

**Die membranproximale Domäne  
von ADAM17**

-

**Ein Schlüssel zur  
Regulation der Proteaseaktivität**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

**Stefan Düsterhöft**

Kiel, 2014

Referent:	Prof. Dr. Joachim Grötzinger
Korreferent:	Prof. Dr. Axel Scheidig
Korreferent:	Prof. Dr. Stefan Rose-John
Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. Eric Beitz
Tag der mündlichen Prüfung:	21.07.2014
Zum Druck genehmigt:	21.07.2014

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Ektodomänen- <i>Shedding</i> . . . . .	10
1.2	ADAM17 - <i>A Disintegrin And Metalloprotease 17</i> . . . . .	11
1.2.1	Struktureller Aufbau von ADAM17 . . . . .	13
1.2.2	Physiologische Bedeutung und Regulation von ADAM17 . . . . .	14
1.3	Proteindisulfidisomerasen . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1	Material . . . . .	24
3.2	Methoden . . . . .	27
3.2.1	Reinigung von Plasmid- <i>DNA</i> . . . . .	27
3.2.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion von <i>DNA</i> . . . . .	27
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	28
3.2.2.1	Coomassie-Färbung . . . . .	30
3.2.2.2	Kolloidale Coomassie-Färbung . . . . .	30
3.2.3	<i>Western Blotting</i> . . . . .	32
3.2.4	Proteinbiochemie . . . . .	33
3.2.4.1	Expression in LB-Medium . . . . .	33
3.2.4.2	Expression in Minimalmedium . . . . .	33
3.2.4.3	Proteinreinigung . . . . .	35
3.2.4.4	Ellman's Test . . . . .	35
3.2.4.5	Reduktion der PDI . . . . .	37
3.2.4.6	Renaturierung . . . . .	37
3.2.5	Auf Zellkultur basierende Experimente . . . . .	39
3.2.5.1	Zellkultur . . . . .	39
3.2.5.2	Zellen für Präzipitationsexperimente . . . . .	39
3.2.5.3	Kopplung von Antikörpern oder Peptiden an <i>Sepharose-Beads</i> . . . . .	40

---

3.2.5.4	Ko-Immunopräzipitationsexperimente . . . . .	41
3.2.5.5	Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Überexpression von PDIA6 . . . . .	42
3.2.5.6	Ko-Immunopräzipitationsexperimente unter <i>in-vitro</i> -Inkubation mit reduzierter PDI . . . . .	42
3.2.5.7	Präzipitationsexperimente mit an <i>Beads</i> gekoppelten Peptiden	43
3.2.5.8	<i>Shedding</i> -Aktivitätstest . . . . .	43
<b>4</b>	<b>Durchführung und Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	Die membranproximale Domäne von ADAM17 . . . . .	46
4.1.1	Expression und Reinigung der rekombinanten Domäne . . . . .	46
4.1.1.1	Affinitätschromatografie der rekombinanten MPD17 . . . . .	46
4.1.1.2	Größenausschlusschromatografie der rekombinanten MPD17	47
4.1.1.3	Trennung verschiedener Disulfidisomere über <i>RP-HPLC</i> . .	49
4.1.1.4	Rechromatografie über <i>RP-HPLC</i> und Ellman's Test der MPD17-Disulfidisomere . . . . .	49
4.1.2	Struktur und Disulfidbrücken-Muster der MPD17-Disulfidisomere . . .	52
4.1.3	Zusammenfassung der Reinigung und strukturellen Charakterisierung der rekombinanten MPD17 . . . . .	57
4.1.4	Rolle der MPD17 in der Redox-Regulation von ADAM17 . . . . .	58
4.1.4.1	Einfluss der Proteindisulfidisomerase auf die MPD17 . . . . .	58
4.1.4.2	Test der eingesetzten PDI auf PDIA6 . . . . .	60
4.1.4.3	Übersicht über die MPD17-Isomerisierung . . . . .	60
4.1.5	Die offene MPD17 bindet Ortho-Phospho-L-Serin . . . . .	63
4.2	HE-ADAM17 ist eine inaktive ADAM17-Variante . . . . .	64
4.2.1	<i>Shedding</i> -Aktivität von HE-ADAM17 . . . . .	64
4.2.2	HE-ADAM17 bindet den IL-6R und TIMP3 . . . . .	67
4.2.3	Identifikation neuer ADAM17-Interaktionspartner . . . . .	68
4.3	Interaktion zwischen der rekomb. MPD17 und dem löslichen IL-6-Rezeptor .	70
4.4	CANDIS ist eine hochkonservierte Sequenz in der <i>Stalk</i> -Region von ADAM17	71
4.4.1	Charakterisierung der <i>Stalk</i> -Region von ADAM17 . . . . .	71
4.4.2	Interaktionsexperimente mit CANDIS . . . . .	72

---

4.5	Einfluss von CANDIS auf das ADAM17-vermittelte <i>Shedding</i> . . . . .	78
4.5.1	<i>Shedding</i> -Aktivität des ADAM17-Konstrukts ADAM17p10 . . . . .	78
4.5.2	<i>Shedding</i> -Aktivität von ADAM17p10 unter Einfluss von HE-ADAM17 . . . . .	78
4.6	Zusammenspiel von MPD17 und CANDIS . . . . .	83
4.6.1	Einfluss der MPD17 auf das ADAM17- <i>Shedding</i> . . . . .	83
4.6.2	Einfluss der MPD17 auf die Substratbindung . . . . .	83
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>88</b>
5.1	Die membranproximale Domäne von ADAM17 besitzt zwei Disulfidiso-mere . . . . .	88
5.2	CANDIS bindet ADAM17-Substrate . . . . .	91
5.3	Zusammenspiel von MPD und CANDIS . . . . .	95
5.4	Model des ADAM17-vermittelten <i>Sheddings</i> . . . . .	97
5.5	Mögliches Gesamtmodel für ADAM17 . . . . .	101
5.6	Ausblick . . . . .	104
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> . . . . .	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> . . . . .	<b>120</b>
9.1	Zusätzliche Experimente . . . . .	120
9.2	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	122
9.3	Material . . . . .	125
9.3.1	Chemikalien . . . . .	125
9.4	Geräte . . . . .	128
9.5	Lebenslauf . . . . .	129
9.6	Publikationen . . . . .	130
9.7	Eidesstattliche Erklärung . . . . .	132
9.8	Danksagungen . . . . .	133

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema möglicher Konsequenzen des Ektodomänen- <i>Sheddings</i> . . . . .	12
1.2	Übersicht über die Familie der Metzinkine . . . . .	13
1.3	Schematische Darstellung der ADAMs . . . . .	15
1.4	Übersicht über die Proteindisulfidisomerasen . . . . .	21
3.1	Verwendeter <i>RP-HPLC</i> -Gradient . . . . .	36
4.1	Sequenz der rekombinanten MPD17 . . . . .	47
4.2	Expression und Reinigung der MPD17 . . . . .	48
4.3	Größenausschlusschromatografie der MPD17 . . . . .	50
4.4	<i>RP-HPLC</i> -Lauf der MPD17-Monomerfraktion . . . . .	51
4.5	Analyse der gereinigten MPD17-Disulfidisomere . . . . .	53
4.6	<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N- <i>HSQC</i> -Spektrum der MPD17 . . . . .	55
4.7	Struktur der geschlossenen MPD17 . . . . .	56
4.8	Muster der Disulfidbrücken . . . . .	56
4.9	Cartoondarstellung der offenen und geschlossenen MPD17 . . . . .	57
4.10	Einfluss der reduzierten PDI auf die offene MPD17 . . . . .	59
4.11	Renaturierung der <i>RP-HPLC</i> -Fraktion 3 . . . . .	59
4.12	Einfluss der PDI auf <i>RP-HPLC</i> -Fraktion 3 . . . . .	60
4.13	PDIA6 in der eingesetzten PDI-Mischung . . . . .	61
4.14	Übersicht über die MPD17-Isomere . . . . .	62
4.15	Cartoondarstellung der MPD17-Isomerisierung . . . . .	62
4.16	Interaktion zwischen der offenen MPD17 und OPLS . . . . .	63
4.17	Struktur der katalytischen Domäne . . . . .	65
4.18	Aktivitätstest von HE-ADAM17 . . . . .	66
4.19	Interaktion zwischen HE-ADAM17 und IL-6R . . . . .	67
4.20	Interaktion zwischen HE-ADAM17 und TIMP3 . . . . .	68
4.21	Identifikation neuer ADAM17-Interaktionspartner . . . . .	69
4.22	Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit rekombinanter MPD17 und IL-6R . . . . .	70

---

4.23 Schematische Abbildung des Konstrukts MPD17_GPI . . . . .	71
4.24 Die <i>Stalk</i> -Region von ADAM17 . . . . .	73
4.25 Sekundärstruktur der verwendeten Peptide . . . . .	74
4.26 CANDIS bildet eine amphipathische Helix . . . . .	74
4.27 Präzipitationsexperimente mit CANDIS- <i>Beads</i> . . . . .	76
4.28 Substratspezifität von CANDIS . . . . .	77
4.29 Aktivitätstest von ADAM17p10 . . . . .	79
4.30 Aktivitätstest von ADAM17p10 unter Einfluss von HE-ADAM17 . . . . .	81
4.31 Expressionskontrolle der Aktivitätstests unter Einfluss von HE-ADAM17 . . . . .	82
4.32 Aktivitätstest von ADAM17E22 . . . . .	84
4.33 Schema der Ko-Immunopräzipitation unter PDI-Einfluss . . . . .	85
4.34 Ko-Immunopräzipitation unter <i>in-vitro</i> -PDI-Einfluss . . . . .	86
4.35 Einfluss der Koexpression von PDIA6 auf die Bindung zwischen MPD17_GPI und IL-6R . . . . .	87
5.1 Model der ADAM17-Ektodomäne . . . . .	90
5.2 Schema des Einflusses von HE-ADAM17 auf die <i>Shedding</i> -Aktivität . . . . .	93
5.3 Interaktion zwischen Substraten und der ADAM17-Ektodomäne . . . . .	94
5.4 CANDIS-Bindestelle im IL-6R . . . . .	94
5.5 Model des <i>Shedding</i> -Ereignisses . . . . .	99
5.6 Model der ADAM17-Regulation . . . . .	103
9.1 Durchflusszytometrie-Analyse verwendeter Konstrukte . . . . .	120
9.2 Einfluss der PDIA6 auf das ADAM17-vermittelte <i>Shedding</i> . . . . .	121

# Tabellenverzeichnis

1.1	Bekannte ADAM17-Substrate . . . . .	15
3.1	Zusammensetzung des verwendeten PBS . . . . .	24
3.2	Plasmide . . . . .	25
3.3	Antikörper . . . . .	26
3.4	Puffer für Phenol-Chloroform-Extraktion . . . . .	28
3.5	Zusammensetzung der verwendeten Lämmli-Probenpuffer . . . . .	29
3.6	Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers . . . . .	29
3.7	Gele für ein SDS-PAGE-Gel . . . . .	30
3.8	Für Coomassie-Färbung verwendete Puffer . . . . .	31
3.9	Für kolloidale Coomassie-Färbung verwendete Puffer . . . . .	31
3.10	Übersicht über die verwendeten Puffer für <i>Western Blotting</i> . . . . .	32
3.11	Verwendete Medien und Puffer für bakterielle Expression . . . . .	34
3.12	<i>RP-HPLC</i> -Programm . . . . .	36
3.13	Zusammensetzung der DTNB-Lösung . . . . .	37
3.14	Puffer für Renaturierung . . . . .	38
3.15	Verwendete Medien . . . . .	39
3.16	Übersicht über die verwendeten Lysepuffer . . . . .	40
3.17	Verwendete Peptid- <i>Beads</i> . . . . .	41
3.18	Verwendete Antikörper- <i>Beads</i> . . . . .	41
3.19	Versuchsansatz für einen <i>Shedding</i> -Aktivitätstest . . . . .	45
3.20	Substratpuffer für den AP-Assay . . . . .	45
4.1	Errechnete Eigenschaften der rekomb. MPD17 . . . . .	46
9.1	Abkürzungen 1 . . . . .	122
9.2	Abkürzungen 2 . . . . .	123
9.3	Aminosäuren . . . . .	124
9.4	Chemikalien 1 . . . . .	125
9.5	Chemikalien 2 . . . . .	126



---

9.6 Chemikalien 3 . . . . .	127
9.7 Geräte . . . . .	128

# 1 Einleitung

## 1.1 Ektodomänen-*Shedding*

Das Ektodomänen-*Shedding* oder kurz *Shedding* ist neben der Proteinsekretion ein weiterer Weg der Zelle lösliche Proteine in den extrazellulären Raum zu entlassen. Die Ektodomänen von Transmembranproteinen werden beim *Shedding* proteolytisch abgespalten und so in eine lösliche Form überführt. Der Schnitt innerhalb der Substrate durch die Proteasen, die auch *Sheddases* genannt werden, liegt dabei nahe an der Zellmembran (Hooper et al., 1997). Generell handelt es sich beim *Shedding*, wie bei allen Prozessen der limitierten Proteolyse, um eine posttranslationale Modifikation, die anders als andere Modifikationen, wie Phosphorylierung, Glykosylierung oder Ubiquitinierung, irreversibel ist.

Zunächst als reiner Degradationsprozess ohne weitere physiologische Relevanz verkannt, hat sich jedoch gezeigt, dass *Shedding* eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Homöostase sowie bei vielen pathophysiologischen Vorgängen spielt (Ehlers & Riordan, 1991; Murphy, 2008; Murphy et al., 2008; Dreymueller et al., 2012).

Das *Shedding* hat neben der Degradation verschiedene Konsequenzen. Zum einen sind Zellen, auf deren Oberfläche die Konzentration eines bestimmten Rezeptors durch *Shedding* reduziert wurde, für Liganden dieses Rezeptors weniger sensitiv. Zum anderen können die entstandenen löslichen Ektodomänen biologische Aktivität aufweisen und dabei auf autokrine und parakrine Weise agonistisch oder antagonistisch wirken. Überdies sind durch das *Shedding* von Adhäsionsproteinen ebenfalls Zell-Zell-Kontakte betroffen.

Die Substrate der *Sheddase* ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloprotease 17*), die im Folgenden noch genauer beschrieben wird, liefern Beispiele für alle möglichen Folgen des *Sheddings*. So wird beispielsweise das Zelladhäsionsprotein L-Selectin, welches unter anderem eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten spielt, von ADAM17 prozessiert (Venturi et al., 2003). Das ADAM17-vermittelte *Shedding* des pro-TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor) führt zur Freisetzung des agonistisch wirkenden, pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  (Black et al., 1997). Dem Gegenüber führt zum Beispiel das *Shedding* des IL-1R<sub>II</sub> (Interleukin-1 Rezeptor Typ 2) durch ADAM17 zu einer antagonistischen Wirkung (Reddy et al., 2000). Die freie Ektodomäne fängt sowohl Interleukin-1 $\alpha$  als auch Interleukin-1 $\beta$  ab

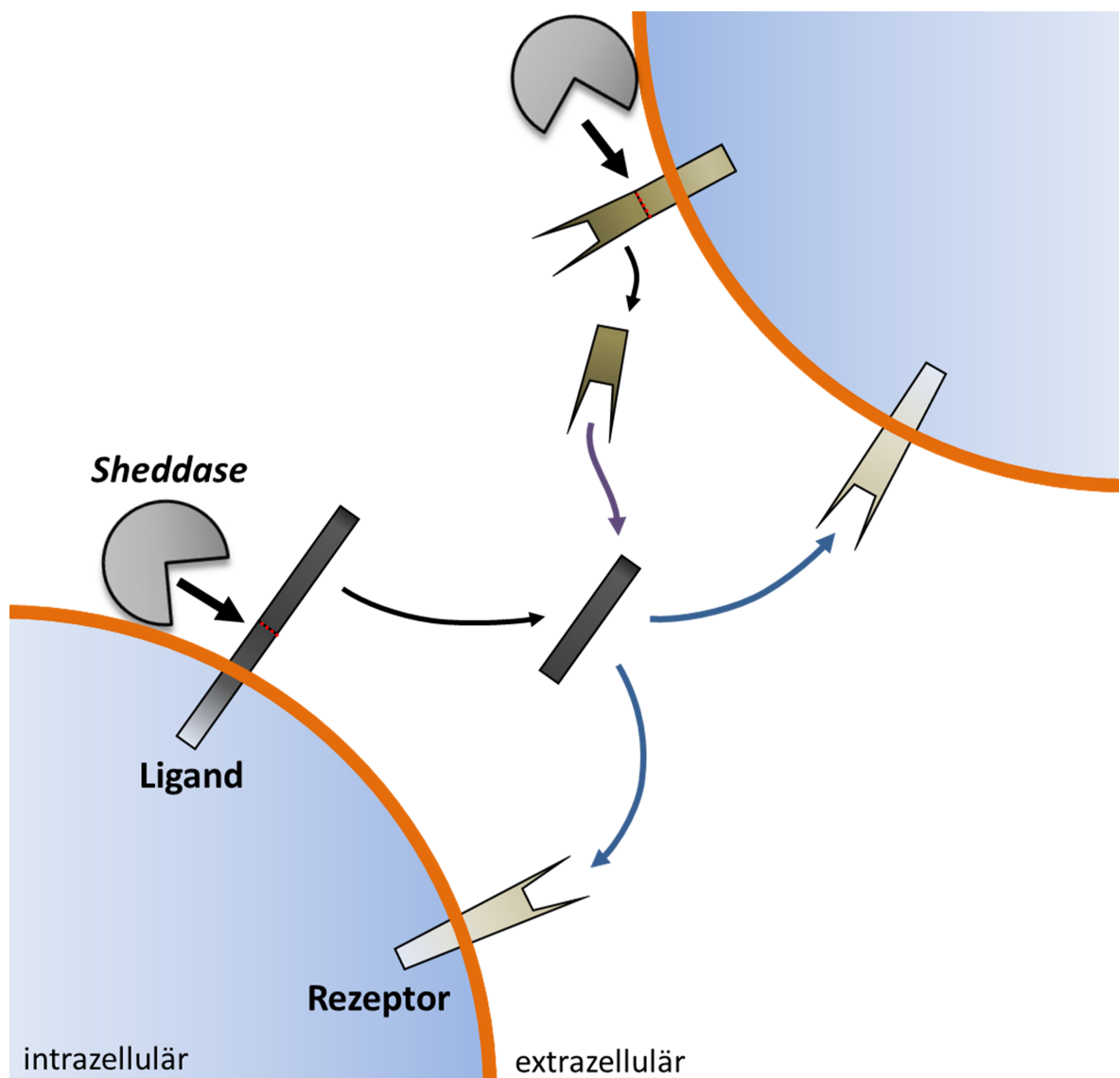
und vermindert so eine Signalübertragung.

Ein weiteres, prominentes ADAM17-Substrat ist der IL-6R (Interleukin-6-Rezeptor), der nur in wenigen Zelltypen exprimiert wird. In seiner membrangebundenen Form vermittelt der IL-6R nach IL-6-Bindung über das Transmembranprotein gp130 das sogenannte IL-6-*classic-signaling*, welches regenerativ und anti-inflammatorisch wirkt. In seiner löslichen Form wirkt der sIL-6R (*soluble* IL-6R) agonistisch und ermöglicht Zellen, die keinen IL-6R aber gp130 exprimieren, das IL-6-*Signaling*. Dies wird auch IL-6-*trans-signaling* genannt und besitzt eine pro-inflammatorisch Wirkung (Rose-John & Heinrich, 1994; Peters et al., 1998; Scheller et al., 2011).

Eine weitere Folge des *Sheddings* ist, dass in der Membran verbleibende Fragmente geschnittener Substrate weiter proteolytisch prozessiert werden. Hierbei kann ein weiteres Fragment intrazellulär freigesetzt werden. Dieser Vorgang wird *RIPping* (regulierte intramembranäre Proteolyse) genannt. Wie im Fall von Notch-1 kann das intrazelluläre Fragment beispielsweise die Expression verschiedener Gene auslösen (Oswald et al., 2001).

## 1.2 ADAM17 - A Disintegrin And Metalloprotease 17

Eine aufgrund ihrer immensen physiologischen Bedeutung wichtige *Sheddase* ist die zink-abhängigen Protease ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloprotease 17*). ADAM17 ist ein glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein, das zu der Superfamilie der Metzinkine gehört. Die Metzinkine zeichnen sich dadurch aus, dass ihr katalytisches Zentrum das HEXXHXX-GXXH-Motiv besitzt. Dort koordinieren die drei Histidinreste das Zinkkation ( $Zn^{2+}$ ), während der Glutaminsäurerest als katalytische Base fungiert. Überdies zeichnen sich die Metzinkine durch einen vom HEXXHXXGXXH-Motiv C-terminal liegenden, konservierten Methioninrest innerhalb einer 1,4- $\beta$ -Schleife (*Met-turn*) aus (Bode et al., 1993; Hooper, 1994; Black & White, 1998). Die Familie der Metzinkine wird aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und strukturellen Übereinstimmungen in Unterfamilien eingeteilt (siehe Abbildung 1.2, Seite 13). Zu der Unterfamilie der Adamalysine gehören neben der Gruppe der Schlangengift-Metalloproteasen (SVMPs) die ADAMs. Die ADAMs sind Multidomänenproteine mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 250 Aminosäureresten. Im humanen Genom sind 25 Gene, die für ADAMs kodieren, bekannt. Von diesen ADAMs weisen aber nur 13 das HEXXHXXGXXH-Motiv auf und sind damit proteolytisch aktiv (Edwards et al., 2008; Murphy, 2009).



**Abbildung 1.1 – Schema möglicher Konsequenzen des Ektodomänen-*Sheddings*:** *Sheddases* können membrangebundene Liganden oder Rezeptoren von der Zelloberfläche schneiden. Die freigesetzten Ektodomänen können entweder autokrin oder parakrin, agonistisch oder antagonistisch wirken.

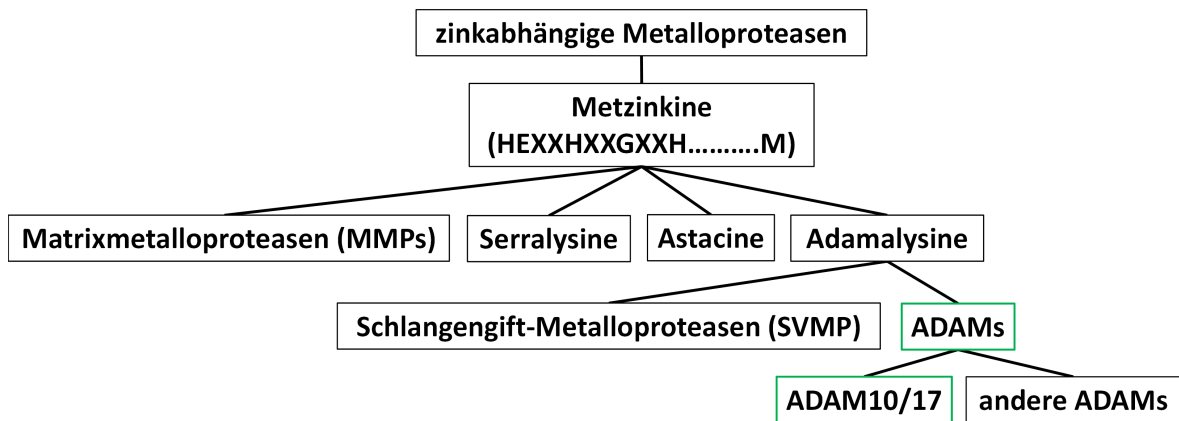


Abbildung 1.2 – Übersicht über die Familie der Metzinkine

### 1.2.1 Struktureller Aufbau von ADAM17

Der allgemeine Aufbau der ADAMs ist in Abbildung 1.3 (Seite 15) dargestellt. N-terminal starten die ADAMs mit einem in der Abbildung nicht dargestellten Signalpeptid. Darauf folgen die Prodomäne, die katalytische Domäne, die Disintegrin-ähnliche Domäne, die cysteinreiche Domäne und die EGF-ähnliche Domäne. Nach einer kurzen *Stalk*-Region und der Transmembranregion folgt die zytoplasmatische Region (Edwards et al., 2008). Die Strukturen von ADAM10 und ADAM17 bilden eine Ausnahme. Statt über eine cysteinreiche Domäne und eine EGF-ähnliche Domäne verfügen beide Proteasen über eine membranproximale Domäne (MPD) (Takeda, 2009; Lorenzen et al., 2012). Durch diese strukturelle Besonderheit bilden ADAM10 und ADAM17 eine eigene Gruppe innerhalb der ADAMs.

Die Prodomäne von ADAM17 wirkt, wie bei den anderen aktiven ADAMs, inhibierend auf die Proteaseaktivität (Moss et al., 2007; Gonzales et al., 2004, 2008) und wird während des Transports zur Zelloberfläche durch die Pro-Proteinkonvertase Furin geschnitten (Schlön-dorff et al., 2000; Endres et al., 2003; Seals & Courtneidge, 2003).

Es wird angenommen, dass die extrazellulären Domänen von ADAM17 wie bei den ADAM-Homologen VAP1 (*vascular adhesion protein 1*) und VAP2b (*vascular adhesion protein 2B*) sowie wie bei ADAM22 und ADAM10 C-förmig angeordnet sind (Igarashi et al., 2007; Liu et al., 2009; Mancina & Shapiro, 2005; Takeda et al., 2006). Dies bringt die Domänen in eine räumliche Nähe zueinander, was wiederum eine gegenseitige Beeinflussung nahe legt. Beispielsweise haben die auf die katalytische Domäne C-terminal folgenden Disintegrin-ähnliche und membranproximale Domäne von ADAM17 einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung des natürlichen Metalloproteaseinhibitors Timp3 (*Tissue Inhibitor of*

*Metalloproteinases* 3), der an die katalytische Domäne bindet und das aktive Zentrum verdeckt (Lee et al., 2002).

Die Disintegrin-ähnliche Domäne ist über die Bindung an das Heterodimer  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, dabei speziell an das  $\beta 1$ -Integrin, an Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Dadurch wird vermutlich die Substraterkennung verhindert und ADAM17 in einem inaktiven Zustand gehalten (Bax et al., 2004; Trad et al., 2013). Die Disintegrin-ähnliche Domäne dient des Weiteren dazu, die katalytische Domäne richtig zum Substrat zu positionieren (Takeda, 2009).

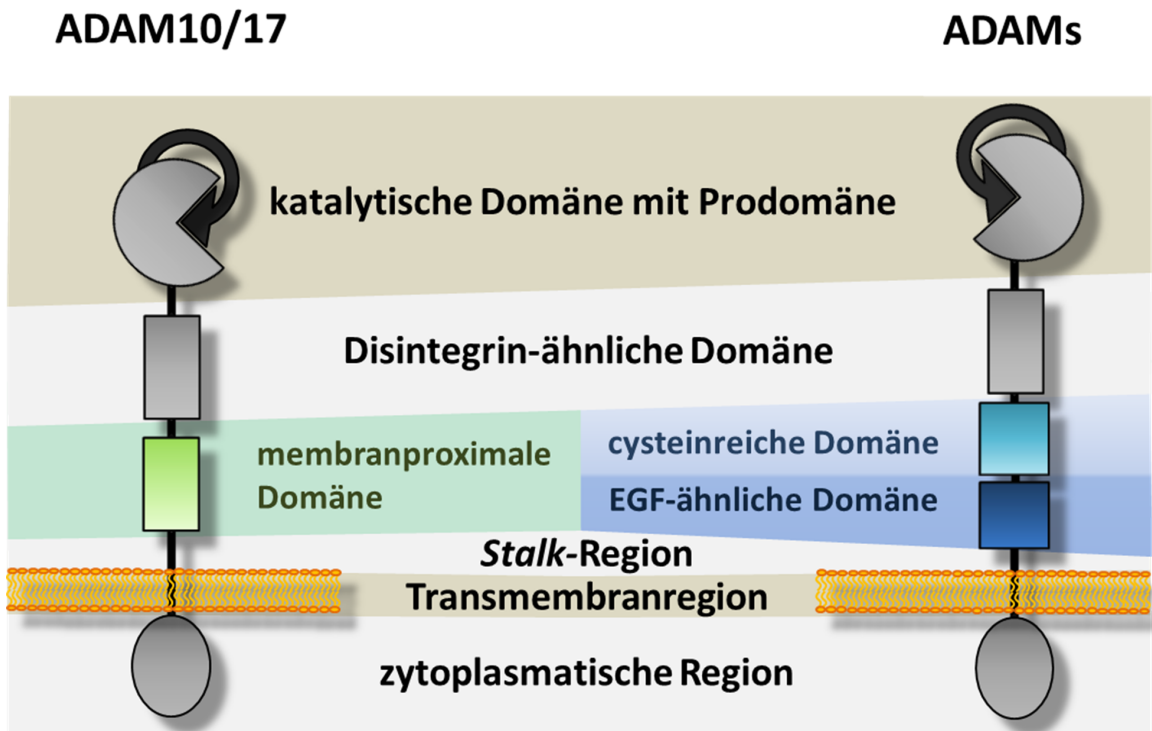
Die membranproximale Domäne ist wichtig für die Substraterkennung. Dies gilt interessanterweise nicht für alle Substrate. So wurde die Bedeutung der membranproximalen Domäne für das *Shedding* des IL-6R und des IL-1R<sub>II</sub>, jedoch nicht für pro-TNF- $\alpha$  und TNF-R<sub>II</sub> (Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2) gezeigt (Reddy et al., 2000; Lorenzen et al., 2012). Auch an der Multimerisierung von ADAM17 ist diese Domäne beteiligt (Lorenzen et al., 2011). Dabei ist zu beachten, dass sowohl bei der Substraterkennung als auch bei der Multimerisierung die membranproximale Domäne nicht losgelöst von der C-terminal folgenden *Stalk*-Region betrachtet wurde.

Auch die Transmembranregion ist wichtig für die *Shedding*-Aktivität, vermutlich indem sie die extrazellulären Domänen korrekt ausrichtet. Li et al. (2007) zeigten, dass es zu einem Verlust des ADAM17-vermittelten TGF- $\alpha$ - und des TNF- $\alpha$ -*Sheddings* kommt, wenn die Transmembrandomäne durch einen GPI-Anker ersetzt wird.

Die zytoplasmatische Region von ADAM17 bietet putative Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen wie der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (Xu & Derynck, 2010) oder der Polo-ähnlichen Kinase 2 (Schwarz et al., 2014). Es gibt Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von ADAM17 bei der Regulation der *Shedding*-Aktivität eine Rolle spielt Xu et al. (2012).

### 1.2.2 Physiologische Bedeutung und Regulation von ADAM17

ADAM17 wurde zunächst unter dem Namen *TACE* (*TNF- $\alpha$  converting enzyme*) als diejenige *Sheddase* bekannt, die das membrangebundene pro-TNF- $\alpha$  in seine lösliche, Immunsystem modulierende Form überführt (Black et al., 1997; Moss et al., 1997a,b). Inzwischen sind über 80 verschiedene Substrate für ADAM17 publiziert, überwiegend aus den Gruppen der Zytokine und deren Rezeptoren sowie aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle. Einige Substrate



**Abbildung 1.3 – Schematische Darstellung der ADAMs:** Die Abfolge der extrazellulären Domänen von ADAM10 und ADAM17 vom N-Terminus zum C-Terminus ist wie folgt: Prodomäne, katalytische Domäne, Disintegrin-ähnliche Domäne und membranproximale Domäne. Darauf folgen die *Stalk-Region*, die Transmembranregion und die zytoplasmatische Region. Alle anderen Mitglieder der ADAMs besitzen statt der membranproximalen Domäne eine cysteinreiche sowie eine EGF-ähnliche Domäne.

**Tabelle 1.1 – Bekannte ADAM17-Substrate**

Substrat	Referenz
TNF- $\alpha$ (Tumornekrosefaktor)	Moss et al. (1997a,b); Black et al. (1997)
TNF- $\alpha$ -Rezeptor Typ 1	Reddy et al. (2000)
TGF- $\alpha$ ( <i>Transforming growth factor</i> )	Peschon et al. (1998)
IL-6R (Interleukin-6-Rezeptor)	Althoff et al. (2000)
IL-1R <sub>II</sub> (Interleukin-1-Rezeptor Typ 2)	Reddy et al. (2000)
L-Selectin (CD62L)	Peschon et al. (1998)

sind in Tabelle 1.1 (Seite 15) gelistet. Das ADAM17-vermittelte *Shedding* beeinflusst nicht nur die Immunantwort und Entzündungsreaktionen, sondern ebenfalls Entwicklungs- und Regenerationsprozesse aber auch Tumorentwicklung. Dies hebt die große physiologische Bedeutung von ADAM17, das in allen Körperzellen exprimiert wird, hervor. Mäuse, die statt dem Wildtyp-ADAM17 eine inaktive ADAM17-Variante exprimieren, sterben bereits vor der Geburt oder kurz danach (Peschon et al., 1998). Hypomorphe Mäuse, die nur noch circa 5 % ADAM17 im Vergleich zum Wildtyp exprimieren, sind lebensfähig, zeigen jedoch eine verminderte Regenerationsfähigkeit (Chalaris et al., 2010). Interessanterweise sieht das Bild im Menschen etwas anders aus. Es wurde ein Patient beschrieben, der homozygot für eine Deletion im ADAM17-Gen ist und damit kein aktives ADAM17 bildet. Das Fehlen von ADAM17 im Menschen führt, anders als bei Mäusen, nicht zu Letalität, aber zu schweren Haut- und Darmkrankheiten (Blaydon et al., 2011).

Eine genaue Regulation der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 ist aufgrund der vielen physiologischen Konsequenzen unerlässlich. Dennoch ist das Bild der ADAM17-Regulation bis heute noch unvollständig. ADAM17 wird mit Prodomäne als Zymogen exprimiert. Während des Transfers durch den Golgi-Apparat wird die Prodomäne durch die Pro-Proteinkonvertase Furin geschnitten (Schlöndorff et al., 2000; Endres et al., 2003; Seals & Courtneidge, 2003). Jedoch scheint dies nicht der entscheidende Schritt zu sein, der zur Dissoziation der Prodomäne und zur Aktivierung von ADAM17 führt (Schwarz et al., 2013; Le Gall et al., 2010). Inwieweit die Prodomäne nach der proteolytischen Spaltung am reifen ADAM17 assoziiert bleibt und unter Umständen mit ADAM17 zur Zelloberfläche gelangt, ist noch nicht bekannt. Im Fall von ADAM10 wurde gezeigt, dass die Prodomäne als rekombinantes Protein an die katalytische Domäne binden kann und dadurch als Inhibitor dient (Moss et al., 2007). Demgegenüber scheint die Prodomäne von ADAM17 eine um ein Vielfaches geringere Affinität zum vollständigen, reifen ADAM17 oder zur Ektodomäne mit katalytischer, Disintegrin-ähnlicher und membranproximaler Domäne zu besitzen (Milla et al., 1999; Li et al., 2009). Wird die katalytische Domäne nur mit der Prodomäne exprimiert, bindet die Prodomäne stärker an die katalytische Domäne, als es beim Vorhandensein der vollständigen Ektodomäne der Fall ist. Dies spricht für einen entscheidenden Einfluss der Disintegrin-ähnlichen Domäne und der membranproximalen Domäne bei der Dissoziation der Prodomäne (Milla et al., 1999). Dieser Umstand deutet ebenfalls auf eine räumliche Nähe der extrazellulären Domänen zueinander hin und unterstützt die postulierte C-Form der Ektodomäne.



Es wurde spekuliert, ob für den inhibitorischen Effekt der Prodomäne ein Cystein-Switch, wie bei den Prodomänen der Matrixmetalloproteasen, notwendig ist (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Dabei koordiniert ein Cysteinrest das Zinkkation, wodurch der Zugang zum katalytischen Zentrum blockiert ist. Für den in Frage kommenden Cysteinrest (C184) in der Prodomäne von ADAM17 wurde dies nicht bestätigt (Gonzales et al., 2004; Milla et al., 2006; Leonard et al., 2005). Stattdessen scheint dieser Cysteinrest eine Rolle bei der Stabilisierung von ADAM17 zu spielen und es vor intrazellulären Degradationsprozessen (Leonard et al., 2005) zu schützen. Die Prodomäne ist nicht nur inhibitorisch, sondern dient auch als intramolekulares Chaperon der katalytischen Domäne (Milla et al., 1999; Schlöndorff et al., 2000).

Zwei inaktive Varianten der Rhomboidproteasen, iRhom1 und iRhom2 (*inactive rhomboid protein*), wurden als wichtige Regulatoren des ADAM17-Transports vom ER zum Golgi-Apparat identifiziert (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Christova et al., 2013). Außerdem spielt iRhom2 eine Rolle in der Substratselektivität von ADAM17 (Maretzky et al., 2013).

Während ADAM10 als konstitutiv aktive *Sheddase* gilt, muss ADAM17-vermitteltes *Shedding* stimuliert werden. Ein besonders starker, obwohl nicht physiologischer Stimulator von ADAM17 ist Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), dessen genaue Wirkungsweise jedoch noch nicht geklärt ist. Le Gall et al. (2010) zeigten, dass der Mechanismus der Stimulation reversibel ist und dass die Stimulation mit PMA zu einer schnellen Aktivierung des ADAM17-vermittelten *Sheddings* führt. Dieser Mechanismus geht dabei mit einer strukturellen, aber reversiblen Änderung in ADAM17 einher. Doedens & Black (2000) zeigten, dass nach Stimulation mit PMA die Konzentration von ADAM17 auf der Zelloberfläche stark zurückgeht und dass dies der Internalisierung von ADAM17 zuzuschreiben ist.

Es wird spekuliert, ob ADAM17-vermitteltes *Shedding* durch Signale aus dem Zellinneren reguliert wird. Die zytoplasmatische Region von ADAM17 bietet dafür mehrere putative Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen, wie für die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) oder ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Gehtman et al., 1999; Díaz-Rodríguez et al., 1999; Diaz-Rodríguez et al., 2002; Killock & Ivetić, 2010; Xu & Derynck, 2010). Die p38 MAPK wird durch das Antibiotikum Anisomycin, das generell stressinduzierte Kinasen stimuliert, aktiviert und führt durch Phosphorylierung von T735 von ADAM17 zum *Shedding* (Xu & Derynck, 2010). Sowohl das Blockieren der p38 MAPK

als auch die Mutation T735A führte zu einem Verlust des Anisomycin-stimulierten, jedoch nicht des PMA-induzierten *Sheddings*.

Sowohl Xu & Derynck (2010) als auch Soond et al. (2005) wiesen einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von T735 und einem gesteigerten Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche nach. Eine hohe Konzentration an ADAM17 liegt in perinukleären Vesikeln gespeichert vor, während nur eine geringe Menge an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Es existieren widersprüchliche Beobachtungen, ob die Translokation von ADAM17 an die Zelloberfläche durch PMA-Stimulation erhöht wird. Soond et al. (2005) zeigten mit Biotinylierungsexperimente eine Erhöhung der ADAM17-Konzentration auf HeLa-Zellen. In MEF-Zellen wurde jedoch gezeigt, dass es auch nach Stimulation zu keinem erhöhten Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche kommt (Le Gall et al., 2010; Schwarz et al., 2013). Scheinbar handelt es sich dabei um einen Zelltyp-abhängigen Effekt. Im Zusammenhang mit der intrazellulären Lokalisation von ADAM17 wird auch diskutiert, in wie weit ADAM17-vermitteltes *Shedding* bereits in den perinukleären Vesikeln stattfindet (Le Gall et al., 2010). Der beobachtete Einfluss der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne auf den ADAM17-Transport weist auf eine intrazelluläre Regulation des ADAM17-vermittelten *Sheddings* hin. ADAM17 ist nach der Deletion des Großteils der zytoplasmatischen Region mit allen putativen Phosphorylierungsstellen weiterhin durch PMA stimulierbar (Reddy et al., 2000; Le Gall et al., 2010). ADAM17 ohne zytoplasmatische Region verhält sich dabei wie der Wildtyp. Damit scheint weder die Reifung noch die Aktivierung von ADAM17 von der zytoplasmatische Region oder dessen Phosphorylierung abzuhängen. Xu et al. (2012) klärten in Bezug auf die p38 MAPK und ERK diese Widersprüche auf, indem sie zeigten, dass die zytoplasmatische Region als negativer Regulator dient. Ohne T735-Phosphorylierung bildet ADAM17 über die zytoplasmatische Region ein Dimer. Dieses Dimer bindet den natürlichen Metalloproteaseinhibitor TIMP3. Dadurch ist kein *Shedding* möglich. Erst wenn p38 MAPK oder ERK ADAM17 T735 phosphoryliert, löst sich das Dimer auf und TIMP3 kann nicht binden, wodurch *Shedding* ermöglicht wird. Durch das Fehlen der zytoplasmatischen Region kann ADAM17 kein durch TIMP3 inhibiertes Dimer mehr bilden und ist somit ohne zytoplasmatische Region in einem aktivierbaren Zustand. Dennoch fehlt hier ein weiterer Aktivierungsschritt. Die unphosphorylierte zytoplasmatische Region hält ADAM17 nur in einem nicht aktivierbaren Zustand. Eine Trennung des Dimers durch Phosphorylierung ist jedoch nicht alleinige Voraussetzung für die Auslösung des ADAM17-vermittelten *Sheddings*,

andernfalls müsste ADAM17 ohne zytoplasmatische Region konstitutiv aktiv sein.

