU KD, TSAI TJ, CHEN YM, DUFFIELD JS, LIN SL (2013) Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol* 182:118-131
  48. YOKOZAWA T, ZHENG PD, OURA H, KOIZUMI F (1986) Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 44:230-234
  49. YOSHIYAMA K, HIGUCHI Y, KATAOKA M, MATSUURA K, YAMAMOTO S (1997) CD156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. *Genomics* 41:56-62
  50. ZEISBERG M, NEILSON EG (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21:1819-1834

## **7 Publikationen**

Die in dieser Arbeit generierten Daten wurden noch nicht veröffentlicht. Die Daten sind die Basis für die Beantragung einer Sachbeihilfe bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

## **8 Dank**

An dieser Stelle möchte ich meinen größten Dank allen Personen aussprechen, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

An vorrangiger Stelle danke ich meiner Doktormutter, Frau Jun. Prof. Daniela Yildiz, für die Überlassung des spannenden Themas, die vielfältige Unterstützung, die hilfreichen Gedankenanstöße und Ideen sowie die gute Aufnahme in ihren Arbeitskreis. Für die gleichzeitig hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung der gesamten Arbeit, die wertvollen Erläuterungen und die produktiven Gespräche bin ich sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich den technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, vor Allem Nina Schnellbach, Maria Rieseweber und Martin Simon-Thomas, für die Arbeiten in der Zellkultur und die technische Unterstützung danken. Euch sowie allen Mitarbeitern des Arbeitskreises möchte ich für die allzeitige Hilfsbereitschaft, die vielen beantworteten Fragen und das angenehme Arbeitsklima meinen Dank aussprechen. Danke insbesondere an Guillermo, Ahmad, Alicia und Lena. Dass ich mich zu jeder Zeit wohlfühlt und auf den gemeinsamen Arbeitstag gefreut habe, darf ich euch verdanken und weiß ich sehr zu schätzen.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden vom ganzen Herzen für ihre Ermutigungen und Zusprüche während des gesamten Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation danken. Besonders meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung dieses Lebensweges und für ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung in all den Jahren.

## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.