Eine weitere wichtige Gruppe von Kinasen in Bezug auf die Regulation der *Shedding*-Aktivität sind die Proteinkinase-C-Familie (PKC). PKCs werden von PMA oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert (Blumberg, 1988; Lemjabbar-Alaoui et al., 2011) und beeinflussen das *Shedding* verschiedener ADAM17-Substrate. Dabei wirken die PKCs scheinbar nicht auf ADAM17 sondern direkt oder über mögliche Adapterproteine auf die ADAM17-Substrate ein (Killock & Ivetić, 2010; Kveiborg et al., 2011; Dang et al., 2013). Unterschiedliche PKC-Isoformen regulieren das *Shedding* unterschiedlicher Substrate (Dang et al., 2013), was eine Möglichkeit der Substratselektivität bietet.

Es gibt Hinweise, dass die Lokalisation innerhalb der Membran einen Einfluss auf die Regulation von ADAM17 hat. ADAM17 ist innerhalb der cholesterolreichen *lipid rafts* lokalisiert (Tellier et al., 2006). Die Auflösung der *lipid rafts* durch Depletion von Cholesterol stimuliert ADAM17-vermitteltes *Shedding* (Matthews et al., 2003).

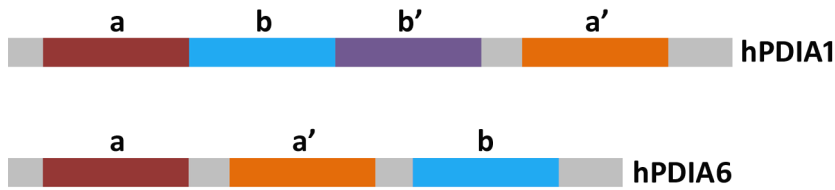
Aber auch die Interaktion der ADAM17-Ektodomäne mit anderen Proteinen hat eine Relevanz für die Regulation der *Shedding*-Aktivität. So hält die Bindung der Disintegrin-ähnlichen Domäne an  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin ADAM17 in einem inaktiven Zustand (Bax et al., 2004; Trad et al., 2013).

Ein weiterer Mechanismus um ADAM17-vermitteltes *Shedding* zu steuern, stellt die Regulation über Redox-Reaktionen dar. Bennett et al. (2000) zeigten, dass eine Inhibition der Proteindisulfidisomerasen (PDI) auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten ADAM17-vermitteltes L-Selectin-*Shedding* induziert. Auch eine Veränderung des Redox-Milieus durch harsche Redox-Reagenzien wirkte sich auf das L-Selectin-*Shedding* aus (Wang et al., 2009). So verminderte der Einsatz von DTT die Aktivität von ADAM17. Gleichzeitig wurde die Bedeutung des CKVC-Motivs innerhalb der membranproximalen Domäne von ADAM17 offenbart. Eine Änderung innerhalb dieses Motivs führte zu einem vollständigen Verlust des L-Selectin-*Shedding* (Wang et al., 2009). CXXC-Motive, die auch Thioredoximotive genannt werden, stellen generelle Angriffspunkte für Redox-Reaktionen dar (Fränd et al., 2000). Willems et al. (2010) zeigten zudem, dass reduzierte PDIs direkt auf den nicht-katalytischen Teil der Ektodomäne von ADAM17 einwirken und dort eine strukturelle Veränderung bewirken. Diese strukturelle Änderung wird vermutlich durch die Isomerisierung von Disulfidbrücken herbeigeführt und hat zur Folge, dass ADAM17 inaktiviert wird. Das inaktive ADAM17 ist dadurch nicht mehr in der Lage, den natürlichen Inhibitor TIMP3 zu binden.

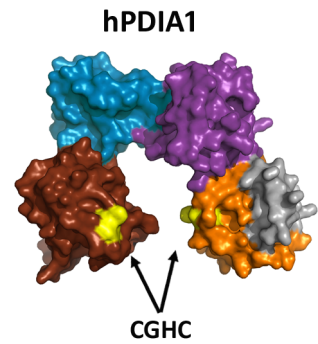
### 1.3 Proteindisulfidisomerasen

Die Familie der PDIs umfasst 21 Mitglieder, die als Oxidoreduktasen sowie als Chaperone fungieren. Sie kommen hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) vor, wo sie die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen. In der oxidierten Form sind die PDIs in der Lage Disulfidbrücken zu schließen, während sie in ihrer reduzierten Form sowohl Disulfidbrücken öffnen als auch isomerisieren (Xu et al., 2014)(siehe Abbildung 1.4, Seite 21). Das bekannteste Mitglied ist die PDIA1, die auch oft nur als PDI bezeichnet wird (Goldberger et al., 1963; Hawkins & Freedman, 1975). Jedoch wird in dieser Arbeit der Begriff "PDI" verwendet, wenn keine spezifische Isoform gemeint ist oder diese nicht bekannt ist. PDIs bestehen aus enzymatisch aktiven und inaktiven Thioredoxin-ähnlichen Domänen. Die enzymatisch aktiven Thioredoxin-ähnlichen Domänen besitzen CXXC-Motive (Thioredoxinmotiv), die das katalytische Zentrum der PDIs darstellen. Die Anzahl der Domänen, die ein Mitglied der PDI-Familie besitzt, ist unterschiedlich. PDIA1 besteht beispielsweise aus vier Thioredoxin-ähnliche Domänen, die C-förmig angeordnet sind (Wang et al., 2013). Dabei sind die beiden äußeren Thioredoxin-ähnlichen Domänen (a und a') aktiv und die beiden Inneren (b und b') inaktiv (siehe Abbildung 1.4, Seite 21). Bei PDIA6 folgt nach zwei N-terminalen aktiven (a und a') eine inaktive Thioredoxin-ähnliche Domäne (b) (Kozlov et al., 2010; Xu et al., 2014). Allen PDIs ist gemein, dass sie C-terminal eine KDEL-Sequenz als klassisches ER-Retentionssignal besitzen. Trotz des Retentionssignals kommen PDIs jedoch auch extrazellulär vor (Terada et al., 1995; Xiao et al., 1999; Kaiser et al., 2007; Jordan & Gibbins, 2006). Wie die PDIs den Retentionsmechanismus umgehen können, ist nicht bekannt. Eine mögliche proteolytische Entfernung der KDEL-Sequenz wurde ausgeschlossen. So entkommt PDIA1 dem Retentionsmechanismus in Hepatozyten, besitzt aber weiterhin die KDEL-Sequenz (Terada et al., 1995). Eine Möglichkeit der Sekretion zeigen autokrine pankreatische Zellen in Ratten, die auch andere ER-residente Proteine sekretieren (Yoshimori et al., 1990). Der Golgi-Apparat dieser Zellen hat einen neutralen pH-Wert (Orci et al., 1987). Normalerweise ist der pH-Wert im Golgi-Apparat leicht sauer, was eine Assoziation zwischen KDEL-Rezeptor und KDEL-Sequenz tragenden Protein ermöglicht (Wilson et al., 1993). Der Rezeptor wandert samt assoziierten Protein per retrograden Transport zurück in das ER, wo durch den dort vorherrschenden neutralen pH-Wert das KDEL-Sequenz tragende Protein wieder dissoziiert. Ist der pH-Wert im Golgi-Apparat wie im Fall der autokrinen pankreatischen Zellen ebenfalls neutral, werden auch normalerweise ER-residente Proteine sekre-

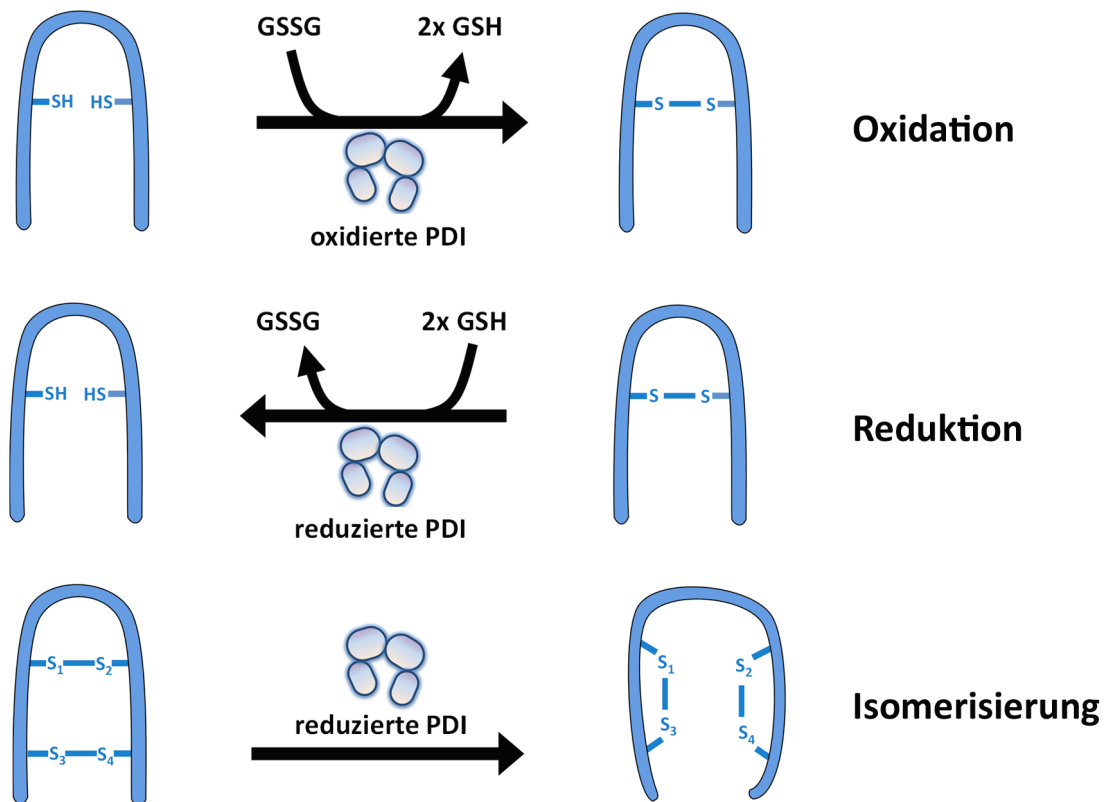
(A)



a und a' = aktive Thioredoxin-ähnliche Domänen mit CGHC  
 b und b' = inaktive Thioredoxin-ähnliche Domänen



(B)



**Abbildung 1.4 – Übersicht über die Proteindisulfidisomerasen:** (A) Links ist die Domänenabfolge von der humanen PDIA1 und der humanen PDIA6 schematische dargestellt. Rechts ist die hufeisenförmige Struktur von PDIA1 gezeigt (Wang et al., 2013) (pdb: 4EKZ1). (B) Die drei durch PDI katalysierten Reaktionen: Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken.

tiert. So könnte beispielsweise auch eine transiente pH-Wertänderung eine Sekretion von PDIs ermöglichen.

Die KDEL-Sequenz könnte aber auch durch ein anderes Protein maskiert werden. PDIA1, PDIA3 und PDIA6 beispielsweise binden an das Lektin Galectin-9 (Bi et al., 2011), das wie alle Galectine über einen alternativen sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert wird (Barondes et al., 1994). Über diesen alternativen Transport ist noch wenig bekannt.

Extrazelluläre PDIs spielen nicht nur eine Rolle bei dem bereits beschriebenen, ADAM17-vermittelten *Shedding* (Bennett et al., 2000; Willems et al., 2010), sondern unter anderem auch bei der Aufnahme von Stickstoffmonoxid in die Zelle (Zai et al., 1999; Ramachandran et al., 2001), der Zelladhäsion in Zusammenhang mit der Wechselwirkung mit Integrinen (Swiatkowska et al., 2008) sowie bei der Bildung von Thromben durch Thrombozyten (Cho et al., 2008, 2012).

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Ektodomäne von ADAM17, da dieser eine entscheidende Rolle in der Regulation der Proteaseaktivität zukommt. Es wurde gezeigt, dass ADAM17 durch Redox-Modifikationen innerhalb der Ektodomäne inaktiviert wird (Bennett et al., 2000; Willems et al., 2010; Wang et al., 2009). Die membranproximale Domäne bietet durch ihre fünf Disulfidbrücken sowie durch ein CXXC-Motiv ein ideales Ziel für Redox-Modifikationen. Da sie des Weiteren in der Substratbindung involviert ist (Reddy et al., 2000; Lorenzen et al., 2012), steht die MPD17 im Fokus dieser Arbeit.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Die bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien sind im Anhang (Kapitel 9, Seite 120) gelistet. Alle für diese Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Als isotonischer Standardpuffer wurde 1x PBS (pH 7.4) genutzt (siehe Tabelle 3.1, Seite 24). Die zum Einsatz gekommenen Plasmide sind in Tabelle 3.2 (Seite 25) zusammengefasst. Alle eingesetzten ADAM17-Substrate und alle nicht Vollängen-ADAM17-Konstrukte sind, wenn nicht anders erwähnt, humanen Ursprungs. Vollängen-ADAM17-Konstrukte sind murinen Ursprungs, da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit kein humanes Vollängen-ADAM17 zur Verfügung stand. Die Oberflächenexpression von wtADAM17, HE-ADAM17, ADAM17p10 sowie MPD17\_GPI wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft (siehe Anhang, Abbildung 9.1, Seite 120). In Tabelle 3.3 (Seite 26) sind alle verwendeten Antikörper gelistet.

**Tabelle 3.1** – Zusammensetzung des verwendeten PBS

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
10x PBS	1.4 M NaCl	80.0 g
	26.8 mM KCl	2.0 g
	80.9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O	14.4 g
	14.7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g



**Tabelle 3.2** – Plasmide

Plasmidbezeichnung	Insert	Bezugsquelle
pET28a-MPD17	membranproximale Domäne (MPD) aus humanem ADAM17	Dr. Verena Pawlak
pcDNA3.1-MPD17_GPI	MPD und <i>Stalk</i> -Region (bis L657) aus humanem ADAM17 mit PC- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen (Lorenzen et al., 2011)
pcDNA3.1-wtADAM17_pc	murines Wildtyp-ADAM17 mit PC- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen
pcDNA3.1-HEADAM17_pc	murines HE-ADAM17 mit PC- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen (Düsterhöft et al., 2014)
pcDNA3.1-HEADAM17_flag	murines HE-ADAM17 mit Flag- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen
pcDNA3.1-ADAM17p10_pc	murines ADAM17p10 mit PC- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen (Düsterhöft et al., 2014)
pcDNA3.1-ADAM17E22_pc	murines ADAM17E22 mit PC- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen (Lorenzen et al., 2012)
pcDNA3.1-IL1-R <sub>II</sub> _myc	humaner IL1-R <sub>II</sub> mit Myc- <i>Tag</i>	Dr. Inken Lorenzen (Lorenzen et al., 2012)
pcDNA3.1-IL1-R <sub>II</sub> _AP	humaner IL1-R <sub>II</sub> mit N-terminaler alkalinen Phosphatase	Dr. Inken Lorenzen (Lorenzen et al., 2012)
p409-IL6R	humaner IL6-R	Dr. Athena Chalaris (Chalaris et al., 2007)
pcDNA4TO-FLAG	muriner pro-TNF- $\alpha$ mit FLAG- <i>Tag</i>	Dr. Athena Chalaris (Düsterhöft et al., 2014)
pEGFP-N1	eGFP-Expressionsvektor	Clontech Laboratories
PDIA6-pCEP	humane PDIA6	Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 3.3** – Antikörper

Antikörper	Antigen	Bezugsquelle
HPC4	PC- <i>Tag</i>	Eigenproduktion (murin)
4-11	humaner IL-6R	Eigenproduktion (murin)
anti-Myc (9E10)	Myc- <i>Tag</i>	Eigenproduktion (murin)
anti-Flag	Flag- <i>Tag</i>	Cell Signaling Technology Europe ( <i>rabbit</i> , 2368S; Leiden, Niederlande)
anti-GFP (D5.1)	eGFP	Cell Signaling Technology Europe ( <i>rabbit</i> , 2956S; Leiden, Niederlande)
anti-TIMP3 (D74B10)	TIMP3	Cell Signaling Technology Europe ( <i>rabbit</i> , 5673; Leiden, Niederlande)
anti-PDIA6	PDIA6	Abcam ( <i>rabbit</i> , ab11432; Cambridge, UK)
$\alpha$ -mouse-POD	muriner IgG	Thermo Fisher Scientific ( <i>goat</i> ; Bonn, Deutschland)
$\alpha$ -rabbit-POD	<i>rabbit</i> IgG	Thermo Fisher Scientific ( <i>goat</i> ; Bonn, Deutschland)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Reinigung von Plasmid-DNA

Die verwendete Plasmid-DNA wurden entweder über das *Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond PC 500* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion, wie im folgenden Kapitel beschrieben, aus *E.coli* DH5- $\alpha$  extrahiert und gereinigt.

#### 3.2.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Für die DNA-Extraktion wurden die Puffer aus dem *Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond PC 500* (Macherey-Nagel) verwendet (siehe Tabelle 3.4, Seite 28). Eine 400-ml-Kultur, die mit DH5- $\alpha$ -Bakterienzellen mit dem gewünschten Plasmid inokuliert wurde, wurde für neun bis zwölf Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und darauf für 20 Minuten bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 8 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Für die Lyse wurden zur Suspension 8 ml Lysepuffer hinzugegeben und mehrmals invertiert. Nach maximal vier Minuten wurden 8 ml kalter (4 °C) Neutralisationspuffer hinzupipettiert und die Suspension wurde wieder mehrmals invertiert. Danach wurde die Suspension bei 18000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 24 ml einer 1:1 Mischung Chloroform/Phenol gemischt und bei 5000 g für zehn Minuten zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und ein weiteres Mal mit 24 ml Chloroform/Phenol gemischt und zentrifugiert. Mit der oberen, wässrigen Phase wurde die Prozedur ein drittes Mal durchgeführt. Darauf wurde der Ablauf weitere dreimal mit nur Chloroform statt Chloroform/Phenol wiederholt. Die Plasmid-DNA-haltige obere Phase wurde auf 2-ml-Gefäße zu je 1 ml aufgeteilt, mit 0.75 ml Isopropanol (RT) versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C maximal zentrifugiert (mindestens 17000 g). Der Überstand wurde abgenommen und auf das zurückbleibende Pellet wurden 500  $\mu$ l 70 % Ethanol gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur maximal zentrifugiert (mindestens 17000 g). Der Überstand wurde abgenommen und das Restethanol wurde durch Trocknung bei Raumtemperatur entfernt. Um die DNA zu rekonstituieren, wurden die Pellets mit 30  $\mu$ l autoklaviertem und doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O versetzt und für 40 Minuten bei 45 °C und 300 rpm inkubiert.

**Tabelle 3.4** – Puffer für Phenol-Chloroform-Extraktion

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
Resuspensionspuffer	50.0 mM Tris	6.0 g
	10.0 mM EDTA	2.9 g
	100.0 µg/ml RNase A	100.0 g
	mit HCL auf pH 8.0 eingestellt	
Lysepuffer	0.2 M NaOH	80.0 g
	1.0 % SDS	10.0 g
Neutralisationspuffer	2.8 M KOAc	278.8 g
	1.0 % SDS	10.0 g
	mit HOAc auf pH 5.1 eingestellt	

### 3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Größenanalyse von Proteinen wurde die diskontinuierliche *SDS*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS*-PAGE) verwendet. Dafür wurden Proteinproben mit entweder reduzierendem oder nicht reduzierendem Lämmli-Probenpuffer (modifiziert nach Laemmli (1970), siehe Tabelle 3.5, Seite 29) versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Je nach Bedarf wurden entweder 12.5% -, 15% - oder 18% -Gele genutzt (siehe Tabelle 3.7, Seite 30). Die Elektrophorese wurde bei  $U = 150 \text{ V}$  ( $I = 30 - 40 \text{ mA}$ ) in *SDS*-Laufpuffer (siehe Tabelle 3.6, Seite 29) mit dem *Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell*-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) durchgeführt. In den folgenden Abschnitten sind die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Färbemethoden aufgeführt. Dabei wurde für eine ausreichende Proteinmenge (ab 200 ng pro 0.5 cm Bande) die Coomassie-Färbung, für geringe Mengen an Protein (bis zu 5 ng pro 0.5 cm Bande) die kolloidale Coomassie-Färbung verwendet.

**Tabelle 3.5** – Zusammensetzung der verwendeten Lämmli-Probenpuffer

Puffer	Konzentration	Einwaage für 20 ml
5x reduzierender	10.0 mM SDS	3.0 g
Lämmli-Puffer	40.0 % 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.5)	8.0 ml
	35.0 % Glycerol	7.0 ml
	25.0 % $\beta$ -Mercaptoethanol	5.0 ml
	6.0 $\mu$ M Bromphenolblau	4.0 mg
5x nicht	10.0 mM SDS	3.0 g
reduzierender	40.0 % 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.5)	8.0 ml
Lämmli-Puffer	35.0 % Glycerol	7.0 ml
	25.0 % H <sub>2</sub> O	5.0 ml
	6.0 $\mu$ M Bromphenolblau	4.0 mg

**Tabelle 3.6** – Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
10x SDS-Laufpuffer	0.25 mM Tris	30.3 g
	1.92 M Glycin	144.1 g
	1.00 % SDS	10.0 g

**Tabelle 3.7** – Gele für ein SDS-PAGE-Gel

Trenngele	12.5%	15%	18%
30 % Acrylamid-Stammlösung	2.50 ml	3.00 ml	3.60 ml
1.5 M Tris pH 8.8	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
10 % SDS-Lösung	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml
H <sub>2</sub> O	1.88 ml	1.38 ml	0.78 ml
10% APS-Lösung	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml
TEMED	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
<hr/>			
Sammelgel	7.5%		
30% Acrylamid-Stammlösung	0.63 ml		
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.63 ml		
10% SDS-Lösung	0.03 ml		
H <sub>2</sub> O	1.23 ml		
10% APS-Lösung	0.03 ml		
TEMED	0.01 ml		

### 3.2.2.1 Coomassie-Färbung

Für die Coomassie-Färbung wurden die in Tab 3.8 (Seite 31) aufgeführten Lösungen verwendet. Das Gel wurde zweimal mit je 100 ml doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und für mindestens sechs Stunden in 50 ml Coomassie-Lösung gefärbt. Darauf wurde es wieder zweimal mit je 100 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit der Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

### 3.2.2.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Lösungen, die für die kolloidale Coomassie-Färbung genutzt wurden, sind in Tabelle 3.9 (Seite 31) zusammengefasst. Das Gel wurde für mindestens sechs Stunden in der CC-Fixierlösung fixiert und anschließend dreimal mit 100 ml doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O für jeweils 30 Minuten gewaschen. Danach wurde es für eine Stunde in 100 ml der CC-Equilibrierungslösung inkubiert und für mindestens zwölf Stunden in der CC-Färbelösung gefärbt.

**Tabelle 3.8** – Für Coomassie-Färbung verwendete Puffer

Puffer	Konzentration	Einwaage für 100 ml
Coomassie-Lösung	25.0 % Methanol	25.0 ml
	10.0 % Essigsäure	10.0 ml
	126.6 pM Coomassie G-250	10.0 µg
Entfärbelösung	10.0 % Methanol	10.0 ml
	10.0 % Essigsäure	10.0 ml

**Tabelle 3.9** – Für kolloidale Coomassie-Färbung verwendete Puffer

Puffer	Konzentration	Einwaage für 100 ml
CC-Fixierlösung	50.0% Methanol	50.0 ml
	2.0% Phosphorsäure	2.0 ml
CC-Equilibrierungslösung	34.0% Methanol	34.0 ml
	2.0% Phosphorsäure	2.0 ml
	1.3 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17.0 g
CC-Färbelösung	34.0 % Methanol	34.0 ml
	2.0 % Phosphorsäure	2.0 ml
	1.3 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17.0 g
	70.0 pM Coomassie G-250	6.0 µg

### 3.2.3 Western Blotting

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden diese zunächst über eine *SDS-PAGE* (12.5 % Gel) getrennt und anschließend wurde mit dem Gel *Western Blotting* durchgeführt. Für *Western Blotting* wurde das *Mini Trans-Blot Cell-System* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) verwendet. Wenn nicht anders erwähnt, wurden hierfür 12.5 % Gele und PVDF-Membranen (Immobilion-P) von Millipore (Billerica, US) genutzt. Die Membran wurde vor dem *Blotting* mindestens 30 Sekunden in Methanol aktiviert und für mindestens zwei Minuten mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das *Blotting* wurde in 1x Transferpuffer (Tabelle 3.10, Seite 32) bei 100 V und 4 °C für zwei Stunden durchgeführt. Anschließend wurde der Blot mit 10 ml 1x TBS/5 % BSA (Tabelle 3.10, Seite 32) für 14 Stunden bei 4 °C blockiert. Für drei Stunden wurde der Blot mit dem jeweiligen 1. Antikörper (Tabelle 3.3, Seite 26) in 5 ml 1x TBST/1 % BSA inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST (Tabelle 3.10, Seite 32) wurde der Blot mit dem jeweiligen 2. Antikörper in 5 ml 1x TBST/1 % BSA inkubiert. Darauf wurde der Blot einmal mit 1x TBST und dreimal mit 1x TBS gewaschen. Zur Detektion wurden das *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* oder das *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, US) verwendet.

**Tabelle 3.10** – Übersicht über die verwendeten Puffer für *Western Blotting*

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
10x TBS	0.50 M Tris	60.6 g
	1.50 M NaCl	87.7 g
	mit HCL auf pH 7.4 eingestellt	
1x TBST	1x TBS	
	0.05 % Tween-20	0.5 ml
10x Transferpuffer	0.25 M Tris	30.3 g
	1.90 M Glycin	144.2 g
1x Transferpuffer	10.0 % 10x Transferpuffer	100.0 ml
	20.0 % Methanol	200.0 ml



### 3.2.4 Proteinbiochemie

#### 3.2.4.1 Expression in LB-Medium

Alle verwendeten Bakterienkulturen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Als Startkultur wurden 5 ml LB-Medium (siehe Tabelle 3.11, Seite 34) mit Kanamycin (30 µg/ml) verwendet. Die Startkultur wurde mit dem *E.coli*-Stamm BL21(DE3), welcher das gewünschte Plasmid trug, inokuliert. Nach zehn Stunden wurden mit 50 µl dieser Startkultur 100 ml LB-Medium mit Kanamycin (30 µg/ml) als Übernachtskultur angeimpft. Für die Expressionskultur wurden nach 14 Stunden 350 ml LB-Medium mit Kanamycin (30 µg/ml) mit 2 ml der Übernachtskultur versetzt. Das Bakterienwachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) überwacht. Bei einer  $OD_{600} = 0.6$  wurde die Expression mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Vor der Induktion ( $T_0$ ) wurde 1 ml der Bakteriensuspension als Expressionsprobe entnommen und bei 3000 g für fünf Minuten und 4 °C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde für eine spätere Analyse mittels SDS-PAGE in 100 µl 2.5x reduzierendem Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach der Induktion wurden nach jeder Stunde weitere Proben genommen und die  $OD_{600}$  bestimmt. Damit eine vergleichbare Bakterienzahl in allen Expressionsproben vorlag, wurde mit der folgenden Formel das zu entnehmende Volumen ( $x$ ) für die Expressionsproben in ml berechnet:

$$\frac{OD_{(600,T_0)} \cdot 1 \text{ ml}}{OD_{(600,T_x)}} = x \text{ ml}$$

Die Expressionsproben wurden wie die  $T_0$ -Expressionsproben für die SDS-PAGE vorbereitet. Nach vier Stunden wurden die Bakterien mittels Zentrifugation (5000 g, 4 °C) pelletiert. Bis zur Reinigung wurde das Pellet bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.4.2 Expression in Minimalmedium

Um Protein mit  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$  zu markieren wurden Minimalmedium (siehe Tabelle 3.11, Seite 34) statt LB-Medium und der Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS verwendet. Bis einschließlich der Inokulation der Expressionskultur wurde hierbei wie bei der Expression in LB-Medium vorgegangen. Erreichte die Expressionskultur eine  $OD_{600} = 0.5$ , wurde die Expression mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert und die Temperatur wurde auf 25 °C gesenkt. Nach 16 Stunden wurden die Bakterien mittels Zentrifugation (5000 g, 4 °C) pelletiert und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 3.11** – Verwendete Medien und Puffer für bakterielle Expression

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
LB-Medium (Fertigmischung Roth)	10.0 g/l Trypton 5.0 g/l Hefeextrakt 10.0 g/l NaCl pH 7.0	
10x Salzlösung	0.45 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O 0.15 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 85.56 mM NaCl mit HCL auf pH 7.2 eingestellt	80.0 g 20.0 g 5.0 g
Minimalmedium	20.00 % 10x Salzlösung 0.01 % 1 M Ca <sub>2</sub> Cl-Lösung 0.20 % 1 M MgSO <sub>4</sub> -Lösung 0.15 % 1 mg/ml Thiaminlösung 1.00 % 0.1 mg/ml Biotinlösung 11.00 mM Glukose 37.00 mM NH <sub>4</sub> Cl	200.0 ml 0.1 ml 2.0 ml 1.5 ml 10.0 ml 2.0 g 2.0 g

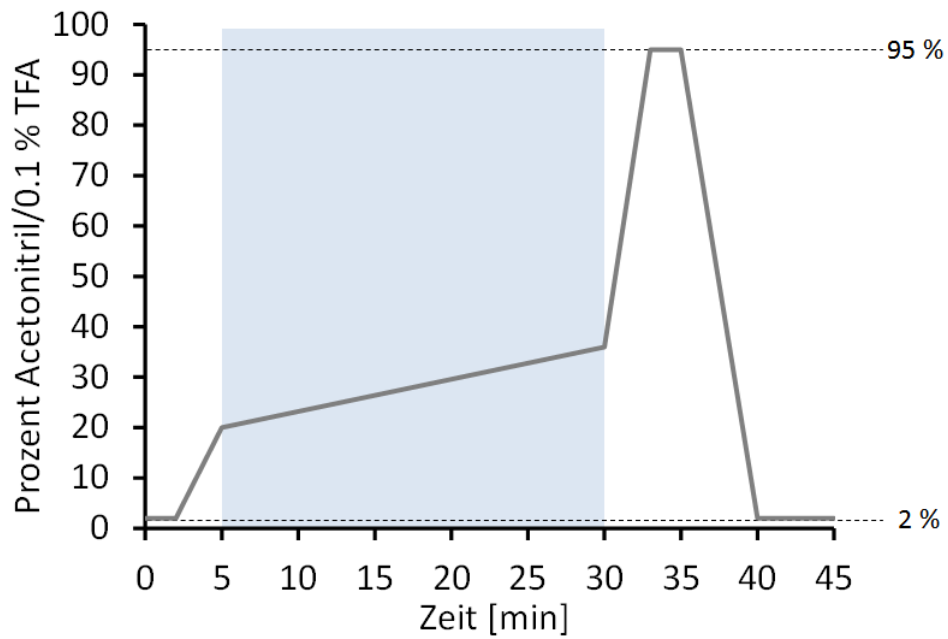
### 3.2.4.3 Proteinreinigung

Die aus einem Liter Expressionskultur erhaltenen Bakterienpellets (siehe Kapitel 3.2.4.1, Seite 33 oder Kapitel 3.2.4.2, Seite 33) wurden in 50 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Als Resuspensionspuffer diente 1x PBS, das mit einer Tablette Proteaseinhibitoren (*cOmplete, Mini Protease Inhibitor Tablets/ Roche, Basel, Schweiz*) sowie mit 10 u/ml Benzonase versetzt war. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis sechsmal jeweils eine Minute mit einem Zeitintervall von 50 % (Amplitudenleistung: 30 %) sonifiziert (Sonoplus Sonotrode TT 19, Bandelin, Berlin, Deutschland). Das Lysat wurde anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C, sowie durch Filtrieren (Porengröße: 0.2 µm) von unlöslichen Bestandteilen geklärt. Das so vorbehandelte Lysat wurde anschließend mit Hilfe des *ÄKTApurifier*-Systems (GE Healthcare, München, Deutschland) mittels Affinitätschromatografie und Größenausschlusschromatografie gereinigt. Für die Affinitätschromatografie wurden 1-ml-*HisTrap HP*-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Für die Größenausschlusschromatografie kam eine *HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade*-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) zum Einsatz.

Disulfidisomere wurden mittels *Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)* am *Prominence*-System (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) über eine C18-Säule (MultoHigh-Bio-200-C18) getrennt. Als Laufmittel dienten Acetonitril/ 0.1 % TFA und H<sub>2</sub>O/ 0.1 % TFA. Die Trennung wurde durch einen ansteigenden Acetonitrilgradienten (0.64 Prozentpunkte pro Minute) erreicht. In Abbildung 3.1 (Seite 36) und in Tabelle 3.12 (Seite 36) ist der Verlauf des verwendeten *RP-HPLC*-Programms dargestellt. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

### 3.2.4.4 Ellman's Test

Der Ellman's Test wurde verwendet, um freie Thiole und damit offenen Disulfidbrücken in Proteinen nachzuweisen. Dafür wurde 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure (DTNB, Ellman's Reagenz) verwendet, dass mit einer freien Thiolgruppe reagiert. Aus dieser Reaktion entsteht 2-Nitro-5-Thiobenzoat (NTB<sup>2-</sup>) mit einer charakteristischen Absorption bei 410 nm. Für den Ellman's Test wurde die in Tabelle 3.13 (Seite 37) beschriebene DTNB-Lösung verwendet. 25 µl DTNB-Lösung wurde mit 50 µl einer 1 M Tris/HCl-Lösung (pH 8) und 400 µl H<sub>2</sub>O versetzt, und dann mit 25 µl der Probe gemischt. Der Ansatz wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einem Spektrophotometer wurde daraufhin die Absorpti-



**Abbildung 3.1 – Verwendeter *RP-HPLC*-Gradient zu Trennung von Disulfidisomeren:** Als Laufmittel wurden Acetonitril/ 0.1 % TFA und H<sub>2</sub>O/ 0.1 % TFA verwendet. Der Gradient ist in Prozent Acetonitril/ 0.1 % TFA angegeben. Im blau hinterlegten Bereich des Laufs (20 bis 36 %) wurde ein Gradient von 0.64 Prozentpunkte pro Minute genutzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

**Tabelle 3.12 – *RP-HPLC*-Programm**

Zeit [min]	Prozent Acetonitril/ 0.1 % TFA
0	2
2	2
20	20
30	36
33	95
35	95
40	2
45	2

on bei 410 nm gemessen. Vor der Messung wurde eine Eichgerade mit  $\beta$ -Mercaptoethanol mit den folgenden Endkonzentrationen erstellt: 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M und 8  $\mu$ M. Die jeweilige Konzentration an  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde in 1x PBS angesetzt, da auch die gemessenen Proteine in 1x PBS gelöst waren.

**Tabelle 3.13** – Zusammensetzung der DTNB-Lösung

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
DTNB-Lösung	50.0 mM Natriumacetat (3x H <sub>2</sub> O)	6.80 g
	2.0 mM 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure	0.79 g

### 3.2.4.5 Reduktion der PDI

1 mg lyophilisierte, bovine PDI (Extrakt aus boviner Leber, Takara Bio Inc., Otsu, Japan) wurde nach den Angaben des Herstellers in 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um die PDI zu reduzieren, wurden 74  $\mu$ M PDI mit 40 mM DTT in 1x PBS für zwölf Stunden bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz mittels einer NAP-5 Säule und anschließend mit einer NAP-25 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) vom DTT befreit. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Als Puffer diente 1x PBS. Die reduzierte PDI wurde nach abgeschlossener Reinigung umgehend eingesetzt.

### 3.2.4.6 Renaturierung

Zur Renaturierung wurden 1 mg Protein in 15 ml Denaturierungspuffer (siehe Tabelle 3.14, Seite 38) gelöst und zweimal in einem Dialyseschlauch (Ausschlussvolumen 5 kDa) gegen ein Liter Renaturierungspuffer 1 (siehe Tabelle 3.14, Seite 38) für je 48 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert. Anschließend wurde zweimal gegen Renaturierungspuffer 2 (siehe Tabelle 3.14, Seite 38) und zweimal gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 8) je 48 Stunden lang bei Raumtemperatur dialysiert. Zur Trennung von Disulfidisomeren wurde *RP-HPLC* eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.4.3, Seite 35)

**Tabelle 3.14** – Puffer für Renaturierung

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
Denaturierungspuffer	5.0 M Guanidinhydrochlorid in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0	477.7 g
Renaturierungspuffer 1	1.0 M Guanidinhydrochlorid 3.0 mM reduziertes Glutathion 0.3 mM oxidiertes Glutathion in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0	95.50 g 0.92 g 0.18 g
Renaturierungspuffer 2	3.0 mM reduziertes Glutathion 0.3 mM oxidiertes Glutathion in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0	0.92 g 0.18 g

### 3.2.5 Auf Zellkultur basierende Experimente

#### 3.2.5.1 Zellkultur

ADAM17<sup>ex/ex</sup> MEF- (*mouse embryonic fibroblasts*) (Chalaris et al., 2010), HepG2- und HEK-293T-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) wurden in DMEM (high-glucose mit Glutamin) mit 10 % fötalem Kälberserum, Streptomycin (100 mg/L) und Penicillin (60 mg/L) in 10-cm-Schalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Weitere benutzte Mediumzusammensetzungen sind in Tabelle 3.15 (Seite 39) gelistet. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst und mit 4 ml DMEM (10 %|1 %) versetzt und bei 1000 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml frischen DMEM (10 %|1 %) resuspendiert. Im Fall der HEK-293T- und der HepG2-Zellen wurden 50 µl im Fall der ADAM17<sup>ex/ex</sup>-MEF 20 µl in eine neue 10-cm-Schale überführt.

**Tabelle 3.15** – Verwendete Medien

DMEM (10 % 1 %)	DMEM (high-glucose mit Glutamin PAA) mit 10 % fötalem Kälberserum, Streptomycin (100 mg/L) und Penicillin (60 mg/L)
DMEM (5 % 1 %)	DMEM (high-glucose mit Glutamin PAA) mit 5 % fötalem Kälberserum, Streptomycin (100 mg/L) und Penicillin (60 mg/L)
DMEM (- -)	DMEM (high-glucose mit Glutamin PAA)

Die für die Lyse eukaryotischer Zellen eingesetzten Lysepuffer sind in Tabelle 3.16 (Seite 40) gelistet. Die Lysepuffer wurden mit HCl auf pH 7.5 eingestellt und vor dem Gebrauch wurden zu je 50 ml Puffer eine Tablette Proteaseinhibitoren (*cOmplete, Mini Protease Inhibitor Tablets/ Roche, Basel, Schweiz*) und 50 µl Marimastat (5 mM) hinzugegeben. Die Zellen wurden wie folgt geerntet. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml 1x PBS/0.05 % Natriumazid (4 °C) von der Zellkulturschale abgeschabt. Die Zellen wurden bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde entweder in Lysepuffer\_1 oder Lysepuffer\_2 bei 4 °C für 30 Minuten lysiert. Anschließend wurde das Lysat mittels 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C von unlöslichen Bestandteilen befreit.

#### 3.2.5.2 Zellen für Präzipitations- und Ko-Immunopräzipitationsexperimente

Für Präzipitations- und Ko-Immunopräzipitationsexperimente wurden 4x10<sup>6</sup> HEK-293T-Zellen in 10 ml DMEM (10 %|1 %) auf 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden

wurden für einen Transfektionsansatz 8 µg Plasmid-DNA mit 20 µl PEI (1 mg/ml) in 500 µl DMEM gemischt. Dieser Ansatz wurde für 20 Minuten bei RT inkubiert und zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 12 Stunden zu DMEM (5 %|1 %) gewechselt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

**Tabelle 3.16** – Übersicht über die verwendeten Lysepuffer

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
Lysepuffer_1	20.0 mM Tris	2.4 g
	150.0 mM NaCl	8.8 g
	2.0 mM EDTA	0.6 g
	1.0 % TritonX-100	10.0 ml
	mit HCL auf pH 7.5 eingestellt	
Lysepuffer_2	50.0 mM Tris	6.1 g
	200.0 mM NaCl	11.7 g
	2.0 mM EDTA	0.6 g
	1.0 % TritonX-100	10.0 ml
	5.0 % Glycerin	50.0 ml
mit HCL auf pH 7.5 eingestellt		

### 3.2.5.3 Kopplung von Antikörpern oder Peptiden an *Sepharose-Beads*

Mit dem hier genutzten Prinzip lassen sich primäre Aminogruppen wie beispielsweise in Lysinresten an *Sepharose-Beads* binden. Für Präzipitationsexperimente wurden in 1x PBS gelöst Peptide an *Beads* (*NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow*, GE Healthcare, München, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers gekoppelt. Die genutzten Peptide sind in Tabelle 3.17 (Seite 41) aufgeführt. Es wurde zum einen ein als CANDIS (*conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence*) bezeichneter Teil der *Stalk*-Region von ADAM17 C-terminal mit einer kurzen *Linker*-Sequenz (GSGSG) und einem Lysinrest versehen. Des Weiteren wurde ein Kontrollpeptid (Kp), das die gleichen Aminosäurereste besitzt wie CANDIS, die aber in einer anderen, zufälligen Reihenfolge angeordnet sind. Außerdem wurde ein Peptid (pA10) benutzt, das die zu CANDIS korrespondierende Sequenz aus der *Stalk*-Region von ADAM10 darstellt. Auch diese beiden Peptide wurden mit der *Linker*-Sequenz



und einem C-terminalen Lysinrest versehen. Alle Peptide wurden bei den Firmen Biosyntan GmbH (Berlin, Deutschland) oder peptides&elephants GmbH (Potsdam, Deutschland) erworben.

Für Ko-Immunopräzipitationsexperimente wurden Antikörper gegen den PC-Tag (HPC4) oder IgG-Antikörper als Isotyp-Kontrolle (*nonsense*), ebenfalls in 1x PBS gelöst, nach dem gleichen Protokoll wie bei den Peptiden an die *Beads* gebunden. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindungen an die reinen *Beads* wurde die Kopplung nur mit 1x PBS durchgeführt.

**Tabelle 3.17** – Verwendete Peptid-*Beads*

Name der <i>Beads</i>	gekoppeltes Peptid	Aminosäuresequenz
CANDIS- <i>Beads</i>	CANDIS mit <i>Linker</i>	RVQDVIERFWDFIDQLS_GSGSGK
pA10- <i>Beads</i>	Peptid aus <i>Stalk</i> -Region von ADAM10 mit <i>Linker</i>	VDADGPLARLKKAIKIFSP_GSGSGK
Kp- <i>Beads</i>	Kontrollpeptid mit <i>Linker</i>	DQWRVVQIEFDIDLFRS_GSGSGK

**Tabelle 3.18** – Verwendete Antikörper-*Beads*

Name der <i>Beads</i>	Antikörper	Epitop (Aminosäuresequenz)
HPC4- <i>Beads</i>	HPC4	PC-Tag (EDQVDPRLIDGK)
<i>nonsense</i> Antikörper- <i>Beads</i> (noAk- <i>Beads</i> )	IgG-Antikörper	kein Peptidepitop

### 3.2.5.4 Ko-Immunopräzipitationsexperimente

Um Interaktionsstudien durchzuführen, wurden die PC-*getaggten* Konstrukte mit dem möglichen Interaktionspartner, wie in Kapitel 3.2.5.2 (Seite 39) beschrieben, koexprimiert und gemäß Kapitel 3.2.5.1 (Seite 39) geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 30 µl Antikörper-

*Beads* (Kapitel 3.2.5.3, Seite 40) vor Gebrauch zweimal mit 1 ml Lysepuffer\_2/ 5 % BSA/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Ein Ko-Immunopräzipitationsansatz bestand aus den jeweiligen *Beads* in 1 ml Lysepuffer\_2/ 2.5 % BSA/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 400 µl des jeweiligen Lysats. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die *Beads* fünfmal mit 1 ml Lysepuffer\_2/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Um die erfolgreich präzipitierten Proteine mit Hilfe eines *Western Blots* (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 32) sichtbar zu machen, wurden die *Beads* mit 50 µl 2.5x Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 3.5, Seite 29) versetzt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt.

### 3.2.5.5 Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Überexpression von PDIA6

Um die Interaktion zwischen dem IL-6R und PC-*getaggte* ADAM17-Konstrukten unter dem Einfluss einer Überexpression von PDIA6 zu untersuchen, wurden zum einen der IL-6R mit dem jeweiligen ADAM17-Konstrukt in HEK-293T-Zellen, wie in Kapitel 3.2.5.2 (Seite 39), koexprimiert. Dabei wurde ein Verhältnis der Expressionsvektoren, IL-6R zu ADAM17-Konstrukt, von 1:1 genutzt. Zum anderen wurde in einem weiteren Ansatz zusätzlich PDIA6 überexprimiert. Hierbei wurde ein Verhältnis der Expressionsvektoren, IL-6R zu ADAM17-Konstrukt zu PDIA6, von 3:3:2 verwendet. Nach der Ernte und Lyse der Zellen (siehe 3.2.5.1, Seite 39) wurde eine Ko-Immunopräzipitation wie in Kapitel 3.2.5.4 (Seite 41) durchgeführt.

### 3.2.5.6 Ko-Immunopräzipitationsexperimente unter *in-vitro*-Inkubation mit reduzierter PDI

Um den Einfluss einer *in-vitro*-Inkubation mit reduzierter PDI (siehe Kapitel 3.2.4.5, Seite 37) auf die Bindung von ADAM17 zum IL-6R zu untersuchen, wurde ähnlich wie bei den anderen Ko-Immunopräzipitationsexperimenten mit HPC4-*Beads* vorgegangen (siehe Kapitel 3.2.5.4, Seite 41). Jedoch wurde hier das PC-*getaggte* ADAM17-Konstrukt nicht mit dem IL-6R in HEK-293T-Zellen koexprimiert. Stattdessen wurden die Konstrukte einzeln in HEK-293T-Kulturen exprimiert. Nach der Ernte und der Lyse (siehe 3.2.5.1, Seite 39) wurde zunächst das Lysat mit dem ADAM17-Konstrukt aufgeteilt. Es wurden für zwei Ansätze jeweils 400 µl Lysat pro Ansatz mit 1 ml Lysepuffer\_2/ 2.5 % BSA/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> gemischt und auf je 30 µl HPC4-*Beads* gegeben. Die Ansätze wurden für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die *Beads* beider Ansätze wurden zwei Mal mit 1 ml 1x PBS gewaschen und darauf entweder mit 200 µl reduzierter PDI in 1x PBS (10 µM; siehe Kapitel 3.2.4.5, Seite 37) oder

mit nur 1x PBS (Negativkontrolle) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die *Beads* beider Ansätze wurden mit 1 ml Lysepuffer\_2/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen und je mit 1 ml Lysepuffer\_2/ 2.5 % BSA/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> sowie mit 400 µl des IL-6-Rezeptor-Lysates versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die *Beads* wie in Kapitel 3.2.5.4 (Seite 41) beschrieben gewaschen und für *Western Blotting* vorbereitet.

Die Stärke der Bindung des IL-6R an das jeweilige ADAM17-Konstrukt wurde über die *Western Blots* ermittelt. Dabei wurden die einzelnen Banden des IL-6R und der jeweiligen ADAM17-Konstrukte auf den *Western Blots* densitometrisch mit dem Computerprogramm ImageJ (Schneider et al. (2012)) gemessen. Der ermittelte Wert der IL-6R-Bande wurde durch den Wert der Bande des dazugehörigen ADAM17-Konstrukts geteilt. Die so erhaltenen zwei Verhältnisse innerhalb eines experimentellen Ansatzes, bestehend aus dem ADAM17-Konstrukt - mit entweder reduzierter PDI oder mit 1x PBS inkubiert - wurden auf das PBS-inkubierte Verhältnis normiert.

### 3.2.5.7 Präzipitationsexperimente mit an *Beads* gekoppelten Peptiden

Um die Interaktion zwischen Peptiden und verschiedenen Interaktionspartnern mit Präzipitationsexperimenten zu testen, wurde die Peptide, wie in Kapitel 3.2.5.3 (Seite 40) dargelegt, an *Beads* gekoppelt. Die zu testenden Konstrukte wurden wie in Kapitel 3.2.5.2 (Seite 39) exprimiert und gemäß Kapitel 3.2.5.1 (Seite 39) lysiert. Pro Ansatz wurden 30 µl Peptid-*Beads* vor Gebrauch zweimal mit 1 ml Lysepuffer\_2/ 5 % BSA für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Ein Präzipitationsansatz bestand aus den jeweiligen Peptid-*Beads* in 1 ml Lysepuffer\_2/ 2.5 % BSA und 250 µl des jeweiligen Lysats. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die *Beads* fünfmal mit 1 ml Lysepuffer\_2 gewaschen. Um die erfolgreich präzipitierten Proteine mit Hilfe eines *Western Blots* (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 32) sichtbar zu machen, wurden die *Beads* mit 50 µl 2.5x Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 3.5, Seite 29) versetzt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt.

### 3.2.5.8 *Shedding*-Aktivitätstest

Um die *Shedding*-Aktivität von ADAM17-Konstrukten zu untersuchen, wurden *Shedding*-Experimente wie folgt durchgeführt. Für die *Shedding*-Experimente wurden in 6-*well*-Platten 1x10<sup>5</sup> MEF ADAM17<sup>ex/ex</sup> pro *well* in 1 ml DMEM (10 %|1 %) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden für einen Transfektionsansatz 2 µg DNA mit 4 µl Turbofect (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, US) in 100 µl DMEM gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die benutzte DNA war eine Mischung aus 1.6 µg pcDNA3.1-IL-1R<sub>II</sub>-AP und aus 0.4 µg des Plasmids, welches das zu testenden ADAM17-Konstrukt kodierte. Das Medium der Zellen wurde durch 900 µl frisches DMEM (10 %|1 %) ersetzt und der Transfektionsansatz wurde hinzupipettiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde für das *Shedding*-Experimente das Medium der Zellen mit 1 ml DMEM (-|-) ersetzt. Entweder wurden die Zellen nicht stimuliert, stimuliert oder stimuliert und gleichzeitig mit einem Metalloproteaseinhibitor behandelt (siehe Tabelle 3.19, Seite 45). Als Metalloproteaseinhibitor wurden entweder GM6001 oder Marimastat verwendet. Die Zellen wurden zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Medium und Zellen wurden geerntet, um mittels eines Alkaline-Phosphatase-Assays (AP-Assay) die Menge an prozessierten IL-1R<sub>II</sub>-APs zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden die geernteten Zellen in 100 µl Lysepuffer\_1, wie in Kapitel 3.2.5.1 (Seite 39) beschrieben, lysiert.

Für den AP-Assay wurden von den Überständen je 100 µl und von den Lysaten je 10 µl eingesetzt. Die 10 µl Lysat wurden je vorher mit 40 µl DMEM (-|-) verdünnt. Für die Messung wurden mit 100 µl Überstände und Lysate mit 50 µl Substratpuffer (siehe Tabelle 3.20, Seite 45) versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen, die proportional zur AP-Aktivität ist. Um aus jedem Überstand-Lysat-Paar die jeweilig *Shedding*-Aktivität zu erhalten, wurde die Absorption des Überstandes durch die des Lysates geteilt. Zur Normalisierung wurden die erhaltenen Überstand-Lysat-Verhältnisse innerhalb eines Experiments durch das Verhältnis der stimulierten Negativkontrolle dividiert. Jedes Experiment, immer bestehend aus einer Negativkontrolle, wtADAM17 als Positivkontrolle sowie aus den zu testenden ADAM17-Konstrukten, wurde mindestens dreimal durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen statt mit einem ADAM17-Konstrukt mit dem eGFP-Expressionsvektor transfiziert.

**Tabelle 3.19** – Versuchsansatz für einen *Shedding*-Aktivitätstest

unstimuliert	stimuliert	stimuliert mit Inhibitor
1 ml DMEM (- -) 4 µl DMSO	1 ml DMEM (- -) 100 nM PMA (in DMSO) 2 µl DMSO	1 ml DMEM (- -) 100 nM PMA (in DMSO) 50 µM GM6001 oder 10 µM Mari- mastat (in DMSO)

**Tabelle 3.20** – Substratpuffer für den AP-Assay

Puffer	Konzentration	Einwaage für 1 L
Substratpuffer	100.0 mM Glycin	2.4 g
	1.0 mM MgCl <sub>2</sub>	8.8 g
	1.0 mM ZnCl <sub>2</sub>	0.6 g
	1.0 mg/ml para-Nitrophenylphosphat frisch hinzufügen	

## 4 Durchführung und Ergebnisse

### 4.1 Die membranproximale Domäne von ADAM17

#### 4.1.1 Expression und Reinigung der rekombinanten Domäne

Um die membranproximale Domäne von ADAM17 (MPD17) strukturell und funktionell zu charakterisieren, wurde die Domäne rekombinant in *E.coli* exprimiert. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pET28a-MPD17 verwendet, welches das in Abbildung 4.1 (Seite 47) gezeigte Konstrukt kodiert. In Tabelle 4.1 (Seite 46) sind die theoretischen Eigenschaften dieses Konstrukts gelistet, die mit Hilfe des Programms *PROTEIN CALCULATOR v3.3* (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc2.html>) ermittelt wurden.

Für eine Expression in LB-Medium wurde, wie in Kapitel 3.2.4.1 (Seite 33) beschrieben, vorgegangen. Um isotope markiertes Protein zu erhalten, wurde eine Expression in Minimalmedium, wie in Kapitel 3.2.4.2 (Seite 33) geschildert, durchgeführt.

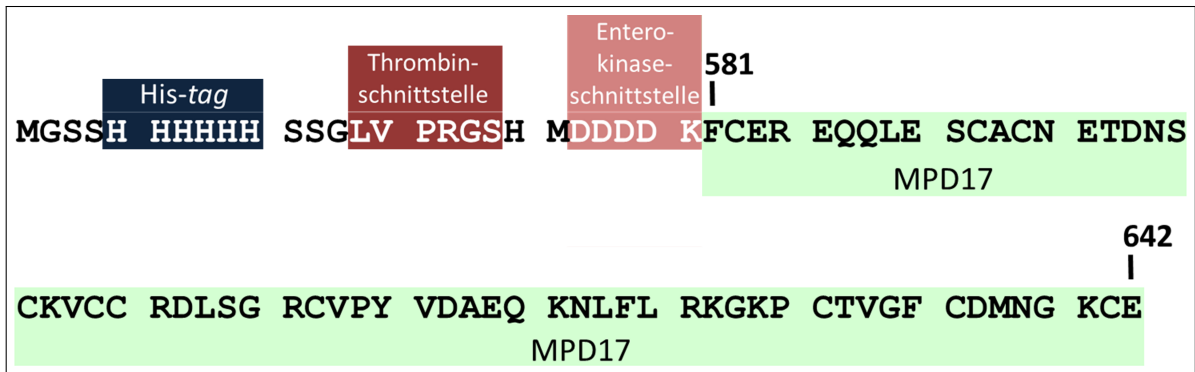
Abbildung 4.2(B) (Seite 48) zeigt, dass nach vierstündiger Expression ( $T_4$ ) die MPD17 exprimiert wurde. In der Spur  $T_4$  ist die neu entstandene Proteinbande knapp oberhalb der 14.4-kDa-Markerbande deutlich zu erkennen.

**Tabelle 4.1** – Errechnete Eigenschaften der rekomb. MPD17

Masse [Da]	9887
isoelektrischer Punkt (theoretisch)	6.60
Extinktionskoeffizient [(mg/ml) <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	0.1901

##### 4.1.1.1 Affinitätschromatografie der rekombinanten MPD17

Sowohl in BL21(DE3) als auch in BL21(DE3)pLys wurde die MPD17 löslich exprimiert. Die Bakterien wurden, wie in Kapitel 3.2.4.3 (Seite 35) beschrieben, aufgeschlossen. Mit dem zentrifugierten und filtrierten Lysat wurde als erster Reinigungsschritt eine Affinitätschromatografie über eine Nickel-NTA-Säule am *ÄKTApurifier*-System durchgeführt. Ein für diesen Reinigungsschritt typisches Chromatogramm ist in Abbildung 4.2(A) (Seite 48) abgebildet.



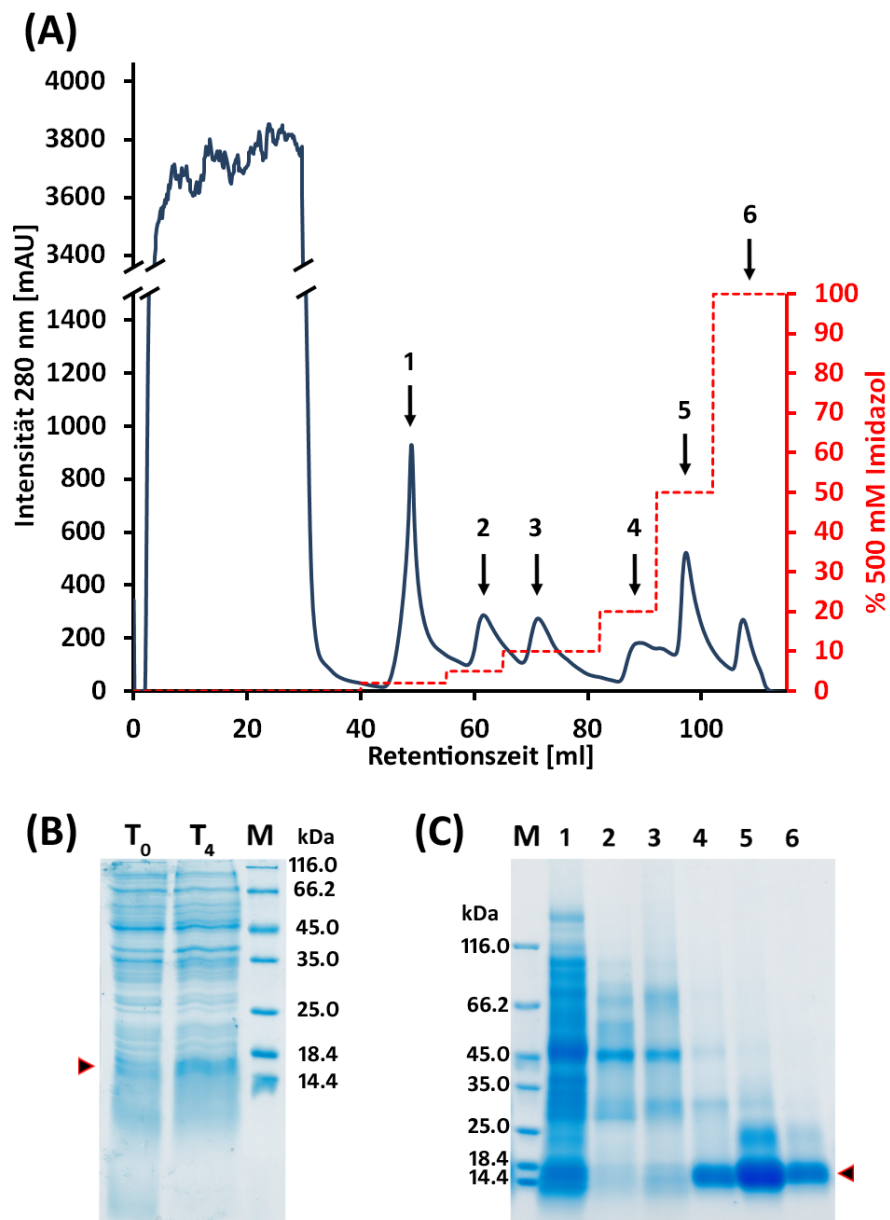
**Abbildung 4.1 – Aminosäuresequenz der rekombinanten MPD17:** Die MPD17 entspricht den Aminosäureresten zwischen F581 und E642 in ADAM17. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der rekombinanten MPD17, wie sie in pET28a-MPD17 kodiert ist. Direkt vor der Domäne (grün) befinden sich eine Entero-kinaseschnittstelle (beige), eine Thrombinschnittstelle (rot) sowie der His-Tag (blau).

Die Analyse der verschiedenen Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE ergab, dass rekombinantes MPD17 bei 100 mM, 250 mM und 500 mM Imidazol (4-6) eluierte (siehe Abbildung 4.2(C), Seite 48). Die 250-mM-Fraktion enthielt die höchste Konzentration an MPD17.

#### 4.1.1.2 Größenausschlusschromatografie der rekombinanten MPD17

Mit den 100-mM-, 250-mM- und 500-mM-Elutionsfraktionen wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt, um die MPD17 weiter zu reinigen und um den Multimerisierungszustand zu ermitteln. In Abbildung 4.3(A) (Seite 50) ist exemplarisch ein Chromatogramm der 500-mM-Fraktion dargestellt. Wie im Chromatogramm zu sehen ist, eluierte die größte Menge des Proteins stets bei einem Retentionsvolumen von ungefähr 80 ml von der Säule. Mit Hilfe des in Abbildung 4.3(C) (Seite 50) gezeigten Chromatogramms dreier Kalibrierungssubstanzen und der daraus erhaltenen Eichkurve (siehe Abbildung 4.3(D), Seite 50), wurde für die Monomerfraktion eine Proteinmasse von annähernd 12 kDa errechnet. Da die Masse des monomeren MPD17 9.887 kDa beträgt, kann hieraus geschlossen werden, dass die Hauptmenge der MPD17 als Monomer vorliegt. Eine zweite Proteinfraction eluierte bei einem Retentionsvolumen von circa 68 ml, was einer Proteinmasse von ungefähr 24 kDa entspricht und somit die Dimerform darstellt. Vor dieser Fraktion eluierten weitere nicht voneinander trennbare Oligomerformen der MPD17.

Weil die MPD17 zehn Cysteine besitzt, wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE unter der Verwen-



**Abbildung 4.2 – Expression und Reinigung der MPD17:** (B) Das SDS-PAGE-Gel (18 %) zeigt die Expression der rekombinanten MPD17 (Markierung) in BL21 vor ( $T_0$ ) und vier Stunden ( $T_4$ ) nach Induktion. Es wurden je 5  $\mu$ l der Expressionsproben aufgetragen. (A und C) Das Chromatogramm und das SDS-PAGE-Gel (15 %) zeigen die Reinigung der MPD17 aus dem Bakterienlysat mittels Nickel-Affinitätschromatografie (Säule: 1 ml *HisTrap HP*). Die Elution erfolgte in sechs Schritten ansteigender Imidazolkonzentration: 2 % = 10 mM (1); 5 % = 25 mM (2); 10 % = 50 mM (3); 20 % = 100 mM (4); 50 % = 250 mM (5); 100 % = 500 mM (6). Es wurden 30  $\mu$ l je Elutionsfraktion für die SDS-PAGE genutzt. In den Fraktionen 4 - 6 war rekombinante MPD17 (Markierung) enthalten.



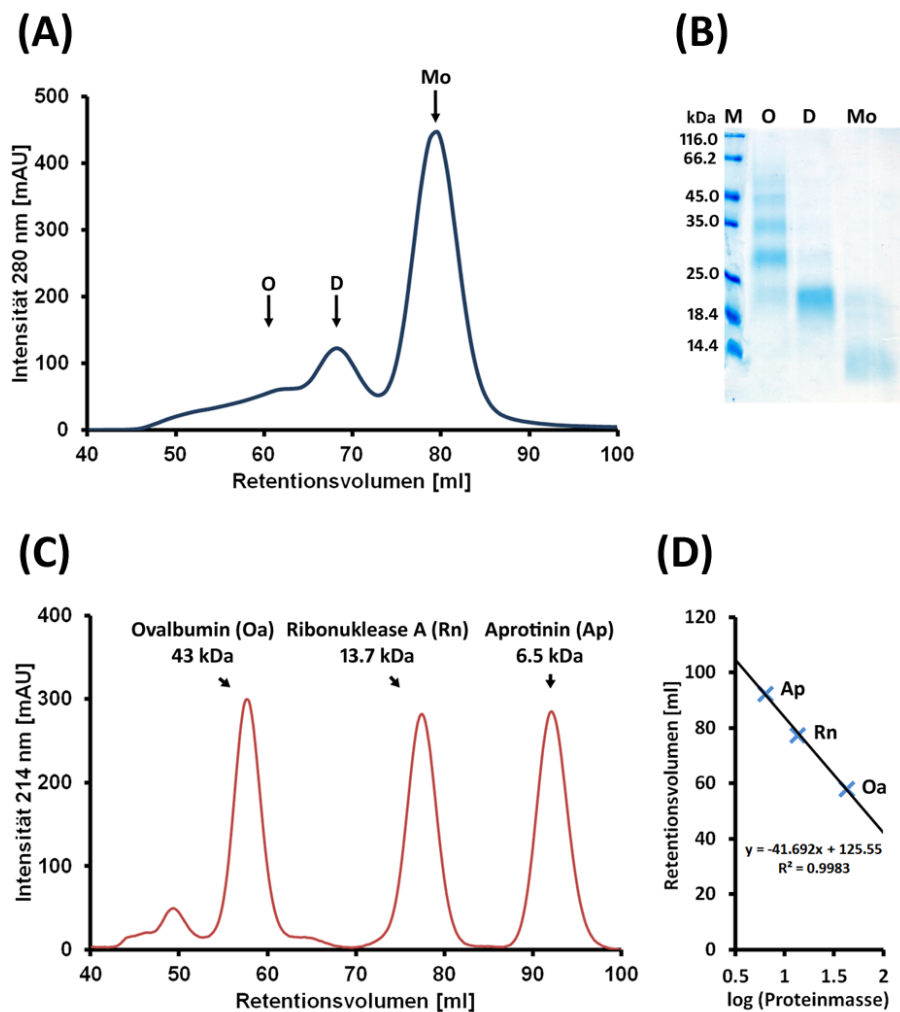
dung nicht reduzierenden Lämmli-Probenpuffers getestet, ob die Dimere und Oligomere durch intermolekulare Disulfidverbrückungen entstanden sind. Das Gel in Abbildung 4.3(C) (Seite 50) zeigt, dass die nicht reduzierte monomere Form in der *SDS*-PAGE unter der 14.4 kDa Bande des Markers läuft. Die nicht reduzierte Dimerform jedoch bei ungefähr der doppelten Masse. Dies belegt, dass die in der Größenausschlusschromatografie detektierten Dimerformen disulfidverbrückte Dimere sind. In der Oligomerfraktion lässt sich auf dem *SDS*-PAGE-Gel ebenfalls kein Monomer erkennen. Stattdessen finden sich Banden unterschiedlicher Proteinmassen, welche unterschiedliche, disulfidverbrückte Oligomerisierungszustände darstellen. Eine geringe Menge an zufälligen Verbrückungen über intermolekulare Disulfide bei der Anzahl von zehn Cysteinen war zu erwarten. Mit der Monomerfraktion, die die Hauptfraktion darstellt, wurde weitergearbeitet.

#### 4.1.1.3 Trennung verschiedener Disulfidisomere über *RP-HPLC*

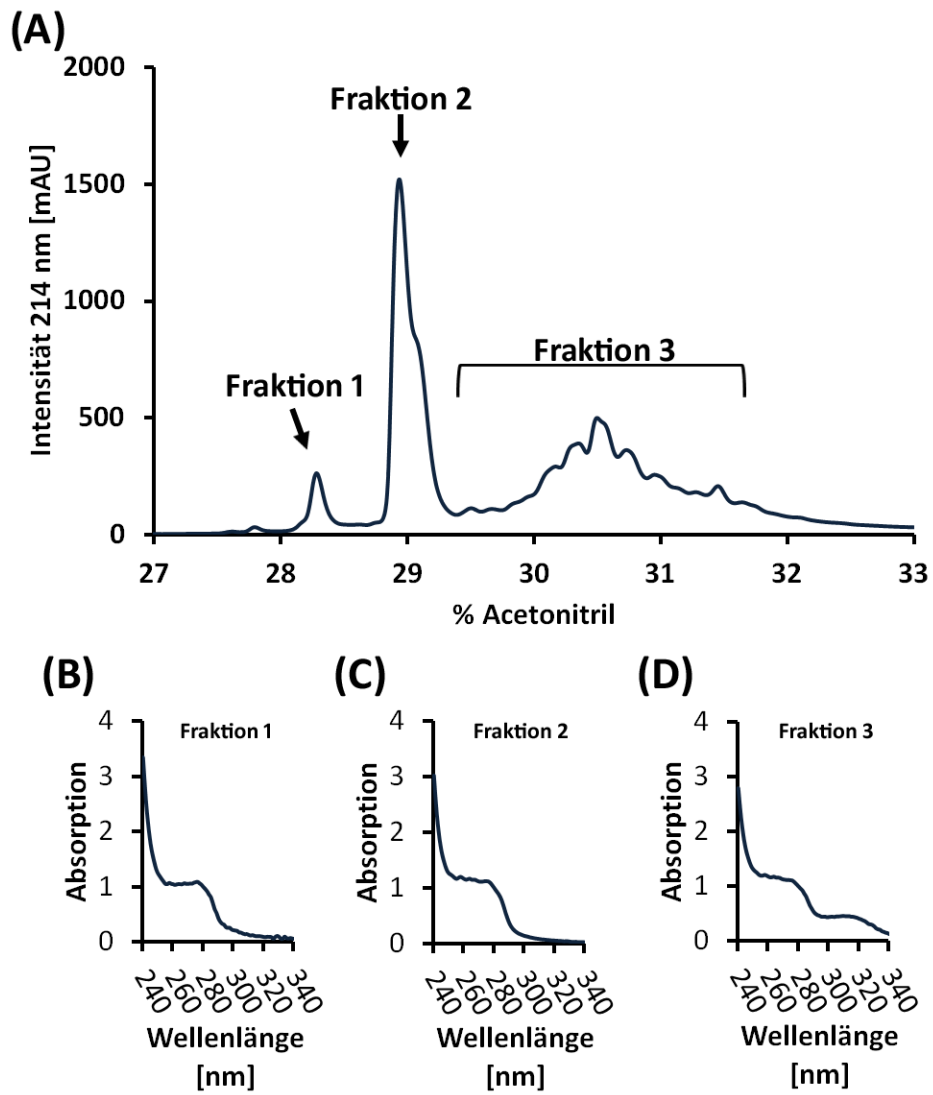
Unter der Voraussetzung, dass alle Disulfidbrücken in der MPD17 geschlossen sind, ergeben sich durch die zehn vorhandenen Cysteine 45 mögliche Disulfidisomere. Mittels *RP-HPLC* wurde die Monomerfraktion auf das Vorhandensein unterschiedlicher Disulfidisomere untersucht. Die *RP-HPLC* wurde unter ansteigender Acetonitrilkonzentration (0.64 % pro Minute) durchgeführt. Das in Abbildung 4.4(A) (Seite 51) abgebildete *RP-HPLC*-Chromatogramm zeigt, dass die Monomerfraktion aus mehreren Disulfidisomeren besteht: zwei gut trennbare Isomere (Fraktion 1 und Fraktion 2) und eine Vielzahl an nicht trennbaren Isomeren (Fraktion 3). Fraktion 2 stellte dabei stets das dominante Isomer dar. Die kleine Schulter an Fraktion 2 wurde von dieser getrennt gesammelt. Diese von Fraktion 2 abgetrennte Schulterfraktion wurde mit der Fraktion 3 vereinigt.

#### 4.1.1.4 Rechromatografie über *RP-HPLC* und Ellman's Test der MPD17-Disulfidisomere

Die drei *RP-HPLC*-Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierten Proteine wurden in 1x PBS rekonstituiert. In Abbildung 4.4(B-D) (Seite 51) sind die Absorptionsspektren der drei Fraktionen gezeigt. Das Isomerengemisch (Fraktion 3) zeigte neben dem Absorptionsmaximum bei 280 nm ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei circa 320 nm, was auf Aggregation hinweist. Die beiden gereinigten Disulfidisomere (Fraktion 1 und 2) wurden ein weiteres Mal über die *RP-HPLC* und zusätzlich mittels *SDS*-PAGE analysiert,



**Abbildung 4.3 – Größenausschlusschromatografie der MPD17:** (A) Dargestellt ist die Größenausschlusschromatografie der 500-mM-Fraktion (siehe Abbildung 4.2(A), Seite 48) mit der Säule: *HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade*. Es eluierten eine Monomerfraktion (Mo) und eine Dimerfraktion (D) sowie eine breitgezogene Fraktion aus verschiedenen Oligomerformen (O). (B) Auf das *SDS-PAGE*-Gel (18 %; nicht reduzierend) wurden je 5 µg Protein der drei Fraktionen aus (A) aufgetragen. (C) Chromatogramm der Kalibrierungssubstanzen. (D) Mit Hilfe der Kalibrierungssubstanzen erstellte Eichgerade zur Ermittlung der Proteinmasse aus der Retentionszeit.



**Abbildung 4.4 – RP-HPLC-Lauf der MPD17-Monomerfraktion:** (A) Dargestellt ist ein typisches RP-HPLC-Chromatogramm der Monomerfraktion. Es wurden 100 µg der Monomerfraktion eingesetzt. Zwischen 27 % und 33 % Acetonitril eluierten die verschiedenen Disulfidisomere. (B) Absorptionsspektren der drei RP-HPLC-Fractionen.

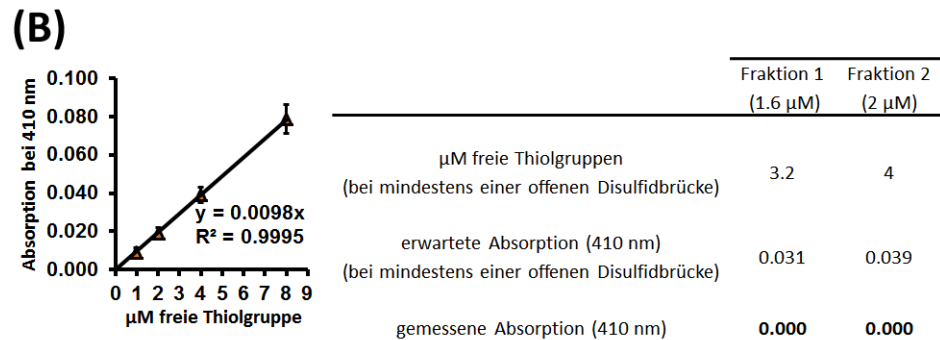
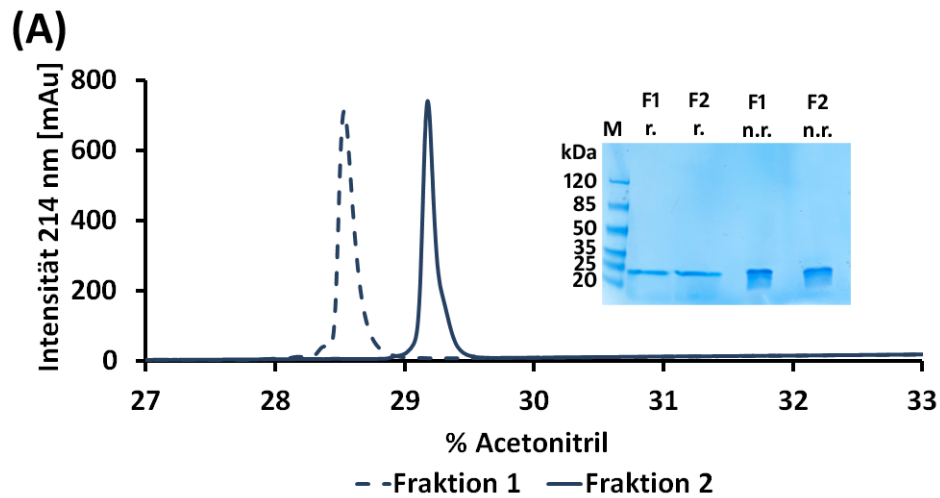
um die Reinheit beider Disulfidisomere zu prüfen (siehe Abbildung 4.5(A) Seite 53). Beide Isomere zeigten dabei keine Verunreinigungen durch andere Disulfidisomere oder andere Proteine. Des Weiteren erwiesen sich beide Disulfidisomere aufgrund des nicht veränderten Retentionsverhalten in der *RP-HPLC* als stabil.

Die Ausbeute an Fraktion 2 aus einer Expression in LB-Medium betrug sich auf circa 1-1.5 mg pro Liter, für eine Expression in Minimalmedium hingegen ergab sich eine geringere Ausbeute von circa 0.3-0.4 mg pro Liter. Die Ausbeute an Fraktion 1 betrug jeweils ungefähr ein Achtel bis ein Zehntel der Proteinmenge an Fraktion 2.

Um zu testen, ob alle Disulfidbrücken in den beiden gereinigten Disulfidisomeren geschlossen sind, wurde ein Ellman's Test, wie in Kapitel 3.2.4.4 (Seite 35) beschrieben, durchgeführt (siehe Abbildung 4.5(B), Seite 53). Um eine Eichgerade zu erstellen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M und 8  $\mu$ M). Für eine Messung wurde eine Konzentration von 1.6  $\mu$ M an Fraktion 1 und eine Konzentration von 2  $\mu$ M an Fraktion 2 eingesetzt. Wäre mindestens eine Disulfidbrücke innerhalb der MPD17-Disulfidisomere offen, wären die in Abbildung 4.5(B) (Seite 53) angegebenen Absorptionen bei 410 nm zu messen gewesen. Beide Disulfidisomere zeigten im Ellman's Test keine Absorption bei 410 nm. Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, dass in den beiden Isomeren keine freien Thiolgruppen vorhanden waren und damit alle Cysteine Disulfidbrücken gebildet haben.

#### 4.1.2 Struktur und Disulfidbrücken-Muster der MPD17-Disulfidisomere

Um zu ermitteln, ob die beiden Disulfidisomere eine Faltung aufweisen, wurde mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -markierten Proben beider Isomere jeweils ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen. In Abbildung 4.6 (Seite 55) ist die Überlagerung beider Spektren dargestellt. Sowohl das Spektrum der *RP-HPLC*-Fraktion 1 (schwarz) als auch das der *RP-HPLC*-Fraktion 2 (rot) zeigten eine gute Dispersion der Resonanzen. Dies weist in beiden Fällen auf gefaltetes Protein hin. Während jedoch die *RP-HPLC*-Fraktion 1 die erwartete Anzahl an Resonanzen lieferte, fehlten 32 % der erwarteten Resonanzen im Spektrum der *RP-HPLC*-Fraktion 2. Dies weist auf einen undefinierten und damit flexiblen Bereich innerhalb des Isomers der *RP-HPLC*-Fraktion 2 hin. Aus diesem Grund wurde dieses Disulfidisomer im Folgenden als offene MPD17 bezeichnet, während das Isomer der *RP-HPLC*-Fraktion 1 geschlossene MPD17 genannt wurde. Des Weiteren ist festzustellen, dass alle Resonanzen der offenen

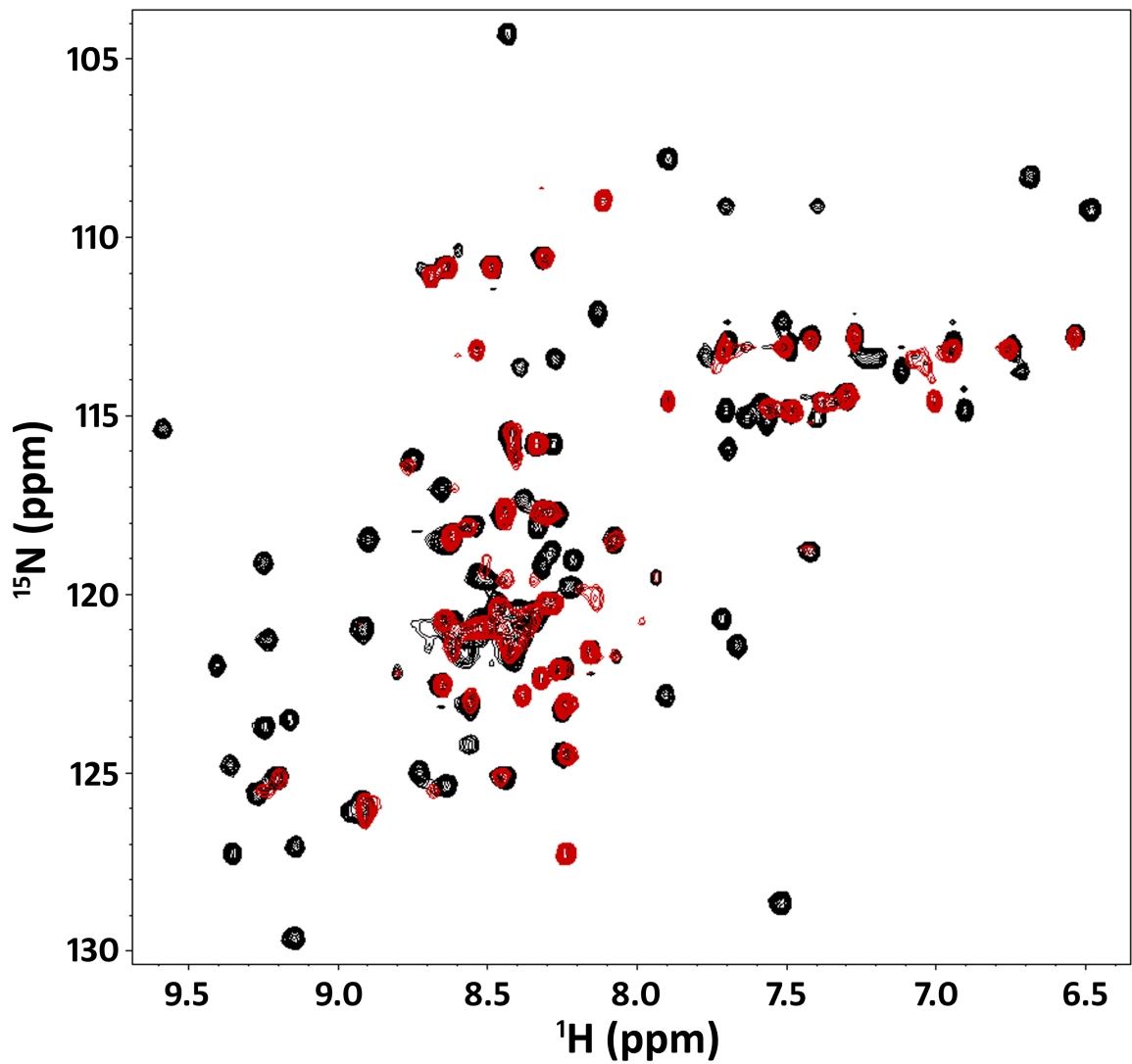


**Abbildung 4.5 – Analyse der gereinigten MPD17-Disulfidisomere:** **(A)** Rechromatografie (*RP-HPLC*) der Disulfidisomere (Fraktion 1 und 2) nach *RP-HPLC*-Reinigung, Lyophilisation und Aufnahme in 1x PBS. Es wurden 20 µg von jedem Disulfidisomer für die Rechromatografie verwendet. Für eine *SDS-PAGE* wurde ein Fertiggel (4-15 % *Ready Gel Tris-HCl Gel*; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) genutzt. Es wurden 2 µg Protein der jeweiligen Fraktion - sowohl mit reduzierendem (r.) als auch mit nicht reduzierendem (n.r.) Lämmli-Probenpuffer - für die *SDS-PAGE* eingesetzt. **(B)** Ergebnisse des Ellman's Test für beide Disulfidisomere.

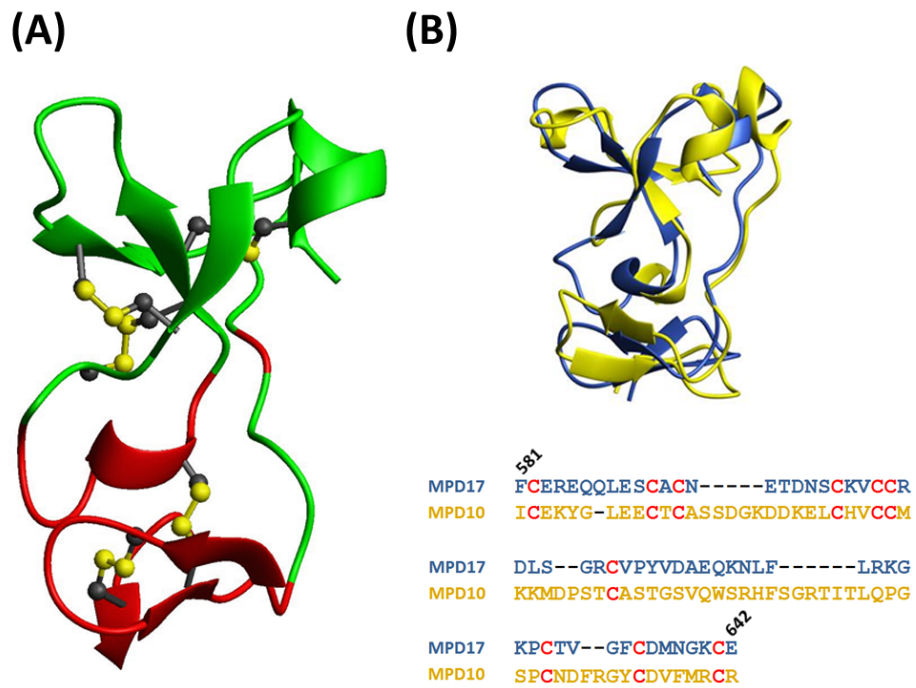
Form identisch mit Resonanzen der geschlossenen Form sind. Die Aminosäurereste, die zu diesen Resonanzen gehören, befinden sich in der gleichen chemischen Umgebung. Daher ist diese Region zu der diese Aminosäurereste gehören, in beiden Disulfidisomeren strukturell identisch. Die Struktur der geschlossenen MPD17 wurde durch *NMR*-Spektroskopie mittels verschiedener 3D-*NMR*-Experimente, wie in Düsterhöft et al. (2013) näher erläutert, von Dr. Sascha Jung gelöst. Dies war aufgrund der fehlenden Resonanzen für die offene MPD17 nicht möglich. In Abbildung 4.7(A) (Seite 56) ist die Struktur der geschlossenen MPD17 dargestellt. Die Struktur lässt sich in zwei Bereiche aufteilen. Die größere N-terminale Region besitzt als Sekundärstrukturelemente zwei  $\alpha$ -Helizes und ein dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Die kleinere C-terminale Region besitzt nur ein dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Ein Vergleich der Struktur der geschlossenen MPD17 mit der MPD aus ADAM10 - der zu ADAM17 am nächsten verwandten Protease - zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten (siehe Abbildung 4.7(B), Seite 56).

Die in der Abbildung 4.7(A) (Seite 56) grün gefärbte Region in der Struktur, stellt den Bereich dar, der in der offenen und der geschlossenen Form der MPD17 strukturell konserviert ist. Die rot gefärbte Region zeigt hingegen den Bereich der nur in der geschlossenen Form strukturiert vorliegt, in der offenen Form aber flexibel ist.

Die Aufklärung des Musters der Disulfidbrücken in beiden Disulfidisomeren wurde, wie in Düsterhöft et al. (2013) beschrieben, von Dr. Chien-Wen Hung über partielle Reduktion der Disulfidbrücken und anschließender Analyse durch Massenspektrometrie erreicht. In Abbildung 4.7(A) (Seite 56) sind die die Disulfidbrücken sowohl der offenen als auch der geschlossenen Form wiedergegeben. Die drei Disulfidbrücken (C582-C604, C591-C611, C593-C603), die in der strukturell konservierten Region liegen, sind erwartungsgemäß identisch. Die beiden anderen Disulfidbrücken, die in der Region liegen, in der sich beide Disulfidisomere unterscheiden, sind in beiden Formen unterschiedlich verknüpft. In der offenen MPD17 sind C600-C630 und C635-C641 miteinander verknüpft, was eine eher gestreckte Struktur ermöglicht. Dem gegenüber überlappen sich die Disulfidbrücken in der geschlossenen Form: C600-C635 und C630-C641. Dieses Disulfidbrücken-Muster bildet das Gerüst, das diese Region in der geschlossenen Form strukturierter und unflexibler macht. Das Disulfidbrücken-Muster der geschlossenen MPD17 entspricht dem der MPD aus ADAM10.

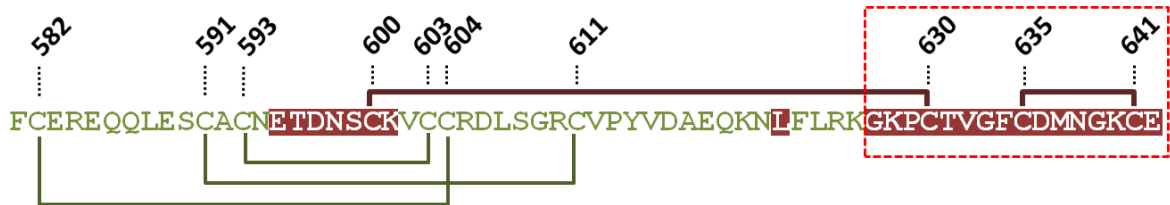


**Abbildung 4.6 –  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren:** Überlagerung des HSQC-Spektrums der offenen MPD17 (Fraktion 2, rot) mit dem der geschlossenen MPD17 (Fraktion 1, schwarz).

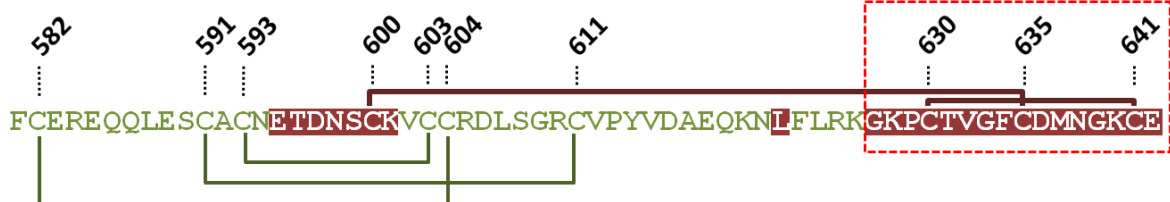


**Abbildung 4.7 – Struktur der geschlossenen MPD17:** (A) *Ribbon*-Darstellung der geschlossenen MPD17 mit Disulfidbrücken. (B) Überlagerung der Struktur der geschlossenen MPD17 (blau) mit der MPD von ADAM 10 (gelb, pdb: 2AO7, Janes et al. (2005)).

offene MPD17

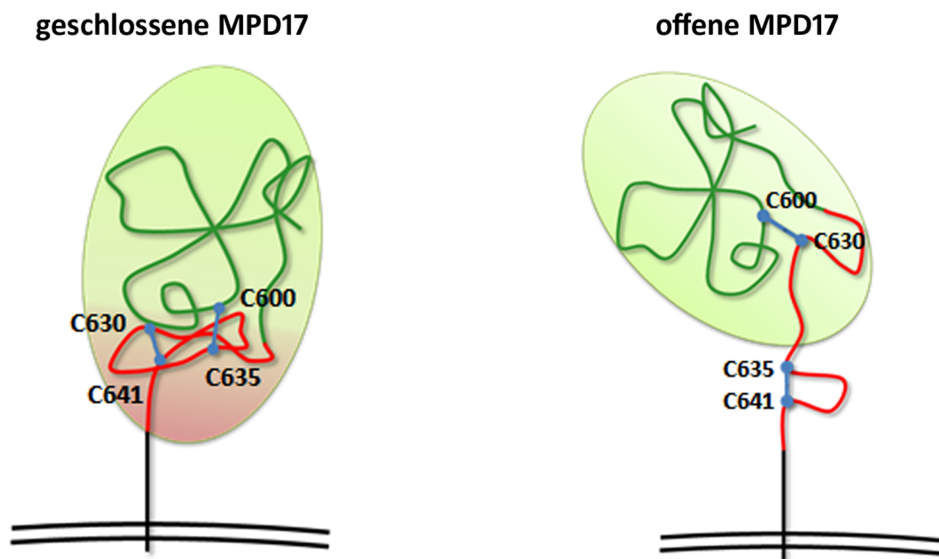


geschlossene MPD17



**Abbildung 4.8 – Muster der Disulfidbrücken:** Der grün gefärbte Bereich in der Aminosäuresequenz stellt die in beiden Formen strukturell identische Region dar. Beide Formen unterscheiden sich strukturell und in Bezug auf das Disulfidbrücken-Muster im rot gefärbten Bereich.





**Abbildung 4.9 – Cartoondarstellung der offenen und geschlossenen MPD17:** Der rot dargestellte Bereich (C-terminal) ist in der geschlossenen MPD17 (links) strukturiert und unflexibel, während er in der offenen Form (rechts) unstrukturiert ist und damit mehr Flexibilität besitzt. C-terminal folgt die *Stalk*-Region (schwarz).

#### 4.1.3 Zusammenfassung der Reinigung und strukturellen Charakterisierung der rekombinanten MPD17

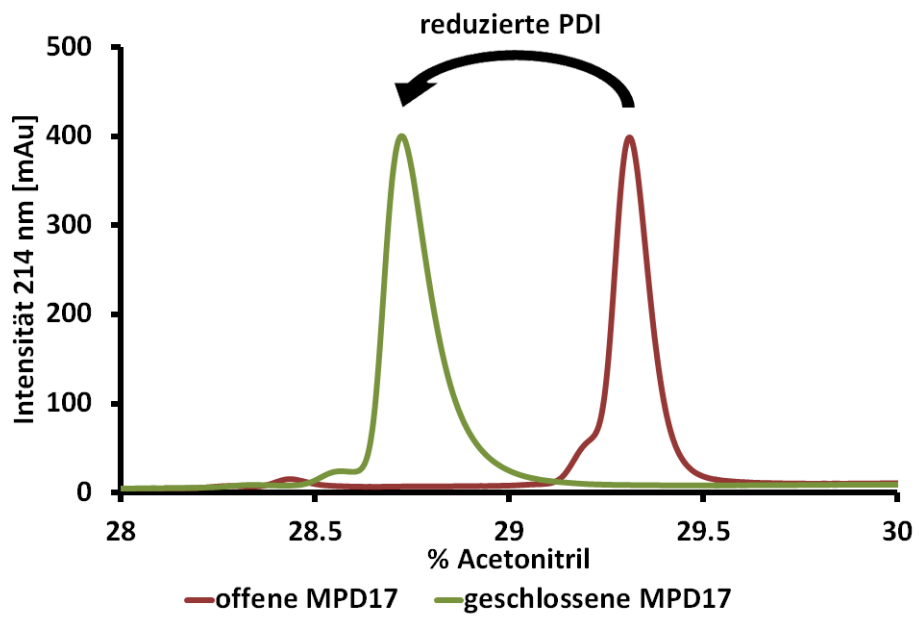
Zwei gefaltete Disulfidisomere der MPD17, die sich nur in zwei Disulfidbrücken unterscheiden, ließen sich über die oben beschriebenen Schritte reinigen und strukturell charakterisieren. Die offene Form besitzt einen unstrukturierten und flexiblen C-Terminus, während die geschlossene Form in dieser Region strukturiert und damit unflexibler ist (siehe Abbildung 4.9, Seite 57). Daraus ergab sich die Frage, welche biologische Relevanz diese zwei unterschiedlichen Disulfidisomere für ADAM17 besitzen.

#### 4.1.4 Rolle der MPD17 in der Redox-Regulation von ADAM17

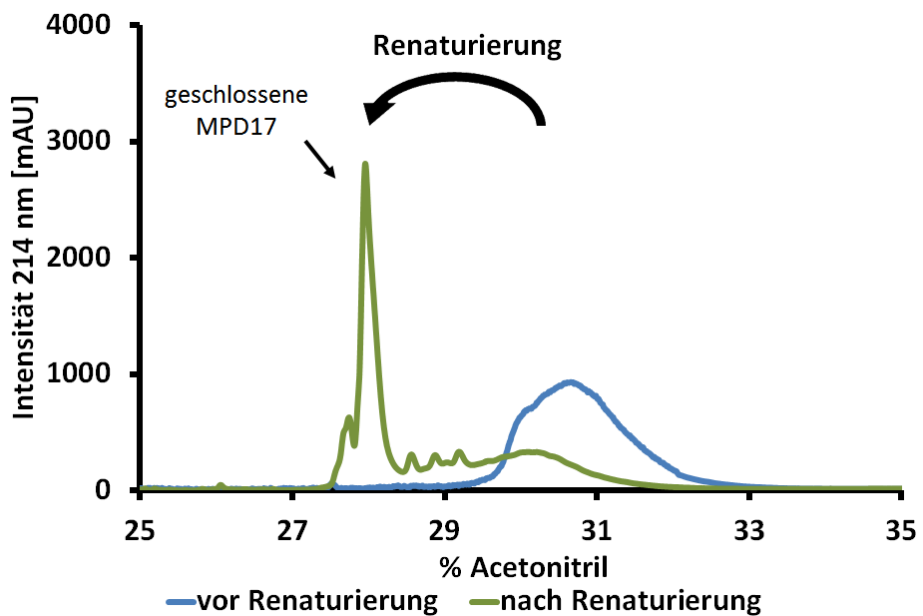
Wie bereits von Bennett et al. (2000) und Willems et al. (2010) gezeigt wurde, kann extrazelluläre PDI die Aktivität von ADAM17 negativ beeinflussen. Dies wurde auf eine durch PDI hervorgerufene, strukturelle Veränderung in der nicht-katalytischen Region des extrazellulären Teils von ADAM17 (Disintegrin-ähnliche Domäne und MPD) zurückgeführt (Willems et al., 2010). ADAM17 wird dabei durch die PDI in einen inaktiven Zustand versetzt. Des Weiteren konnte von Wang et al. (2009) gezeigt werden, dass das CKVC-Motiv in der MPD17 entscheidend für die Proteaseaktivität ist. Dieses Motiv gehört zu den Thioredoxinmotiven (CXXC), welche oft als Angriffspunkt für Redox-Modifikation fungiert (Wang et al., 2009).

##### 4.1.4.1 Einfluss der Proteindisulfidisomerase auf die MPD17

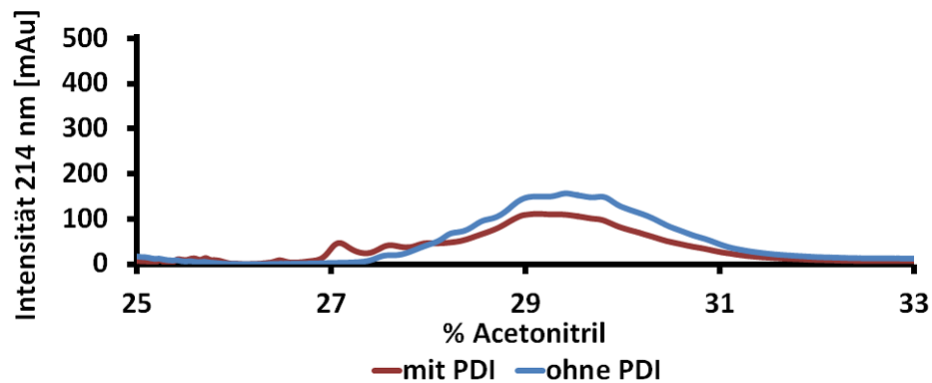
Die offene MPD17-Form unterscheidet sich unter anderem von der geschlossenen Form in einer der Disulfidbrücken, die von C600 ausgeht und damit im CXXC-Motiv liegt. Es wurde daher untersucht, welchen Einfluss die PDI auf die beiden Formen der MPD17 hat. Zu diesem Zweck wurden 6.5  $\mu\text{M}$  entweder oxidierte (unbehandelte) oder reduzierte PDI (siehe Kapitel 3.2.4.5, Seite 37) mit 85  $\mu\text{M}$  einer der beiden MPD17-Formen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über die *RP-HPLC* analysiert. Weder zeigte die oxidierte PDI bei einer der beiden Formen einen Effekt, noch wurde eine Veränderung bei der geschlossenen MPD17 beobachtet, wenn sie mit der reduzierten Form der PDI inkubiert wurde. Die offene MPD17 hingegen wurde von der reduzierten PDI in die geschlossene Form umgewandelt (siehe Abbildung 4.10, Seite 59). Die Umwandlung in die geschlossene MPD wurde über  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -*HSQC*-Messungen bestätigt (siehe Abbildung 4.6, Seite 4.6). Die gleiche Umwandlung wurde durch eine Denaturierung und anschließende Renaturierung der offenen Form erreicht (siehe Kapitel 3.2.4.5, Seite 37). Bei der geschlossenen MPD17 handelt es sich offenbar um die thermodynamisch stabile Form der MPD17. Auch die *RP-HPLC*-Fraktion 3 (Kapitel 4.1.1.3, Seite 49) lässt sich mittels Denaturierung und Renaturierung in die geschlossene MPD17 überführen (siehe Abbildung 4.11, Seite 59). Eine dreistündig Inkubation mit reduzierter PDI in einem Verhältnis 1:13 (Fraktion 3 zu PDI) bei Raumtemperatur hatte jedoch keinen Effekt (siehe Abbildung 4.12, Seite 60). Die enzymkatalysierte Isomerisierung durch die PDI ist damit spezifisch für die Umwandlung der offenen (C600-C630 und C635-C641) in die geschlossene MPD17 (C600-C635 und C630-C641).



**Abbildung 4.10 – Einfluss der reduzierten PDI auf die offene MPD17:** *RP-HPLC*-Chromatogramm der offenen MPD17 (rot) vor Inkubation mit reduzierter PDI und danach (grün). Die offene MPD17 wurde durch die reduzierte PDI in die geschlossene MPD17 überführt.



**Abbildung 4.11 – Renaturierung der *RP-HPLC*-Fraktion 3:** *RP-HPLC*-Chromatogramm vor (blau) und nach der Renaturierung (grün) der Disulfidisomere aus der *RP-HPLC*-Fraktion 3.



**Abbildung 4.12 – Einfluss der PDI auf die *RP-HPLC*-Fraktion 3:** *RP-HPLC*-Chromatogramm der Disulfidisomere aus der *RP-HPLC*-Fraktion 3 vor (blau) und nach der dreistündigen Inkubation mit reduzierter PDI (rot).

#### 4.1.4.2 Test der eingesetzten PDI auf PDIA6

Die oben eingesetzte PDI wurde laut Herstellerangaben aus boviner Leber extrahiert. In Leberzellen ist PDIA1 in einer mindestens zehnfach höheren Konzentration als die anderen PDI-Isoformen vorhanden (BioGPS-Datenbank (Wu et al., 2009)) und macht damit auch den Hauptanteil im benutzten Extrakt aus. PDIA6 ist die PDI-Isoform, von der bekannt ist, dass sie eine Inaktivierung von ADAM17 bewirkt (Düsterhöft et al., 2013) (siehe Anhang - Abbildung 9.2, Seite 121). Mit einem Antikörper der spezifisch gegen PDIA6, jedoch nicht gegen PDIA1 gerichtet ist, wurde gezeigt, dass auch PDIA6 im Extrakt aus boviner Leber nachweisbar war (siehe Abbildung 4.13, Seite 61). Die Ergebnisse der Experimente, die mit dem PDI-Extrakt aus boviner Leber durchgeführt wurden, können daher nicht auf eine bestimmte PDI-Isoform zurückgeführt werden.

#### 4.1.4.3 Übersicht über die MPD17-Isomerisierung

Nach der rekombinanten, intrazellulären Expression und dem Aufschluss der Bakterien bildet sich durch spontane Faltung und Bildung der Disulfidbrücken hauptsächlich die offene MPD17 als offensichtlich kinetisch bevorzugtes Isomer (siehe Abbildung 4.14, Seite 62). Durch die reduzierte PDI lässt sich das offene Isomer in die geschlossene Form überführen. Diese Umwandlung funktioniert exklusiv nur mit der offenen MPD17. Die offene MPD sowie die Isomere aus *RP-HPLC*-Fraktion 3 (siehe Kapitel 4.1.1.3, Seite 49) lassen sich durch Renaturierung in die geschlossene Form überführen. Die geschlossene MPD17 scheint daher,

**Anti-PDIA6 –Antikörper (abcam: ab11432)**

Erkennungssequenz des Antikörpers:

DIDLSDVELDDLGKDEL

**PDIA1-Sequenz:**

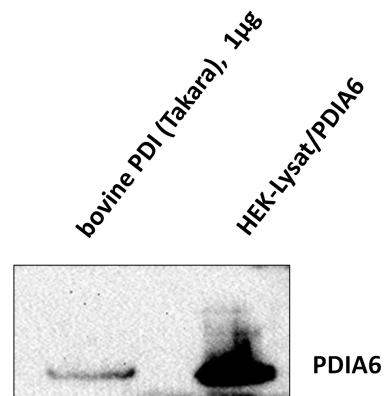
human EPDMEEDDDQKAVKDEL

bovin EPDLEEDDDQKAVKDEL

**PDIA6-Sequenz:**

human DIDLSDVELDDLGKDEL

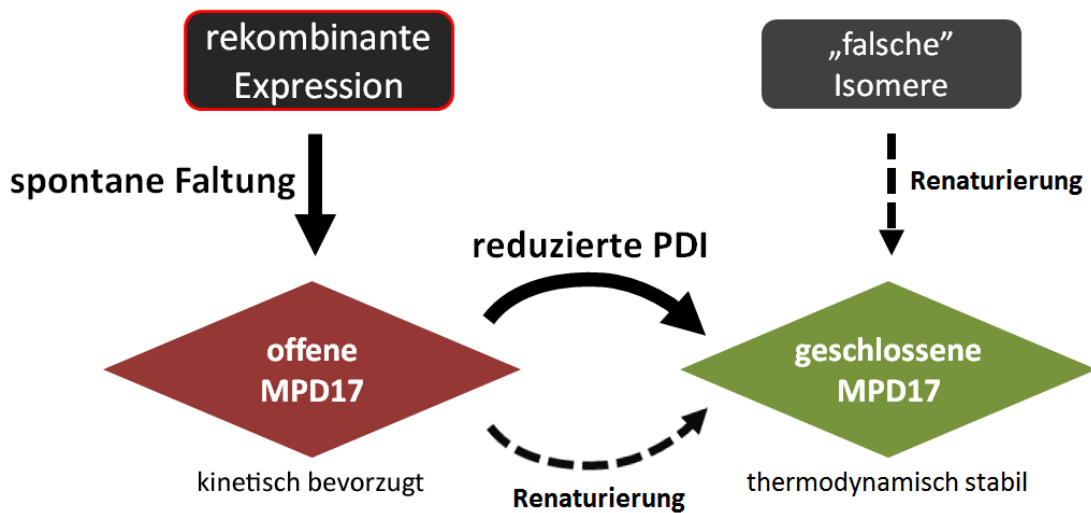
bovin DIDLSDVELDDLEKDEL



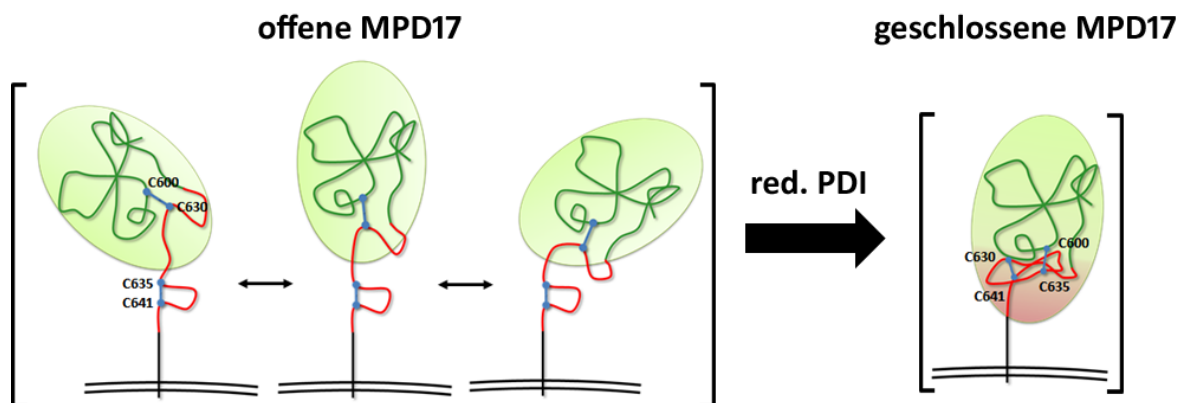
**Abbildung 4.13 – PDIA6 in der eingesetzten PDI-Mischung:** Links ist die Erkennungssequenz des eingesetzten anti-PDI-Antikörpers dargestellt, die sich deutlich von der korrespondierenden Sequenz in PDIA1 unterscheidet. Der *Western Blot* (rechts) zeigt, dass in der kommerziell erworbenen und in dieser Arbeit verwendeten PDI aus boviner Leber PDIA6 vorhanden ist. Als PDIA6-Positivkontrolle diente ein Lysat aus HEK-293T-Zellen, in denen PDIA6 überexprimiert wurde.

die thermodynamisch stabilste Form zu sein.

Wie in Abbildung 4.15 (Seite 62) illustriert, besitzt die offene MPD17 durch ihren flexiblen C-Terminus mehr Bewegungsmöglichkeiten auf der Zelloberfläche. Dies würde ebenfalls für das gesamte ADAM17 gelten. Durch Bennett et al. (2000), Wang et al. (2009) und Willems et al. (2010) ist bekannt, dass ADAM17 durch reduzierte PDI auf der Zelloberfläche inaktiviert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass in der aktiven Form von ADAM17 die MPD in der offenen Form vorliegt, während in der inaktiven Form von ADAM17 die MPD den geschlossenen Zustand einnimmt.



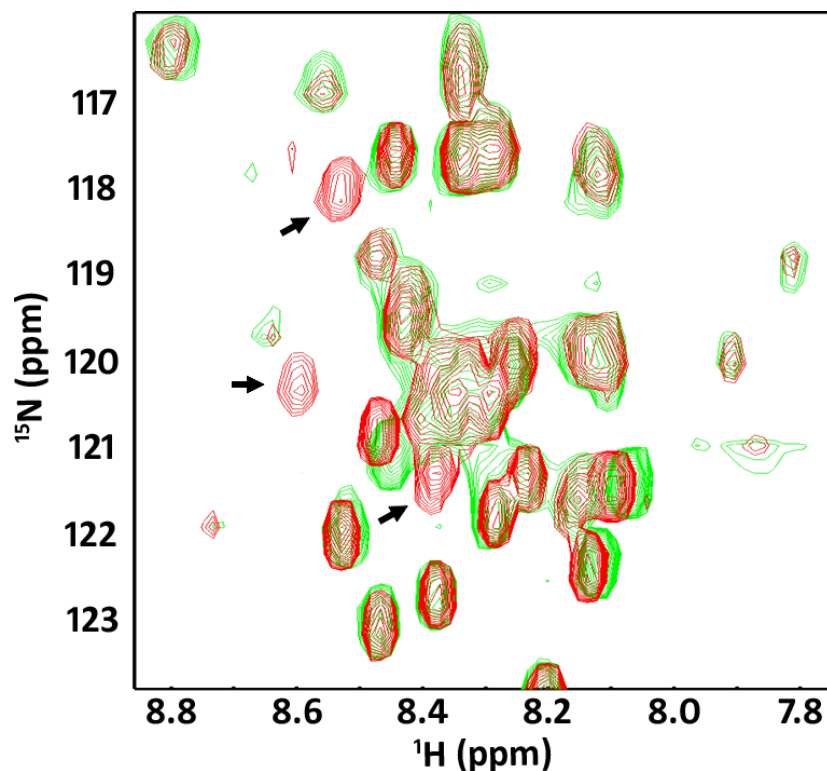
**Abbildung 4.14 – Übersicht über die MPD17-Isomere:** Bei der in Kapitel 4.1.1 (Seite 46) beschriebenen Reinigung, lässt sich hauptsächlich die offene MPD17 erhalten. Diese wird durch reduzierte PDI in die geschlossene Form überführt. Durch Renaturierung lassen sich sowohl die offene MPD17 als auch die „falschen“ Disulfidisomere (*RP-HPLC*-Fraktion 3; siehe Kapitel 4.1.1.3, Seite 49) in die geschlossene MPD17 umwandeln.



**Abbildung 4.15 – Cartoondarstellung der MPD17-Isomerisierung:** Die offene MPD17 ist auf der Zelloberfläche flexibler als die geschlossene Form. Die reduzierte PDI überführt die offene MPD17 in die geschlossene Form.

#### 4.1.5 Die offene MPD17 bindet Ortho-Phospho-L-Serin

Sommer & Reiß (Manuskript in Vorbereitung) konnten vor Kurzem zeigen, dass die Auslösung des *Shedding*-Ereignisses von einer transienten Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran abhängt. In diesem Zusammenhang lag die Vermutung nahe, dass ADAM17 mit den exponierten Phosphatidylserinen interagiert. Mittels *NMR* wurde überprüft, ob die offene oder die geschlossene MPD17 eine Interaktion mit Phosphatidylserinen zeigen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 1 mg/ml  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -markiertes Protein beider MPD17-Formen mit je 6 mM Ortho-Phospho-L-Serin (OPLS) versetzt und ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen. Während die geschlossene Form keine Veränderung im Spektrum aufwies, tauchten im Spektrum der offenen Form neue Resonanzen auf (siehe Abbildung 4.16, Seite 63). Daraus folgt, dass die offene aber nicht die geschlossene Form der MPD17 spezifisch mit Phosphatidylserin interagiert.



**Abbildung 4.16 – Interaktion zwischen der offenen MPD17 und OPLS:** Ausschnitt der Überlagerung des HSQC-Spektrums der offenen MPD17 (grün) mit dem Spektrum der Mischung aus offener MPD17 und OPLS (rot). Die Pfeile markieren Resonanzen, die nach OPLS-Zugabe neu erschienen sind.

## 4.2 HE-ADAM17 ist eine inaktive ADAM17-Variante

Die ADAM17-Variante HE-ADAM17 basiert auf der Arbeit von Roderfeld et al. (2006), in der ein inaktive Variante der Matrixmetalloprotease-9 erzeugt wurde. Im aktiven Zentrum von ADAM17 wird das  $Zn^{2+}$  von drei Histidinresten (H405, H409, H415) komplexiert, während der Glutaminsäurerest E406 dort als katalytische Base dient (siehe Abbildung 4.17, Seite 65). Analog zu Roderfeld et al. (2006) wurde in ADAM17 der Glutaminsäurerest E409 mit dem räumlich gegenüberliegenden Histidinrest H415 ausgetauscht. Das aktive Zentrum des so entstandenen HE-ADAM17 (ADAM17 E406H, H415E) sollte keine Änderung in den elektrostatischen Eigenschaften aufweisen und weiterhin das  $Zn^{2+}$  binden. HE-ADAM17 sollte außerdem in der Lage sein, im katalytischen Zentrum Substrate zu binden, sie jedoch aufgrund des Aminosäuretausches nicht zu prozessieren.

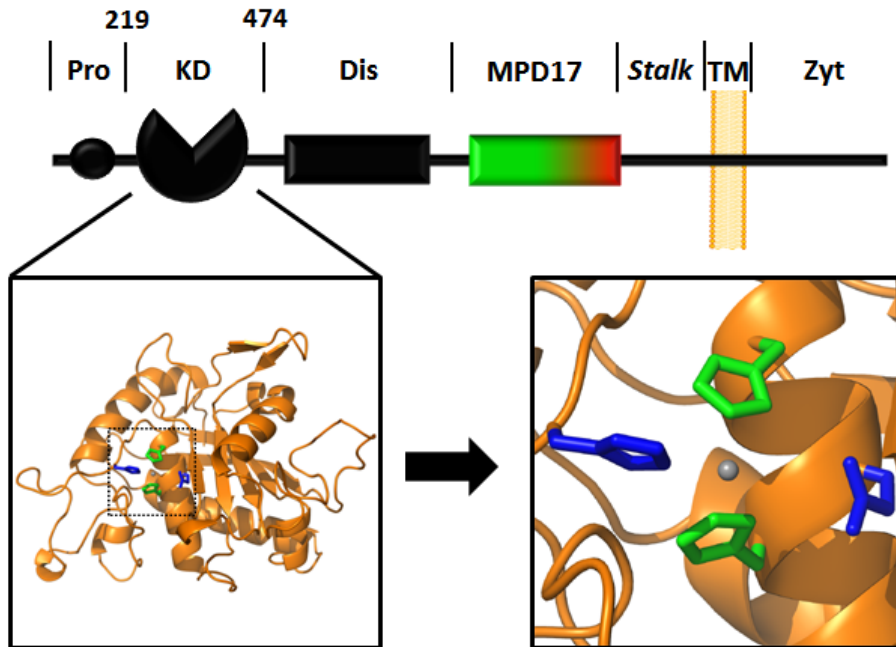
### 4.2.1 *Shedding*-Aktivität von HE-ADAM17

Dass HE-ADAM17 keine *Shedding*-Aktivität aufweist, wurde mit Hilfe des in Kapitel 3.2.5.8 (Seite 43) beschriebenen Aktivitätstest ermittelt. IL-1R<sub>II</sub> mit N-terminaler alkalinen Phosphatase (IL-1R<sub>II</sub>-AP) wurde mit entweder Wildtyp-ADAM17 (wtADAM17), HE-ADAM17 oder eGFP als Negativkontrolle transient in MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen koexprimiert. Dabei wurde bei der Transfektion folgendes Plasmidverhältnis eingesetzt: Konstrukt zu Substrat - 1:5. Wie in Kapitel 3.2.5.8 (Seite 43) beschrieben, wurden die Zellen mit 100 nM PMA für zwei Stunden stimuliert. Anschließend wurde die AP-Aktivität im Überstand und im Zelllysat bestimmt. Dies wurde auch für unstimulierte Zellen und mit PMA stimulierte Zellen, die zusätzlich noch mit 50  $\mu$ M GM6001 behandelt wurden, durchgeführt (siehe Abbildung 4.18, Seite 66). Durch die Negativkontrolle wurde das Hintergrund-*Shedding* des IL-1R<sub>II</sub>-AP in den MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen ermittelt. Um die getesteten ADAM17-Konstrukte im Vergleich zu diesem Hintergrund-*Sheddings* wiederzugeben, wurden alle Werte eines Experiments auf den Wert der stimulierten Zellen der Negativkontrolle normalisiert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten.

Auf den Zellen mit wtADAM17 fand im Vergleich zur Negativkontrolle erwartungsgemäß ein deutlich erhöhtes *Shedding* statt. Das *Shedding* der stimulierten, wtADAM17 exprimierenden Zellen war knapp doppelt so hoch wie das der stimulierten Zellen der Negativkontrolle. Im Vergleich dazu zeigten HE-ADAM17 exprimierende und PMA-stimulierte Zellen keine

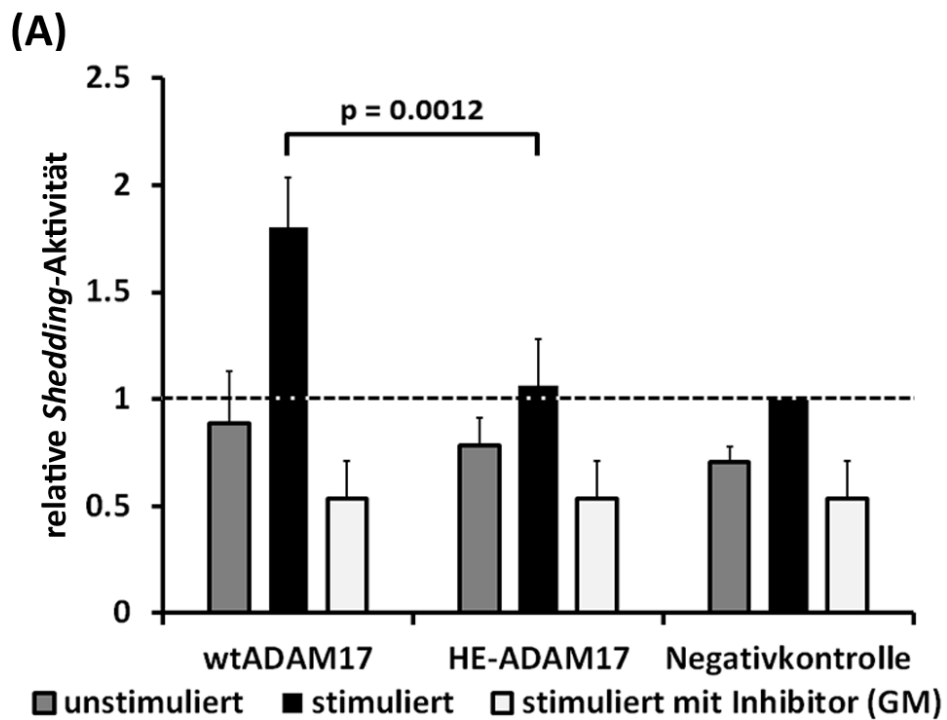


*Shedding*-Aktivität, die über die *Shedding*-Aktivität der Negativkontrolle hinausgeht. HE-ADAM17 ist dementsprechend tatsächlich eine inaktive ADAM17-Variante.

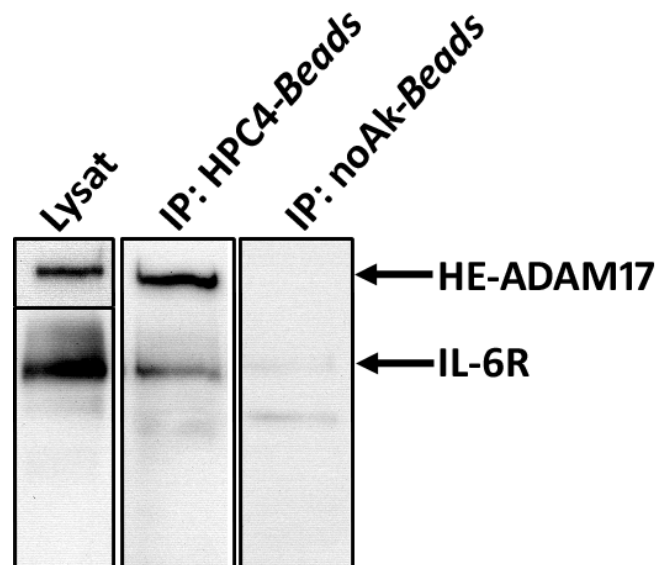


wtADAM17	H	E	X	G	H	X	X	G	X	X	H	D	} katalytisches Zentrum
HE-ADAM17	H	<u>H</u>	X	G	H	X	X	G	X	X	<u>E</u>	D	

**Abbildung 4.17 – Struktur der katalytischen Domäne:** Die katalytische Domäne von ADAM17 beginnt bei D219 und endet bei S474. Dargestellt ist die Struktur der katalytischen Domäne (orange, pdb: 1BKC, Maskos et al. (1998)). ADAM17 besitzt ein katalytisches Zentrum vom Repolysin-Typ, in dem drei Histidinreste ein  $Zn^{2+}$  komplexieren und ein Glutaminsäurerest als katalytische Base dient. Um eine inaktive Variante von ADAM17 zu erstellen, wurde die Aminosäure E406 mit H415 (in der Struktur blau gefärbt) ausgetauscht.



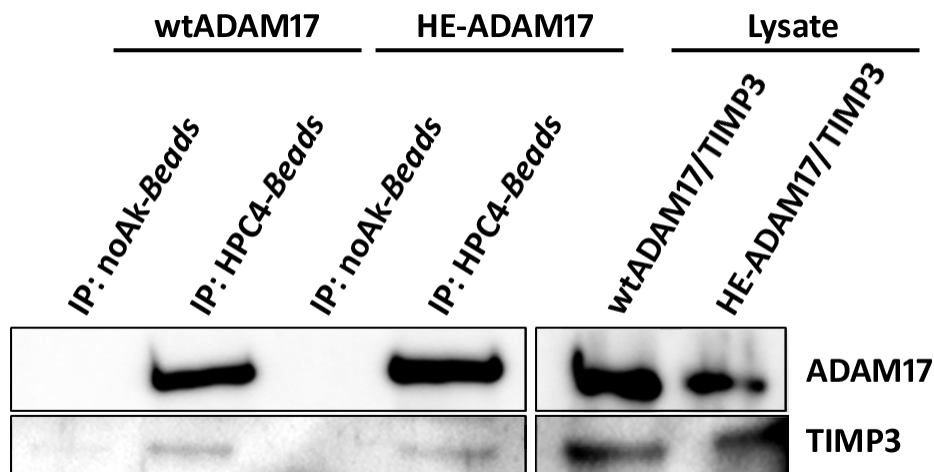
**Abbildung 4.18 – Aktivitätstest von HE-ADAM17:** (A) MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen wurden mit wtADAM17, HE-ADAM17 oder eGFP als Negativkontrolle mit IL-1R<sub>II</sub>-AP transient kotransfiziert. Plasmidverhältnis: Konstrukt zu IL-1R<sub>II</sub>-AP - 1:5. Das *Shedding* auf den Zellen wurde entweder nicht stimuliert, mit 100 nM PMA stimuliert oder mit 100 nM PMA stimuliert und gleichzeitig mit 50  $\mu$ M GM inhibiert. Das gezeigte Diagramm repräsentiert den Mittelwert aus sechs unabhängigen Experimenten. (B) Dass die Zellen wtADAM17 und HE-ADAM17 gleichmäßig exprimieren, wurde mittels *Western Blot* überprüft. Sowohl das benutzte wtADAM17-Konstrukt als auch das HE-ADAM17-Konstrukt besitzen beide einen PC-Tag, der mit dem HPC4-Antikörper detektiert wurde.



**Abbildung 4.19 – Interaktion zwischen HE-ADAM17 und IL-6R:** In HEK-293T-Zellen wurden IL-6R und HE-ADAM17 koexprimiert. Ob der IL-6R mit HE-ADAM17 interagiert, wurde mit Ko-Immunopräzipitationen (siehe Kapitel 3.2.5.4, Seite 41) und anschließender Detektion mittels *Western Blot* getestet. Das verwendete HE-ADAM17-Konstrukt besaß einen C-terminalen PC-Tag. Für die Ko-Immunopräzipitationen wurden daher HPC4-Beads genutzt. Als Negativkontrolle dienten noAK-Beads. Im *Western Blot* wurde HE-ADAM17 mit dem HPC4-Antikörper, der IL-6R mit dem 4-11-Antikörper detektiert.

#### 4.2.2 HE-ADAM17 bindet den IL-6R und TIMP3

Ob HE-ADAM17 weiterhin in der Lage ist, Substrate oder den natürlichen ADAM17-Inhibitor TIMP3 zu binden, wurde mit Ko-Immunopräzipitationsexperimenten überprüft. Wie in Kapitel 3.2.5.4 (Seite 41) beschrieben, wurde HE-ADAM17 mit dem IL-6R in HEK-293T-Zellen koexprimiert. Dabei wurde bei der Transfektion folgendes Plasmidverhältnis eingesetzt: HE-ADAM17 zu IL-6R - 1:1. Das verwendete HE-ADAM17-Konstrukt besitzt C-terminal einen PC-Tag und wurde mit den HPC4-Beads aus dem Lysat präzipitiert. Als Negativkontrolle wurden noAK-Beads, an denen keine Bindung stattfinden sollte, verwendet. Mittels *Western Blot* wurde nachgewiesen, dass HE-ADAM17 den IL-6R bindet (siehe Abbildung 4.19, Seite 67). Das Experiment wurde ebenfalls mit TIMP3 durchgeführt. Hier wurde gezeigt, dass TIMP3 an HE-ADAM17 genauso bindet wie an wtADAM17 (siehe Abbildung 4.20, Seite 68). Es lässt sich zusammenfassen, dass, obwohl HE-ADAM17 keine *Shedding*-Aktivität aufweist, diese ADAM17-Variante dennoch in der Lage ist, ADAM17-Interaktionspartner zu binden.

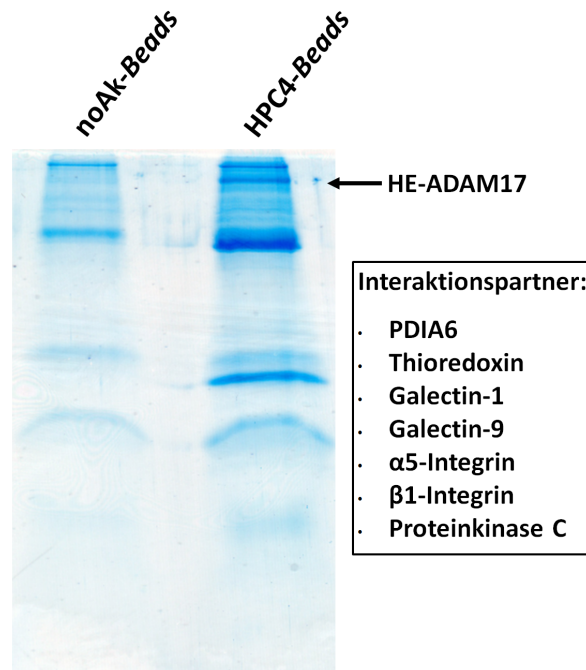


**Abbildung 4.20 – Interaktion zwischen HE-ADAM17 und TIMP3:** In HEK-293T-Zellen wurden TIMP3 und entweder HE-ADAM17 oder wtADAM17 koexprimiert. Ob TIMP3 mit HE-ADAM17 wie mit wtADAM17 interagiert, wurde mit Ko-Immunopräzipitationen (siehe Kapitel 3.2.5.4, Seite 41) und anschließender Detektion mittels *Western Blot* überprüft. Das verwendete HE-ADAM17-Konstrukt besaß wie das wtADAM17-Konstrukt einen C-terminalen PC-Tag, daher wurden für die Ko-Immunopräzipitationen HPC4-Beads genutzt. Als Negativkontrolle dienen noAK-Beads. Im *Western Blot* wurde HE-ADAM17 und wtADAM17 mit dem HPC4-Antikörper, TIMP3 mit dem anti-TIMP3-Antikörper detektiert.

### 4.2.3 Identifikation neuer ADAM17-Interaktionspartner

Durch die Überexpression von HE-ADAM17 in HEK-293T-, MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup> sowie HepG2-Zellen und anschließender Ko-Immunopräzipitation (siehe Kapitel 3.2.5.4, Seite 41) wurde versucht, neue Interaktionspartner zu identifizieren. Dabei wurde je Ko-Immunopräzipitationsansatz das Lysat aus zwanzig 10-cm-Schalen verwendet. Kurz vor der Ernte wurden die Zellen mit 100 nm PMA und 50  $\mu$ M GM6001 für eine Minute bei 37 °C inkubiert. Die Proben aus den Ko-Immunopräzipitationsexperimenten wurden über SDS-PAGE (18 % Gele) getrennt und die Gele mittels kolloidaler Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 3.2.2.2, Seite 30) gefärbt. In Abbildung 4.21 (Seite 69) ist ein Gel eines Ko-Immunopräzipitationsexperiments aus HEK-293T-Zellen exemplarisch dargestellt. Dr. Bart van den Berg oder Dr. Tomas Kouzelka werteten die Gele massenspektrometrisch aus. Dabei konnten bereits bekannte Interaktionspartner bzw. Proteine, die mit der Regulation von ADAM17 in Zusammenhang stehen, identifiziert werden: beispielsweise Proteinkinase C, Thioredoxin,  $\alpha$ 5-Integrin sowie  $\beta$ 1-Integrin (Killock & Ivetić, 2010; Aragao et al., 2012; Bax et al., 2004). Weitere interessante Interaktionspartner waren unter anderem die PDI-Isoform PDIA6, auf die in Ka-

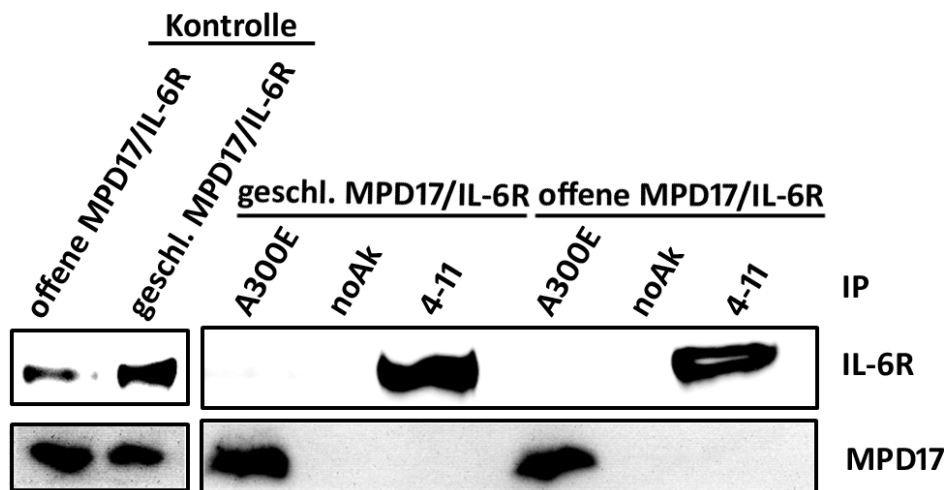
pitel 4.1.4 (Seite 58) bereits näher eingegangen wurde. Des Weiteren wurden die beiden Lektine Galectin-1 und Galectin-9 identifiziert. Galectin-9 ist bereits als Interaktionspartner der PDIA6 an der Zelloberfläche bekannt (Bi et al., 2011).



**Abbildung 4.21 – Identifikation neuer ADAM17-Interaktionspartner:** Dargestellt ist ein exemplarisches 18 % Gel mit Proben einer Ko-Immunopräzipitation mit HE-ADAM17 aus HEK-293T-Zellen. Die Ko-Immunopräzipitation wurde mittels HPC4-Beads oder noAk-Beads als Negativkontrolle durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.5.4, Seite 41).

### 4.3 Interaktion zwischen der rekombinanten MPD17 und dem löslichen IL-6-Rezeptor

Es wurde gezeigt, dass die MPD17 an der Substratbindung beispielsweise des IL-6R beteiligt ist (Lorenzen et al., 2012). Um dies mit der löslichen, rekombinanten MPD17 zu testen, wurden Ko-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dafür wurde ein löslicher IL-6R (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) eingesetzt, der den extrazellulären Abschnitt zwischen L20 und D358 umfasst. In diesem Konstrukt fehlt das Signalpeptid (M1 bis A19) sowie ein kleiner Teil der *Stalk*-Region (S359 bis T366). Die ADAM17-Schnittstelle befindet sich zwischen Q357 und D358 und ist daher bei diesem Konstrukt vorhanden. Wie anhand des in Abbildung 4.22 (Seite 70) gezeigten *Western Blots* zu erkennen ist, konnte der lösliche IL-6R weder mit der offenen noch mit der geschlossenen Form präzipitiert werden. Auch die reverse Ko-Immunopräzipitation zeigte keine Interaktion.

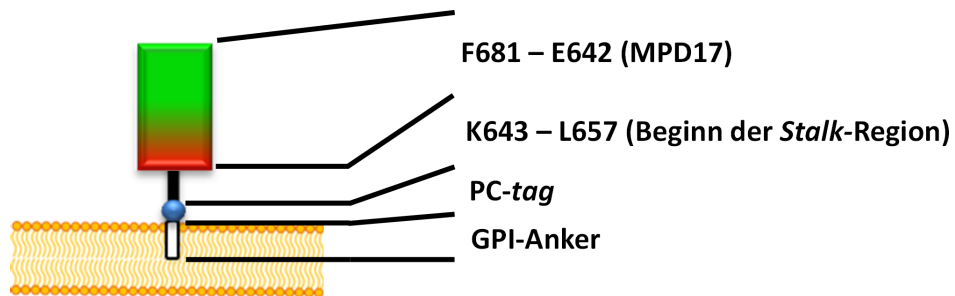


**Abbildung 4.22 – Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit rekomb. MPD17 und IL-6R:**

Für die Ko-Immunopräzipitation wurden 8 µg entweder der offenen oder der geschlossenen MPD17 mit 6 µg des löslichen IL-6R in 200 µl 1x PBS gemischt und mit den jeweiligen *Beads* versetzt. Entweder wurde mit A300E-*Beads* an der MPD17 oder mit 4-11-*Beads* am löslichen IL-6R gezogen. Als Negativkontrolle wurden *Beads* mit *nonsense* Antikörpern (noAk) benutzt.

## 4.4 CANDIS ist eine hochkonservierte Sequenz in der *Stalk*-Region von ADAM17

Die MPD17 wurde sowohl mit der Substratbindung als auch mit der Multimerisierung von ADAM17 in Verbindung gebracht (Lorenzen et al., 2011, 2012). Jedoch erwiesen sich beide Formen der rekombinanten, löslichen MPD17 als Monomer (siehe Kapitel 4.1, Seite 46). Des Weiteren interagierten beide Formen nicht mit dem ADAM17-Substrat IL-6R (siehe Kapitel 4.3, Seite 70). Das membrangebundene MPD17-Konstrukt MPD17\_GPI, mit dem die Multimerisierung sowie die Substraterkennung gezeigt wurden, besitzt neben der membranproximalen Domäne auch den Anfang der *Stalk*-Region von ADAM17 (siehe Abbildung 4.23, Seite 71). Daher wurde im Folgenden ein näherer Blick auf diese Region geworfen.



**Abbildung 4.23 – Schematische Abbildung des Konstrukts MPD17\_GPI:** Das Konstrukt umfasst die vollständige MPD17 sowie den folgenden Teil der *Stalk*-Region: KRVQDVIERFWDFIDQL. Darauf folgt ein *PC-Tag*. Das Konstrukt ist mit einem GPI-Anker in der Zellmembran verankert.

### 4.4.1 Charakterisierung der *Stalk*-Region von ADAM17

Ein Alignment von ADAM17-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies zeigte, dass die Sequenz im N-terminalen Teil der *Stalk*-Region vom Menschen bis zur Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und dem gemeinen Wasserfloh (*Daphnia pulex*) hoch konserviert ist (siehe Abbildung 4.24 (B), Seite 73). Eine solch konservierte Sequenz wurde in der am nächsten verwandten Protease ADAM10 nicht gefunden. Da diese Sequenz voraussichtlich wichtig für Protein-Protein-Interaktion ist, wurde sie im Folgenden als CANDIS (*C*onserved *A*DAM-*S*eventeen *N* *D*ynamic *I*nteraction *S*equence) bezeichnet.

Um diese konservierte Sequenz zu charakterisieren wurde zunächst eine Sekundärstrukturvorhersage mit den Programmen *Jpred* (Cuff et al., 1998) und *PredictProtein* (Rost et al.,

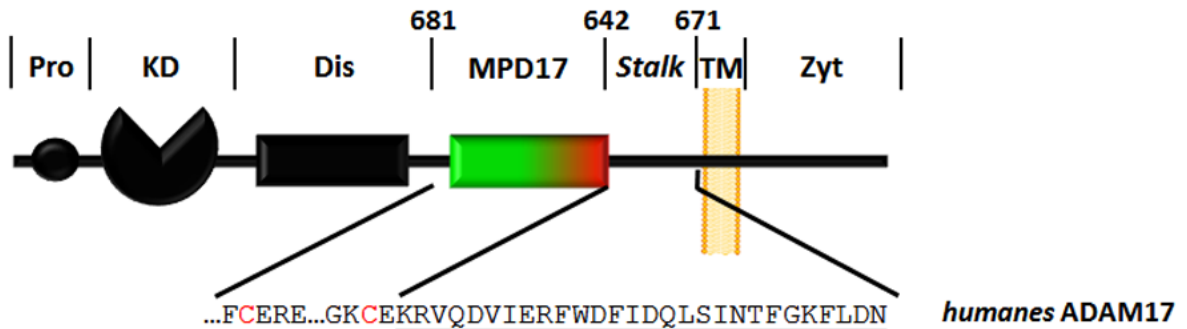
2004) durchgeführt. Wie in Abbildung 4.25(A) (Seite 74) dargestellt, sagten beide Programme einen  $\alpha$ -helikalen Charakter für diese Sequenz voraus. Ob diese Vorhersage für CANDIS zutrifft, wurde mit dem in Abbildung 4.25(B) (Seite 74) gezeigten Peptid b getestet. Von diesem Peptid wurde ein CD-Spektrum in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) aufgenommen. In Abbildung 4.25(C) (Seite 74) ist das CD-Spektrum von Peptid b wiedergegeben. Die W-Form mit Minima bei 208 nm und bei 222 nm zeigt, dass CANDIS tatsächlich eine  $\alpha$ -Helix bildet. Mit Hilfe des Programms *HeliQuest* (Gautier et al., 2008) wurde ein Helixraddarstellung für CANDIS generiert (siehe Abbildung 4.26(A), Seite 74). Alle hydrophoben Aminosäuren befinden sich dabei auf der einen, alle hydrophilen Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite. Bei der von CANDIS gebildeten  $\alpha$ -Helix handelt es sich dementsprechend um eine amphipathische Helix (siehe Abbildung 4.26(B), Seite 74). Dies lässt eine Interaktion mit der Zellmembran vermuten. Experimente, die von Dr. Matthias Michalek mit dem Peptid b und Liposomen durchgeführt wurden, bestätigten diese Hypothese (unveröffentlichte Ergebnisse).

#### 4.4.2 Interaktionsexperimente mit CANDIS

Im Folgenden wurden Peptide verwendet, die einen C-terminalen Linker (GSGSG) und darauf C-terminal folgend ein Lysin besaßen (siehe Abbildung 4.25(B), Seite 74). Diese Peptide wurden verwendet, um sie, wie in Kapitel 3.2.5.3 (Seite 40) beschrieben, an *Sepharose-Beads* zu koppeln. Die dabei entstandenen Peptid-*Beads* wurden verwendet, um Präzipitationsexperimente durchzuführen. Das Peptid a enthielt CANDIS und wurde zur Herstellung der CANDIS-*Beads* verwendet. Des Weiteren wurden die Peptid pA10 und Kp als Kontrollen an *Beads* gekoppelt. Das Peptid pA10 entsprach der zu CANDIS korrespondierende Sequenz aus der *Stalk*-Region des humanen ADAM10. Das Peptid Kp enthielt die gleichen Aminosäurereste wie CANDIS. Diese waren jedoch rein zufällig angeordnet. Beide Peptide wiesen bei CD-Messungen keine  $\alpha$ -helikale Struktur auf (siehe Abbildung 4.25(D), Seite 74). Die Präzipitationsexperimente mit den Peptid-*Beads* wurden, wie in Kapitel 3.2.5.7 (Seite 43) beschrieben, durchgeführt. Neben der Fähigkeit von CANDIS, ADAM17-Substrate zu binden, wurde auch das Multimerisierungspotential von CANDIS getestet. Um eine mögliche Multimerisierung nachzuweisen, wurde das bereits vorgestellte Konstrukt MPD17\_GPI (siehe Abbildung 4.23, Seite 71) eingesetzt. Wie bereits erwähnt, verfügt dieses Konstrukt sowohl über die MPD17 als auch über CANDIS. Als ADAM17-Substrat wurde zunächst der



(A)

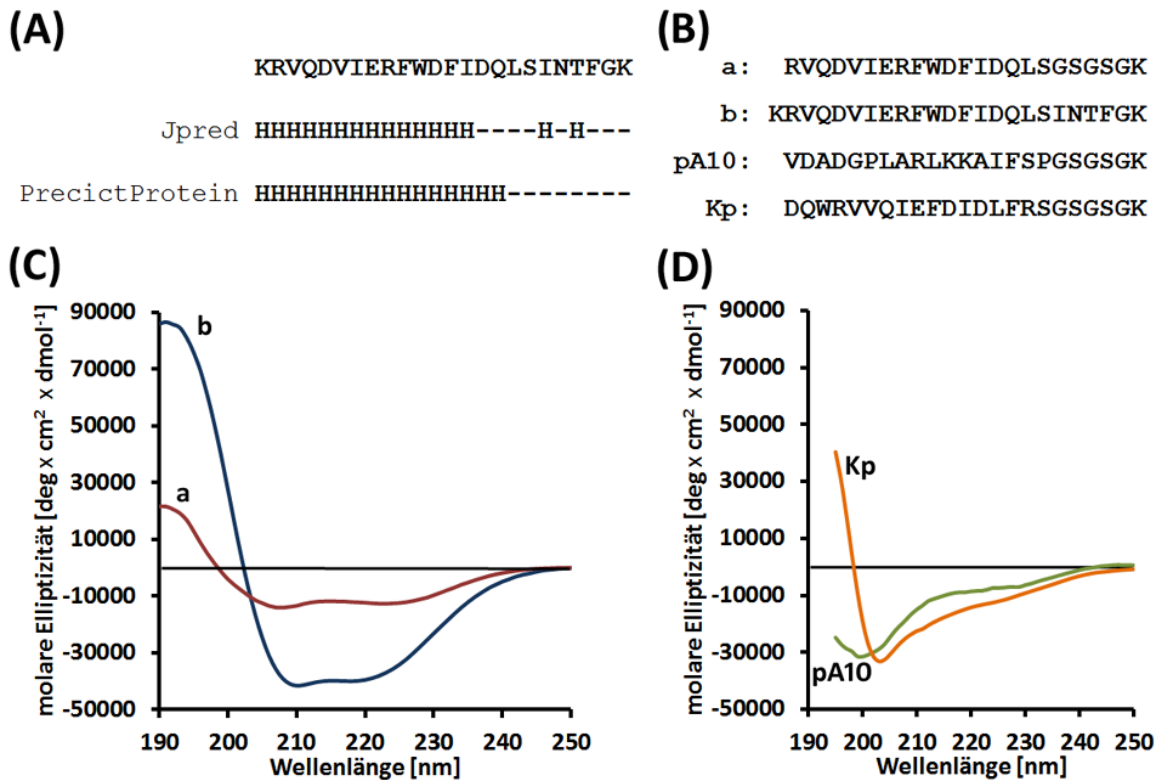


(B)

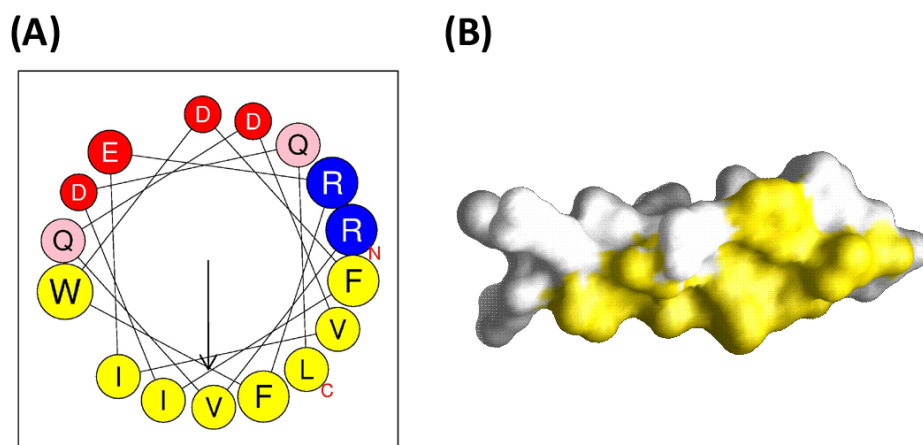
ADAM17 Sequenz-Alignment:

	MPD	643	Stalk-Region	671	TM
<i>Homo sapiens</i>	.QKNLFLRKGKPCITVGFCDMNGKCEKRVQDVIERFWD FIDQLSINTFGKFLADNI.	← →		← →	
<i>Mus musculus</i>	.QKNLFLRKGKPCITVGFCDMNGKCEKRVQDVIERFWD FIDQLSINTFGKFLADNI.				
<i>Rattus norvegicus</i>	.QKNLFLRKGKPCITVGFCDMNGKCEKRVQDVIERFWD FIDQLSINTFGKFLADNI.				
<i>Drosophila melanogaster</i>	.EPPDVLPDGTGTCITGFCNK.GVCEKTIQDVVERFWD IIEEININTFGKFLADNI.				
<i>Daphnia pulex</i>	.EPYDILPDGTGTCVHGFCNS.GICEKTVQDIVERFWD IVEELSINRVL SMLKDNL.				
			hoch konservierte Region		

**Abbildung 4.24 – Die Stalk-Region von ADAM17:** (A) Übersicht über die Domänenstruktur von ADAM17: Pro = Prodomäne; KD = katalytische Domäne; Dis = Disintegrin-ähnliche Domäne; TM = Transmembranregion; Zyt = zytoplasmatische Region. (B) Vergleich der ADAM17-Stalk-Region verschiedener Spezies. Grüne Aminosäurereste sind hoch, gelbe nur zum Teil konserviert.



**Abbildung 4.25 – Sekundärstruktur der verwendeten Peptide:**(A) Eine Sekundärstrukturvorhersage für CANDIS wurde mit *Jpred* (Cuff et al., 1998) und *PredictProtein* (Rost et al., 2004) erzeugt. (B) Übersicht über die im Folgenden verwendeten Peptide. (C) CD-Spektren der CANDIS enthaltenden Peptide a und b in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.4). (D) CD-Spektren des Peptids aus ADAM10 (pA10) und des Kontrollpeptids (Kp) in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.4).

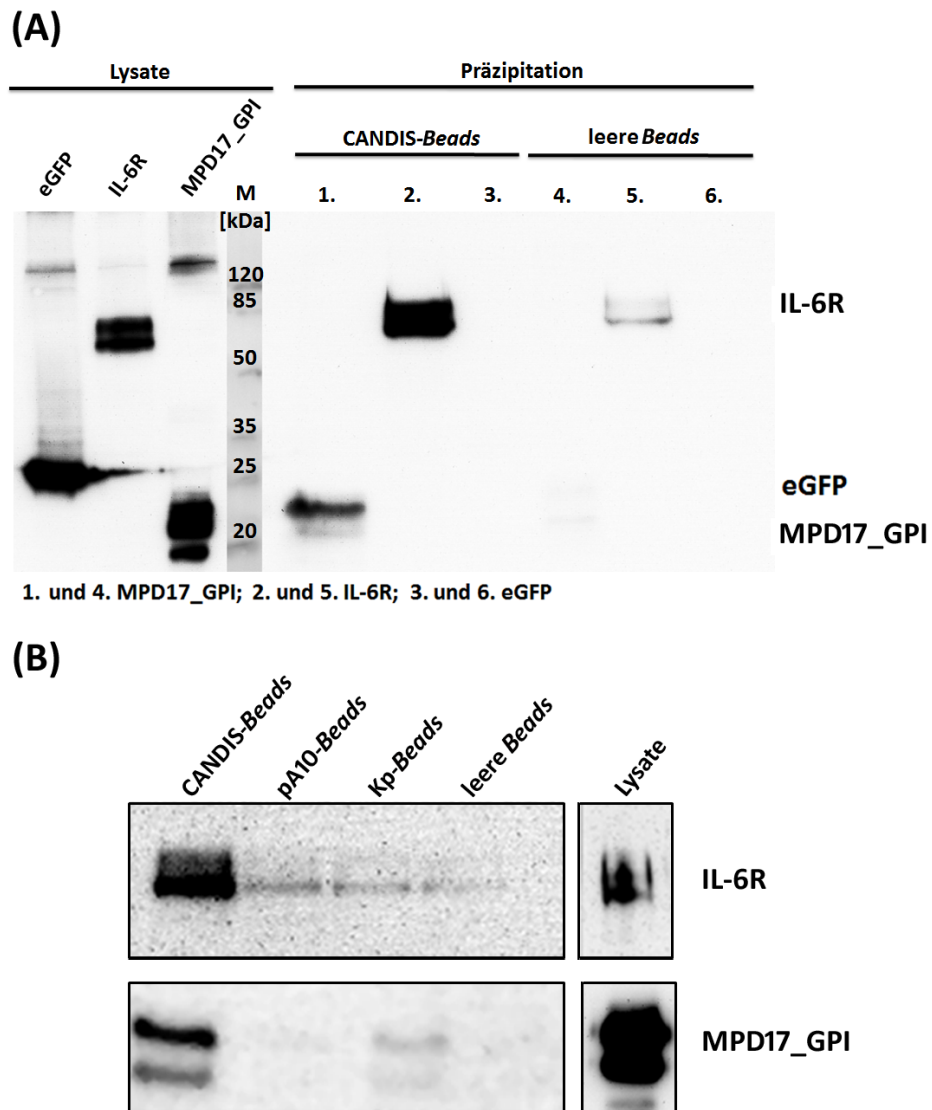


**Abbildung 4.26 – CANDIS bildet eine amphipathische Helix:** (A) Helixrad von CANDIS - erstellt mit *HelixQuest* (Gautier et al., 2008). (B) Strukturmodell von CANDIS. Hydrophile Aminosäurereste sind weiß und hydrophobe Reste gelb dargestellt.

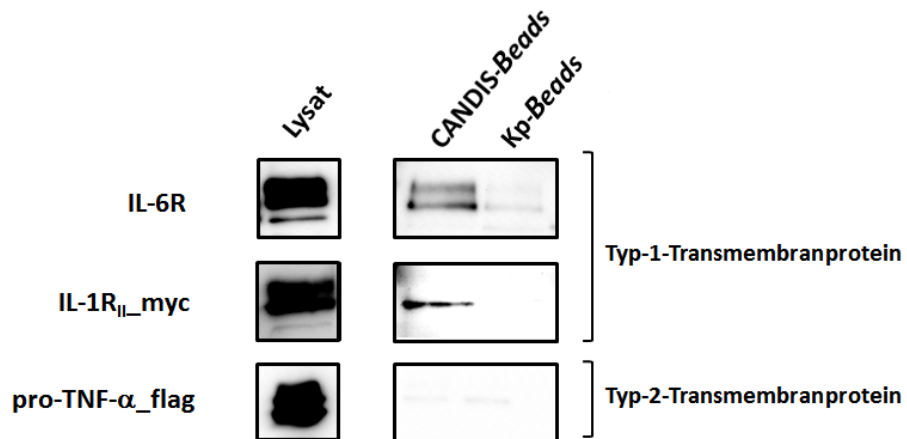
humane IL-6R verwendet. Als Negativkontrolle diente eGFP. Diese drei Proteine wurden, wie in Kapitel 3.2.5.2 (Seite 39) geschildert, in HEK-293T-Zellen exprimiert. Für die initialen Präzipitationsexperimente wurden CANDIS-*Beads* und leere *Beads* eingesetzt. Abbildung 4.27(A) (Seite 76) zeigt, dass es möglich war MPD17\_GPI und den IL-6R mit den CANDIS-*Beads* zu präzipitieren, nicht jedoch mit den leeren *Beads*. Dies galt nicht für die eGFP-Präzipitationen, bei denen keinerlei Interaktion zwischen eGFP und CANDIS nachweisbar war. Die hier und in den folgenden Experimenten bei MPD17\_GPI und dem IL-6R im *Western Blot* auftretenden Doppelbanden sind auf unterschiedliche Glykosylierungen zurückzuführen.

Als nächstes wurde mit pA10-*Beads* und Kp-*Beads* überprüft, ob MPD17\_GPI und der IL-6R spezifisch nur mit dem CANDIS-Peptid (Peptid a) interagieren. Auch hier fand eine Bindung exklusiv nur an die CANDIS-*Beads* statt (siehe Abbildung 4.27(B), Seite 76). Offensichtlich stellt CANDIS tatsächlich die Region dar, die sowohl an der Multimerisierung von ADAM17 als auch an der Substraterkennung beteiligt ist.

Mittels weiterer Präzipitationsexperimente wurden zwei weitere ADAM17-Substrate darauf getestet, ob sie in der Lage sind, mit CANDIS zu interagieren. Für diese Experimente wurden der humane Interleukin-1-Rezeptor Typ 2 (IL-1R<sub>II</sub>) - wie der IL-6R ein Typ-1-Transmembranprotein - und das humane Typ-2-Transmembranprotein pro-TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor) verwendet. Lorenzen et al. (2012) zeigten bereits, dass das Konstrukt MPD17\_GPI die beiden Typ-1-Transmembranproteine IL-6R und IL1-R<sub>II</sub>, aber nicht das Typ-2-Transmembranprotein pro-TNF- $\alpha$  bindet. Alle drei Substrate wurden wie bei den vorangegangenen Präzipitationsexperimenten in HEK-293T-Zellen exprimiert. Mit CANDIS-*Beads* wurde versucht, die Substrate zu präzipitieren (siehe Kapitel 3.2.5.7, Seite 43). Kp-*Beads* dienten als Negativkontrolle. Wie in Abbildung 4.28 (Seite 77) zu sehen ist, bindet CANDIS nur die beiden Typ-1-Transmembranproteine, nicht jedoch pro-TNF- $\alpha$ .



**Abbildung 4.27 – Präzipitationsexperimente mit CANDIS-Beads:** Die Präzipitationen wurden, wie in Kapitel 3.2.5.7 (Seite 43) beschrieben, durchgeführt. Auf den *Western Blots* wurde MPD17\_GPI mit dem HPC4-Antikörper, der IL-6R mit dem anti-IL-6R-Antikörper 4-11 und eGFP mit dem anti-eGFP-Antikörper detektiert. **(A)** Der *Western Blot* zeigt die Präzipitationsexperimente mit CANDIS-Beads und leere Beads. Lysate von IL-6R-, MPD17\_GPI- oder eGFP-exprimierenden HEK-293T-Zellen wurden für diese Präzipitationen benutzt. **(B)** *Western-Blot*-Analysen der Präzipitationen von IL6-R und MPD17\_GPI mit den verschiedenen, an Beads gekoppelten Peptiden: CANDIS, die korrespondierende Sequenz aus ADAM10 (pA10) und das Kontrollpeptid (Kp).



**Abbildung 4.28 – Substratspezifität von CANDIS:** Die Präzipitationen wurden, wie in Kapitel 3.2.5.7 (Seite 43) beschrieben, durchgeführt. Lysate von IL-6R-, IL-1R<sub>II</sub>\_myc- oder pro-TNF- $\alpha$ \_flag-exprimierenden HEK-293T-Zellen wurden für die Präzipitationen benutzt. Die *Western Blots* zeigen die Präzipitationsexperimente mit CANDIS-Beads und Kp-Beads. Auf den *Western Blots* wurde IL-6R mit dem 4-11-Antikörper, IL-1R<sub>II</sub>\_myc mit anti-Myc-Antikörper und pro-TNF- $\alpha$ \_flag mit anti-Flag-Antikörper detektiert.

## 4.5 Einfluss von CANDIS auf das ADAM17-vermittelte *Shedding*

Da CANDIS allein in der Lage ist, die ADAM17-Substrate IL-6R und IL-1R<sub>II</sub> zu binden, wurde im Folgenden ermittelt, in welchem Maße CANDIS bei der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurde die ADAM17-Variante ADAM17p10 eingesetzt. Diese Variante besitzt statt CANDIS die korrespondierende Sequenz aus humanem ADAM10 (siehe Abbildung 4.25(B), Seite 74).

### 4.5.1 *Shedding*-Aktivität des ADAM17-Konstrukts ADAM17p10

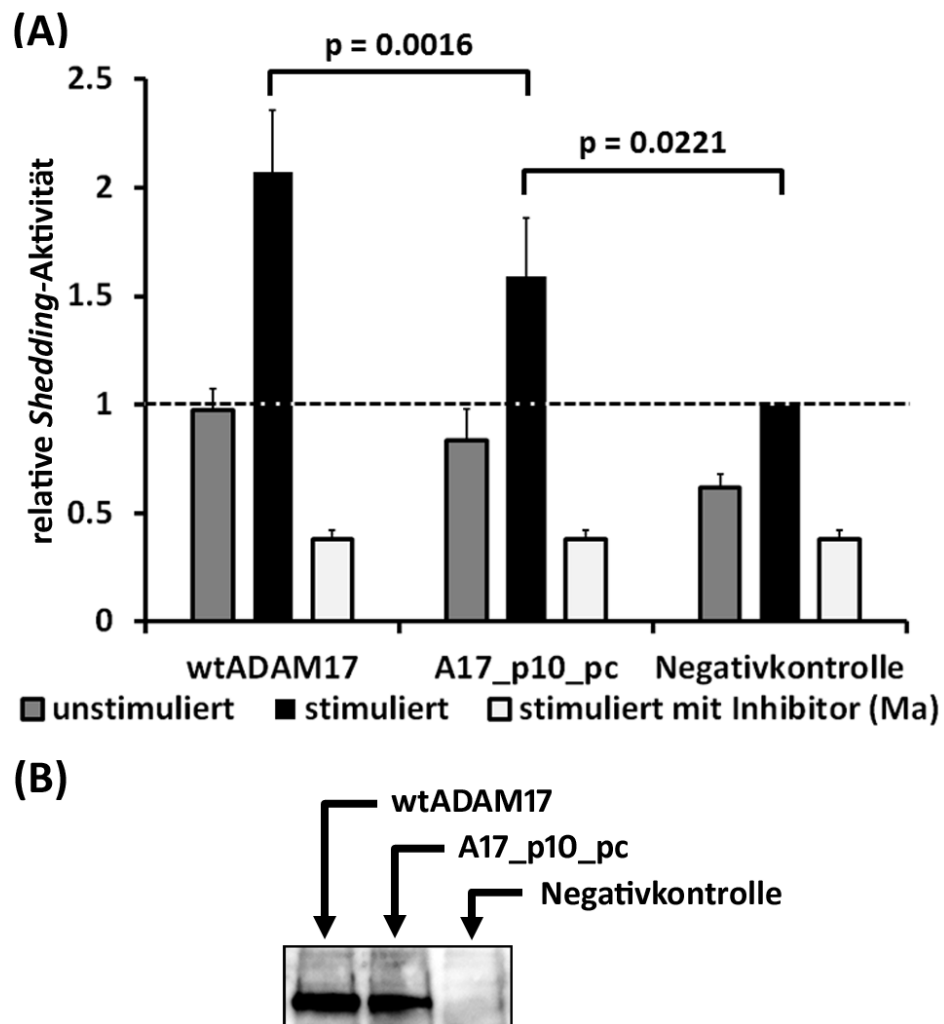
Die Aktivitätstests wurden, wie in Kapitel 3.2.5.8 (Seite 43) beschrieben, durchgeführt. IL-1R<sub>II</sub> mit N-terminaler alkalinen Phosphatase (IL-1R<sub>II</sub>-AP) wurde mit entweder wtADAM17, ADAM17p10 oder eGFP als Negativkontrolle in MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen transient koexprimiert. Es wurde analog zu Kapitel 4.2.1 (Seite 64) vorgegangen.

Die Abbildung 4.29 (Seite 79) zeigt die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten. Auf den PMA-stimulierten Zellen, die wtADAM17 exprimierten, fand circa doppelt so viel *Shedding* statt wie in der Negativkontrolle. Im Vergleich dazu war die *Shedding*-Aktivität von ADAM17p10 vermindert. Sie betrug ungefähr das 1.6-fache des Hintergrund-*Sheddings*. Folglich bewirkt die Abwesenheit von CANDIS in ADAM17, dass das IL-1R<sub>II</sub>-*Shedding* um circa 40 Prozent reduziert ist.

Dies ist vermutlich auf die durch das Fehlen von CANDIS verringerte Affinität zum Substrat zurückzuführen. CANDIS ist dementsprechend für ein effizientes *Shedding* notwendig. Jedoch scheint CANDIS nicht allein für die Substraterkennung verantwortlich zu sein.

### 4.5.2 *Shedding*-Aktivität von ADAM17p10 unter Einfluss von HE-ADAM17

Um nachzuweisen, dass die geringere Aktivität auf eine Reduktion der Affinität durch den Verlust von CANDIS zurückzuführen ist, wurden zusätzliche Aktivitätstests mit einer Koexpression von HE-ADAM17 durchgeführt. Das inaktive HE-ADAM17 wurde bereits in Kapitel 4.2.1 (Seite 64) charakterisiert. Aktivitätstests wurden für die Konstrukte HE-ADAM17, ADAM17p10, wtADAM17 sowie für die Negativkontrolle, wie bereits in Kapitel 4.2.1 (Seite 64) beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde bei der Transfektion wieder folgendes Plasmidverhältnis eingesetzt: Konstrukt zu Substrat - 1:5. Bei den parallel dazu durchgeführten Aktivitätstests, die unter Koexpression von entweder HE-ADAM17 oder als Negativkontrolle



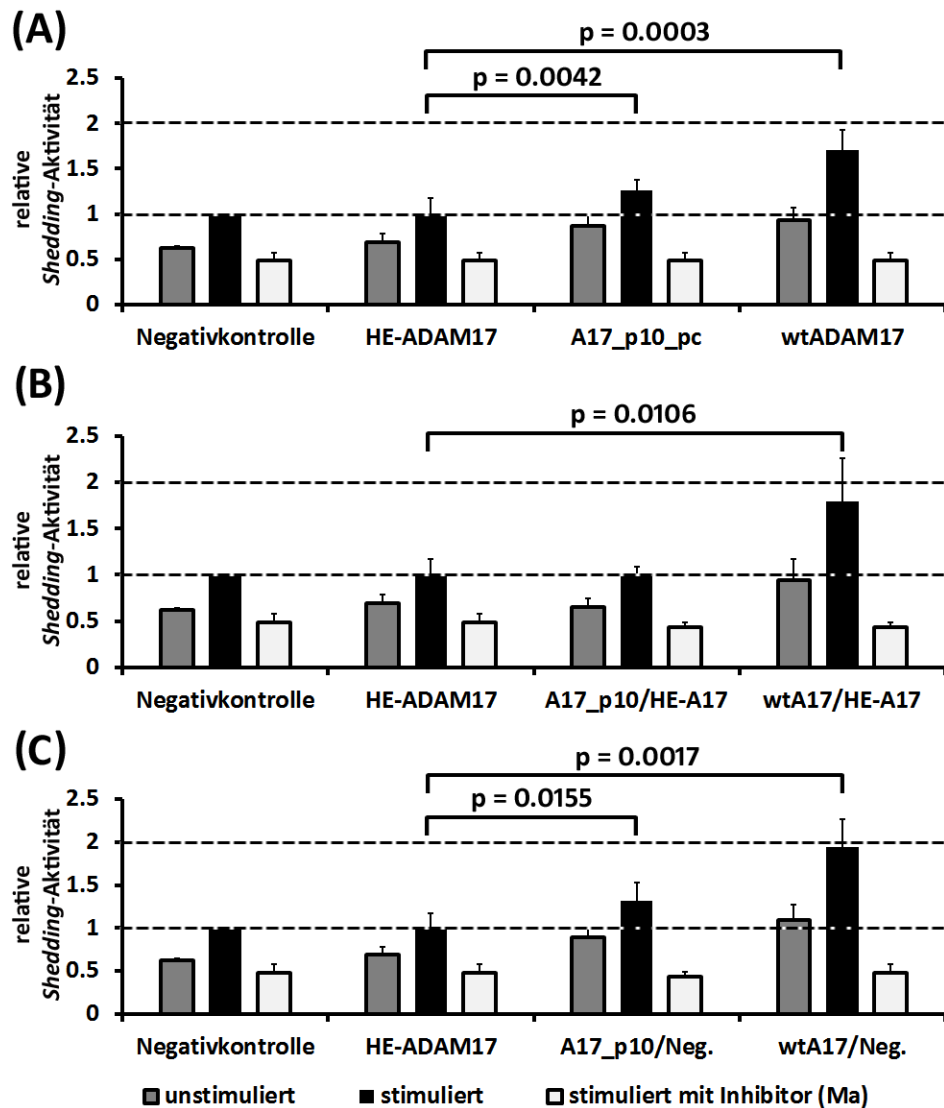
**Abbildung 4.29 – Aktivitätstest von ADAM17p10:** **(A)** MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen wurden mit wtADAM17, ADAM17p10 (A17\_p10\_pc) oder eGFP als Negativkontrolle mit IL-1R<sub>II</sub>-AP transient kotransfiziert. Konstrukt zu IL-1R<sub>II</sub>-AP-Verhältnis: 1:5. Das *Shedding* auf den Zellen wurde entweder nicht stimuliert, mit 100 nM PMA stimuliert oder mit 100 nM PMA stimuliert und gleichzeitig mit 10  $\mu$ M Marimastat inhibiert. Das gezeigte Diagramm repräsentiert den Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. **(B)** Dass die Zellen wtADAM17 und ADAM17p10 gleichmäßig exprimieren, wurde mittels *Western Blot* überprüft. Sowohl das benutzte wtADAM17-Konstrukt als auch das ADAM17p10-Konstrukt besaßen einen PC-Tag, der mit dem HPC4-Antikörper detektiert wurde.

eGFP durchgeführt wurden, wurde bei der jeweiligen Transfektion folgendes Plasmidverhältnis eingesetzt: HE-ADAM17 bzw. eGFP zu Konstrukt zu IL-1R<sub>II</sub>-AP - 1:1:10.

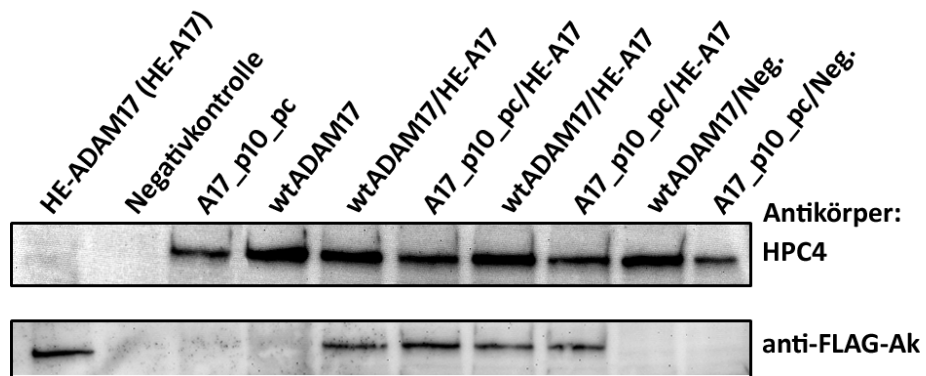
Die Diagramme in Abbildung 4.30 (Seite 81) zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten. Es wurde zunächst überprüft, ob sich HE-ADAM17, ADAM17p10 und wtADAM17 verhalten (siehe Abbildung 4.30A, Seite 81), wie zuvor in Kapitel 4.2.1 (Seite 64) und Kapitel 4.5.1 (Seite 78) beschrieben. Die *Shedding*-Aktivität der PMA-stimulierten Zellen mit HE-ADAM17 lag auf dem Niveau des Hintergrund-*Sheddings* der Negativkontrolle. Die Werte für wtADAM17 waren knapp doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle, während ADAM17p10 ein im Vergleich zum wtADAM17 reduziertes *Shedding* zeigte.

Wurde HE-ADAM17 mit wtADAM17 koexprimiert, so war die *Shedding*-Aktivität weiterhin doppelt so hoch wie das Hintergrund-*Shedding*. Wenn jedoch HE-ADAM17 mit ADAM17p10 koexprimiert wurde, war ein völliger Verlust der *Shedding*-Aktivität die Folge (siehe Abbildung 4.30(B), Seite 81). Dass dies kein Effekt der Transfektion mit weniger Konstrukt-DNA war, ist durch Abbildung 4.30(C) (Seite 81) festzustellen. Statt HE-ADAM17 wurde dort eGFP als Negativkontrolle kotransfiziert. Es ergab sich das gleiche Bild wie in Abbildung 4.30(A) (Seite 81): ADAM17p10 hatte eine reduzierte *Shedding*-Aktivität, die jedoch deutlich über dem Hintergrund-*Shedding* liegt. Dass alle Konstrukte das gleiche Expressionslevel hatten, wurde mittels *Western Blot* bestätigt (siehe Abbildung 4.31, Seite 82).





**Abbildung 4.30 – Aktivitätstest von ADAM17p10 unter Koexpression von HE-ADAM17:** Das *Shedding* auf den Zellen wurde entweder nicht stimuliert, mit 100 nM PMA stimuliert oder mit 100 nM PMA stimuliert und gleichzeitig mit 10  $\mu$ M Marimastat inhibiert. Das gezeigte Diagramm repräsentiert den Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. **(A)** MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen wurden mit wtADAM17, ADAM17p10 (A17\_p10\_pc), HE-ADAM17 (Konstrukt mit FLAG-Tag) oder eGFP als Negativkontrolle mit IL-1R<sub>II</sub>-AP transient kotransfiziert. Konstrukt zu IL-1R<sub>II</sub>-AP-Verhältnis: 1:5. **(B)** ADAM17p10 oder wtADAM17 wurden mit HE-ADAM17 koexprimiert. Konstrukt zu HE-ADAM17 zu IL-1R<sub>II</sub>-AP-Verhältnis: 1:1:10. **(C)** ADAM17p10 oder wtADAM17 wurden mit eGFP als Negativkontrolle koexprimiert. Konstrukt zu eGFP zu IL-1R<sub>II</sub>-AP-Verhältnis: 1:1:10.



**Abbildung 4.31 – Expressionskontrolle der Aktivitätstests unter Koexpression von HE-ADAM17:** Dass die Zellen die verwendete ADAM17-Konstrukte gleichmäßig exprimieren, wurde mittels *Western Blot* überprüft. Das in diesem Experiment verwendete HE-ADAM17 besaß einen FLAG-Tag und wurde mit dem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. Alle anderen eingesetzten ADAM17-Konstrukte besaßen einen PC-Tag, der mit dem HPC4-Antikörper detektiert wurde.

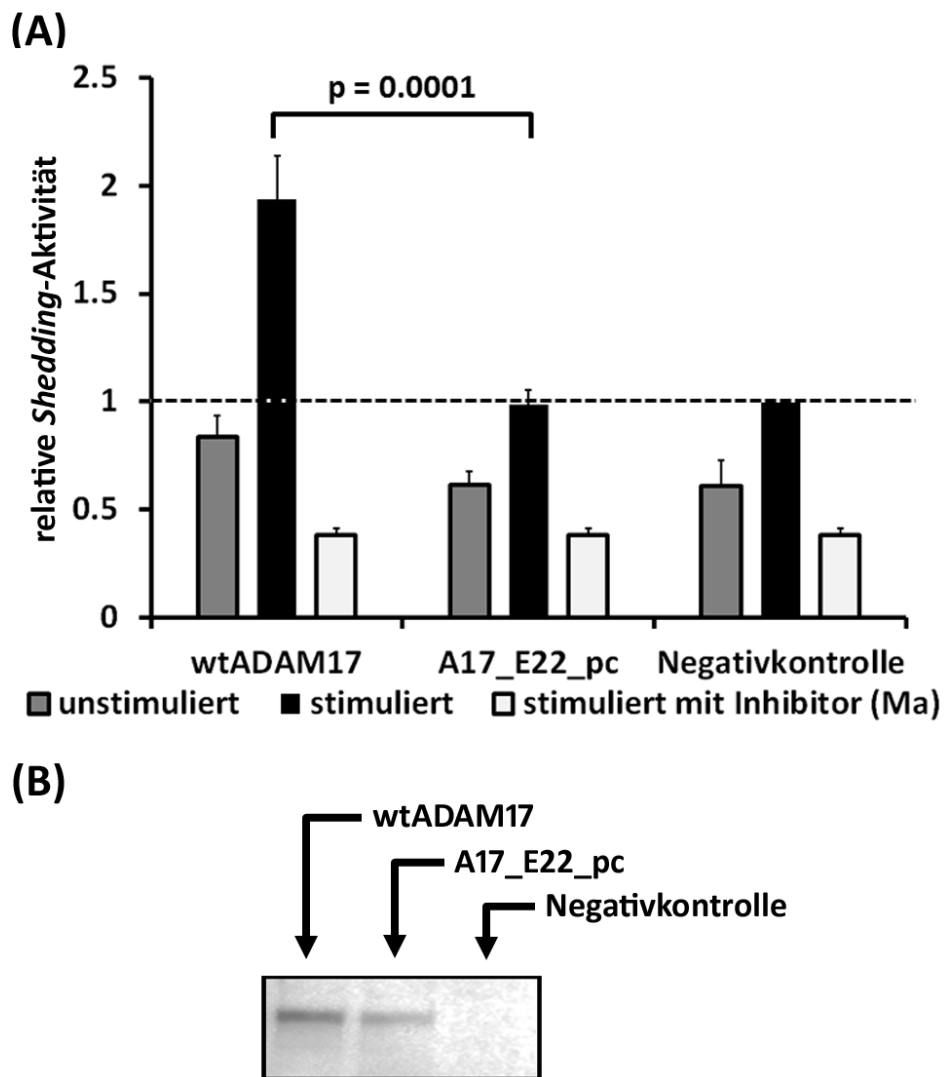
## 4.6 Zusammenspiel von MPD17 und CANDIS

### 4.6.1 Einfluss der MPD17 auf das ADAM17-*Shedding*

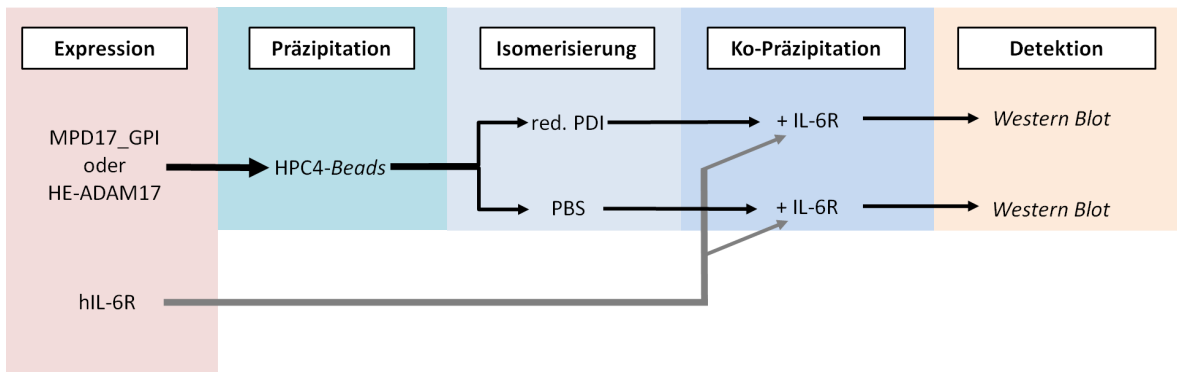
Um die Relevanz der MPD17 für die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 genauer zu untersuchen, wurde das Konstrukt ADAM17E22 verwendet. Dieses Konstrukt besitzt statt der MPD17 die *EGF-like*-Domäne von ADAM22, hat aber weiterhin CANDIS. Es wurden mit ADAM17E22, wie in Kapitel 4.2.1 (Seite 64) erläutert, Aktivitätstests mit IL-1R<sub>II</sub>-AP durchgeführt. Wie in Abbildung 4.32 (Seite 84) zu erkennen ist, zeigte ADAM17E22 keine *Shedding*-Aktivität, die über das Hintergrund-*Shedding* hinausging. Die Inaktivität von ADAM17E22 macht deutlich, dass für *Shedding* die MPD17 essentiell ist.

### 4.6.2 Einfluss der MPD17 auf die Substratbindung

Obwohl die lösliche, rekombinante MPD17 keine Substratbindung zeigte (siehe Kapitel 4.3, Seite 70), führte ein Austausch dieser Domäne in ADAM17 zu einem vollständigen Verlust der *Shedding*-Aktivität (siehe Kapitel 4.6.1, Seite 83). Da die MPD17 direkt N-terminal vor CANDIS liegt, wurde im Folgenden der Einfluss der MPD17 auf die Substratbindung von CANDIS mittels Ko-Immunopräzipitationsexperimenten, wie in Kapitel 3.2.5.6 (Seite 42) beschrieben, untersucht. Dabei wurde zum einen HE-ADAM17 und zum anderen MPD17\_GPI verwendet. HE-ADAM17 wurde dem Wildtyp-ADAM17 vorgezogen, da Vorversuche gezeigt haben, dass es im Lauf des folgenden Experiments zur autokatalytischen Degradation des Wildtyp-ADAM17 kam. Außerdem sollte eine Prozessierung des IL-6R verhindert werden. Ein Ablaufschema des folgenden Experiments ist in Abbildung 4.33 (Seite 85) wiedergegeben. MPD17\_GPI oder HE-ADAM17 wurden in Hek-293T-Zellen exprimiert. Aus den Zelllysaten wurden die beiden Konstrukte mit HPC4-*Beads* präzipitiert. Die *Beads* mit dem jeweiligen gebundenen Konstrukt wurden aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit 1x PBS die andere Hälfte mit reduzierter PDI (10 µM in 1x PBS, siehe Kapitel 3.2.4.5, Seite 37) bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Parallel wurden humanen IL-6R exprimierende Hek-293T-Zellen lysiert. Nach der Inkubation mit reduzierter PDI oder 1x PBS wurden die *Beads* mit dem IL-6R-Lysat versetzt. Ob der IL-6R in der Lage war an das jeweilige Konstrukt zu binden, wurde mittels *Western Blot* überprüft (siehe Abbildung 4.33, Seite 85). Nach der Inkubation mit 1x PBS hat der humane IL-6R sowohl an HE-ADAM17 als auch an MPD17\_GPI gebunden. Die Inkubation mit reduzierter PDI führte dagegen zu einem Verlust



**Abbildung 4.32 – Aktivitätstest von ADAM17E22:** (A) MEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen wurden mit wtADAM17, ADAM17E22 (A17\_E22\_pc) oder eGFP als Negativkontrolle mit IL-1R<sub>II</sub>-AP transient kotransfiziert. Konstrukt zu IL-1R<sub>II</sub>-AP-Verhältnis: 1:5. Das *Shedding* auf den Zellen wurde entweder nicht stimuliert, mit 100 nM PMA stimuliert oder mit 100 nM PMA stimuliert und gleichzeitig mit 10  $\mu$ M Marimastat inhibiert. Das gezeigte Diagramm repräsentiert den Mittelwert aus sechs unabhängigen Experimenten. (B) Dass die Zellen wtADAM17 und ADAM17E22 gleichmäßig exprimieren, wurde mittels *Western Blot* überprüft. Sowohl das benutzte wtADAM17-Konstrukt als auch das ADAM17E22-Konstrukt besaßen beide einen PC-Tag, der mit dem HPC4-Antikörper detektiert wurde.

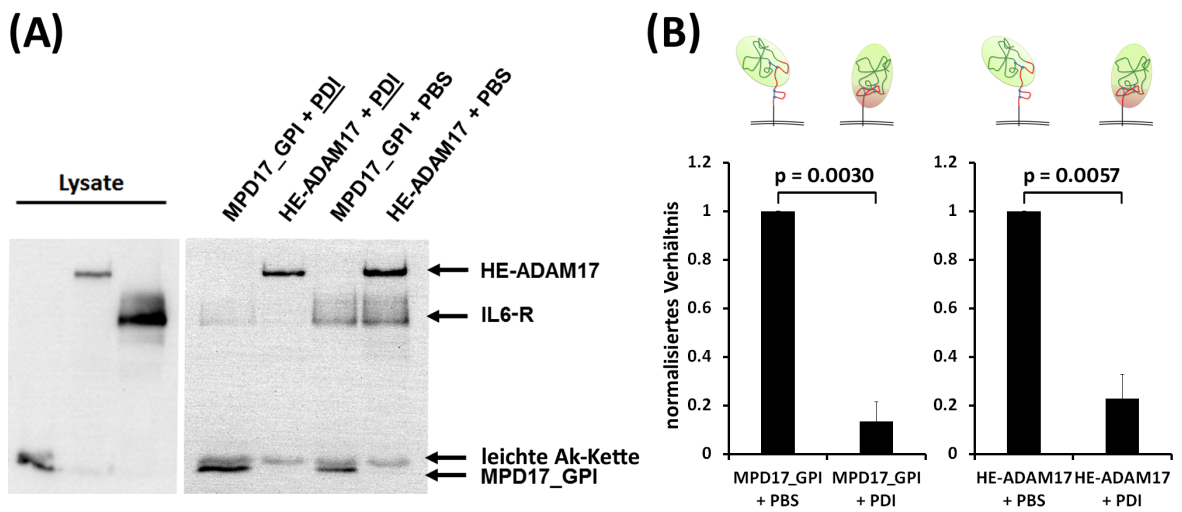


**Abbildung 4.33 – Schema der Ko-Immunopräzipitation unter PDI-Einfluss:** MPD17\_GPI oder HE-ADAM17 wurden in HEK-293T-Zellen exprimiert und, wie Kapitel 3.2.5.6 (Seite 42) beschrieben, mit HPC4-Beads präzipitiert. Nach Inkubation mit entweder reduzierter PDI oder 1x PBS wurde IL-6R enthaltendes HEK-293T-Lysat zu den Beads gegeben. Eine erfolgreiche Ko-Immunopräzipitation wurde mittels *Western Blotting* nachgewiesen.

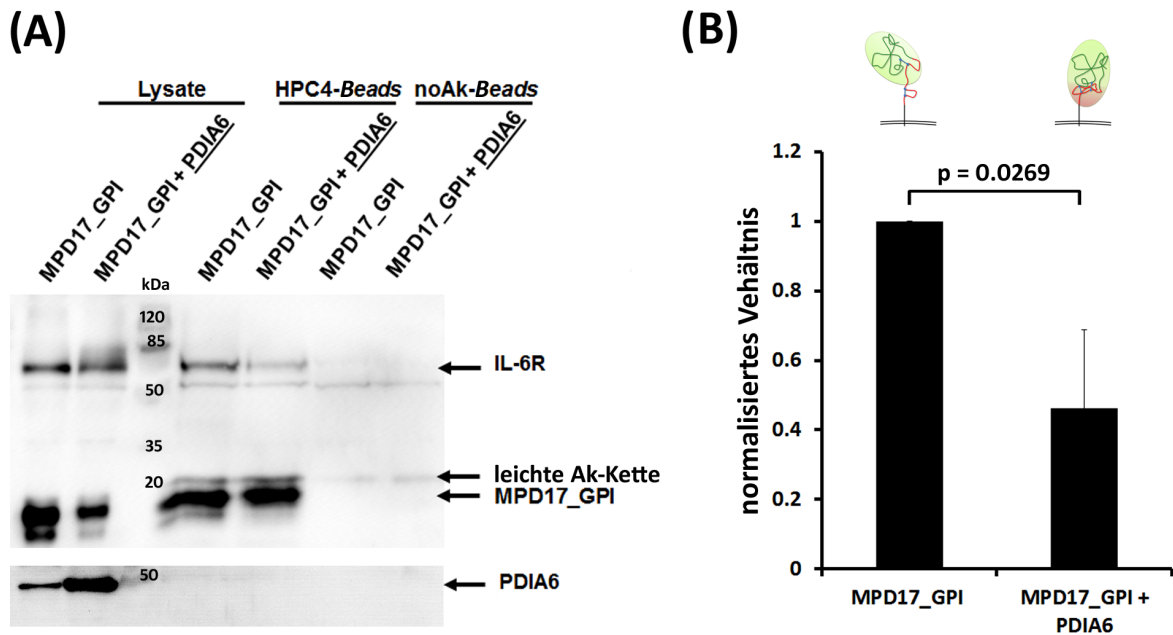
dieser Bindung (siehe Abbildung 4.34, Seite 86).

In einem zusätzlichen Experiment wurde geprüft, inwieweit eine Überexpression der PDIA6 einen negativen Effekt auf die Bindung zwischen MPD17\_GPI und dem IL-6R hat. HEK-293T-Zellen wurden entweder nur mit dem humanen IL-6R und MPD17\_GPI oder zusätzlich noch mit PDIA6 kotransfiziert (siehe Kapitel 3.2.5.5, Seite 42). Anschließend wurde eine Ko-Immunopräzipitation, wie in Kapitel 3.2.5.4 (Seite 41), mit HPC4-Beads oder noAK-Beads als Negativkontrolle durchgeführt. Der in Abbildung 4.35 (Seite 87) dargestellte *Western Blot* zeigt, dass die Bindung des humanen IL-6R zu MPD17\_GPI unter dem Einfluss einer PDIA6-Überexpression um ungefähr 50 % verringert ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die MPD von ADAM17 tatsächlich zunächst in der offenen Form vorliegt, und dies die Bindung und damit die Prozessierung von Substraten wie dem IL-6R ermöglicht. Unter dem Einfluss der PDI wird die MPD17 in die geschlossene Form überführt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 58). Die MPD17 selbst ist offenbar nicht an der Bindung zu den Substraten beteiligt (siehe Kapitel 4.3, Seite 70); CANDIS auf der anderen Seite ist aufgrund fehlender Cysteine aber nicht von der PDI direkt betroffen. Dies deutet auf einen rein sterischen Einfluss der MPD17 während der Substratbindung hin. Die offene MPD17 ermöglicht den Zugang der Substrate zu CANDIS, die geschlossene Form versperrt ihn jedoch.



**Abbildung 4.34 – Ko-Immunopräzipitation unter *in-vitro*-PDI-Einfluss:** **(A)** Exemplarischer *Western Blot* der Ko-Immunopräzipitation des IL-6R durch MPD17\_GPI oder HE-ADAM17 nach *in-vitro*-Inkubation mit reduzierter PDI oder 1x PBS. HE-ADAM17 und MPD17\_GPI besaßen einen PC-Tag und wurden mit dem HPC4-Antikörper detektiert. Der IL-6R wurde mit dem anti-IL-6R-Antikörper 4-11 nachgewiesen. **(B)** Mit Hilfe des Computerprogramms *ImageJ* (Schneider et al., 2012) wurden die *Western Blots* der Ko-Immunopräzipitationen densitometrisch ausgewertet. Zunächst wurde der gemessene Wert der IL-6R-Bande durch den Wert der jeweiligen ADAM17-Konstrukt-Bande geteilt. Anschließend wurden diese Verhältnisse auf das Verhältnis der PBS-inkubierten Probe normiert (siehe Kapitel 3.2.5.6, Seite 42). Das Diagramm stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar.



**Abbildung 4.35 – Einfluss der Koexpression von PDIA6 auf die Bindung zwischen MPD17\_GPI und IL-6R:** (A) Exemplarischer *Western Blot* der Ko-Immunopräzipitation des IL-6R durch MPD17\_GPI. MPD17\_GPI wurden mit dem IL-6R koexprimiert. Zusätzlich gab es je einen Ansatz, bei dem PDIA6 überexprimiert wurde. MPD17\_GPI besaß einen PC-Tag und wurde mit dem HPC4-Antikörper detektiert. Der IL-6R wurde mit dem anti-IL-6R-Antikörper 4-11 und PDIA6 mit dem anti-PDIA6-Antikörper nachgewiesen. (B) Mit Hilfe des Computerprogramms *Image Studio Lite Version 3.1* (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland) wurden die *Western Blots* der Ko-Immunopräzipitationen densitometrisch ausgewertet. Zunächst wurde der gemessene Wert der IL-6R-Bande durch den Wert der MP17\_GPI-Bande geteilt. Anschließend wurden diese Verhältnisse auf das Verhältnis der Probe normiert, bei der PDIA6 nicht überexprimiert wurde (siehe Kapitel 3.2.5.5, Seite 42). Das Diagramm stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar.

## 5 Diskussion

Das Enzym ADAM17 ist mit seinen unterschiedlichen Substraten eine für viele physiologische Prozesse bedeutende *Sheddase*. Ein Ungleichgewicht in der Regulation des ADAM17-vermittelten *Sheddings* hat für den Organismus gravierende Folgen. So spielt eine übermäßige Freisetzung von Zytokinen und deren Rezeptoren durch ADAM17 eine Rolle sowohl in der Tumorentwicklung als auch bei Autoimmunprozessen. Auf der anderen Seite führt die fehlende Freisetzung von Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche zu einer Störung regenerativer Prozesse (Chalaris et al., 2010). Dies zeigt, dass die Aktivität von ADAM17 streng reguliert werden muss. In diesem Zusammenhang wiesen Bennett et al. (2000) und Willems et al. (2010) nach, dass extrazelluläre, reduzierte PDI ADAM17 inaktiviert. Die Inaktivierung geht dabei mit einer strukturellen Veränderung im nicht katalytischen Teil der ADAM17-Ektodomäne einher (Willems et al., 2010).

### 5.1 Die membranproximale Domäne von ADAM17 besitzt zwei Disulfidisomere

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die membranproximale Domäne von ADAM17 in zwei unterschiedlichen Disulfidisomeren vorliegen kann: in einer offenen und einer geschlossenen Form. Die N-terminale Region ist bei beiden Isomeren strukturell identisch. Die offene Form besitzt jedoch einen flexiblen C-Terminus, während die geschlossene Form einen unflexiblen und kompakten C-Terminus aufweist (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 52). Dieser strukturelle Unterschied ist durch zwei Disulfidbrücken bedingt. In der offenen Form ist C600 mit C630 und C635 mit C341 verbunden, während in der geschlossenen Form C600 mit C635 und C630 mit C641 Disulfidbrücken bilden (siehe Abbildung 4.9, Seite 57).

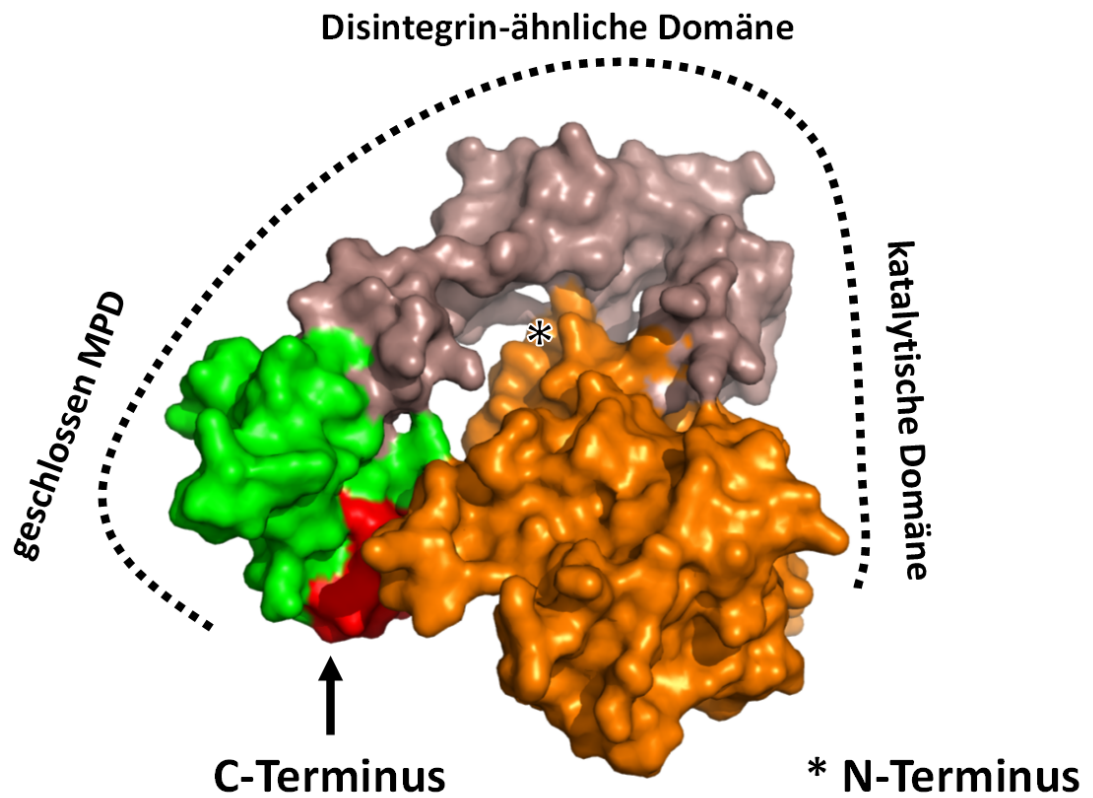
Bei der rekombinanten Expression und Reinigung wird hauptsächlich die offene MPD17 erhalten. Diese Form lässt sich mittels Denaturierung und anschließender Renaturierung in die geschlossene MPD17 überführen. Dies spricht dafür, dass es sich bei der offenen Form um den kinetisch bevorzugten Zustand, bei der geschlossenen Form um den thermodynamisch stabilen Zustand handelt. Die reduzierte PDI überführt, durch die Isomerisierung der oben erwähnten Disulfidbrücken, die offene MPD17 in die geschlossene MPD17. Zusam-



men mit den Ergebnissen von Bennett et al. (2000) und Willems et al. (2010) lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass im aktiven Zustand von ADAM17 die MPD17 offen vorliegt, während sie im inaktiven ADAM17 den geschlossenen Zustand einnimmt.

Wenn die offene MPD17 als kinetisch favorisierte Form bei der Expression von ADAM17 entsteht, macht dies einen Mechanismus nötig, der die Isomerisierung der MPD17 durch PDIs im ER verhindert. Vorstellbar sind dabei Adapterproteine, welche die MPD17 von den PDIs abschirmen. Dadurch könnte die offene Form der MPD17 stabilisiert und geschützt werden. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.6.2 (Seite 83) zeigen, dass MPD17\_GPI - bestehend nur aus MPD17 und CANDIS - in der offenen Form in Zellen exprimiert wird. Dies legt nahe, dass ein entsprechendes Adapterprotein direkt an der MPD17 und/oder an CANDIS bindet. Ein solches Adapterprotein könnte zum Beispiel das an ADAM17 bindende  $\beta$ 1-Integrin sein (Bax et al., 2004; Trad et al., 2013). Erst wenn  $\beta$ 1-Integrin von ADAM17 dissoziiert ist ADAM17 aktiv und vielleicht für PDIs zugänglich. Auch Chaperone, wie beispielsweise GRP78 (*glucose-regulated protein*), das ebenfalls als möglicher Interaktionspartner bei den in Kapitel 4.2.3 (Seite 68) beschriebenen Ko-Immunopräzipitationsexperimenten identifiziert wurde, könnten als solche Adapterproteine fungieren.

Da neben der MPD17-Struktur die Struktur der katalytischen Domäne ebenfalls bekannt ist (Maskos et al., 1998), fehlen nur noch die Struktur der Disintegrin-ähnlichen Domäne sowie die der Prodomäne, um ein vollständige Struktur der Ektodomäne von ADAM17 zu erhalten. Die Struktur der Disintegrin-ähnlichen Domäne von ADAM10, der zu ADAM17 am nächsten verwandten Protease, ist ebenfalls bereits bekannt (Mancia & Shapiro, 2005). Mit diesen Informationen wurde das in Abbildung 5.1 (Seite 90) gezeigte Modell der ADAM17-Ektodomäne ohne Prodomäne erstellt. Dabei ist die Ektodomäne mit der geschlossenen MPD17 dargestellt. Die Ektodomäne von ADAM17 zeigt in diesem Modell wie bei den ADAM-Homologen VAP1 und VAP2b sowie wie bei ADAM22 und ADAM10 eine C-förmige Anordnung der Domänen (Igarashi et al., 2007; Liu et al., 2009; Mancia & Shapiro, 2005; Takeda et al., 2006). In diesem Modell kommen sich die extrazellulären Domänen räumlich sehr nahe. Hinweise auf eine daraus resultierende gegenseitige Beeinflussung liefern unter anderem die Beobachtung, dass die MPD17 und die Disintegrin-ähnliche Domäne bei der Dissoziation der Prodomäne von der katalytischen Domäne sowie bei der Bindung des natürlichen Inhibitors TIMP3 an die katalytische Domäne eine essentielle Rolle spielen (Lee et al., 2002; Milla et al., 1999). Die durch die reduzierte PDI ausgelöste strukturelle Ände-



**Abbildung 5.1 – Model der ADAM17-Ektodomäne:** Die katalytische (orange), die Disintegrin-ähnliche (grau) und die membranproximale Domäne (grün/rot) sind C-förmig angeordnet. Die katalytische Domäne kommt dabei in direkte Nähe zur geschlossenen MPD17. C-Terminus würde die *Stalk*-Region mit CANDIS folgen, N-terminal die Prodomäne. (Modifizierte Abbildung nach ADAM17-Ektodomänenmodell von Prof. Dr. Joachim Grötzinger)

rung innerhalb der Ektodomäne von ADAM17, die von Willems et al. (2010) beschrieben wurde, aber nicht genauer definiert werden konnte, ist, wie oben dargelegt, auf die MPD17 zurückzuführen. Der flexible C-Terminus der offenen MPD17 bedingt wahrscheinlich eine Flexibilität der gesamten Ektodomäne. Dieser flexible Zustand ermöglicht das Binden der Substrate und damit das *Shedding*. Eine kompakte, geschlossene MPD17 hingegen verhindert dies. Im Model der Ektodomäne in Abbildung 5.1 (Seite 90) steht die geschlossenen MPD17 mit der katalytischen Domäne über die C-terminale Region in Kontakt. Dies wäre nur in der geschlossenen, strukturierten Form möglich. In der offenen, flexiblen Form wäre diese Interaktion aufgrund des flexiblen C-Terminus wahrscheinlich geschwächt. Die offene MPD17 würde daher zu mehr Flexibilität in der Ektodomäne beitragen, wie es von Willems et al. (2010) postuliert wurde.

## 5.2 CANDIS bindet ADAM17-Substrate

Obwohl angenommen wurde, dass die MPD17 für die Substraterkennung verantwortlich ist (Reddy et al., 2000; Lorenzen et al., 2012), konnte dies in dieser Arbeit für beide Disulfid-isomere nicht gezeigt werden (siehe Kapitel 4.3, Seite 70). Vielmehr geriet diesbezüglich die hochkonservierte Region, die direkt C-terminal der MPD liegt und CANDIS (*Conserved ADAM-SeventeenN Dynamic Interaction Sequence*) genannt wurde, in den Fokus. Wie in Kapitel 4.4.2 (Seite 72) nachgewiesen wurde, kann CANDIS allein die beiden ADAM17-Substrate IL-6R und IL-1R<sub>II</sub> binden. In wieweit dies auch für weitere ADAM17-Substrate gilt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. In dieser Arbeit wurde ebenfalls geprüft, ob das Typ-2-Transmembranprotein TNF- $\alpha$  mit CANDIS interagiert. Dies war nicht der Fall. Dieses Resultat steht mit anderen veröffentlichten Ergebnissen in Einklang. Reddy et al. (2000) und Lorenzen et al. (2012) zeigten, dass der C-terminale Bereich der Ektodomäne mit der MPD und der gesamten *Stalk*-Region, einschließlich CANDIS, weder einen Einfluss auf das TNF- $\alpha$ -*Shedding* noch auf die Bindung von TNF- $\alpha$  hat.

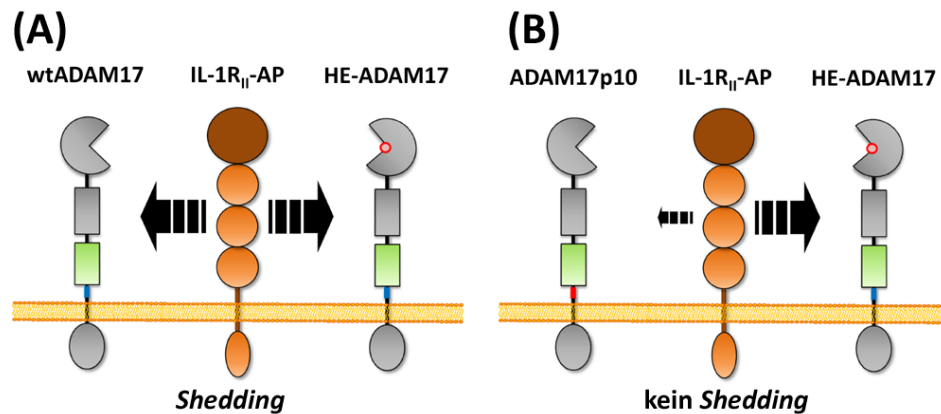
Ein Blick auf das Model der ADAM17-Ektodomäne in Abbildung 5.3 (Seite 94) liefert eine mögliche Erklärung für diese Tatsache. Das Substrat kann nur in einer Ausrichtung im katalytischen Zentrum positioniert sein. Dabei ist der N-Terminus des Substrats in Richtung MPD17 und damit auch in Richtung CANDIS ausgerichtet. Die Schnittstellen der ADAM17-Substrate liegen dicht über der Membran (circa 10-15 Aminosäurereste). Ein Typ-2-Trans-

membranprotein kommt daher nicht, wie in Abbildung 5.3 (Seite 94) gezeigt, in direkten Kontakt mit der MPD17 oder CANDIS. Bei Typ-1-Transmembranproteinen, wie dem IL-6R und dem IL-1R<sub>II</sub>, hingegen liegen die N-Termini und damit die Ektodomänen der Substrate in Richtung der MPD17 und CANDIS, sodass eine Bindung an CANDIS im Gegensatz zu Typ-2-Transmembranproteinen möglich ist. Dieses Model unterstützend wurde gezeigt, dass die in Abbildung 5.4 (Seite 94) dargestellte CANDIS-Bindestelle im IL-6R tatsächlich N-terminal von der ADAM17-Schnittstelle positioniert ist. Dies wurde von Katharina Höbel mittels Präzipitationsexperimenten mit verschiedenen IL-6R-Deletionsvarianten und IL-6R/IL-11R-Chimären nachgewiesen (Düsterhöft et al., 2014).

Ein Austausch von CANDIS in ADAM17 gegen die korrespondierende Sequenz aus der *Stalk*-Region von ADAM10 (ADAM17p10) führte zu einer 40-prozentigen Reduktion des IL-1-R<sub>II</sub>-*Sheddings* (Kapitel 4.5) (Seite 78). Bei einer zusätzlichen Koexpression der inaktiven ADAM17-Variante HE-ADAM17, wurde keine *Shedding*-Aktivität mehr nachgewiesen (Kapitel 4.5.2) (Seite 78). HE-ADAM17 besitzt im Gegensatz zu ADAM17p10 noch CANDIS und hat damit eine höhere Affinität zum Substrat. Daher fängt HE-ADAM17 die Substrate ab, kann sie aber nicht prozessieren, wie in Abbildung 5.2 (Seite 93) illustriert ist. Im Fall der Koexpression von wtADAM17 und HE-ADAM17 trifft dies nicht zu, da HE-ADAM17 eine ähnlich starke Substrataffinität aufweist wie wtADAM17. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Substrataffinität von HE-ADAM17 im Vergleich zum wtADAM17 aufgrund des veränderten katalytischen Zentrums vielleicht sogar etwas vermindert ist.

Das ADAM17p10 ohne die Koexpression von HE-ADAM17 zu einem, wenn auch verminderterem *Shedding* in der Lage ist, zeigt, dass CANDIS für ein effizientes *Shedding* notwendig ist, es aber nicht die einzige Bindungsregion für das Substrat in ADAM17 darstellt. Das reverse Experiment, dass von Dr. Christoph Garbers durchgeführt wurde und bei dem die CANDIS-Binderegion im IL-6R deletiert wurde, ergibt ein ähnliches Bild (Düsterhöft et al., 2014). Auch hier ist das *Shedding* stark reduziert (circa 40 %), aber nicht vollständig unterbunden.

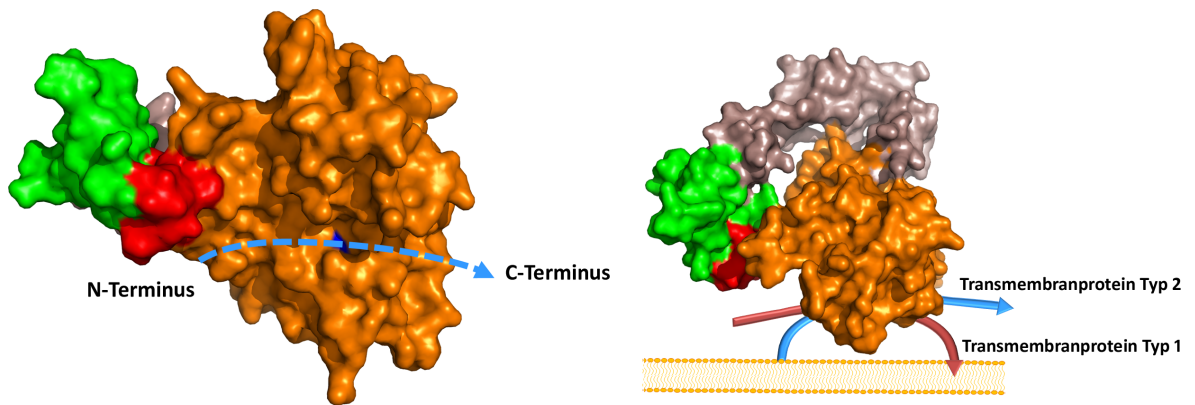
Die in dieser Arbeit getesteten Substrate waren humanen Ursprungs. Inwieweit sich die Interaktion zwischen CANDIS und Substraten in anderen Spezies verhält, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden. Da CANDIS jedoch hochkonserviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass CANDIS ebenfalls bei anderen Spezies eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung einnimmt. In diesem Zusammenhang ist der murine IL-6R interessant. Garbers et al. (2011) wiesen nach, dass der murine IL-6R von ADAM17 nicht effizient pro-



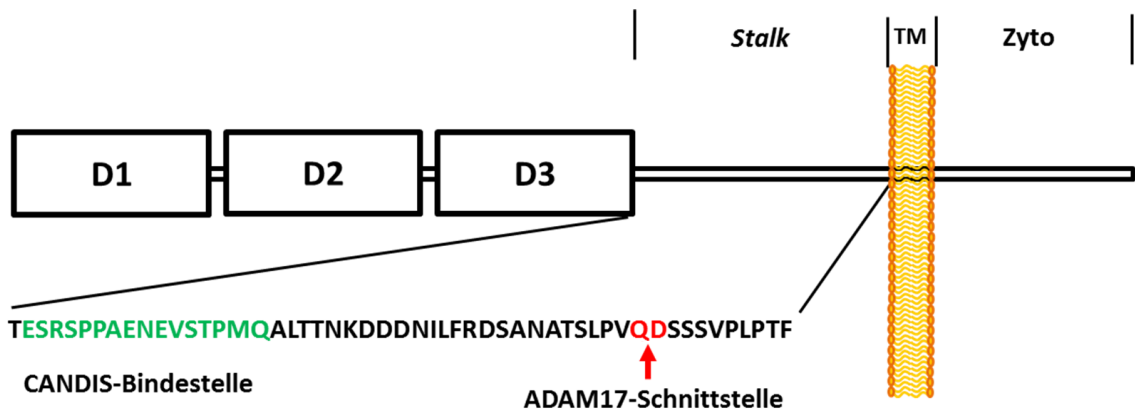
**Abbildung 5.2 – Schema des Einflusses von HE-ADAM17 auf die *Shedding*-Aktivität von wtADAM17 und ADAM17p10:** (A) Da wtADAM17 und HE-ADAM17 die gleiche Affinität zum Substrat besitzen, kann der IL-1R<sub>II</sub>-AP vom wtADAM17 prozessiert werden. (B) Durch den Austausch von CANDIS in ADAM17p10 durch die korrespondierende Sequenz aus ADAM10 (p10) ist die Affinität von ADAM17p10 zum Substrat so stark vermindert, dass HE-ADAM17 das IL-1R<sub>II</sub>-AP abfängt. Hierdurch wird das IL-1R<sub>II</sub>-AP-*Shedding* verhindert.

zessiert wird. Die oben beschriebene CANDIS-Binderegion im humanen IL-6R weist nur eine geringe Sequenzähnlichkeit (38 %) zur korrespondierenden Sequenz im murinen IL-6R auf. Dies könnte eine schwächere Interaktion zwischen dem murinen IL-6R und ADAM17 erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CANDIS-abhängige und CANDIS-unabhängige Substrate existieren. Ein solcher Unterschied im Mechanismus der Substraterkennung könnte eine Selektivität auf Substratebene ermöglichen. In Anbetracht der großen Substratvielfalt von ADAM17, liegt ein solcher selektiver Regulationsmechanismus nahe. Ein bereits bekanntes Beispiel für eine solche Regulation stellt die inaktive Rhomboidprotease iRhom2 dar (Maretzky et al., 2013). So *sheddet* ADAM17 iRhom2-abhängige Substrate, wie HB-EGF oder Amphiregulin, nicht, wenn iRhom2 abwesend ist. Das ADAM17-vermittelte *Shedding* von Substraten wie TGF- $\alpha$ , die iRhom2 unabhängig sind, wird durch die Abwesenheit von iRhom2 jedoch nicht beeinträchtigt. Inwieweit vielleicht auch CANDIS dabei eine Rolle spielt, sollte Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.



**Abbildung 5.3 – Interaktion zwischen Substraten und der ADAM17-Ektodomäne:** Rechts ist die Ausrichtung des Substrats in der katalytischen Domäne (orange) dargestellt. Links ist gezeigt, welche Konsequenz diese Positionierung für Substrate hat. Der extrazelluläre Teil von Typ-1-Transmembranproteinen (dunkelrot) liegt in Richtung der MPD17 (grün/rot) und CANDIS (nicht dargestellt), was eine Interaktion ermöglicht. Der extrazelluläre Teil von Typ-2-Transmembranproteine (blau) hingegen verläuft in die andere Richtung, was eine Interaktion mit der MPD17 und CANDIS ausschließt.



**Abbildung 5.4 – CANDIS-Bindestelle im IL-6R:** Dargestellt ist der strukturelle Aufbau des IL-6R, mit den drei extrazellulären Domänen (D1 bis D3), der *Stalk*-Region, der Transmembranregion (TM) sowie der zytosomatischen Region (Zyto). Die CANDIS-Bindestelle (grün) im IL-6R liegt N-terminal von der ADAM17-Schnittstelle in der *Stalk*-Region.

### 5.3 Zusammenspiel von MPD und CANDIS

Die Identifikation und Charakterisierung von CANDIS liefern eine Erklärung, wie die PDI durch die strukturelle Veränderung der MPD17 zu einer Inaktivierung von ADAM17 führt. Anders als CANDIS binden weder die offene noch die geschlossene Form der löslichen MPD17 an den IL-6R. Wie in Kapitel 4.6 (Seite 83) dargestellt, interagiert jedoch MPD17\_GPI, welches aus MPD17 und CANDIS besteht, mit dem IL-6R. Nach *in vitro* Inkubation mit reduzierter PDI oder unter dem Einfluss einer PDIA6-Überexpression wird diese Bindung unterbunden. Der Verlust der Bindungsfähigkeit lässt sich damit erklären, dass die offene Form der MPD17 mit ihrem flexiblen C-Terminus, auf den unmittelbar CANDIS folgt, die Interaktion zwischen Substrat und CANDIS erlaubt. Nach der Isomerisierung durch PDI befindet sich die MPD17 im geschlossenen Zustand mit einem strukturierten, unflexiblen C-Terminus. Dadurch blockiert offenbar die geschlossene MPD17 die Interaktion zwischen CANDIS und den Substraten. Damit stellt die MPD17 den von der PDI kontrollierten Schalter dar, der über die Interaktion mit Substraten und dadurch über die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 entscheidet. Eine Überexpression von PDIA6 betrifft nicht nur das *Shedding* des IL-6R und des IL-1R<sub>II</sub>, die Substrate die mit CANDIS interagieren, sondern auch das *Shedding* von TNF- $\alpha$ , welches nicht an CANDIS bindet (siehe Anhang - Abbildung 9.2, Seite 121). Die durch PDI hervorgerufene Umwandlung der MPD17 in die geschlossene Form führt daher offenbar zu einer strukturellen Veränderung, welche die gesamte Ektodomäne von ADAM17 betrifft. Diese Überlegung steht im Einklang mit dem oben erläuterten Modell der Ektodomäne, in dem die Umwandlung durch die PDI zu einem Verlust der Flexibilität in der gesamten Ektodomäne führt. Ob der inaktive Zustand von ADAM17 tatsächlich für alle ADAM17-Substrate gilt, muss jedoch noch weiter untersucht werden. Neben den hier gezeigten drei Substraten gilt die Inaktivierung von ADAM17 auch für L-Selectin und HB-EGF (Bennett et al., 2000; Willems et al., 2010).

Welche Vertreter der PDI-Familie in der Lage sind, ADAM17 über die Umwandlung der MPD17 zu inaktivieren, muss ebenfalls weiter analysiert werden. In dieser Arbeit wurden im Ko-Immunoprecipitationsexperiment als mögliche ADAM17-Interaktionspartner sowohl PDIA6 als auch Galectin-9 identifiziert. Eine Interaktion zwischen Galectin-9 und PDIA6 konnte bereits von Bi et al. (2011) nachgewiesen werden. Galectin-9 könnte als Adapterprotein zwischen ADAM17 und PDIA6 dienen. Vorstellbar wäre auch, dass Galectin-9 als Transportprotein für PDIA6 dient und sie vom ER an die Zelloberfläche bringt. Wie oben

erwähnt, inaktiviert PDIA6 ADAM17. Inwieweit dies auch für PDIA1 zutrifft ist fraglich. Auch sie ist extrazellulär vorhanden und bindet Galectin-9 (Bi et al., 2011). Die für die in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Experimente genutzte PDI wurde vom Hersteller aus boviner Leber extrahiert. Die Konzentration von PDIA1 im Vergleich zur PDIA6 ist nach der BioGPS-Datenbank (Wu et al., 2009) in der Leber circa 500-fach höher. Dennoch war PDIA6 in der verwendeten PDI-Mischung deutlich nachweisbar (siehe Abbildung 4.1.4.2, Seite 60). So ist nicht auszuschließen, dass der beobachtete Effekt in den *in-vitro*-Experimenten, bei dem die PDI-Mischung verwendet wurde, nur auf die PDIA6 und nicht auf PDIA1 zurückgeht. Dies könnte ebenfalls für die Experimente von Willems et al. (2010) gelten. Der von Bennett et al. (2000) und Willems et al. (2010) genutzte PDI-Antikörper RL90, der auf PDIA1 inhibitorisch wirkt, inhibiert ebenfalls PDIA6 (Wu et al., 2012). Dies bedeutet, dass sich mit den Ergebnissen der ADAM17-Inaktivierung von Bennett et al. (2000) und Willems et al. (2010) ADAM17 als Substrat von PDIA1 nicht eindeutig identifizieren lässt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass PDIA1 oder auch andere PDI-Isoformen die Isomerisierung der MPD17 bewerkstelligen können, wird im Folgenden nur allgemein von PDI die Rede sein. Welche Isoformen neben PDIA6 letztlich zur Isomerisierung der MPD17 führen, sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

In dieser Arbeit wurde des Weiteren gezeigt, dass CANDIS ebenfalls in der ADAM17-Multimerisierung involviert ist, dass aber die MPD17 alleine keine Dimere bildet. Damit wurde die von Lorenzen et al. (2011) nachgewiesene Multimerisierungsregion weiter eingegrenzt. Wie genau die Multimerisierung über CANDIS abläuft, ist noch nicht klar. Jedoch gibt es Hinweise, die darauf hindeuten, dass CANDIS mit der MPD17 interagiert (unveröffentlichte Ergebnisse).

Zudem zeigten Xu et al. (2012), dass ADAM17 über seine zytoplasmatische Region dimerisieren kann. Das von Xu et al. (2012) beschriebene ADAM17-Dimer bindet an TIMP3 und führt so zur Inhibition von ADAM17. Durch die Phosphorylierung an T735 heben die Kinasen p38 MAPK oder ERK die Dimerisierung auf. Dadurch wird die Interaktion zwischen ADAM17 und TIMP3 aufgehoben.

In wieweit CANDIS bei der Formierung dieses Dimers eine Rolle spielt, ist noch unklar. Vorstellbar ist aber auch, dass der durch PDI herbeigeführte inaktive Zustand von ADAM17 zu einer Dimerisierung über CANDIS führt.



## 5.4 Model des ADAM17-vermittelten *Sheddings*

Neue Ergebnisse legen nahe, dass das ADAM17-vermittelte *Shedding* durch eine transiente Präsentation von Phosphatidylserin in der extrazellulären Schicht der Zellmembran ausgelöst wird (Sommer & Reiß, Manuskript in Vorbereitung). ADAM17 bindet dabei über die präsentierten Phosphatidylserine an die Zellmembran.

Der Mechanismus der Phosphatidylserin-Translokation ist nur ansatzweise verstanden. Unter physiologischen, unstimulierten Bedingungen verteilen sich die verschiedenen Lipidmoleküle asymmetrisch auf die extrazelluläre und intrazelluläre Schicht der Lipiddoppelschicht. So befinden sich Phosphatidylserin tragende Lipide in der intrazellulären Schicht, während beispielsweise Phosphatidylcholin hauptsächlich in der extrazellulären Schicht vorkommt (Bretscher, 1972). Diese Asymmetrie wird durch eine Reihe von transmembranen Lipidtransporterproteinen aufrechterhalten, den Flippasen und den Floppasen. Floppasen transportieren Phospholipide von der intrazellulären zur extrazellulären Schicht, während der Transport in die andere Richtung durch Flippasen erfolgt. Eine weitere Gruppe der Lipidtransporterproteine, die Scramblasen, transportiert Phospholipide in beide Richtungen und hebt damit die Asymmetrie in der Zellmembran wieder auf. Im Fall der Phosphatidylserinlipide bedeutet eine Inhibition der Phosphatidylserin-Flippasen sowie eine gleichzeitige Aktivierung der Phosphatidylserin-Scramblasen und der Phosphatidylserin-Floppasen eine Präsentation von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, wie es beispielsweise bei der Apoptose der Fall ist (Bratton et al., 1997; Orrenius et al., 2003). Eine Phosphatidylserin-Translokation kann aber auch transient geschehen und steht dabei nicht im Zusammenhang mit Apoptose. Eine solche transiente Phosphatidylserin-Translokation wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Zytosol und/oder durch die Aktivierung von Kinasen der PKC-Familie ausgelöst (Orrenius et al., 2003; de Jong et al., 2002; Klarl et al., 2006). Sowohl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als auch die aktivierten PKCs hemmen Floppasen und Flippasen und aktivieren gleichzeitig Scramblasen.

PKC-Aktivierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bedingen sich zum Teil gegenseitig (Fathallah et al., 1997; Andrews et al., 2002) und werden unter anderem durch den nicht physiologischen Stimulator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) hervorgerufen (Blumberg, 1988; de Jong et al., 2002; Klarl et al., 2006). Nguyen et al. (2011) konnten direkt zeigen, dass PMA zu Phosphatidylserin-Translokation in Erythrozyten führt. PMA stimuliert wie oben bereits erwähnt ADAM17-vermitteltes *Shedding*. Bisher war jedoch unklar, wie genau PMA ADAM17

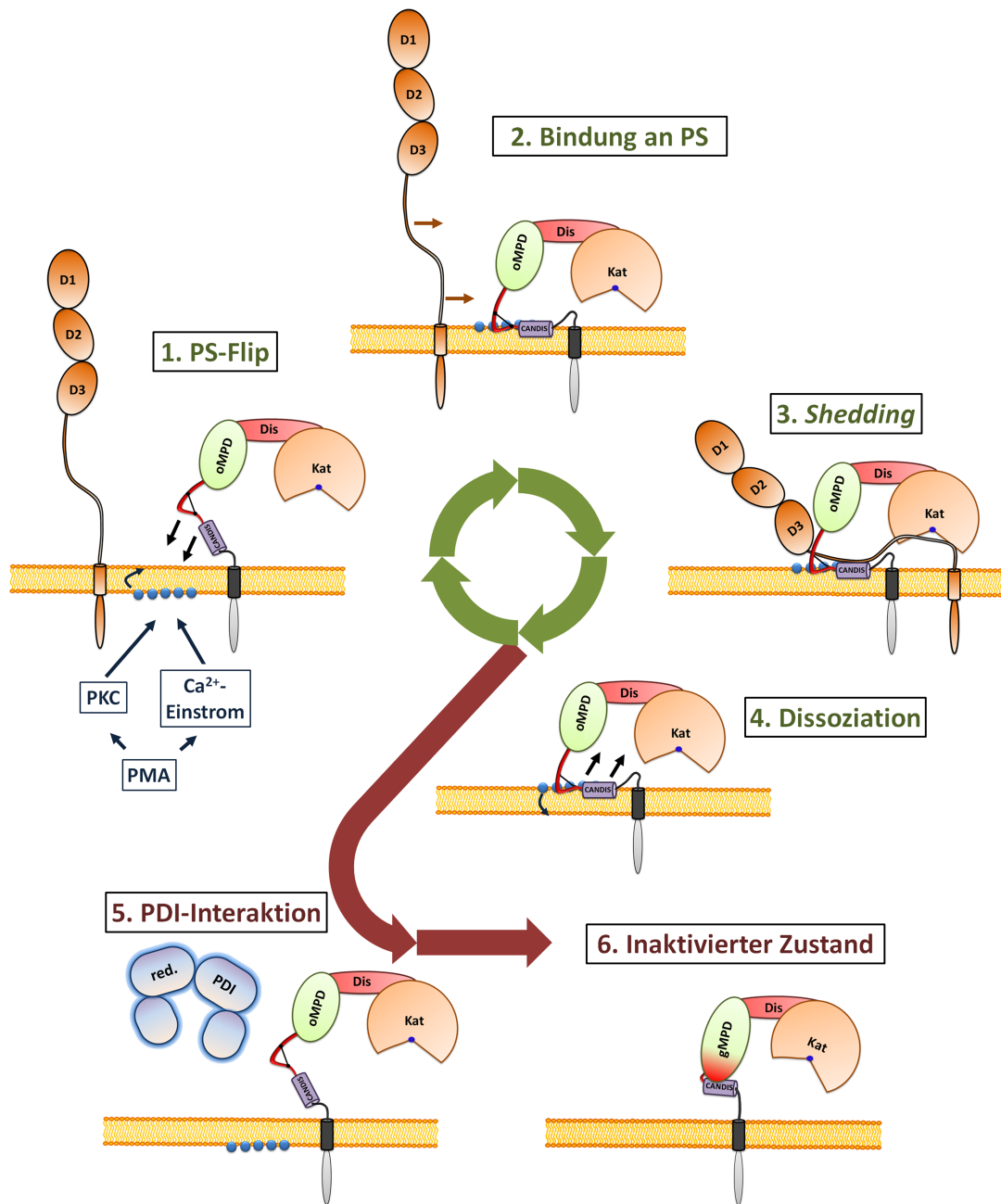
stimulieren kann. Die Ergebnisse von Sommer & Reiß (Manuskript in Vorbereitung), welche die Stimulation des ADAM17-vermittelten *Sheddings* direkt mit einer transienten Phosphatidylserin-Translokation in Relation bringen, liefern dafür eine Erklärung. Über die Aktivierung der PKCs und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, beides ausgelöst durch Stimulation mit PMA, wird eine transiente Phosphatidylserin-Translokation induziert, die wiederum zu einer Interaktion zwischen ADAM17 und der Zellmembran führt. Dies wiederum induziert ADAM17-vermitteltes *Shedding*.

PKCs wirken damit scheinbar nicht nur indirekt über die ADAM17-Substrate (Killock & Ivezić, 2010; Kveiborg et al., 2011; Dang et al., 2013) auf das *Shedding*, sondern auch über Phosphatidylserin-Präsentation auf ADAM17.

Interessanterweise führen auch andere bekannte ADAM17-Stimulatoren zu PKC-Aktivierung und/oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, was wiederum mit einer Phosphatidylserin-Translokation in Zusammenhang stehen kann. Beispiele dafür sind Thrombin, LPA (*lysophosphatidic acid*) und ATP, welches an dem purinergen Rezeptor P2X7 bindet (Uhl & Reiser, 1997; Sengstake et al., 2006; Scheuplein et al., 2009; Le Gall et al., 2010; Kaestner, 2013). Des Weiteren ist bekannt, dass auch Apoptose, die mit einer Phosphatidylserin-Translokation einhergeht, das ADAM17-vermittelte *Shedding* des humanen IL-6R sowie des L-Selectins auslöst (Chalaris et al., 2007; Wang et al., 2010).

Die von Sommer & Reiß vermutete Bindungsstelle in ADAM17 (625-RKGK-628) für Phosphatidylserin liegt innerhalb der MPD17 und dort in der Region, die in der offenen Form flexibel ist (vergleiche Abbildung 4.8, Seite 56). Wie in Kapitel 4.1.5 (Seite 63) gezeigt, interagiert die offene MPD17 tatsächlich spezifisch mit Phosphatidylserin. Diese Interaktion wurde jedoch nicht für die geschlossene Form nachgewiesen. Dies bedeutet, dass nur das aktive ADAM17 mit der offenen MPD17 über Phosphatidylserin an die Zellmembran bindet. Inaktives ADAM17 ist zu dieser Bindung offenbar nicht in der Lage. Auch CANDIS scheint bevorzugt mit Phosphatidylserinlipiden zu interagieren, wie Tests mit Phosphatidylserinlipid-enthaltende Liposomen zeigten (Michalek, unpublizierte Daten).

Mit den aus dieser Arbeit gezogenen Schlüssen sowie mit den oben diskutierten Erkenntnissen, lässt sich das in Abbildung 5.5 (Seite 99) gezeigte Model entwerfen. Dabei befindet sich ADAM17 mit der offenen MPD17 in einem aktiven Zustand, in dem *Shedding* potentiell möglich ist, aber noch nicht stattfindet. Bereits Le Gall et al. (2010) postulierten einen solchen *Off*-Zustand, der durch PMA-Stimulation reversibel in einen *On*-Zustand überführt



**Abbildung 5.5 – Model des Shedding-Ereignisses:** (1) ADAM17 befindet sich im *Off*-Zustand. Unter anderem durch PMA kann eine transiente Phosphatidylserin-Translokation (PS-Flip) ausgelöst werden, die zu einer Bindung der MPD und CANDIS an die Membran führt und ADAM17 in den *On*-Zustand versetzt (2). Die Schnittstellen des IL-6R wird durch die Bindung an CANDIS optimal zum katalytischen Zentrum positioniert, sodass *Shedding* stattfinden kann (3). Nach dem *Shedding*-Ereignis wird die Phosphatidylserin-Translokation aufgehoben und ADAM17 dissoziiert von der Zellmembran (4), um wieder in den *Off*-Zustand zu wechseln (1). Dieser Zyklus kann unterbrochen werden, indem reduzierte PDI ADAM17 inaktiviert (5-6).

wird, in dem es zum *Shedding* kommt. In diesem *Off*-Zustand interagiert vermutlich weder die MPD17 noch CANDIS mit der Membran. Letzteres wird durch die Ergebnisse gestützt, dass CANDIS nur eine geringe Interaktion mit Liposomen aufweist, die Cholesterol enthalten (Michalek, unpublizierte Daten) und dass es Hinweise gibt, dass ADAM17 in den cholesterolreichen *lipid rafts* lokalisiert ist (Tellier et al., 2006). Durch den oben beschriebenen Prozess kommt es durch PMA-Stimulation zu einer Aktivierung von PKCs und zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, was wiederum eine Phosphatidylserin-Translokation auslöst. Die dabei aktivierten Scramblasen haben vermutlich auch einen Einfluss auf die Integrität der *lipid rafts*. Es konnte gezeigt werden, dass die Auflösung der *lipid rafts* durch Depletion von Cholesterol zu ADAM17-vermitteltem *Shedding* führt (Matthews et al., 2003).

Nach der Phosphatidylserin-Translokation an die Zelloberfläche binden die offene MPD17 und CANDIS an die Zellmembran. Dies führt vermutlich zu einer strukturellen Veränderung in ADAM17, die die Bindung des Substrats, beispielsweise des IL-6R an CANDIS, ermöglicht und die das aktive Zentrum der katalytischen Domäne zu der Schnittstelle im Substrat ausrichtet. Die Positionierung führt dann zum *Shedding* des Substrats. Dieser Zustand könnte dem von Le Gall et al. (2010) postulierten *On*-Zustand von ADAM17 entsprechen. Durch die Wiederherstellung der Membranasymmetrie geht ADAM17 wieder in den *Off*-Zustand über. Von diesem Zustand kann nach erneuter Stimulation wieder ein neues *Shedding*-Ereignis stattfinden. Le Gall et al. (2010) zeigten, dass das *Shedding*-Ereignis nach PMA-Stimulation schnell und vor allem reversibel abläuft, konnten den dahinter liegenden Mechanismus jedoch nicht genau definieren. Das hier dargestellte Modell liefert eine mögliche Erklärung für diesen reversiblen Mechanismus. ADAM17 besitzt nach diesem Modell einen aktiven Zustand, der *Shedding* ermöglicht. Das *Shedding* erfordert jedoch ein Stimulationsereignis, die Phosphatidylserin-Translokation.

Die von Willems et al. (2010) beschriebene Inaktivierung von ADAM17 mittels einer von PDI-vermittelten, strukturellen Veränderung, ist auf die Isomerisierung zweier Disulfidbrücken in der MPD17 zurückzuführen (Düsterhöft et al., 2013). Dies stellt einen möglichen Weg dar, den von Phosphatidylserin-Translokation abhängigen Kreislauf zwischen *Off*-Zustand und *On*-Zustand zu verlassen. Durch die PDI-vermittelte Umwandlung der MPD17 in die geschlossene Form interagiert diese nicht mehr mit Phosphatidylserin. Außerdem wird CANDIS direkt von dieser strukturellen Veränderung beeinflusst und bindet nicht mehr an die Substrate. Bis jetzt wurde noch keine Oxidoreduktase identifiziert, die den aktiven Zustand

von ADAM17 wiederherstellen kann. Vielleicht stellt die Inaktivierung durch PDI einen irreversiblen Schritt dar, der eine schnelle, negative Regulation ermöglicht. Doedens & Black (2000) zeigten, dass ADAM17 nach PMA-Stimulation durch Internalisierung von der Zelloberfläche verschwindet. Es ist möglich, dass der inaktive Zustand von ADAM17 zu einer Internalisierung führt. Zwei Konsequenzen der Internalisierung sind denkbar. Eine Konsequenz könnte die proteolytische Degradation von ADAM17 sein. Die andere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass ADAM17 nach der Internalisierung wieder aktiviert wird und ein neues Reservoir an aktivem Enzym bildet.

## 5.5 Mögliches Gesamtmodell für ADAM17

Das oben erläuterte Modell des stimulierten ADAM17-vermittelten *Shedding*-Ereignisses lässt sich in das in Abbildung 5.6 (Seite 103) vorgestellte Gesamtmodell der ADAM17-Aktivität einbetten. Nach der Expression liegt ADAM17 vermutlich in der offenen, aktiven Form im ER vor, ist jedoch durch die Prodomäne inhibiert. Ein noch nicht bekannter Mechanismus verhindert gleichzeitig, dass PDIs des ERs die MPD17 in die geschlossene Form umwandeln. Während des durch iRhoms unterstützten Transports an die Zelloberfläche durch den Golgi-Apparat wird die Prodomäne durch die Pro-Proteinkonvertase Furin proteolytisch gespalten und entfernt (Schlöndorff et al., 2000; Endres et al., 2003; Seals & Courtneidge, 2003; Le Gall et al., 2010; Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Schwarz et al., 2013; Christova et al., 2013). An der Zelloberfläche kann ADAM17 weiterhin inhibiert vorliegen. Zum einen durch die Interaktion mit inaktiven Integrinen (Bax et al., 2004; Trad et al., 2013), zum anderen als Timp3 bindendes Dimer (Lee et al., 2002; Xu et al., 2012). Welcher inhibierte Zustand vorliegt, hängt dabei vermutlich vom Zelltyp ab. Ob es einen Übergang zwischen den inhibierten Zuständen gibt, ist unbekannt. Es darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass ein Großteil von ADAM17 intrazellulär in Vesikel gelagert werden kann. Zudem gibt es widersprüchliche Angaben, ob das intrazelluläre ADAM17 nach Stimulation vermehrt an die Oberfläche transportiert wird (Xu & Derynck, 2010; Soond et al., 2005; Le Gall et al., 2010; Schwarz et al., 2013).

ADAM17 wird aus der Inhibierung durch die Integrine entlassen, wenn diese aktiviert werden (Bax et al., 2004; Trad et al., 2013). Auf der anderen Seite führt die Phosphorylierung durch p38 MAPK oder ERK an T735 innerhalb der zytoplasmatischen Region von

ADAM17 dazu, dass ADAM17 vom Dimer zum Monomer übergeht, wodurch die Interaktion mit TIMP3 unterbunden wird (Xu et al., 2012). ADAM17 ist nun in seinem aktiven, nicht inhibierten Zustand und *Shedding* kann erfolgen, muss jedoch zunächst durch eine transiente Phosphatidylserin-Translokation ausgelöst werden (Sommer & Reiß, Manuskript in Vorbereitung). Dabei bindet ADAM17 an die Phosphatidylserin präsentierende Zelloberfläche und geht so von einem *Off*-Zustand in einen *On*-Zustand, in dem es zum *Shedding*-Ereignis kommt, über. Sowohl PKC-Aktivität als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom können die Phosphatidylserin-Translokation auslösen (Orrenius et al., 2003; de Jong et al., 2002; Klarl et al., 2006). Wie genau beim *Shedding* die Substratselektivität gesteuert wird, ist noch unklar. Neben der selektiven Expression der Substrate in unterschiedlichen Zelltypen, haben sowohl iRhoms (Maretzky et al., 2013) als auch die Interaktion unterschiedlicher PKCs mit den Substraten einen Einfluss auf die Substratselektivität von ADAM17 (Killock & Ivetić, 2010; Kveiborg et al., 2011; Dang et al., 2013).

Der reversible Wechsel zwischen *Off*- und *On*-Zustand wird durch den Einfluss der PDI beendet. Die PDI inaktiviert ADAM17 durch die Isomerisierung der MPD (Willems et al., 2010; Düsterhöft et al., 2013). Anschließend wird ADAM17 vermutlich internalisiert (Doedens & Black, 2000).

Dies stellt nur ein allgemeines Model der ADAM17-Aktivität dar. In verschiedenen Zelltypen läuft die ADAM17-Aktivierung wahrscheinlich auf leicht unterschiedliche Weise ab. So zeigten Bennett et al. (2000), dass das ADAM17-vermittelte L-Selectin-*Shedding* in neutrophilen Zellen durch die Inhibition von PDI an der Zelloberfläche stimuliert wird. Dies spricht dafür, dass ADAM17 auf den neutrophilen Zellen ständig im *On*-Zustand an der Zelloberfläche bereitgestellt wird und L-Selectin-*Shedding* nur dadurch verhindert wird, dass die PDIs ADAM17 inaktivieren. Durch die Inhibierung der PDIs findet dann L-Selectin-*Shedding* statt. Dazu passen auch die Beobachtung von Karmakar et al. (2005), dass Galectin-1 stimulierte neutrophile Zellen eine Phosphatidylserin-Translokation aufweisen, die längere Zeit andauert. Dadurch gäbe es ohne die Inaktivierung von ADAM17 durch die PDIs eine ständig *Shedding*-Aktivität auf Galectin-1-stimulierten Zellen.

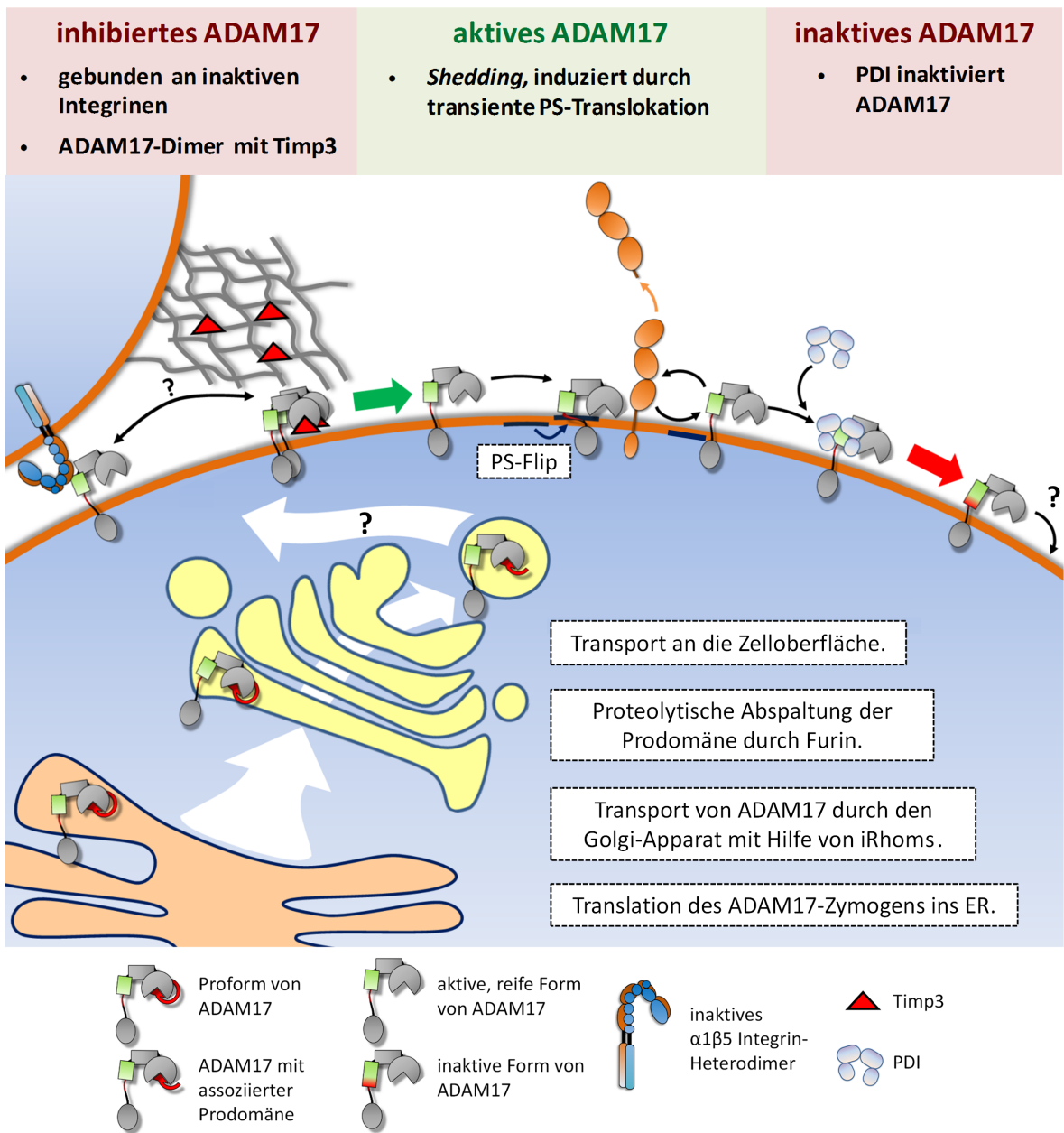


Abbildung 5.6 – Model der ADAM17-Regulation

## 5.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Einblicke in den Mechanismus der Substraterkennung als auch in die Regulation von ADAM17 gewonnen werden. Die MPD17 dient als Schalter, der die Substraterkennung CANDIS-abhängiger Substrate reguliert. Die Überführung der MPD17 von der offenen in die geschlossene Form durch PDI-vermittelte Isomerisierung blockiert den Zugang der Substrate zu CANDIS. Aber auch CANDIS-unabhängige Substrate wie TNF- $\alpha$  sind von der ADAM17-Inaktivierung betroffen. Dies zeigt, dass die PDI-vermittelte strukturelle Veränderung in der MPD17 die gesamte Ektodomäne beeinflusst. Dieser Effekt sollte jedoch noch näher untersucht werden. Auch sollte weiter untersucht werden, wie die offene MPD17 im ER vor Isomerisierung geschützt wird und wie die PDIs trotz KDEL-Sequenz an die Zelloberfläche gelangen können.

Auch inwieweit andere ADAM17-Substrate CANDIS-abhängig oder -unabhängig sind, bedarf weiterer Analysen. In diesem Zusammenhang stellt CANDIS ein vielversprechendes Ziel dar, eine selektive Inhibition des ADAM17-vermittelten *Sheddings* zu erreichen. Inhibitoren, die gegen das katalytische Zentrum von ADAM17 gerichtet sind, sind zu unspezifisch (Richards et al., 2012). Auch andere Metalloproteasen werden durch sie inhibiert, da die katalytischen Domänen dieser Proteasen strukturell sehr ähnlich sind. Eine Blockierung von CANDIS, beispielsweise mittels Antikörper oder *Nanobodies*, könnte vermutlich das *Shedding* CANDIS-abhängiger Substrate verhindern.

Die Befunde, die die Phosphatidylserin-Translokation in direkten Zusammenhang mit dem *Shedding*-Ereignis bringen, liefern ein entscheidendes Puzzelteil im Verständnis der Regulation von ADAM17. Jedoch sollten für ein umfassendes Bild der Regulation weitere Analysen folgen. So ist beispielsweise der genaue Mechanismus, der zur Phosphatidylserin-Translokation führt, nicht bekannt. Wenn die Aminosäurereste, die innerhalb der offenen MPD17 für die Phosphatidylserin-Bindung verantwortlich sind, genau identifiziert sind, würde dies ebenfalls einen Angriffspunkt bieten, ADAM17-vermittelt *Shedding* zu blockieren.



## 6 Zusammenfassung

Ektodomänen-*Shedding* stellt eine irreversible, posttranslationale Modifikation dar, die unter anderem zur Freisetzung von biologisch aktiven Ektodomänen führt. A *Disintegrin And Metalloprotease 17* (ADAM17) ist mit über 80 Substraten eine, für physiologische Prozesse wie Entzündungsreaktionen oder Regenerationsprozesse, wichtige *Sheddase*. Trotz der bedeutenden Rolle von ADAM17 ist bis heute nur wenig über die Regulation ihrer *Shedding*-Aktivität bekannt.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass extrazelluläre Proteindisulfidisomerasen (PDIs) mit ADAM17 interagieren und eine strukturelle Änderung innerhalb der ADAM17-Ektodomäne herbeiführen. Dies hat eine Inaktivierung von ADAM17 zur Folge. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die PDIs mit der membranproximalen Domäne von ADAM17 (MPD17) interagieren und diese durch die Isomerisierung zweier Disulfidbrücken von einer offenen in eine geschlossene Form überführen. Dabei liegt im aktiven ADAM17 die offene, flexible MPD17 vor, während im inaktiven Zustand die MPD17 die geschlossene Form einnimmt.

Der Wechsel von der offenen zu der geschlossenen Form reguliert CANDIS (*Conserved ADAM-SeventeenN Dynamic Interaction Sequence*), ein hochkonservierter Bereich innerhalb der *Stalk*-Region von ADAM17, der in der Lage ist die beiden Substrate IL-6R und IL-1R<sub>II</sub> zu binden. Nur wenn die MPD17 in der offenen Form vorliegt, werden diese Substrate von CANDIS gebunden. Die geschlossene MPD17 verhindert hingegen den Zugang der Substrate zu CANDIS.

Neue Daten zeigen, dass das ADAM17-vermittelte *Shedding*-Ereignis durch eine transiente Phosphatidylserin-Translokation ausgelöst wird. In dieser Arbeit wurde in diesem Zusammenhang geklärt, dass nur die offene MPD17, und nicht die geschlossene Form, spezifisch Ortho-Phospho-L-Serin (OPLS) bindet. Daraus lässt sich schließen, dass das *Shedding*-Ereignis in Zusammenhang mit einer Bindung der offenen MPD17 an die Phosphatidylserin-präsentierende Zellmembran steht. Diese Bindung ist in der geschlossenen, inaktiven Form nicht möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die fundamentale Bedeutung der MPD17 und CANDIS für die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 und ermöglichen so ein tieferes Verständnis der ADAM17-Regulation.

## 7 Summary

Ectodomain shedding is an irreversible posttranslational modification which leads to the release of biologically active ectodomains of transmembrane proteins. A disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) is an important sheddase which can cleave more than 80 different substrates and is therefore involved in various physiological and pathophysiological processes, including inflammation and regeneration. Despite the importance of ADAM17, the regulation of the shedding activity is scarcely understood.

It is known from previous studies that extracellular protein-disulphide isomerases (PDIs) interact with ADAM17 which results in a structural change in the ectodomain of the protease. This interaction leads to the inactivation of ADAM17. In this study, it was shown that the PDIs interact with the membrane-proximal domain of ADAM17 (MPD17) and that this domain can be converted from an open conformation into a closed one through isomerisation of disulphide-bonds. Thereby, the open and more flexible form relates to the active ADAM17 while the MPD17 shows the closed and rather rigid conformation in the inactive protease.

The shift from the open to the closed conformation regulates CANDIS (Conserved ADAM-Seventeen Dynamic Interaction Sequence), a highly conserved sequence within the stalk region of ADAM17 which is able to bind the two substrates IL-6R and IL-1RII. This interaction can only occur when the MPD17 is in the open conformation while the closed form prevents the interaction between CANDIS and the substrates.

Recent results show that ADAM17 mediated shedding can be triggered by transient exposure of phosphatidylserine (PS). Along that line, it was shown in this study that solely the active form of MPD17, but not the closed one, can bind to OPLS (ortho-phospho-l-serine). This leads to the conclusion that an ADAM17 mediated shedding event includes the binding of the open conformation of the MPD17 to the PS-presenting plasma membrane. This binding does not occur when MPD17 is in the closed conformation.

In conclusion, this study shows the fundamental relevance of the MPD17 and CANDIS for the shedding activity and allows a deeper understanding of the regulation of ADAM17.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N., & Freeman, M. (2012). Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science*, 335(6065), 225–8.
- Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S., & Müllberg, J. (2000). Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(9), 2624–31.
- Andrews, D. A., Yang, L., & Low, P. S. (2002). Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood*, 100(9), 3392–9.
- Aragao, A. Z. B., Nogueira, M. L. C., Granato, D. C., Simabuco, F. M., Honorato, R. V., Hoffman, Z., Yokoo, S., Laurindo, F. R. M., Squina, F. M., Zeri, A. C. M., Oliveira, P. S. L., Sherman, N. E., & Paes Leme, A. F. (2012). Identification of novel interaction between ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) and thioredoxin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43071–82.
- Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A., & Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 20807–10.
- Bax, D. V., Messent, A. J., Tart, J., van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R. A., & Humphries, M. J. (2004). Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22377–86.
- Bennett, T. A., Edwards, B. S., Sklar, L. A., & Rogelj, S. (2000). Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *Journal of Immunology*, 164(8), 4120–9.
- Bi, S., Hong, P. W., Lee, B., & Baum, L. G. (2011). Galectin-9 binding to cell surface protein

- disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. PNAS, 108(26), 10650–5.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. Nature, 385(6618), 729–33.
- Black, R. A. & White, J. M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. Current Opinion in Cell Biology, 10(5), 654–9.
- Blaydon, D. C., Biancheri, P., Di, W.-L., Plagnol, V., Cabral, R. M., Brooke, M. A., van Heel, D. A., Ruschendorf, F., Toynbee, M., Walne, A., O'Toole, E. A., Martin, J. E., Lindley, K., Vulliamy, T., Abrams, D. J., MacDonald, T. T., Harper, J. I., & Kelsell, D. P. (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. The New England Journal of Medicine, 365(16), 1502–8.
- Blumberg, P. M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. Cancer Research, 48(1), 1–8.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., & Stöckler, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. FEBS Letters, 331(1-2), 134–40.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. The Journal of Biological Chemistry, 272(42), 26159–65.
- Bretscher, M. S. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. Nature: New Biology, 236(61), 11–2.
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Häslner, R., Becker, C., Neurath, M. F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J., & Rose-John, S. (2010). Critical

- role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. The Journal of Experimental Medicine, 207(8), 1617–24.
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., Jones, S. A., Rose-John, S., & Scheller, J. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. Blood, 110(6), 1748–55.
- Cho, J., Furie, B. C., Coughlin, S. R., & Furie, B. (2008). A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. The Journal of Clinical Investigation, 118(3), 1123–31.
- Cho, J., Kennedy, D. R., Lin, L., Huang, M., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. C., & Furie, B. (2012). Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation in vivo depends on the presence of  $\beta 3$  integrins. Blood, 120(3), 647–55.
- Christova, Y., Adrain, C., Bambrough, P., Ibrahim, A., & Freeman, M. (2013). Mammalian iR-homs have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation. EMBO Reports, 14(10), 884–90.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M., & Barton, G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. Bioinformatics, 14(10), 892–93.
- Dang, M., Armbruster, N., Miller, M. A., Cermen, E., Hartmann, M., Bell, G. W., Root, D. E., Lauffenburger, D. A., Lodish, H. F., & Herrlich, A. (2013). Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. PNAS, 110(24), 9776–81.
- de Jong, K., Rettig, M. P., Low, P. S., & Kuypers, F. A. (2002). Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. Biochemistry, 41(41), 12562–7.
- Díaz-Rodríguez, E., Cabrera, N., Esparís-Ogando, A., Montero, J. C., & Pandiella, A. (1999). Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. The European Journal of Neuroscience, 11(4), 1421–30.
- Díaz-Rodríguez, E., Montero, J. C., Esparís-Ogando, A., Yuste, L., & Pandiella, A. (2002). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-

- converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. Molecular Biology of the Cell, 13(6), 2031–44.
- Doedens, J. R. & Black, R. A. (2000). Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. The Journal of Biological Chemistry, 275(19), 14598–607.
- Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E., & Ludwig, A. (2012). The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. European Journal of Cell Biology, 91(6-7), 472–85.
- Düsterhöft, S., Höbel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G. H., Chalaris, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Lorenzen, I., & Grötzinger, J. (2014). A disintegrin and metalloprotease-17 dynamic interaction sequence (CANDIS) - the sweet tooth for the human interleukin-6 receptor. The Journal of Biological Chemistry.
- Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C.-W., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. Journal of the American Chemical Society, 135(15), 5776–81.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. Molecular Aspects of Medicine, 29(5), 258–89.
- Ehlers, M. R. & Riordan, J. F. (1991). Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. Biochemistry, 30(42), 10065–74.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., & Postina, R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. European Journal of Biochemistry / FEBS, 270(11), 2386–93.
- Fathallah, H., Sauvage, M., Romero, J. R., Canessa, M., & Giraud, F. (1997). Effects of PKC alpha activation on Ca<sup>2+</sup> pump and K(Ca) channel in deoxygenated sickle cells. The American Journal of Physiology, 273(4 Pt 1), C1206–14.
- Frand, A. R., Cuozzo, J. W., & Kaiser, C. A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. Trends in Cell Biology, 10(5), 203–10.

- Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S., & Scheller, J. (2011). Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14804–11.
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2.
- Gechtman, Z., Alonso, J. L., Raab, G., Ingber, D. E., & Klagsbrun, M. (1999). The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28828–35.
- Goldberger, R. F., Epstein, C. J., & Anfinsen, C. B. (1963). Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 238, 628–35.
- Gonzales, P. E., Galli, J. D., & Milla, M. E. (2008). Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry*, 47(37), 9911–9.
- Gonzales, P. E., Solomon, A., Miller, A. B., Leesnitzer, M. A., Sagi, I., & Milla, M. E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its prodomain. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31638–45.
- Hawkins, H. C. & Freedman, R. B. (1975). Randomly reoxidised soybean trypsin inhibitor and the possibility of conformational barriers to disulphide isomerization in proteins. *FEBS Letters*, 58(1), 7–11.
- Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters*, 354(1), 1–6.
- Hooper, N. M., Karran, E. H., & Turner, A. J. (1997). Membrane protein secretases. *The Biochemical Journal*, 321, 265–79.
- Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., & Takeda, S. (2007). Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Letters*, 581(13), 2416–22.
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J.-P., Lackmann, M., & Nikolov, D. B. (2005). Adam meets Eph:

- an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. Cell, 123(2), 291–304.
- Jordan, P. A. & Gibbins, J. M. (2006). Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. Antioxidants & Redox signaling, 8(3-4), 312–24.
- Kaestner, L. (2013). Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. In Calcium signalling chapter 27, (pp. 210–22). Springer Verlag.
- Kaiser, B. K., Yim, D., Chow, I. T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H. H., Strong, R. K., Groh, V., & Spies, T. (2007). Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. Nature, 447(7143), 482–486.
- Karmakar, S., Cummings, R. D., & McEver, R. P. (2005). Contributions of Ca<sup>2+</sup> to galectin-1-induced exposure of phosphatidylserine on activated neutrophils. The Journal of Biological Chemistry, 280(31), 28623–31.
- Killock, D. J. & Ivetić, A. (2010). The cytoplasmic domains of TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. The Biochemical Journal, 428(2), 293–304.
- Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S., Niemoeller, O. M., Akel, A., Sobiesiak, M., Eisele, K., Podolski, M., Huber, S. M., Wieder, T., & Lang, F. (2006). Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 290(1), C244–53.
- Kozlov, G., Määttänen, P., Thomas, D. Y., & Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. The FEBS Journal, 277(19), 3924–36.
- Kveiborg, M., Instrell, R., Rowlands, C., Howell, M., & Parker, P. J. (2011). PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding of heparin binding-EGF through separate pathways. PloS one, 6(2), e17168.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259), 680–5.
- Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D. A., Niu, X.-D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., & Blobel, C. P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible me-



- chanism that controls access to its catalytic site. Journal of Cell Science, 123(Pt 22), 3913–22.
- Lee, M.-H., Verma, V., Maskos, K., Becherer, J. D., Knäuper, V., Dodds, P., Amour, A., & Murphy, G. (2002). The C-terminal domains of TACE weaken the inhibitory action of N-TIMP-3. FEBS Letters, 520(1-3), 102–6.
- Lemjabbar-Alaoui, H., Sidhu, S. S., Mengistab, A., Gallup, M., & Basbaum, C. (2011). TACE/ADAM-17 phosphorylation by PKC-epsilon mediates premalignant changes in tobacco smoke-exposed lung cells. PLoS one, 6(3), e17489.
- Leonard, J. D., Lin, F., & Milla, M. E. (2005). Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. The Biochemical Journal, 387(Pt 3), 797–805.
- Li, X., Pérez, L., Pan, Z., & Fan, H. (2007). The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. Cell Research, 17(12), 985–98.
- Li, X., Yan, Y., Huang, W., Yang, Y., Wang, H., & Chang, L. (2009). The regulation of TACE catalytic function by its prodomain. Molecular Biology Reports, 36(4), 641–51.
- Liu, H., Shim, A. H. R., & He, X. (2009). Structural characterization of the ectodomain of a disintegrin and metalloproteinase-22 (ADAM22), a neural adhesion receptor instead of metalloproteinase: insights on ADAM function. The Journal of Biological Chemistry, 284(42), 29077–86.
- Lorenzen, I., Lokau, J., Düsterhöft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., & Grötzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. FEBS Letters, 586(8), 1093–100.
- Lorenzen, I., Trad, A., & Grötzinger, J. (2011). Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. Biochemical and Biophysical Research Communications, 415(2), 330–6.
- Mancia, F. & Shapiro, L. (2005). ADAM and Eph: how Ephrin-signaling cells become detached. Cell, 123(2), 185–7.

- Maretzky, T., McIlwain, D. R., Issuree, P. D. A., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P. A., Mak, T. W., & Blobel, C. P. (2013). iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *PNAS*, 110(28), 11433–8.
- Maskos, K., Fernandez Catalan, C., Huber, R., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., Ellestad, G. A., Reddy, P., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Castner, B. J., Davis, R., Clarke, H. R., Petersen, M., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., March, C. J., Paxton, R. J., Black, R. A., & Bode, W. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *PNAS*, 95(7), 3408–12.
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bußmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J., & Rose-John, S. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Biochemical Journal*, 278, 38829–38839.
- McIlwain, D. R., Lang, P. A., Maretzky, T., Hamada, K., Ohishi, K., Maney, S. K., Berger, T., Murthy, A., Duncan, G., Xu, H. C., Lang, K. S., Häussinger, D., Wakeham, A., Itie-Youten, A., Khokha, R., Ohashi, P. S., Blobel, C. P., & Mak, T. W. (2012). iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science*, 335(6065), 229–32.
- Milla, M. E., Gonzales, P. E., & Leonard, J. D. (2006). The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 44(3), 342–8.
- Milla, M. E., Leesnitzer, M. A., Moss, M. L., Clay, W. C., Carter, H. L., Miller, A. B., Su, J. L., Lambert, M. H., Willard, D. H., Sheeley, D. M., Kost, T. A., Burkhart, W., Moyer, M., Blackburn, R. K., Pahel, G. L., Mitchell, J. L., Hoffman, C. R., & Becherer, J. D. (1999). Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *The Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30563–70.
- Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J. W., Palmisano, R., & Zhou, P. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *The Journal of Biological chemistry*, 282(49), 35712–21.

- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., & Willard, D. (1997a). Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Journal of Neuroimmunology*, 72(2), 127–9.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., & Becherer, J. D. (1997b). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385(6618), 733–6.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Cancer*, 8(12), 929–41.
- Murphy, G. (2009). Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(2), 138–45.
- Murphy, G., Murthy, A., & Khokha, R. (2008). Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue. *Trends in Immunology*, 29(2), 75–82.
- Nguyen, D. B., Wagner-Britz, L., Maia, S., Steffen, P., Wagner, C., Kaestner, L., & Bernhardt, I. (2011). Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 28(5), 847–56.
- Orci, L., Ravazzola, M., & Anderson, R. G. (1987). The condensing vacuole of exocrine cells is more acidic than the mature secretory vesicle. *Nature*, 326(6108), 77–9.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 552–65.
- Oswald, F., Täuber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S., & Schmid, R. M. (2001). p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), 7761–74.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky,

- C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., & Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392), 1281–4.
- Peters, M., Müller, A. M., & Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood*, 92(10), 3495–504.
- Ramachandran, N., Root, P., Jiang, X. M., Hogg, P. J., & Mutus, B. (2001). Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *PNAS*, 98(17), 9539–44.
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., & Black, R. A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14608–14.
- Richards, F. M., Tape, C. J., Jodrell, D. I., & Murphy, G. (2012). Anti-tumour effects of a specific anti-ADAM17 antibody in an ovarian cancer model in vivo. *PloS One*, 7(7), e40597.
- Roderfeld, M., Weiskirchen, R., Wagner, S., Berres, M.-L., Henkel, C., Grötzinger, J., Gressner, A. M., Matern, S., & Roeb, E. (2006). Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *The FASEB Journal*, 20(3), 444–454.
- Rose-John, S. & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *The Biochemical Journal*, 300 Pt 2, 281–90.
- Rost, B., Yachdav, G., & Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), W321–6.
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., & Rose-John, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in Immunology*, 32(8), 380–7.
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2009). NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *Journal of Immunology*, 182(5), 2898–908.

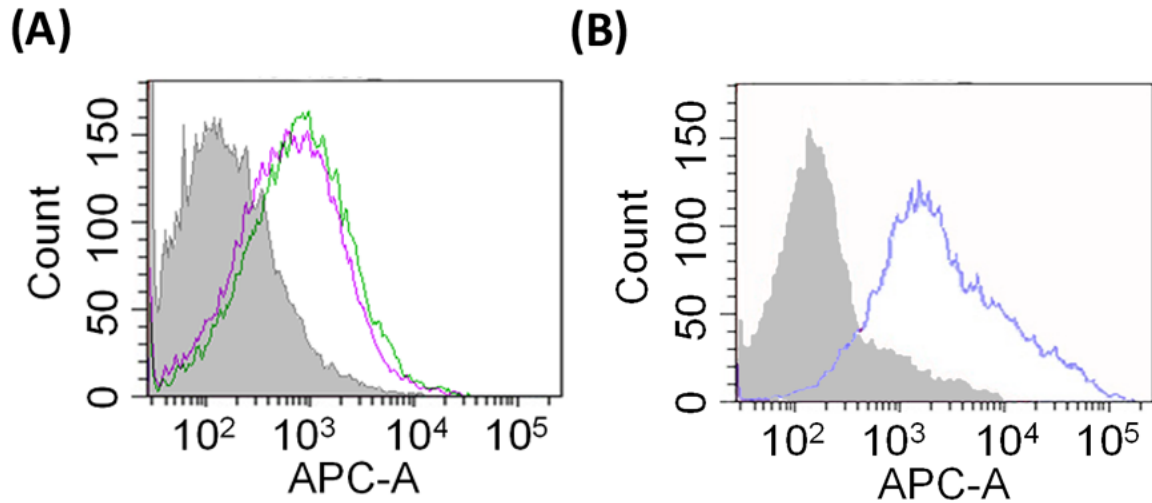
- Schlöndorff, J., Becherer, J. D., & Blobel, C. P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *The Biochemical Journal*, 347 Pt 1, 131–8.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.-W., Rabe, B., Rose-John, S., & Chalaris, A. (2013). Short-term TNF $\alpha$  shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), 3355–67.
- Schwarz, J., Schmidt, S., Will, O., Koudelka, T., Köhler, K., Boss, M., Rabe, B., Tholey, A., Scheller, J., Schmidt-Arras, D., Schwake, M., Rose-John, S., & Chalaris, A. (2014). Polo-like Kinase 2, a Novel ADAM17 Signaling Component, Regulates Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Ectodomain Shedding. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(5), 3080–93.
- Seals, D. F. & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 17(1), 7–30.
- Sengstake, S., Boneberg, E.-M., & Illges, H. (2006). CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. *International Immunology*, 18(7), 1171–8.
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. H., & Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF $\alpha$ -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 11), 2371–80.
- Swiatkowska, M., Szymanski, J., Padula, G., & Cierniewski, C. S. (2008). Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin on endothelial cells. *The FEBS Journal*, 275(8), 1813–23.
- Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(2), 146–52.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., & Araki, S. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *The EMBO Journal*, 25(11), 2388–96.

- Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G., & Peiretti, F. (2006). The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. Experimental Cell Research, 312(20), 3969–80.
- Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H. O., Stockert, R. J., & Schilsky, M. L. (1995). Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. The Journal of Biological Chemistry, 270(35), 20410–6.
- Trad, A., Riese, M., Shomali, M., Hedeman, N., Effenberger, T., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2013). The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblast-carcinoma cell interactions. International Journal of Oncology, 42(5), 1793–800.
- Ubl, J. J. & Reiser, G. (1997). Activity of protein kinase C is necessary for sustained thrombin-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in rat glioma cells. European Journal of Physiology, 433(3), 312–20.
- Van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. PNAS, 87(14), 5578–82.
- Venturi, G. M., Tu, L., Kadono, T., Khan, A. I., Fujimoto, Y., Oshel, P., Bock, C. B., Miller, A. S., Albrecht, R. M., Kubes, P., Steeber, D. A., & Tedder, T. F. (2003). Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. Immunity, 19(5), 713–24.
- Wang, C., Li, W., Ren, J., Fang, J., Ke, H., Gong, W., Feng, W., & Wang, C.-C. (2013). Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. Antioxidants & Redox Signaling, 19(1), 36–45.
- Wang, Y., Herrera, A. H., Li, Y., Belani, K. K., & Walcheck, B. (2009). Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. Journal of Immunology, 182(4), 2449–57.
- Wang, Y., Zhang, A. C., Ni, Z., Herrera, A., & Walcheck, B. (2010). ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. Journal of Immunology, 184(8), 4447–54.

- Willems, S. H., Tape, C. J., Stanley, P. L., Taylor, N. a., Mills, I. G., Neal, D. E., McCafferty, J., & Murphy, G. (2010). Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *The Biochemical Journal*, 428(3), 439–50.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J., & Pelham, H. R. (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7465–8.
- Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C. L., Haase, J., Janes, J., Huss, J. W., & Su, A. I. (2009). BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology*, 10(11), R130.
- Wu, Y., Ahmad, S. S., Zhou, J., Wang, L., Cully, M. P., & Essex, D. W. (2012). The disulfide isomerase ERp57 mediates platelet aggregation, hemostasis, and thrombosis. *Blood*, 119(7), 1737–46.
- Xiao, G., Chung, T. F., Pyun, H. Y., Fine, R. E., & Johnson, R. J. (1999). KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 72(2), 121–8.
- Xu, P. & Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular Cell*, 37(4), 551–66.
- Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., & Derynck, R. (2012). TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Science Signaling*, 5(222), ra34.
- Xu, S., Sankar, S., & Neamati, N. (2014). Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 19(3), 222–240.
- Yoshimori, T., Semba, T., Takemoto, H., Akagi, S., Yamamoto, A., & Tashiro, Y. (1990). Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15984–90.
- Zai, A., Rudd, M. A., Scribner, A. W., & Loscalzo, J. (1999). Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(3), 393–9.

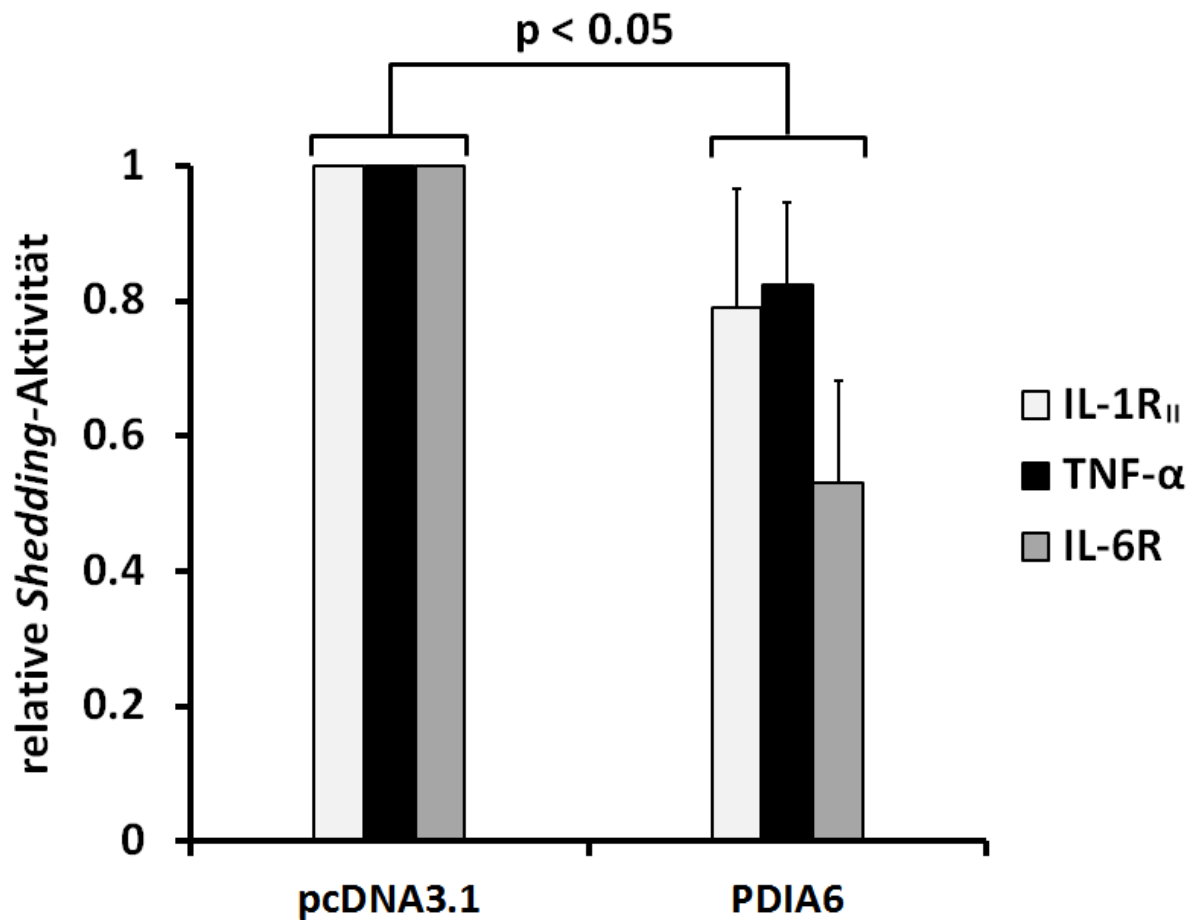
## 9 Anhang

### 9.1 Zusätzliche Experimente



**Abbildung 9.1 – Durchflusszytometrie-Analyse verwendeter Konstrukte:** Die Durchflusszytometrie-Experimente wurden von Mirja Oldefest, wie in Düsterhöft et al. (2014) beschrieben, in ADAM17<sup>ex/ex</sup> MEF-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienen untransfizierte Zellen (grau). **(A)** HE-ADAM17 (lila) und wtADAM17 (grün) zeigen eine deutliche Oberflächenexpression. **(B)** MPD17\_GPI (blau) wird an der Oberfläche präsentiert. ADAM17p10 (nicht gezeigt) wird ebenfalls auf der Oberfläche exprimiert (unveröffentlichte Daten, Dr. Jana Nowinski).





**Abbildung 9.2 – Einfluss der PDIA6 auf das ADAM17-vermittelte *Shedding*:** Die AP-*Shedding*-Assays wurden von Dr. Inken Lorenzen mit AP-*getaggte* Substraten in HEK-293-Zellen, wie in Düsterhöft et al. (2013) und Düsterhöft et al. (2014) beschrieben, durchgeführt. Es wurde das ADAM17-vermittelte, PMA stimulierte *Shedding* unter gleichzeitiger Überexpression der PDIA6 analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen statt mit dem PDIA6 mit dem leeren Vektor pcDNA3.1 transfiziert.

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 9.1** – Abkürzungen 1

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
AP	alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
CANDIS	<i>conserved ADAM17 dynamic interaction sequence</i>
CD	Circulardichroismus
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HSQC	<i>heteronuclear-single quantum coherence</i>
I	Stromstärke
IL-1R <sub>II</sub>	Interleukin-1-Rezeptor Typ 2
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

**Tabelle 9.2** – Abkürzungen 2

---

kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M	Molar
ml	Milliliter
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
min	Minute
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEI	Polyethylenimin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TACE	<i>TNF-<math>\alpha</math> converting enzyme</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	transmembran
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
u	<i>unit</i>
U	Spannung
UV	ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp

**Tabelle 9.3** – Aminosäuren

---

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparaginsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin

## 9.3 Material

### 9.3.1 Chemikalien

**Tabelle 9.4** – Chemikalien 1

Substanz	Firma	Artikelnummer
2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure	Fluka (Steinheim, Deutschland)	43760
4-Nitrophenylphosphatdinatrium-Substrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	N9389-100TAB
Acetonitril/ 0.1 % TFA	Carl Roth GmbH + Co. KG	CP02.2
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3746.1
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG	K029.1
APS	Fluka (Steinheim, Deutschland)	09913
30 % Acrylamid-Stammlösung, Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3029.2
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)	21985-023
Benzonase	Merck (Darmstadt, Deutschland)	70746-3
Bromphenolblau	Riedel-de Haen AG (Buchs, Schweiz)	32768
Coomassie G-250	Carl Roth GmbH + Co. KG	9598.1
DMEM mit Natriumpyruvat und L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)	E15-843
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)	A2948.005
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG	4720.4
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG	8040.2

**Tabelle 9.5** – Chemikalien 2

Substanz	Firma	Artikelnummer
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	3738.5
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG	9065.4
FCS ( <i>fetal bovine serum</i> )	PAA Laboratories GmbH	E15-101
Glycin (Pufferan, $\geq 99$ %; pa)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3908.3
Glycerin ( $\geq 98$ %; PH.Eur., was- serfrei)	Carl Roth GmbH + Co. KG	7530.1
Glutathion (reduziert)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6382.2
Glutathion (oxidiert)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6378.2
GM6001	Calbiochem/ Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	364205
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	6069.1
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG	X998.3
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	6781.1
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co. KG	T832.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG	3904.1
Magnesiumchlorid 6x H <sub>2</sub> O	Fluka	63064
Marimastat	Calbiochem	444289
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	8388.6
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	6885.1
NaOH-Plätzchen	Carl Roth GmbH + Co. KG	6771.1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co. KG	4984.1
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.)	PAA Laboratories GmbH	P11-010
PMA	Calbiochem	524400
Polyethylenimine MAX	Polyscience Inc. (Eppelheim Deutschland)	9002-98-6

**Tabelle 9.6** – Chemikalien 3

Substanz	Firma	Artikelnummer
PVDF-Membran (Immobilion-P)	Millipore/ Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	IPVH00010
Rotiphorese Gel 30 (37.5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3029.1
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG	2367.3
Tris (Pufferan, $\geq 99.9$ %; Ultra Qualität)	Carl Roth GmbH + Co. KG	5429.5
TritonX-100 (reinst.)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3051.3
Trypsin/EDTA (UV irradiated)	PAA Laboratories GmbH	L11-660
TurboFect Transfection Reagent	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)	R0531
Tween 20 (PH.Eur.)	Carl Roth GmbH + Co. KG	9127.1
37 % Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	4625.2
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG	CN30.2
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	34096
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	34080
Wasser/ 0.1 % TFA	Carl Roth GmbH + Co. KG	CP05.2
Zinkchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	T887.1

## 9.4 Geräte

**Tabelle 9.7 – Geräte**

	Firma
<i>ÄKTA</i> purifier	GE Healthcare (München, Deutschland)
Blot-Detektion - Fluorochem Q, Multiimage III	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Blot-Detektion - Las1000	FUJIFILM Europe GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
HPLC-System	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Inkubator Multitron Standard	Infors HAT (Bottmingen, Schweiz)
Lyophylle - Alpha 2-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen (Osterode, Deutschland)
NanoDrop ND1000	peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter MP225/ pH-Meter Elektrode inlab 410	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Sonifikator - Sonopuls UW2200, SH2133, Tianteller TT13	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Spektrophotometer U2001	Hitachi (Chiyoda, Japan)



## 9.5 Lebenslauf

**Name:** Stefan Düsterhöft

**Geburtstag:** 05.12.1985

**Geburtsort:** Cottbus

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 11/2010 - 2014    | Promotion am Institut für Biochemie im Rahmen des SFB 877 "Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology". Titel: Die membranproximale Domäne von ADAM17 - Ein Schlüssel zur Regulation der Proteaseaktivität  |
| 10/2009 - 07/2010 | Diplomarbeit am ZBM (Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie) der Universität Kiel bei PD Dr. Christoph Plieth. Titel: Klonierung, Expression, Reinigung und Charakterisierung von fluoreszierenden Indikatoren zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in pflanzlichen Zellen |
| 10/2005 - 9/2010  | Diplomstudium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  |
| 2005              | Allgemeine Hochschulreife (Europa-Gymnasium Schwarzenbek)   |

## 9.6 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht.

### Originalbeiträge:

Lorenzen, I., Lokau, J., **Düsterhöft, S.**, Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Grötzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Letters*, 586(8), 1093-1100.

**Düsterhöft, S.**, Jung, S., Hung, C.-W., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Grötzinger, J., Lorenzen, I. (2013): Membrane-Proximal Domain of a Disintegrin and Metalloprotease- 17 Represents the Putative Molecular Switch of Its Shedding Activity Operated by Protein-disulfide Isomerase. *Journal of the American Chemical Society*, 135(15), 5776-5781.

**Düsterhöft, S.**, Höbel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G. H., Chalaris, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Lorenzen, I., Grötzinger, J. (2014). A disintegrin and metalloprotease-17 dynamic interaction sequence (CANDIS) - the sweet tooth for the human interleukin-6 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*.

**Tagungsbeiträge:**

10/2011: IRTG Symposium 2011: Protease & Pathophysiology; Titel: *PDI mediates a conformational change in the EGF-like domain of ADAM17.* **(Vortrag)**

09/2012: 1st International Symposium: Protease World in Health & Disease; Titel: *PDI mediates a conformational change of the membrane-proximal domain of ADAM17* - **Düsterhöft, S.**, Hung, C.-W., Jung, S., Tholey, S., Soennichsen, F. D., Grötzinger, J., Lorenzen, I. **(Poster)**

10/2013: Molecular Life Science 2013 - International Symposium of the German Society of Biochemistry and Molecular Biology (GBM); Titel: *An Off Switch: PDI Mediates a Conformational Change in the Membrane-proximal Domain of ADAM17* - **Düsterhöft, S.**, Hung, C.-W., Jung, S., Koudelka, T., Tholey, S., Soennichsen, F. D., Grötzinger, J., Lorenzen, I. **(Poster)**

05/2014: MidTerm Conference of ICIS: Interleukin 6; Titel: *An Off Switch: PDI Mediates a Conformational Change in the Membrane-proximal Domain of ADAM17* - **Düsterhöft, S.**, Hung, C.-W., Jung, S., Koudelka, T., Tholey, S., Soennichsen, F. D., Grötzinger, J., Lorenzen, I. **(Poster)**

## **9.7 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Stefan Düsterhöft, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe. Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 02.06.2014

Stefan Düsterhöft

## 9.8 Danksagungen

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie anfertigen zu können, sowie für seinen fachlichen Rat und für die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John danke ich für die Aufnahme am Biochemischen Institut und die konstruktiven Diskussionen.

Besonders möchte ich Dr. Inken Lorenzen für die intensive Betreuung und vielen Dankanstöße danken.

Danken möchte ich auch Dr. Sascha Jung für die NMR-Auswertungen, sowie für die Hilfe bei der Einarbeitung sowohl am CD-Spektrometer als auch an der HPLC.

Außerdem bedanke ich mich für die kooperative Zusammenarbeit bei Herrn Prof. Dr. Frank Sönnichsen, Prof. Dr. Andreas Tholey, Prof. Dr. Karina Reiß, Dr. Bart van den Berg, Dr. Tomas Koudelka und Dr. Chien-Wen Hung.

Ich danke der gesamten AG Grötzinger für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre.