

Aus dem Biochemischen Institut
Geschäftsführender Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Regulation der ADAM17-Aktivität durch iRhom2

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

ANSGARD FREYA HELMSTETTER

aus
Leipzig

Kiel
2014

1. Berichtstatter: Univ. Prof. Dr. Stefan Rose-John, Biochemisches Institut

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Karina Reiss, Klinik für Dermatologie, Venerologien und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.12.2014

Inhalt

Eidesstattliche Erklärung	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Anhangsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Die Familie der ADAM-Proteasen	1
1.2. Die membranständige Protease A Disintegrin And Metalloprotease 17 (ADAM17)	1
1.3. Aufbau von ADAM17	3
1.4. Aktivierung und Regulation von ADAM17	3
1.5. iRhom2	5
1.6. Problemstellung und Zielsetzung	7
2. Material und Methoden	9
2.1. Material	9
2.1.1. Chemikalien	9
2.1.2. Puffer und Lösungen	10
2.1.3. Nährmedien	14
2.1.4. Antibiotika	14
2.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.1.6. Kits	16
2.1.7. Synthetische Oligonukleotide	17
2.1.8. Vektoren	17
2.1.9. Enzyme und Marker	18
2.1.10. Antikörper	19
2.1.11. Zelllinien und Bakterienstämme	19
2.1.12. Computersoftware	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1. RNA-Isolierung	21
2.2.1.2. cDNA-Synthese	21
2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.2.1.4. Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	21
2.2.1.5. Agarosegelelektrophorese	22
2.2.1.6. DNA-Isolierung aus Agarosegel	22
2.2.1.7. Restriktionsanalyse	22
2.2.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.2.1.9. Hitzeschocktransformation von kompetenten Bakterien	23
2.2.1.10. Präparation von Plasmiden	23
2.2.1.11. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
2.2.1.12. ADAM17-Mutanten	24
2.2.2. Zellbiologische Methoden	26
2.2.2.1. Kultivierung von Zellen	26
2.2.2.2. Zellzahlbestimmung	26
2.2.2.3. Transfektion und Co-Transfektion	26
2.2.2.4. Experimentelle Bestimmung der letalen Puromycinkonzentration von NIH 3T3 und C2C12-Zellen („Death curve“)	27
2.2.2.5. Retrovirale Transduktion	28
2.2.2.6. Ernten von Zellen	29
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.3.1. Zelllyse und Proteinprobenvorbereitung	29

2.2.3.2.	Co-Immunopräzipitation	29
2.2.3.3.	Deglycosylierung	30
2.2.3.4.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.3.5.	Proteintransfer durch Western Blotting	31
2.2.3.6.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.2.3.7.	Durchflusszytometrie	32
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Klonierungsergebnisse	34
3.2.	Aktivitätssteigerung von ADAM17 durch Überexpression von iRhom2	37
3.2.1.	Herstellung von iRhom2 transgenen Zelllinien	37
3.2.2.	Bestimmung des ADAM17mRNA-Expressionslevels der Zelllinien NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2	38
3.2.3.	Konstitutive Freisetzung von TNFR-I und TNFR-II von iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen und nach PMA-Stimulation	39
3.3.	Untersuchung von Maturierung und Transport von ADAM17 in iRhom2 transgenen Zellen	42
3.3.1.	Deglycosylierung von Zelllysaten von iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen	42
3.3.2.	Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen	46
3.4.	Studien zum Interaktionsmotiv von ADAM17 bei der Bindung mit iRhom2	47
3.4.1.	Expressionsnachweis der ADAM17-Mutanten in HEK-Zellen	47
3.4.2.	Oberflächenexpression der klonierten ADAM17-Mutanten in HEK-Zellen	48
3.4.3.	Co-Immunopräzipitation von iRhom2 und ADAM17 und ADAM17-Mutanten	49
4.	Diskussion	55
4.1.	Die Überexpression von iRhom2 führt zu erhöhter <i>Shedding</i> -Aktivität von ADAM17	55
4.2.	In iRhom2 transgenen Zellen kann anhand der Glycosylierung von ADAM17 kein erhöhter intrazellulärer Transport nachgewiesen werden	55
4.3.	Durch Überexpression von iRhom2 wird die Oberflächenexpression von ADAM17 gesteigert	57
4.4.	Durch PMA-Stimulation wird ADAM17 in iRhom2 transgenen Zellen nicht stärker aktiviert oder an der Zelloberfläche exprimiert als in Kontrollzellen	57
4.5.	iRhom2 interagiert mit allen untersuchten ADAM17-Mutanten	58
4.6.	Ausblick	59
4.6.1.	iRhom2 als therapeutisches Ziel in der Therapie TNF- α -assoziierter Entzündungserkrankungen	59
4.6.2.	iRhom2-Expression in primären Makrophagen von Patienten mit rheumatoider Arthritis	60
4.6.3.	Die Generierung einer iRhom2 transgenen Mauslinie	61
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	64
	Danksagung	69
	Anhang	70
	Lebenslauf	80

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der in den Fußnoten und im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt habe.

Kiel, den 26.02.14

Ansgard Freya Helmstetter

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
cDNA	complementäre DNA
DNA	Desoxy- Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Medium modified dulbecco eagle medium</i>
EDTA	N, N, N, N -Ethyldiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
Endo-H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FSC	<i>Forward scatter</i>
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HEK- Zellen	<i>human embryonic kidney- cells</i>
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
MAP-Kinases	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger-</i> Ribonukleinsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline containing tweenVI</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PNGase F	N-Glycosidase F
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Side Scatter</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TACE	<i>TNF- α-Converting Enzyme</i>
TLR 4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TM	mittlere Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Auflistung von verwendeten Chemikalien und dem jeweiligen Hersteller	9
Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Antibiotika und ihrer Endkonzentration	14
Tabelle 2.3: Synthetische Oligonukleotide	17
Tabelle 2.4: Verwendete Primärantikörper	19
Tabelle 2.5: Verwendete Sekundärantikörper	19
Tabelle 2.6: Auflistung und schematische Illustration der klonierten ADAM17-Mutanten.	25
Tabelle 2.7 Zelldichte und entsprechende Zusammensetzung des Transfektionsansatzes	27
Tabelle 2.8 Zusammensetzung der Transfektionsansätze bei einfacher und doppelter Transfektion	27
Tabelle 2.9 Zelldichte und entsprechende Zusammensetzung des Transfektionsansatzes bei retroviraler Transduktion	28
Tabelle 3.1: Übersicht der zur Verfügung gestellten Plasmide.	34
Tabelle 3.2: Übersicht der klonierten Plasmide	37
Tabelle 3.3: Expressionsnachweis und Co-Immunopräzipitation von ADAM17 oder ADAM17-Mutanten und iRhom2.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur von ADAM17	3
Abbildung 3.1: Arbeitsablauf der Klonierung eines Konstrukts	36
Abbildung 3.2: Expressionsnachweis von iRhom2 in transient transfizierten HEK-Zellen	36
Abbildung 3.3: Expressionsnachweis der iRhom2 stabil überexprimierenden Zellen	38
Abbildung 3.4: ADAM17mRNA-Expressionslevel von ADAM17 der Zellen NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2	39
Abbildung 3.5: TNFR-I- und TNFR-II-Freisetzung von iRhom2 überexprimierenden NIH 3T3-Zellen und Kontrollzellen im Vergleich	40
Abbildung 3.6: TNFR-I und TNFR-II <i>Shedding</i> von iRhom2 überexprimierenden NIH 3T3-Zellen und Kontrollzellen im zeitlichen Verlauf	41
Abbildung 3.7: Konzentration von TNFR-I und TNFR-II in Überständen iRhom2 transgener C2C12- Zellen und Kontrollzellen im Vergleich.....	42
Abbildung 3.8: Deglycosylierung von ADAM17 in NIH 3T3_iRhom2- und NIH 3T3_cv-Zelllysaten.	43
Abbildung 3.9: Deglycosylierung von ADAM17 Lysaten von PMA-stimulierten NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2.	44
Abbildung 3.10: Deglycosylierung von Lysaten von LPS- und PMA-stimulierten C2C12_cv-Zellen und C2C12_iRhom2-Zellen.....	45
Abbildung 3.11: Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen und den dazugehörigen Kontrollzellen.....	46
Abbildung 3.12: Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen C2C12-Zellen und den dazugehörigen Kontrollzellen.....	47
Abbildung 3.13: Expressionsnachweis von ADAM17-Mutanten mit verschiedenen Antikörpern.....	48
Abbildung 3.14: Fluoreszenzmessung von mit ADAM17 und ADAM17-Mutanten transfizierten HEK- Zellen	49
Abbildung 3.15: Co-Immunopräzipitation von iRhom2 und ADAM17.....	50
Abbildung 4.1: Transport und Maturierung von ADAM17.....	56

Anhangsverzeichnis

Anhang I: Vektorkarte des Vektors pcDNA4To3xflag-c_iRhom2	70
Anhang II: Vektorkarte des Vektors pQCXIP_iRhom2	71
Anhang III: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_wt	72
Anhang IV: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_d700	73
Anhang V: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_dCT	74
Anhang VI: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17kat	75
Anhang VII: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17dis	76
Anhang VIII: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17egf	77
Anhang IX: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_gpi	78
Anhang X: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17ttkt	79
Anhang XI: Datenträger mit PDF-Datei dieser Dissertation	79

1. Einleitung

1.1. Die Familie der ADAM-Proteasen

Die ADAM (a disintegrin and metalloprotease) -Proteasen sind Transmembranproteine, die der Proteingruppe der Adamalysine angehören (Murphy, 2008). Bislang wurden 38 verschiedene ADAM-Proteine in unterschiedlichen Spezies entdeckt, 25 davon im humanen Genom (University of Virginia, 2014). Vier dieser Gene sind Pseudogene, d.h. sie kodieren für kein funktionelles Protein. Von den 21 funktionellen humanen ADAM-Genen kodieren 13 für Proteine mit funktionellen proteolytischen Eigenschaften (Edwards et al., 2008). Die proteolytisch inaktiven ADAM-Proteine sind vornehmlich durch ihre adhäsiven Eigenschaften an interzellulärer Kommunikation beteiligt (Gooz, 2010). ADAM2, 7, 18, 20, 21, 29 und 30 werden vornehmlich im Hoden exprimiert und sind dort an der Spermatogenese und der Funktion der Spermien beteiligt. Während einige ADAM-Proteasen (ADAM9, 10, 12, 15, 17 und 19) eine ubiquitäre Expression aufweisen, haben ADAM28 und 33 ein eingeschränkteres Expressionsmuster. ADAM8 ist hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. ADAM11, 22 und 23 werden primär im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert und ADAM12 in der Plazenta und mesenchymalen oder adulten Stammzellen (Edwards et al., 2008). Proteolytisch aktive ADAM-Proteasen spalten membrangebundene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Rezeptoren von der Zelloberfläche und setzen somit deren Ektodomänen frei (Blobel, 2005a). Dieser Prozess der proteolytischen Freisetzung eines membrangebundenen Proteins wird als *Ektodomänen-Shedding* bezeichnet. ADAM-Proteasen initiieren durch Proteolyse ihrer Substrate Signalwege, die vielfältige Ereignisse, wie zum Beispiel Zelladhäsion, Migration und Differenzierung regulieren (Reiss and Saftig, 2009; Saftig and Reiss, 2011). ADAM-Proteasen sind in der Eizellbefruchtung involviert (Cho et al., 1996), sowie in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie Krebs, Inflammation, Asthma bronchiale und Morbus Alzheimer (Deuss et al., 2008; Garton et al., 2006; Holgate et al., 2006; Mochizuki and Okada, 2007). Da ADAM-Proteasen zu physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beitragen, könnten sie pharmakologische Angriffspunkte in der Therapie diverser Erkrankungen darstellen (Gooz, 2010; Rose-John, 2013; Scheller et al., 2011).

1.2. Die membranständige Protease A Disintegrin And Metalloprotease 17 (ADAM17)

Die membranständige Protease ADAM17 gehört zu der Familie der ADAM-Proteasen und ist ebenfalls unter dem Namen TACE (*tumor necrosis factor α converting enzyme*) bekannt. Dieser Name leitet sich aus ihrer Entdeckung als hauptverantwortliche Protease für die Freisetzung von TNF- α her. Der Entzündungsmediator TNF- α liegt in seiner Vorform als Typ II Transmembranprotein vor und

wird durch proteolytische Spaltung durch ADAM17 in seine lösliche Form überführt und in den extrazellulären Raum entlassen (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Somit kommt ADAM17 eine Schlüsselrolle in der Entstehung aller mit TNF- α assoziierten Entzündungskrankheiten zu. Darüber hinaus wurden bislang 75 weitere membranständige Substrate identifiziert, wie zum Beispiel L-Selectin, Liganden des EGF-Rezeptors, TGF- α , Amphiregulin, HB-EGF, Neuregulin (Black et al., 1997; Blobel, 2005a; Li et al., 2006; Moss et al., 1997; Peschon et al., 1998; Sahin et al., 2004; Scheller et al., 2011).

Die Generierung ADAM17 defizienter Mäuse zeigte, dass ADAM17 essentiell für die embryonale Entwicklung von Mäusen ist, da ADAM17-defiziente Mäuse zwischen dem 17,5. Embryonaltag und dem ersten Tag nach der Geburt versterben (Peschon et al., 1998). Die Erforschung von ADAM17 *in vivo* im adulten Tier ist somit stark erschwert, daher wurden vielfältige konditionale ADAM17-*Knock-out*-Mauslinien, bei denen ADAM17 in unterschiedlichen Geweben genetisch inaktiviert wurde, generiert. Die bislang beschriebenen Mauslinien sind alle lebensfähig. Konditionale ADAM17-*Knock-out*-Mäuse, deren ADAM17-Expression in myeloiden Zellen stark reduziert ist, sind vor septischen Schock durch Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) protektiert. ADAM17 vermittelt in diesem Zusammenhang einen proinflammatorischen Effekt durch die Freisetzung von TNF- α während des septischen Schocks (Horiuchi et al., 2007a). Eine weitere konditional ADAM17-defiziente Mauslinie, bei der ADAM17 in Leukozyten deaktiviert ist, zeigt nach peritonealer Injektion von *E.coli* einen deutlich niedrigeren peritonealen TNF- α -Spiegel, eine verringerte Freisetzung von L-Selectin sowie eine schnellere Infiltration von neutrophilen Granulozyten, die eine schnellere Eliminierung der Bakterien bewirkt. Diese Resultate weisen eine proinflammatorische Rolle von ADAM17 innerhalb bakterieller Infektion nach. Andererseits zeigten ADAM17^{ex/ex}-Mäuse, welche eine starke Verminderung der ADAM17-Expression auf 5 % in allen Geweben aufweisen, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Dextransulfat (DSS) induzierter Kolitis (Chalaris et al., 2010). Somit kommt ADAM17 neben seiner proinflammatorischen Wirkung ebenfalls eine Bedeutung bei der Geweberegeneration während der Immunantwort zu.

Die Generierung einer ADAM17 transgenen Mauslinie, in der die Transkription von exogenem ADAM17 durch einen ubiquitären Promoter vermittelt wird, zeigt, dass die systemische Überexpression von ADAM17 die katalytische Aktivität der Protease *in vivo* nicht steigert. Obwohl die Expression von ADAM17 in allen untersuchten Geweben, wie Leber, Lunge, Haut und Knochenmark, der transgenen Mäuse vervielfacht ist und nachgewiesen wurde, dass exogenes ADAM17 in murinen embryonalen Fibroblasten die Zelloberfläche erreicht. Die ADAM17-transgenen Mäuse zeigten nach 8 Wochen keine Defekte im Vergleich zu Wildtypmäusen (Yoda et al., 2013). Diese Resultate demonstrieren, dass das Expressionslevel von ADAM17 nicht mit dessen katalytischer Aktivität korreliert und daher ein anderer Aktivierungsmechanismus existieren muss.

1.3. Aufbau von ADAM17

ADAM17 ist ein Typ I Transmembranprotein und besteht aus mehreren Domänen. Die Protease besitzt N-terminal ein Signalpeptid gefolgt von einem Propeptid. Es schließt sich die katalytische Domäne an, welche ein für Metalloproteasen charakteristisches Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum besitzt. Darauf folgen eine Disintegrindomäne, eine Cystein-reiche Region, eine membranproximale Domäne, die auch EGF-ähnliche Domäne heißt und im weiteren Verlauf mit EGF abgekürzt wird, eine Transmembrandomäne und einen cytoplasmatischen Teil (Blobel, Schlöndorff, 1999). Der cytoplasmatische Teil von ADAM17 beinhaltet eine prolinreiche Region, die als potentiell *short consensus repeats*-Bindungsmotiv fungiert und möglicherweise phosphoryliert werden kann (Soond et al., 2005).

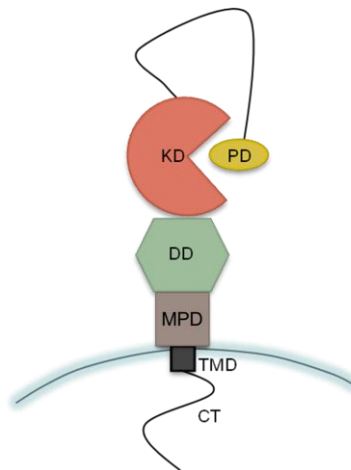


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur von ADAM17. Prodomäne (PD), katalytische Domäne (KD), Disintegrindomäne (DD), Membranproximale-Domäne (MPD), Transmembrandomäne (TMD), cytoplasmatischer Teil (CT).

1.4. Aktivierung und Regulation von ADAM17

Trotz der Stellung von ADAM17 als Schlüsselenzym vieler Signalwege, ist seine Regulation noch wenig erforscht. Durch *in vitro* Stimulation mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) wird die katalytische Aktivität von ADAM17 gesteigert. PMA induziert die Aktivierung der Proteinkinase C und *extracellular-signal regulated kinase* ERK (Xu and Derynck, 2010). Darüber hinaus kann ADAM17 durch Apoptose, zellulären Stress und Calciumeinstrom durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Chalaris et al., 2010; Chalaris et al., 2007; Horiuchi et al., 2007b).

Die Funktion der Prodomäne von ADAM17 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits liegen Beweise vor, dass sie durch einen Cystein-Schalter-Mechanismus als Inhibitor der Protease fungiert (Schlondorff et al., 2000; Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). Ein freier Cysteinrest der Prodomäne koordiniert das Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum und inaktiviert so die katalytische Untereinheit. Die Entfernung der Prodomäne im späten Golgi-Kompartiment durch die Protease Furin wird daher als entscheidend für die Aktivierung von ADAM17 erachtet (Schlondorff et al., 2000). Des Weiteren wurde dokumentiert, dass die Freisetzung von ADAM17-Substraten durch Überexpression des Furin-spezifischen Inhibitors Portland Alpha1-antitrypsin (PDX) herabgesetzt, hingegen durch Überexpression von Furin gesteigert werden kann. Furin wurde somit als verantwortliche Propeptidkonvertase für die Reifung und Aktivierung von ADAM17 identifiziert. Die Abspaltung der Prodomäne hat aber keinen Einfluß auf die Lokalisation von ADAM17, da die Protease auch in Furin-defizienten Zellen und nach Inhibierung der Propeptidase auf der Zelloberfläche erscheint (Peiretti et al., 2003). Kongruent dazu wurde gezeigt, dass rekombinant hergestelltes ADAM17-Propeptid dazu im Stande ist, die Freisetzung von löslichem TNF α zu inhibieren. Es stellt somit in diesem Zusammenhang einen effektiven, spezifischen Antagonisten von ADAM17 dar (Li et al., 2009). Andererseits wurde gezeigt, dass ADAM17 durch Mutation der Furinschnittstelle nicht inaktiviert wurde und nach Aktivierung durch PMA TNF- α spaltet (Schwarz et al., 2013). Des Weiteren wurde festgestellt, dass ADAM17 schnell auf die Stimulation physiologischer Signalwege durch Thrombin, EGF, LPA und TNF α reagiert und diese Stimulation unabhängig von der Entfernung der Prodomäne durch Furin und von der Dissoziation von TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*), einem endogenem Inhibitor von ADAM17 (Amour et al., 1998), ist. Für die Aktivierung von ADAM17 durch die physiologischen Stimuli wird die Transmembrandomäne, nicht aber der zytoplasmatische Teil benötigt (Le Gall et al., 2010).

Die Aktivität von ADAM17 kann durch Dimerisierung reguliert werden. In unstimulierten Zellen liegt ADAM17 überwiegend als Dimer an der Zelloberfläche vor (Xu et al., 2012). Für die Dimerisierung des Moleküls wird der zytoplasmatische Teil benötigt (Xu et al., 2012). Liegt ADAM17 an der Zelloberfläche als Dimer vor, kann TIMP3 effizient binden und ADAM17 inhibieren. Durch Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAP-Kinasen) p38- und ERK findet sich ADAM17 vermehrt als Monomer an der Zellmembran. Die Interaktion zwischen ADAM17 und TIMP3 wird aufgehoben und die Aktivität von ADAM17 wird gesteigert (Xu et al., 2012). Andere Studien identifizieren die EGF-Domäne als verantwortlich für die Dimerisierung und ermitteln, dass sowohl der zytoplasmatische Teil, als auch die Transmembrandomäne für die Dimerisierung von ADAM17 redundant sind (Lorenzen et al., 2011).

Die Rolle des zytoplasmatischen Teils von ADAM17 im Zuge seiner Regulierung ist noch nicht abschließend geklärt. Zum einen wird die Phosphorylierung des cytoplasmatischen Teils von

ADAM17 vielfach als regulatorischer Schritt in der Aktivierung der Protease beschrieben (Moss et al., 1997; Xu et al., 2012). Des Weiteren wird gezeigt, dass ADAM17 von ERK1/2 an Threonin 735 phosphoryliert wird (Rousseau et al., 2008). Diese Phosphorylierung wird als Schlüsselereignis des Transports und der Reifung von ADAM17 angesehen (Soond et al., 2005). Zum anderen stellen diverse Studien dar, dass mutierte Formen des ADAM17 Moleküls, denen der zytoplasmatische Teil fehlt, in ihrer Aktivität, induziert durch PMA, nicht herabgesetzt sind (Hall and Blobel, 2012; Reddy et al., 2000). Vielmehr wird dem zytoplasmatischen Teil von ADAM17 eine inhibitorische Rolle zugesprochen (Li et al., 2011).

Es wurde gezeigt, dass das Transmembranprotein Tetraspanin 15 den Transport und die Oberflächenexpression von ADAM10 reguliert (Prox et al., 2012). Im ER binden Tetraspanin 15 und ADAM10. Werden ADAM10 und Tetraspanin 15 gleichzeitig überexprimiert, wird die Menge an maturer Form ADAM10 deutlich gesteigert. Analog dazu wurde kürzlich gezeigt, dass das Transmembranprotein iRhom2 an dem Transport und der Maturierung von ADAM17 in murinen Makrophagen maßgeblich beteiligt ist (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Siggs et al., 2012)

1.5. iRhom2

Rhomboide regulieren als transmembrane Serinproteasen verschiedene biologische Prozesse, wie den Wachstumsfaktorsignalweg, parasitäre Invasion und die Translokation von bakteriellen Proteinen (Freeman, 2008; Urban, 2009; Zettl et al., 2011). Das aktive Zentrum der Rhomboide liegt innerhalb der Doppellipidschicht. Dort wird das Substrat nahe oder innerhalb seiner Transmembrandomäne proteolytisch gespalten und daraufhin in den Extrazellularraum entlassen (Freeman, 2008). Die Hauptfunktion der Rhomboide ist die Freisetzung von extrazellulären Proteindomänen durch die Spaltung ihrer membrangebundenen Vorläuferform (Adrain and Freeman, 2012; Zettl et al., 2011). Die iRhoms stellen eine proteolytisch inaktive Unterklasse der Rhomboidfamilie dar. Sie sind in allen Metazoen hoch konservierte, proteolytisch inaktive Rhomboide, die ihre katalytisch aktiven Reste verloren haben (Lemberg and Freeman, 2007b). Zur Gruppe der iRhoms gehören iRhom1 und iRhom2. Sie besitzen zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne eine globuläre Domäne in der L1-Schleife, die IRHD genannt wird (Lemberg and Freeman, 2007a). Die iRhoms sind Teil der Proteinqualitätskontrolle im ER in *Drosophila*- und Säugetierzellen (Zettl et al., 2011).

iRhom2 wird von Immunzellen, vor allem von Makrophagen, exprimiert. Das Protein ist in der Membran des ER und des Golgi-Apparates lokalisiert und notwendig für die Maturierung und den Transport von ADAM17. iRhom2 bindet ADAM17 im ER und bewirkt das Verlassen des ERs und seinen Transport durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, wo ADAM17 auf seine Substrate

trifft. Die Reifung von ADAM17 im Golgi-Apparat kann ohne iRhom2 nicht stattfinden (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Siggs et al., 2012).

Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung von TNF- α in iRhom2 defizienten Mäusen stark reduziert ist. Die Mäuse werden durch Deletion des Gens RHBDF2, welches iRhom2 kodiert, generiert. Sie sind lebensfähig, fertil und weisen keine morphologischen Defekte auf. In Makrophagen dieser Tiere wurde nachgewiesen, dass ADAM17 das ER nicht verlassen kann und somit seine Reifung und sein Transport an die Zelloberfläche scheitern. ADAM17 verbleibt in Makrophagen der iRhom2 defizienten Mäuse im ER und kann nicht an den sekretorischen Weg bis zur Zelloberfläche durchlaufen. In Folge dessen ist die Freisetzung von TNF- α in iRhom2 defizienten Makrophagen stark reduziert (Adrain et al., 2012). Die Expression von TNF- α , ADAM17 und iRhom2 wird durch Stimulation des *Toll-like Receptors 4* (TLR 4) durch LPS erhöht. Die Freisetzung von TNF- α ist in iRhom2 defizienten Makrophagen jedoch stark verringert, während die Menge an membrangebundenem TNF- α erhöht ist. Die iRhom2 defizienten Mäuse sind gegenüber LPS-induzierten septischen Schock geschützt, erliegen aber schneller bakterieller Infektion durch *L.monocytogenes* (McIlwain et al., 2012). Neben der Freisetzung von TNF- α ist ADAM17 für die Freisetzung vieler anderer Zytokine, wie zum Beispiel L-Selectin, verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass iRhom2 spezifisch für ADAM17 ist, und notwendig für die proteolytische Spaltung seiner Substrate ist. Das ADAM10-abhängige *Shedding* wird in iRhom2 defizienten Mäusen nicht beeinflusst, da in iRhom2 defizienten Zellen der Transport von ADAM10 an die Zelloberfläche nicht beeinträchtigt ist (McIlwain et al., 2012). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass iRhom2 an der Entstehung rheumatoider Arthritis, einer TNF- α assoziierten, entzündlichen Gelenkerkrankung, beteiligt ist. Die Expression von iRhom2 ist in primären, synovialen Makrophagen von Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht (Issuree et al., 2013). iRhom2 defiziente Mäuse sind gegenüber Kontrolltieren vor induzierter rheumatoider Arthritis geschützt und zeigen eine deutlich geringere TNF- α -Freisetzung. Der induzierte Gewebeschaden war bei iRhom2 defizienten Mäusen deutlich abgeschwächt (Issuree et al., 2013).

Des Weiteren ist iRhom2 für das schnelle ADAM17-vermittelte Shedding einiger Substrate, wie zum Beispiel Amphiregulin und Epiregulin, nach PMA-Stimulation notwendig, jedoch nicht für die Substrate TGF- α , CD62 Ligand und ICAM-1. Diese Ergebnisse legen eine Rolle von iRhom2 bei der Substratspezifität der ADAM17-vermittelten Proteolyse nahe (Maretzky et al., 2013).

Während iRhom1 ubiquitär exprimiert wird und eine weit verbreitete Funktion erfüllt, wird iRhom2 hauptsächlich von myeloiden Zellen, vor allem Makrophagen, exprimiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass iRhom1 in iRhom2 defizienten Mäusen den Verlust von iRhom2 funktional kompensieren kann (Issuree et al., 2013). In murinen embryonalen Fibroblasten werden iRhom1 und iRhom2 endogen exprimiert. Die genetische Inaktivierung von iRhom1 oder iRhom2 hat keinen Einfluss auf die

Reifung von ADAM17, der Verlust beider iRhom-Proteine führt dazu, dass Transport und Reifung von ADAM17 fehlschlagen (Issuree et al., 2013). In myeloiden Zellen ist die Expression von iRhom1 allerdings so gering, dass keine Kompensation stattfindet, was dazu führt, dass der Transport und die Reifung von ADAM17 in Makrophagen, Lymphknoten und Knochenmark von iRhom2 defizienten Mäusen scheitern. Obwohl iRhom2 für die Regulation von ADAM17 verantwortlich ist, sind iRhom2 defiziente Mäuse im Gegensatz zu ADAM17-defizienten Mäusen lebensfähig und fertil. Diese Unterschiede könnten auf die Kompensation von iRhom2 durch iRhom1 in somatischen Geweben zurückzuführen sein (Issuree et al., 2013). Die Inaktivierung von iRhom2 bietet die Möglichkeit, ADAM17 gewebespezifisch in Immunzellen zu inhibieren (Lichtenthaler, 2013).

TNF- α ist ein Zytokin, dem eine übergeordnete Rolle in der angeborenen Immunantwort und der Entstehung von Entzündungen zukommt. Der Entzündungsmediator ist entscheidend an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie zum Beispiel Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, Arteriosklerose, Psoriasis, Sepsis und Adipositas, beteiligt. Die medikamentöse Blockade von TNF- α führt dazu, dass viele Kennzeichen der chronischen Entzündung wie die Rekrutierung, Aktivierung und Proliferation von Leukozyten und die Produktion von Entzündungsmediatoren reduziert werden (Tracey et al., 2008). Gleichzeitig kommt es während der Therapie mit TNF- α -Inhibitoren zu unerwünschten Nebenwirkungen. Die pharmakologische Inhibierung der Interaktion zwischen ADAM17 und iRhom2 würde eine spezifische Aufhebung der TNF- α -Sekretion von myeloiden Zellen möglich machen (Adrain et al., 2012). iRhom2 könnte in diesem Kontext ein wichtiges therapeutisches Angriffsziel in der Therapie von TNF- α assoziierten Erkrankung darstellen.

1.6. Problemstellung und Zielsetzung

Da ADAM17 durch *Shedding* vieler Zytokine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren eine Schlüsselrolle in den Signalwegen der angeborenen Immunantwort, Krebsentstehung und Gewebsregeneration zukommt (Scheller et al., 2011), ist es von großer Bedeutung, seine physiologische Regulation und die Auswirkungen von Inhibierung und Aktivierung zu erforschen. Verschiedene Studien zeigten kürzlich, dass iRhom2 in murinen Makrophagen unerlässlich für die Freisetzung von TNF- α durch ADAM17 ist. Da es weder *in vitro* noch *in vivo* möglich ist, die Aktivität von ADAM17 durch Überexpression zu steigern (Merlos-Suarez et al., 1998; Yoda et al., 2013), soll im Zuge dieser Arbeit ermittelt werden, ob eine Überexpression von iRhom2 auch zu einer Aktivitätssteigerung von ADAM17 führt.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Expression von iRhom2 durch den TNF-Signalweg gesteigert wird. Somit entsteht eine positive Rückkopplung, da TNF- α die Expression von iRhom2 verstärkt, welches für den Transport und die Reifung von ADAM17 unerlässlich ist und ADAM17

wiederum für die Freisetzung von aktivem TNF- α verantwortlich ist (Adrain et al., 2012). Somit käme einer Aktivitätssteigerung von ADAM17 durch Überexpression von iRhom2 auch eine physiologische Bedeutung zu.

Darüber hinaus soll die für die Bindung verantwortliche Domäne von ADAM17 identifiziert werden. Übergeordnet soll auch ermittelt werden, ob die Generierung einer iRhom2-transgenen Maus der Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie von ADAM17 zuträglich wäre.

2. Material und Methoden

Nachstehend werden verwendete Materialien und Methoden beschrieben.

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 2.1: Auflistung von verwendeten Chemikalien und dem jeweiligen Hersteller

Reagenz	Hersteller
β2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
4β-Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumperoxiddisulfat	Biozym, Hess, Oldendorf
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, D
Bromophenolblau	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
BSA Fraction V ph 7.0	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Complete Proteaseinhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Concanavalin A Sepharose®-Konjugat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe, D
dATP, dCTP, dGTP, dGTP	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMSO Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, D
Dynabeads® Protein G	Invitrogen; Darmstadt, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, vergällt mit 1% Petrolether	Walter CMP, Kiel, D
Fötales Kälberserum	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
Glycin Pufferan®	Roth, Karlsruhe, D
Guanidin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe, D
Hyper IL-6	AG Grötzinger, CAU, Kiel, D
Isopropanol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, D

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Methanol	Walter CMP, Kiel, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
NaCl	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat	Roth, Karlsruhe, D
MEM Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NP40	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Peressigsäure	AppliChem, Darmstadt, D
Rekombinantes, murines M-CSF	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rotiphorese® Gel 30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	Walter CMP, Kiel, D
Schwefelsäure Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, D
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe, D
Supersignal West Femto Maximum Sensivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Tris Pufferan®	Roth, Karlsruhe, D
TritonX-100	Roth, Karlsruhe, D
Tween®	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D

2.1.2. Puffer und Lösungen

10x PBS	81,82 g NaCl
	2,01 g KCl

	14,20 g Na ₂ HPO
	2,45 g KH ₂ PO ₄
	pH 7,4 einstellen
10x SDS-PAGE Laufpuffer	144 g Glycin
	30 g Tris
	10 g SDS
	add 1000 ml ddH ₂ O
10x Transferpuffer	30,3 g Tris
	144,1 g Glycin
	add 1000 ml ddH ₂ O
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer
	200 ml Methanol
	add 1000 ml ddH ₂ O
10x TBS	12,1 g Tris
	87,6 g NaCl ₂
	add 1000 ml ddH ₂ O
TBS-T	100 ml 10x TBS
	500 µl Tween 20
	add 1000 ml ddH ₂ O
6% Milchpulver in TBS-T	100 ml TBS-T
	6 g Magermilchpulver
10% APS	1 g APS
	10 ml ddH ₂ O
10% Trenngel	3,87 ml H ₂ O
	2,55 ml 1,5 M Tris/ HCl oH 8,8
	100 µl 10% SDS
	3,33 ml Polyacrylamid
	100 µl 10% APS

	10 µl TEMED
4% Sammelgel	1,86 ml H ₂ O
	312 µl 0,5 M Tris/ HCl pH 8,8
	25 µl 10% SDS
	335 µl Polyacrylamid
	25 µl 10% APS
	5 µl TEMED
5x Lämmli-puffer	2,5 ml 1M Tris ph 6,8
	1 g SDS
	5 mg Bromphenolblau
	5 ml Glycerin
	2,5 ml H ₂ O
	pro 980 µl 20 µl β-Mercaptoethanol
6x DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol
	3ml Glycerol (100%)
	50 mM EDTA pH 8,0 (1 ml 0,5 M EDTA 8,0)
	10 mM Tris pH 7,6 (100 µl 1 M Tris pH 7,6)
5x TBE-Puffer	54 g Tris
	27,5 g Borsäure
	4,6 g EDTA
	add 1000ml ddH ₂ O
0,5x TBE	100 ml 5x TBE
	900 ml ddH ₂ O
1 % Agarosegel	0,5 g Agarose
	50 ml 0,5x TBE
Zelllysis-puffer	50 mM Tris/HCl
	150 mM NaCl

2 mM EDTA

1 % NP-40

1 % Triton X-100

add 500ml ddH₂O

eine Tabletten Complete ohne EDTA hinzugeben

Zelllysispuffer für Co-Immunopräzipitation

10 mM HEPES

1 mM EDTA

1 mM EGTA

10 mM KCl

0,5 % NP-40

Auf 50 ml eine Tablette Complete

Plasmidpräparationslösungen:

Resuspensionspuffer

1g Glucose

2, ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

2,5 1 M Tris-HCl (pH 8,0)

add 100ml ddH₂O

Lysepuffer

5 ml 4 M NaOH

10 ml 10% SDS

add 100ml ddH₂O

Neutralisationspuffer

60 ml 5 M Kaliumacetat

11,5 ml Essigsäure

add 100ml ddH₂O

Lösungen für FACS-Analysen

Saponinlösung

1,5 g Saponin

5 g BSA

2 ml NaAcid

In 500 ml PBS

FACS-Puffer 1 g BSA
 100 ml PBS

2.1.3. Nährmedien

DMEM High Glucose (4,5 g/l) PAA Laboratories; Pasching, A

Fetales Kälberserum (FCS) PAA Laboratories; Pasching, A

LB-Agarplatten 2g NaCl
 2 g Trypton/Pepton
 1 g Hefeextrakt
 4 g Agar
 add 200ml ddH₂O

LB-Flüssigmedium 10 g NaCl
 10 g Trypton/Pepton
 5 g Hefeextrakt
 add 1000ml ddH₂O

Kulturmedium DMEM High Glucose (4,5 g/l)
 10 % FCS
 1 % Penicillin

Einfriermedium 90 % FCS
 10 % DMSO

2.1.4. Antibiotika

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Antibiotika und ihrer Endkonzentration

Antibiotikum	Stockkonzentration des Herstellers	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Puromycin	1 mg/ml	2 µg/ml
Geneticin (G-418)	50 mg/ml	800 µg/ml
Zeozin	100 mg/ml	100 µg/ml

2.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Reinstwasseranlage Milli Q-Plus	Millipore; Massachusetts, USA
PCR-Maschine T personal	Biometra; Göttingen, D
Thermomixer compact	Eppendorf; Hamburg, D
Agarosegellaufkammer Mini-Sub	Biorad; München, D
Geldokumentationsanlage Whatman	Biometra; Göttingen, D
Lichtmikroskop BX50	Olympus; Hamburg, D
Zellzähler Cellometer® Auto T4	Peqlab, Erlangen, D
Cellometer® Cell Counting Chambers SD100	Peqlab, Erlangen, D
SDS-PAGE Laufkammer Mini Protean	Biorad; München, D
Power Pac™ Basic Power Supply	Biorad; München, D
Mini Trans-Blot® Cell	Biorad; München, D
PVDF-Membran	Whatman; Dassel, D
Whatmanpapier	Roth; Karlsruhe, D
Western Blot Imaging FluorChemQ	Alpha Innotech; Hessisch Oldendorf, D
UV-Absorptionsphotoskettrometer	Thermo Scientific; Massachusetts, USA
Nanodrop 2000	
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific; Massachusetts, USA
Biofuge 13	Heraeus Sepatech; Osterode am Hartz, D
Megafuge	Heraeus Sepatech; Osterode am Hartz, D
Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen, D
Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ MaxiSorp™	Thermo Scientific; Massachusetts, USA
Micro Centrifuge	
VortexGenie 2	Scientific Industries; New York, USA
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt; Nümbrecht, D
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt; Nümbrecht, D
DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen; Darmstadt, D
Multiply®-µStrip 0,2 ml Kette	Sarstedt; Nümbrecht, D

Pipettenspitzen	Sarstedt; Nümbrecht, D
1,5 und 2 ml Reagiergefäße	Sarstedt; Nümbrecht, D
Assistent Rollenmischer RM5	Karl Hecht KG; Sonderheim/Rohn, D
Rotator	Thermo Scientific; Massachusetts, USA
Nitril-Einmalhandschuhe	Roth; Karlsruhe, D
Concanavalin A Sepharose®-Konjugat	Sigma-Aldrich; St.Louis, USA
Hamiltonpipette Microliter 725	Hamilton Company; Bonaduz, Schweiz
ECL SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific; Massachusetts, USA

2.1.6. Kits

NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Machery & Nagel; Düren, D
NucleoSpin® Extract II	Machery & Nagel; Düren, D
NucleoSpin® RNA II	Machery & Nagel; Düren, D
Human sTNF RI/TNFRSF1A DuoSet	R&D Systems; Minneapolis, USA
Human sTNF RII/TNFRSF1B DuoSet	R&D Systems; Minneapolis, USA
RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase	Fermentas; St. Leon-Rot, D
BM Blue POD Substrate, soluble	Roche; Mannheim, D

2.1.7. Synthetische Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide stammen von Metabion International AG (Martinsried, D).

Tabelle 2.3: Synthetische Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Anwendung
iRhom2-up	ATGGCCTCAGCTGACAAGAATG	PCR iRhom2
iRhom2-dn	GTGTAGCACCTGGTCTAGC	PCR iRhom2
iRhom2-HindIII-up	GATCAAGCTTGGCGCGCCACCATGGCCTCAGCTGACAAGA ATGG	PCR iRhom2
iRhom2-EcoRI-dn	GATCGAATTCGTGTAGCACCTGGTCTAGCTCGTACTTCTCA C	PCR iRhom2
iRhom2-pos900	GCATGTCAAACGCAG	Sequenzierung
iRhom2-pos1623	CATTACCAAGTGGCCG	Sequenzierung
iRhom2-pos1985	ACCGCATCTCCATCATCTTC	Sequenzierung
ADAM17-KpnI-up	GATCGGTACCATGAGGCGGGCGTCTCCTC	PCR ADAM17
ADAM17-NotI-dn	GATCGCGGCCGCCCCGCACTCTGTCTCTTTGCTGTCAAC	PCR ADAM17
spIL-6myc-katA17 fow	GATCCGCGGCCGCAAATACTTGTAATTACTGGTGGTAG	PCR ADAM17kat
spIL-6myc-egfA17 fow	GATCGCGGCCGCAAACAAGGTGTGTGGCAACTCC	PCR ADAM17dis
spIL-6myc-disA17 fow	GATCGCGGCCGCATGCATCCCTTTCTGCAAGAGG	PCR ADAM17egf
ADAM17 rev-primer	GATCGGATCCCTAGCACTCTGTCTCTTTGCTG	PCR ADAM17 kat/dis/egf

2.1.8. Vektoren

Die Vektorkarten befinden sich im Anhang.

pcDNATM 3.1(+)

pcDNATM3.1(+) ist ein Expressionsvektor (Invitrogen; Darmstadt, D) mit CMV-Promoter und Multiple Cloningside (MCS). Er enthält Resistenzgene gegen Neomycin, Kanamycin und Ampicillin.

pcDNA3.1TM(+)spIL-6myc

Der pcDNA3.1(+) Vektor wurde modifiziert, indem ein Myc-tag und die Basensequenz des Signalpeptids des Interleukin-6-Rezeptors eingefügt wurden. Er enthält ein Ampicillinresistenzgen.

pcDNATM 4/TO 3xflag-c

Der pcDNATM 4/TO Vektor (Invitrogen; Darmstadt, D) ist ein Tetracyclin reguliertes Expressionssystem mit CMV-Promotor. In den Vektor wurde über die Restriktionsstellen XhoI und ApaI C-terminal ein 3xflag-tag kloniert.

pQCXIP

Dieser retrovirale Vektor (Clontech; Mountain View, CA) wird zur retroviralen Transduktion verwendet und kann ein Zielprotein zusammen mit einem Puromycinselektionsmarker exprimieren. Er wird nach Transfektion in eine Verpackungszelllinie in retrovirale Partikel verpackt. Der pQCXIP-Vektor kodiert einen CMV- und einen MSV-Promotor, sowie LTR-Elemente, Verpackungssignal (Psi⁺) und einer tRNA-Primerbindestelle. Mittels dieses Vektors wird ein genomisches Transkript in das Genom der Zielzelle integriert, welches dann stabil exprimiert wird.

2.1.9. Enzyme und Marker

Gene Ruler TM 1 kb DNA-Ladder	Fermentas; St Leon-Rot, D
Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas; St Leon-Rot, D
RevertAid TM H Minus Reverse Transcriptase	Fermentas; St Leon-Rot, D
T4-Polynucleotid-Kinase	Fermentas; St Leon-Rot, D
Restriktionsendonukleasen	Fermentas; St Leon-Rot, D
FastAP TM	Fermentas; St Leon-Rot, D
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes; Keilaranta; Finnland
DreamTaq TM Polymerase	Fermentas; St Leon-Rot, D
Trypsin EDTA	PAA Laboratories; Pasching, A
Denaturierungspuffer	New England BioLabs GmbH; Frankfurt a.M., D
Endo-H	New England BioLabs GmbH; Frankfurt a.M., D
PNGase F	New England BioLabs GmbH; Frankfurt a.M., D

2.1.10. Antikörper

Tabelle 2.4: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Anwendung	S-A
α -flag M2	1 : 1000	Sigma-Aldrich; St.Louis, USA	Western Blot Co-Immunoprecipitation	anti-mouse
α -ADAM17 18.2	1 : 1000	Pineda; Berlin, D	Western Blot	anti-rabbit
α -ADAM17 10.1	1 : 1000	Pineda; Berlin, D	Western Blot	anti-rabbit
α -Aktin	1 : 10000	Santa Cruz; Californien, USA	Western Blot	anti-rabbit
K133	1 : 100	AG Molecular Immunology UKE, D	FACS-Färbung	

Tabelle 2.5: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Anwendung
goat anti-rabbit #31462	1 : 5000	Thermo Scientific; Massachusetts, USA	Western Blot
goat anti-mouse #31432	1 : 5000	Thermo Scientific; Massachusetts, USA	Western Blot
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit #A-11034	1 : 100	Invitrogen; Darmstadt, D	FACS-Färbung

2.1.11. Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinien

HEK 293

Es handelt sich bei dieser humanen Zelllinie um embryonale Nierenzellen, die adhären wachsen.

NIH 3T3

Diese Zelllinie entstammt dem Organismus *Mus musculus*. NIH 3T3-Zellen sind Fibroblasten, die adhären wachsen.

C2C12

C2C12-Zellen sind adhären wachsende murine Myoblasten.

Phönix

Phönixzellen sind Verpackungszellen und werden zur retroviralen Transduktion genutzt. Die Zelllinie wurde durch Transfektion von HEK 293-Zellen mit Konstrukten zur Synthese des GAG-, POL- und

ENV-Proteins in HEK-Zellen produziert. Nach Transfektion mit einem retroviralen Vektor verpacken Phoenixzellen das zuvor eingebrachte Konstrukt in retrovirale Partikel. Diese infizieren Zielzellen und die DNA wird stabil in das Genom integriert.

Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden *E.coli* der Stämme Top 10 (Invitrogen; Darmstadt, D) und XL-1 blue (Stratagene; Heidelberg, D) benutzt.

2.1.12. Computersoftware

FCS Express Version 3 Research Edition

pDraw und DNASTAR

SnapGene

Adobe Photoshop CS 4

Microsoft Office 2010

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. RNA-Isolierung

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen oder murinen Organen erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA II Kit (Machery & Nagel; Düren, D) gemäß dem Protokoll.

2.2.1.2. cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA (*complementary DNA*) wurden 2 µg RNA mit RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas; St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben umgeschrieben.

2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Das PCR-Protokoll (Pipettierschema und Programm) entspricht den Herstellerangaben der verwendeten Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific; Massachusetts, USA).

2.2.1.4. Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die *Real-time*-PCR folgt dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei die vervielfältigte DNA während des Prozesses zeitabhängig detektiert wird. Sie dient somit der Messung der Menge von mRNA (*messenger RNA*) respektive cDNA einer Zellpopulation und trifft somit eine quantitative Aussage über die Expression eines Proteins. Da die Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung in Echtzeit stattfindet, wird diese Methode *Real-time* quantitative Polymerasereaktion genannt.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben des Light Cycler 480 unter Verwendung zweier unterschiedlicher Sonden. Sonde 1 bindet in der cDNA von ADAM17 an Position 2269-2415. Das Amplicon ist 147 Nukleotide lang und geht über das Exon8-Exon9. Sonde 2 bindet in der cDNA von

ADAM17 zwischen Position 188 und 276 und das Amplicon ist 89 Nukleotide lang und geht über das ADAM17 Signalpeptid-Exon1.

2.2.1.5. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können verschiedenen DNA-Fragmenten größenabhängig im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Die Herstellung von 1 %igen Agarosegelen erfolgte durch Aufkochen von 0,5 g Agarose in 50 ml 0,5x TBE mit 1 µl Ethidiumbromid. Nach Erstarren wurde das Agarosegel in eine mit 0,5x TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, zusätzlich wurde ein Größenmarker aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 90 V für 60-120 Minuten angelegt. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde das Gel zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

2.2.1.6. DNA-Isolierung aus Agarosegel

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel entfernt und mit dem NucleoSpin®RNA II Kit (Machery & Nagel; Düren, D) aufgereingt. Die Vorgehensweise folgte dabei dem Standardprotokoll des Herstellers.

2.2.1.7. Restriktionsanalyse

Zur gezielten Fragmentierung von DNA dienen Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen spezifisch vier bis acht palindromisch angeordnete Basenpaare in einem DNA-Strang und spalten dessen Phosphodiesterbindung. Die resultierenden Enden können überstehende Einzelstrangabschnitte, sogenannte kohäsive Enden, besitzen oder glatt sein. Restriktionsendonukleasen werden bei Klonierungen verwendet, um Inserts spezifisch in Vektoren zu ligieren.

Standardansatz Restriktionshydrolyse:

5 µg DNA, 3 µl 10x Pufferlösung, 1 µl Restriktionsendonuklease, add 30 µl ddH₂O.

Durch die Spaltung entstehen spezifische Enden, die sich durch ihre zum Teil komplementäre Basenpaarung leicht wieder anlagern können. Um das zu verhindern und den Einbau fremder DNA-Fragmente zu fördern, wurde nach Restriktionshydrolyse die Phosphatase FastAP™ (Fermentas; St.

Leon-Rot, D) hinzugesetzt, welche die Abspaltung von 5'- und 3'-Phosphatgruppen von DNA-Enden katalysiert.

2.2.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T4-DNA-Ligase ist dazu in der Lage, zwei DNA-Abschnitte miteinander zu verbinden. Es katalysiert unter Verbrauch von ATP die Phosphodiesterbindung von 5'-Phosphatenden und 3'-Hydroxyenden.

Standard Ligationsansatz:

24 µl Insert DNA (24 µl H₂O), 3 µl T4-Ligasepuffer, 1 µl VektorDNA 1 µl T4-Ligase

2.2.1.9. Hitzeschocktransformation von kompetenten Bakterien

Die Hitzeschocktransformation wird genutzt, um Plasmide oder DNA in Bakterien einzubringen, welche diese Fremd-DNA im Zuge ihrer eigenen Reproduktion amplifiziert.

Es wurden 50 µl chemisch kompetenter Bakterien mit 1 µg DNA für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 60 Sekunden. Nach 5 Minuten auf Eis wurden 500 µl LB-Medium mit Ampicillin hinzugegeben. Die Bakteriensuspension wurde zunächst bei 37 °C vorkultiviert und nach 60 Minuten auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert. Das Bakterienwachstum wurde nach 12-16 Stunden bei 37 °C durch Lagerung der LB-Agarplatten bei 4 °C abgestoppt.

2.2.1.10. Präparation von Plasmiden

Zur Isolation amplifizierter Plasmide aus Bakterien wurde die Methode der alkalischen Lyse genutzt (Birnboim and Doly, 1979).

Analytische Präparation von Plasmiden

Zur Analyse neu klonierter Konstrukte wurden einzelne Bakterienklone von der LB-Agarplatte entnommen und in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht kultiviert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit (Machery & Nagel; Düren, D)

nach Herstellerangaben. Anschließend folgten Restriktionsanalyse und Sequenzierung zur Bestimmung korrekt klonierter Konstrukte.

Präparative Präparation von Plasmiden

Um von gewünschten Plasmiden große Mengen zu erhalten, wurden 200 ml LB-Medium mit transformierten Bakterien angeimpft. Die Isolation erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit (Machery & Nagel; Düren, D) gemäß dem Protokoll des Herstellers.

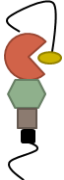



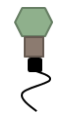

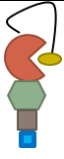

2.2.1.11. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch photometrische Absorptionsmessung bestimmt. Dazu wurde das Spektralphotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific; Massachusetts, USA) benutzt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.1.12. ADAM17-Mutanten

Für nachfolgende Experimente wurden verschiedene Mutationsformen von ADAM17 benutzt. Ausgangsvektor für diese ist stets der pcDNATM 3.1(+)-Vektor.

Tabelle 2.6: Auflistung und schematische Illustration der klonierten ADAM17-Mutanten. TMD: Transmembrandomäne; TRAIL: Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand

Name der Mutante	Insert	Aminosäuresequenz	Schematische Darstellung des mutierten ADAM17
ADAM17	ADAM17	ADAM17: 1-827	
ADAM17Δ700	ADAM17 c-terminal verkürzt	ADAM17: 1-699	
ADAM17ΔCT	ADAM17 ohne cytoplasmatischen Teil	ADAM17: 1- 692	
ADAM17kat	ADAM17 ohne Prodomäne	ADAM17: 223-827	
ADAM17dis	ADAM17 ohne Prodomäne und katalytische Domäne	ADAM17: 475-827	
ADAM17egf	ADAM17 ohne Prodomäne, katalytische Domäne und Disintegrindomäne	ADAM17: 578-827	
ADAM17gpi	ADAM17 ohne cytoplasmatischen Teil, die TMD wurde durch einen GPI-Anker des TRAIL-Proteins ausgetauscht	ADAM17: 1-670 B4DQ70 : 126-157	
TTKT	ADAM17 ohne TMD, diese wurde durch die TMD von ADAM10 ausgetauscht	ADAM17:1-672 ADAM 10: 674-693 ADAM17: 693-827	

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Die zellbiologische Arbeit fand an einer Sterilwerkbank statt und erfolgte mit sterilisierten Verbrauchsmaterialien. Um ein Absterben der Zellen durch übermäßiges Wachstum zu verhindern, wurden diese regelmäßig passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und die adhärent wachsenden Zellen auf ihrer Kulturschale mit 5 ml autoklaviertem und sterilfiltriertem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen für 1 Minute bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte daraufhin durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Die Zellsuspension wurde zur Weiterkultivierung im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Das Kulturmedium stabil transfizierter Zellen wurde stets mit Selektionsantibiotikum versetzt, um den Selektionsdruck auf die Zellen aufrecht zu erhalten.

2.2.2.2. Zellzahlbestimmung

Um im zellbiologischen Experiment vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Versuchszellen in gleicher Zellzahl ausgesät. Zur Zählung wurden 20 µl suspendierter Zellen in eine Zählkammer (Cellometer Cell Counting Chamber SD100; Peqlab, Erlangen, D) pipettiert und diese durch den Zellzähler Cellometer® Auto T4 (Peqlab; Erlangen, D) analysiert.

2.2.2.3. Transfektion und Co-Transfektion

Um Fremd-DNA transient in Zielzellen einzubringen, wurde diese mit dem Transfektionsreagenz TurboFect (Thermo Scientific; Massachusetts, USA) gemischt. Das Reagenz ist eine Lösung kationischen Polymers in Wasser, das mit der negativ geladenen DNA stabile Komplexe bildet. Diese Komplexe sind positiv geladen und können so die Doppellipidschicht der Zellmembran durchdringen.

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vorher wie in Tabelle 2.7 angegeben ausgesät. Es wurde FCS-freies Kulturmedium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und durch DNA und

Turbofect in unten angegebener Menge (Tabelle 2.7) ergänzt. Nach gründlichem Mischen mit Hilfe eines Kreisschüttlers wurde der Transfektionsansatz 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise in das Kulturmedium der Versuchszellen gegeben. Die Weiterkultur der Zellen erfolgte für 24-48 Stunden.

Tabelle 2.7 Zelldichte und entsprechende Zusammensetzung des Transfektionsansatzes

Kulturschale	<u>Zellkultur</u>		DMEM	<u>Transfektionsansatz</u>	
	Kulturmedium	Zellzahl		DNA	TurboFect
6-Lochplatte	2 ml	$2,5 \times 10^5$	400 μ l	1 μ g	3 μ l
60mm-Schale	5 ml	5×10^5	600 μ l	1,5 μ g	4,5 μ l

Um für Co-Immunopräzipitation doppelt transfizierte Zellen zu generieren, wurde der Transfektionsansatz mit zwei verschiedenen Plasmiden versetzt. Da die Expression der ADAM17-Konstrukten bei Co-Transfektion im Vergleich zur Einfachtransfektion stark abnahm, wurde bei Doppeltransfektion ein Verhältnis von 1:4 von pcDNATM4/TO3xflag-c_iRhom2 zu ADAM17-Konstrukten eingestellt. Die in Tabelle 2.8 angegebenen DNA-Menge bezieht sich auf die Gesamtmenge der DNA, wobei 1/5 auf pcDNATM4/TO3xflag-c_iRhom2 und 4/5 auf das jeweilige ADAM17-Konstrukt entfallen.

Tabelle 2.8 Zusammensetzung der Transfektionsansätze bei einfacher und doppelter Transfektion

	<u>Transfektionsansatz einfach</u>			<u>Transfektionsansatz doppelt</u>		
	Kulturmedium	DNA	TurboFec	DMEM	DNA	TurboFect
6-Lochplatte	400 μ l	1 μ g	3 μ l	800 μ l	5 μ g	15 μ l
60mm-Schale	600 μ l	1,5 μ g	4,5 μ l	1200 μ l	7,5 μ g	22,5 μ l

2.2.2.4. Experimentelle Bestimmung der letalen Puromycinkonzentration von NIH 3T3 und C2C12-Zellen („Death curve“)

Zur Selektion stabil überexprimierender Zellen nach retroviraler Transduktion wurde zuvor die spezifische lethale Konzentration des zu verwendenden Antibiotikums, in diesem Falle Puromycin, ermittelt. Dafür wurden die Zelllinien NIH 3T3 und C2C12 in einer Zahl von 8×10^4 pro 12 Loch auf einer 12-Lochplatte ausgesät. Dem Kulturmedium wurde Puromycin in einer Konzentrationsreihe von 0 bis 3 μ g hinzugefügt. Nach 4 Tagen wurde mikroskopisch ermittelt, bei welcher minimalen Puromycinkonzentration alle Zellen abstarben. Daraus ergab sich die zu verwendende Konzentration von 2 μ g/ml des Selektionsantibiotikums nach retroviraler Transduktion für beide Zelllinien.

2.2.2.5. Retrovirale Transduktion

Um ein gleichbleibendes Expressionslevel und somit vergleichbare experimentelle Ergebnisse zu erzielen, wurden die Zelllinien NIH 3T3 und C2C12 mit Hilfe des retroviralen Systems stabil mit dem Plasmid pQCXIP_iRhom2 und dem leeren Vektor pQCXIP transfiziert. Zu diesem System gehören der retrovirale Vektor pQCXIP und die Phönix-Verpackungszelllinie. Der retrovirale Vektor wurde in die Verpackungszelllinie transfiziert und von dieser in retrovirale Partikel verpackt. Diese infizieren Zielzellen und das Plasmid wird stabil in das zelluläre Genom integriert und bleibt so nach Zellteilung erhalten. Man nutzt zusätzlich das Resistenzgen (Pur^r) des pQCXIP-Vektors, um transfizierte Zellen zu selektieren.

Am ersten Tag erfolgte das Aussäen der Phönix-Zellen in einer Zellzahl von 3×10^5 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte. Einen Tag darauf wurden diese Zellen gemäß des oben beschriebenen Transfektionsverfahrens transfiziert.

Tabelle 2.9 Zelldichte und entsprechende Zusammensetzung des Transfektionsansatzes bei retroviraler Transduktion

Kulturschale	Phönix-Zellen		DMEM	Transfektionsansatz	
	Kulturmedium	Zellzahl		DNA	TurboFect
6-Lochplatte	2 ml	3×10^5	400 μ l	1 μ g	3 μ l

Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzvektor ohne retrovirale Eigenschaften, mit dem pQCXIP-Vektor und dem Konstrukt pQCXIP_iRhom2 transfiziert. Die Zielzelllinien NIH 3T3 und C2C12 wurden in einer Zellzahl von 8×10^4 pro Loch auf einer 12-Lochplatte subkultiviert. Am dritten Tag konnte der Transfektionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskopie der mit dem Fluoreszenzvektor transfizierten Phönixzellen überprüft werden. Der Zellüberstand wurde abgenommen und durch einen Filter von 0,45 μ m Porenweite gegeben. Das Kulturmedium der 12-Lochplatte der Zielzellen wurde entfernt und durch den filtrierten Überstand der Verpackungszellen ersetzt. Es folgte ein 120-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 g bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen 48 Stunden unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen erfolgte ab dem fünften Tag durch Hinzufügen des Selektionsantibiotikums Puromycin in einer Konzentration von 2 μ g/ml Kulturmedium. Diese Konzentration wurde zuvor mittels *Death curve* experimentell bestimmt.

Nach erfolgreicher Kultivierung der so genetisch veränderten Zellen erfolgte eine Expressionskontrolle des gewünschten Proteins iRhom2 per SDA-PAGE und Western Blot.

2.2.2.6. Ernten von Zellen

Um nach erfolgten Experimenten Zelllysate herzustellen und zu analysieren, wurde das Kulturmedium der Zellen entfernt und die adhärennten Zellen mit PBS auf ihrer Kulturschale gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt auf der Kulturschale lysiert oder durch Abschaben mit einem Spatel vorsichtig von dieser entfernt und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt, um in diesem lysiert zu werden.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Zellyse und Proteinprobenvorbereitung

Nach erfolgter Zellernte wurden die Zellen abhängig vom Versuch mit Zelllysispuffer oder Co-IP-Zelllysispuffer lysiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Lysispuffer erfolgte für eine Stunde bei 4 °C. Anschließend wurde das Gemisch aus Zellentrümmern und Lysispuffer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 21.000 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wurden Zelldebris und Proteine voneinander getrennt und der proteinhaltige Überstand konnte in neue Reagiergefäße überführt und bei -20 °C gelagert werden.

2.2.3.2. Co-Immunopräzipitation

Diese Methode dient dazu, die Interaktion zweier Proteine direkt nachzuweisen. Man bedient sich der Methodik der Immunopräzipitation. Es handelt sich um die Ausfällung eines Antigens durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes.

Bei der Co-Immunopräzipitation wird neben dem Interaktionspartner A, der direkt durch Antikörperbindung gefällt wird, ebenfalls Interaktionspartner B über die Bindung an A indirekt gefällt. Nach erfolgter Fällung wird die Interaktion beider Proteine durch Aufkochen und Denaturierung aufgehoben. Die Probe kann per SDS-PAGE aufgetrennt, und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Durch die folgende Immunfärbung, die gegen Interaktionspartner B gerichtet ist, kann nun eine Bindung der beiden Proteine nachgewiesen werden.

Die einfach und doppelt transfizierten HEK-Zellen wurden wie oben beschrieben mit 500 µl Co-IP-Zelllysispuffern lysiert. Dem Lysat wurden 500 µl PBS hinzugefügt und es wurden 50 µl dieses Gemischs für den Expressionsnachweis in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Daraufhin wurde je 1 µl αflag-Antikörper zu den mit PBS verdünnten Lysaten hinzugefügt. Diese Proben inkubierten über Nacht bei 4 °C im Rotator. Pro Probe wurden jeweils 30 µl Dynabeads® zweimal mit 1 % BSA in PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit 1 % BSA in PBS blockiert.

Am nächsten Tag wurde der Ansatz aus Dynabeads® und 1 % BSA in PBS auf die Proben aufgeteilt. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads® mit Hilfe des DynaMag™ mit einem Gemisch aus PBS und Co-IP-Zelllysispuffer (1:1) zweimal gewaschen. Danach wurde der komplette Überstand der Dynabeads® entfernt, 50 µl 5x Lämmli-puffer hinzugegeben und für 15 Minuten bei 99 °C aufgeköcht. Die Proben wurden anschließend per SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

2.2.3.3. Deglycosylierung

Für diesen Versuch wurden NIH 3T3- und C2C12-Zellen, die stabil mit dem Konstrukt pQCXIP_iRhom2 und dem Vektor pQCXIP transfiziert wurden, auf 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät (je 1×10^6 Zellen in 10 ml Kulturmedium, 2 µg/ml Puromycin) und nach 24 Stunden mit PMA (100 nM) und im Falle der C2C12-Zellen zusätzlich mit LPS (10 µg/ml) stimuliert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 600 µl Co-IP-Puffer wie oben beschrieben lysiert. Dem Lysat wurden 400 µl PBS und 30 µl Concanavalin A Sepharose hinzugefügt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Concanavalin A Sepharose durch Zentrifugieren bei 1000 g für 5 Minuten sedimentiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit der Hamiltonpipette vollständig entfernt. Das Pellet wurde nun in 70 µl Denaturierungspuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 99 °C aufgeköcht.

Im Anschluss wurden die Proben in je drei Ansätze aufgeteilt und wie folgt behandelt:

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
2,5 µl G5 Puffer	2,5 µl G5 Puffer	2,5 µl G7 Puffer
2,5 µl ddH ₂ O	1,5 µl ddH ₂ O	2,5 µl NP-40
	1 µl Endo-H	1 µl PNGase

Die Proben wurden drei Stunden bei 37 °C inkubiert und danach mit 5x Lämmli versehen, 10 Minuten bei 99 °C denaturiert und mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

2.2.3.4. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur größenabhängigen Auftrennung eines Proteingemisches im elektrischen Feld verwendet. Dabei bildet das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) mit den Proteinen einen Komplex mit konstantem Masse-Ladungsverhältnis. Durch Aufkochen der Proben bei 95 °C für 10 min werden die Proteine linearisiert, da die Wasserstoffbrückenbindungen und somit die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgehoben werden. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch reduzierendes β -Mercaptoethanol im Lämmli-Puffer aufgehoben. Somit können Proteine abhängig von ihrer Masse in der porösen Polyacrylamidmatrix aufgetrennt werden. Die Proben durchliefen zuerst ein 4 % Sammelgel. Dabei wurde für 15 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt. Darauf folgt ein 10% Trenngel mit einem höheren Vernetzungsgrad. Es wurden nun 150 V Spannung angelegt, die Dauer variierte je nach der Größe der zu detektierenden Proteine zwischen 60-180 Minuten. Neben den Proben wurden 3 μ l Proteinmarker zur Größenmarkierung aufgetragen.

2.2.3.5. Proteintransfer durch Western Blotting

Zum Transfer aufgetrennter Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran wurde die Methodik des *Western Blots* genutzt. Eine PVDF-Membran wurde für 2 Minuten mit Methanol aktiviert und auf das Gel gelegt. Umgeben von in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier wurden Gel und Membran in eine mit dünnen Schwämmen ausgekleidete Gelhalterungskassette eingelegt. Diese wurde in die Blotkammer eingesetzt und die Kammer mit Transferpuffer ausgefüllt. Es wurde eine Spannung von 90 V für zwei Stunden angelegt, die bewirkt, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertreten. Der Blottingvorgang wurde durch Lagerung der Kammer in Eis und einen innenliegenden Kühlakku vor Überhitzung geschützt. Anschließend wurde die Membran wieder entnommen. Durch den farbigen Proteinmarker konnte der Erfolg des Blottingvorgangs erkannt werden. Die Membran wurde nun mit 6% Milchpulver in TBS-T für zwei Stunden blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in seiner spezifischen Verdünnung (Tabelle 2.4) in TBS-T mit 6% Milchpulver aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Einen Tag darauf erfolgte das dreimalige Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Minuten und die Applikation des Sekundärantikörpers (Tabelle 2.5) in TBS-T mit 6% Milchpulver. Die Inkubation des Sekundärantikörpers dauerte eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Da der Sekundärantikörper mit Peroxidase markiert ist, kommt es bei der Entwicklung mit einem

Luminol-haltigen Substrat (Super Signal® West Femto von Thermo Scientific Massachusetts, USA) zu Chemilumineszenz. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols und es kommt zur Lichtfreisetzung. Diese wird durch Scannen sichtbar gemacht.

2.2.3.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Man nutzt die ELISA-Technik für den spezifischen, quantitativen Nachweis eines Proteins. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Enzyme Linked Immunosorbent Assays (im Folgenden als ELISA bezeichnet) gegen Tumor necrosis factor receptor I (TNFR-I) und gegen Tumor necrosis factor receptor II (TNFR-II) mit Hilfe des DuoSet® ELISA (Development Systems R&D Systems; Minneapolis, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll (siehe Anhang) durchgeführt.

Bei der hier verwendeten Sandwichtechnik bindet der Capture-Antikörper einerseits an eine proteinbindende 96-Lochplatte und andererseits an das Antigen. Das auf der Lochplatte gebundene Antigen wird durch den Detection-Antikörper, welcher gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichtet ist, nachgewiesen. An diesen Sekundärantikörper bindet HRP, die das hinzugesetzte Substrat Tetramethylbenzidin umsetzt. Bei dieser Reaktion nimmt die Substratlösung eine blaue Färbung an, deren Intensität proportional zur gebundenen Menge von Antigen ist. Die Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt und es findet ein Farbumschlag zu Gelb statt. Anschließend wird die Intensität dieser Farbe im Fotometer gemessen und die Menge des detektierten Proteins anhand der Standardwerte errechnet.

2.2.3.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Messmethode zur Charakterisierung von lebenden Zellen. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Anregung von Zellen durch einen Laser. Die Zellen gleiten in einem laminaren Probenstrom einzeln am Laser vorbei und streuen das auftreffende Licht in verschiedene Richtungen. Dieses wird durch ein optisches System auf Spiegeln und Filtern nach Wellenlängen aufgeteilt und durch Detektoren gemessen. Ein Teil des Lichts wird in Vorwärtsrichtung abgelenkt und gibt Aufschluss über die Größe der angeregten Zellen. Dieser Anteil wird als *Forwardscatter* (FCS) bezeichnet. Der andere Teil des Lichts wird im rechten Winkel gestreut. Dieses Licht wird als *Sidescatter* (SSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Zellgranularität. Zusätzlich können die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert werden. Durch den Laser werden die

Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Man kann so durch Immunfärbung Antigene auf der Zelloberfläche nachweisen.

Die Zellen wurden auf ihrer Kulturschale mit PBS gewaschen und durch 5 minütige Behandlung mit Acutase bei 37 °C abgelöst. HEK-Zellen wurden aufgrund ihrer geringen Adhäsion durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren suspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C durch Zentrifugieren sedimentiert. Diese Bedingungen wurden bei allen folgenden Zentrifugierungsschritten eingehalten. Ein Waschschrift beinhaltet dieses Sedimentieren, das Verwerfen des Überstands und das Resuspendieren der Zellen in FACS-Puffer. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden diese in 500 µl PBS mit 10 % FCS in PBS resuspendiert und 10 Minuten inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu reduzieren. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und entsprechend der Anzahl der anschließenden Färbungen aufgeteilt. Es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4 °C für eine Stunde. Dabei wurde ein Teil der Zellen nicht mit Primärantikörper gefärbt, um als Referenz für die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu dienen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden alle Proben mit dem fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit) für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in FACS-Puffer gemäß der Tabellen 2.4 und 2.5. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

Die FACS-Analyse der Proben erfolgte mit dem FACSCanto Flow Cytometer (BD Bioscience; San Jose, USA) und der dazugehörigen Software. Da alle Proben mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit gefärbt wurden, erfolgte die Messung im FITC-Kanal, da das Emissionsmaximum der Fluorochrome Alexa Fluor® und FITC bei derselben Wellenlänge von 519 nm liegt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit soll ermittelt werden, ob die Generierung einer iRhom2 transgenen Maus der weiteren Erforschung des Proteins iRhom2 und seiner Funktion als regulatorisches Transportprotein von ADAM17 zuträglich wäre und weitere Hinweise auf die Funktion von ADAM17 geben könnte.

3.1. Klonierungsergebnisse

Die verwendeten DNA-Konstrukte wurden entweder selbst generiert, oder, wie aufgeführt, von Arbeitsgruppenmitgliedern und Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Das Ziel der Klonierung verschiedener ADAM17-Mutationsformen besteht darin, ADAM17-Proteine in verkürzter oder modifizierter Aminosäuresequenz für nachfolgende Versuche zu exprimieren. Darüber hinaus wurden Plasmide zur transienten oder stabilen Transfektion von iRhom2 generiert.

Tabelle 3.1: Übersicht der zur Verfügung gestellten Plasmide. AS: Aminosäure, TMD: Transmembrandomäne, GPI: Glycosylphosphatidylinositol, TRAIL: Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand

Bezeichnung	Insert	Erhalten von
pcDNA3.1_ADAM17 Δ 700	ADAM17 c-terminal verkürzt (AS 1-699)	Jeanette Schwarz, AG Chalaris, Biochemisches Institut Kiel
pcDNA3.1_ADAM17 Δ CT	ADAM17 ohne cytoplasmatischen Teil (AS 1- 692)	Christoph Garbers /Jeanette Schwarz, AG Chalaris, Biochemisches Institut Kiel
pcDNA3.1_ADAM17gpi	ADAM17 ohne cytoplasmatischen Teil, TMD wurde durch GPI-Anker des TRAIL-Proteins ersetzt	Jeanette Schwarz, AG Chalaris, Biochemisches Institut Kiel
pcDNA3.1_ADAM17ttkt	ADAM17-TMD wurde durch die TMD von ADAM10 ausgetauscht	Marc Schulte, AG Saftig, Biochemisches Institut Kiel

Klonierung des Konstrukts pcDNA4TO3xflag-c_iRhom2

Exemplarisch für die Klonierung aller selbst generierten Plasmide wird im Folgenden die Klonierung des Konstrukts pcDNA4TO3xflag-c_iRhom2 dargestellt. Die Gewinnung der cDNA von iRhom2 erfolgte mittels PCR mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Primern. Grundlage dafür war aus muriner Milz hergestellte cDNA. Über einen zweiten PCR-Schritt wurden Restriktionsstellen angefügt. Daraufhin wurden der Vektor pcDNA4TO3xflag-c und das Insert mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRI hydrolysiert. Bei dem im Vektor enthaltenen 3xflag-tag handelt es sich um einen DNA-Abschnitt, der für ein sogenanntes Protein-tag kodiert. Dieses Polypeptid wird gemeinsam mit dem durch das cDNA-Insert kodierten Protein exprimiert und kann vom α -flag-Antikörper erkannt werden. Durch das Einbringen dieses 3xflag-tags wurde die Erkennung des Proteins iRhom2 ermöglicht. Nach der Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurden Vektor und Insert ligiert. Anschließend erfolgten die bakterielle Amplifikation und die chemische Präparation der Plasmid-DNA. Daraufhin wurde das Plasmid zum Sequenzieren der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, D) zugesandt. Das Sequenzierungsergebnis wurde mit Hilfe der aus der Literatur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) stammenden Basensequenz von iRhom2 überprüft. Hierauf wurde das Plasmid transient in HEK-Zellen transfiziert, diese wurden lysiert und die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach Immunfärbung mit einem α -flag-Antikörper wurde in den Lysaten der mit dem Plasmid pcDNA4TO3xflag-c_iRhom2 transfizierten HEK-Zellen eine Bande auf der Höhe von 110 kDa nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle dienten Zelllysate von HEK-Zellen, die mit den Fluoreszenzproteinen EYFP und mCherry transfiziert wurden.

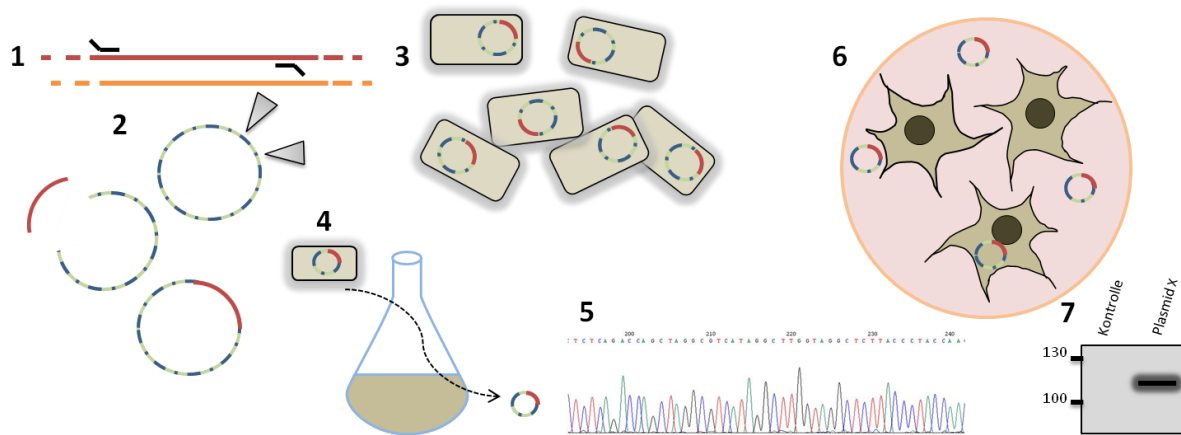


Abbildung 3.1: Arbeitsablauf der Klonierung eines Konstrukts. 1) Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts mittels PCR. Durch das Design der synthetischen Oligonukleotide werden dem neu synthetisierten DNA-Fragment Restriktionsstellen angehängt. 2) Restriktionshydrolyse des Ausgangsvektors und des Inserts. 3) Transformation des Plasmids in kompetente Bakterien und dessen Amplifikation durch Vermehrung der Bakterien 4) Chemische Präparation der Plasmid-DNA aus den Bakterien 5) Sequenzierung des klonierten Konstrukts durch GATC Biotech AG (Konstanz, D) 6) Transfektion von HEK-Zellen 7) Nach Ernten und Lysieren der transfizierten Zellen erfolgt die Expressionskontrolle durch SDS-PAGE und *Western Blot*.

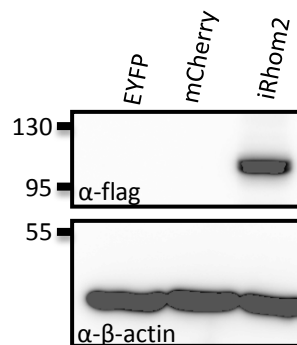


Abbildung 3.2: Expressionsnachweis von iRhom2 in transient transfizierten HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden mit dem Konstrukt pcDNA4TO3xflag-c_iRhom2, EYFP und mCherry transfiziert und nach 24 Stunden lysiert. Die Lysate wurden per SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Immunfärbung mit dem Primärantikörper α -flag M2 und dem entsprechenden Sekundärantikörper goat anti-mouse #31432 (Konzentrationen entsprechend Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5)

Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden die folgenden Konstrukte mit Hilfe der Tabelle 2.3 in angegebenen synthetischen Oligonukleotide kloniert. Die Vektorkarten befinden sich im Anhang.

Tabelle 3.2: Übersicht der klonierten Plasmide

Bezeichnung	Insert	Vektor
pcDNA4TO3xflag-c_iRhom2	iRhom2	pcDNA4TO3xflag-c
pcDNA3.1_mCherry	mCherry	pcDNA3.1
pQCXIP_3xflag-c_iRhom2	iRhom2	pQCXIP_3xflag-c
pcDNA3.1_ADAM17	ADAM17	pcDNA3.1
pcDNA3.1_ADAM17kat	ADAM17 ohne Prodomäne (AS 223-827)	pcDNA3.1
pcDNA3.1_ADAM17dis	ADAM17 ohne Prodomäne und katalytische Domäne	pcDNA3.1
pcDNA3.1_ADAM17egf	ADAM17 ohne Prodomäne, katalytische Domäne und Disintegrindomäne (AS 578-827)	pcDNA3.1

3.2. Aktivitätssteigerung von ADAM17 durch Überexpression von iRhom2

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ADAM17-vermittelte Proteolyse (*Shedding*) durch die Überexpression von iRhom2 beeinflusst wird.

3.2.1. Herstellung von iRhom2 transgenen Zelllinien

Um die Expression von iRhom2 für nachfolgende Versuche konstant zu halten, wurden NIH 3T3- und C2C12-Zellen durch retrovirale Transduktion stabil mit iRhom2 transfiziert. Nach erfolgreicher Kultivierung der stabil transfizierten Zellen unter Selektionsdruck, wurde die Expression des eingebrachten Gens kontrolliert. Dazu wurden Zelllysate aufgearbeitet, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Immunfärbung mit dem Primärantikörper α -flag M2, der gegen das eingebrachte *3xflag-tag* gerichtet ist, wird in den Lysaten der iRhom2 transgenen C2C12-Zellen auf der Höhe von 110 kDa eine Bande nachgewiesen. Die Lysate der Kontrollzellen zeigen kein Signal. Die iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen zeigten im

Western Blot eine Bande bei 110 kDa (Bahn 5-8); die Lysate der Kontrollzellen zeigten kein Signal (Bahn 1-4). In allen Bahnen konnte nach Immunfärbung mit einem gegen Aktin gerichteten Antikörper eine Bande bei 40 kDa nachgewiesen werden. Die transfizierten Zellen überexprimieren iRhom2 und werden im Folgenden als NIH 3T3_iRhom2 und C2C12_iRhom2 bezeichnet. Gleichzeitig wurden Kontrollzelllinien durch stabile Transfektion des Leervektors pQCXIP generiert, die NIH 3T3_cv und C2C12_cv benannt wurden.

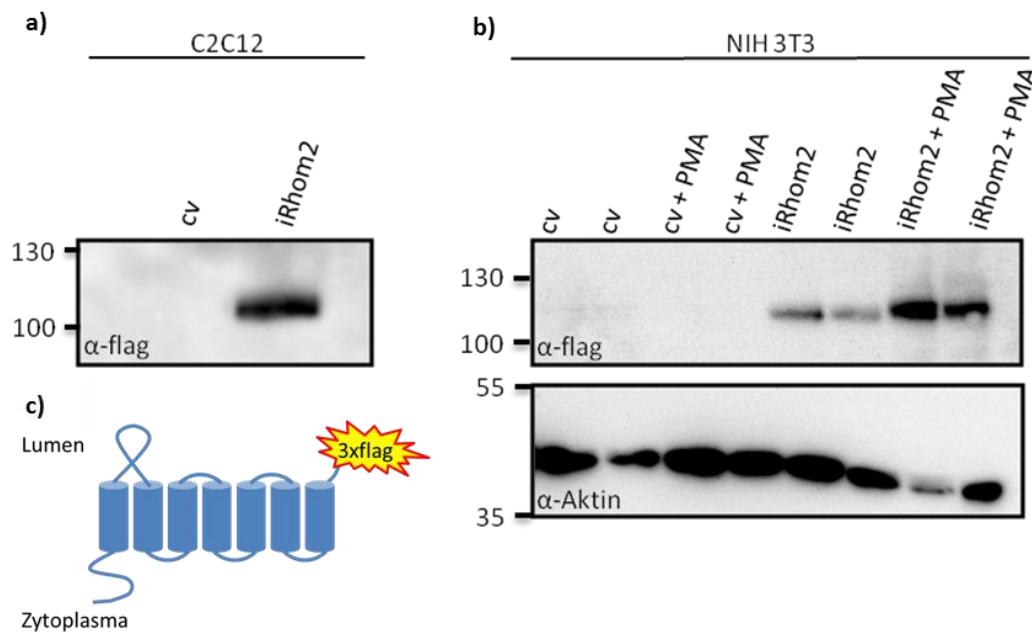


Abbildung 3.3: Expressionsnachweis der iRhom2 stabil überexprimierenden Zellen. a) und b) Die stabil mit dem Kontrollvektor und iRhom2 transfizierten Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät und nach 24 Stunden lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Zum Nachweis von iRhom2 erfolgte die Immunfärbung mit dem Primärantikörper α -flag M2 und dem entsprechenden Sekundärantikörper goat anti-mouse #31432 (Konzentrationen entsprechend Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5) c) Das *3x-flag-tag* befindet sich am c-terminalen Ende von iRhom2.

3.2.2. Bestimmung des ADAM17mRNA-Expressionslevels der Zelllinien NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2

Um das Expressionslevel von ADAM17 in den Zelllinien relativ zueinander zu bestimmen, wurde eine *Real-time-PCR* mit zwei verschiedenen Sonden durchgeführt. Die Messung zeigt, dass die ADAM17-Expression in den iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen zwischen 70-87 % der Expression der Kontrollzellen beträgt.

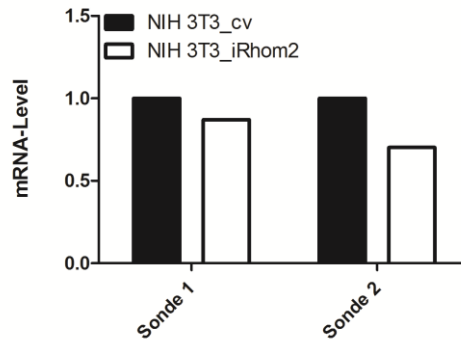


Abbildung 3.4: ADAM17mRNA-Expressionslevel von ADAM17 der Zellen NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2. Nach der Herstellung der cDNA der oben genannten Zellen wurde eine *Real-time-PCR* mit zwei ADAM17-spezifischen Sonden durchgeführt. Die Expression der Kontrollzellen wurde auf den Wert 1 normiert.

3.2.3. Konstitutive Freisetzung von TNFR-I und TNFR-II von iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen und nach PMA-Stimulation

Es wurde gezeigt, dass ADAM17 in iRhom2 defizienten Zellen nicht an die Oberfläche gelangt und die proteolytische Freisetzung von TNF α stark vermindert ist (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012). Im Umkehrschluss soll anhand des nachfolgenden Experiments untersucht werden, ob die Überexpression von iRhom2 die katalytische Aktivität von ADAM17 steigern kann. Die Konzentration von löslichem TNFR-I und TNFR-II wurden in Überständen iRhom2 überexprimierender NIH 3T3- und C2C12-Zellen und den dazugehörigen Kontrollzellen untersucht. TNFR-I und TNFR-II sind Substrate von ADAM17 und eignen sich zur quantitativen Bestimmung der katalytischen Aktivität der Protease (Chanthaphavong et al., 2012). Die NIH 3T3_cv- und NIH 3T3_iRhom2-Zellen wurden in gleicher Zellzahl jeweils doppelt ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium erneuert und ein Teil der Zellen mit 100 nM PMA stimuliert. Nach ein bzw. zwei Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und bei -20 °C gelagert. Es erfolgte die Analyse der löslichen TNFR-I- und TNFR-II-Konzentration mittels ELISA. Dieser zeigt, dass die TNFR-I- und TNFR-II-Konzentrationen in den Überständen der iRhom2 transgenen Zellen um das 1,5-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigert sind. Durch die einstündige bzw. zweistündige PMA-Stimulation kommt es in den Überständen der NIH 3T3_cv-Zellen und den NIH 3T3-Zellen gleichermaßen zu einer Steigerung der TNFR-I-Proteolyse um das 3-fache. Die Konzentration des löslichen TNFR-II ist in den Überständen der NIH 3T3_cv- und NIH 3T3_iRhom2-Zellen nach PMA-Stimulation für ein oder zwei Stunden im Vergleich zu der Konzentration in den Überständen der unstimulierten Zellen ebenfalls um das 3-fache angestiegen. In den Überständen von iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen ist die Konzentration des TNFR-II in den Überständen um das

1,5-fache erhöht. Die ADAM17-Substrate TNFR-I und TNFR-II werden durch Überexpression von iRhom2 um das 1,5-fache mehr sezerniert.

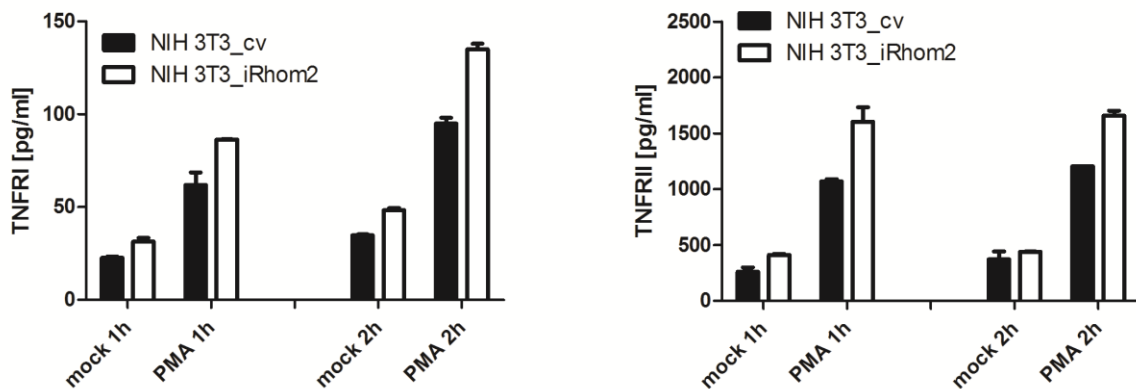


Abbildung 3.5: TNFR-I- und TNFR-II-Freisetzung von iRhom2 überexprimierenden NIH 3T3-Zellen und Kontrollzellen im Vergleich. Die Zelllinien NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iR2 wurden in gleicher Zellzahl ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte nach Mediumwechsel die Stimulation der Zellen für ein oder zwei Stunden mit 100 nM PMA. Lösliche TNFR-I und TNFR-II-Konzentrationen der Überstände wurden mittels ELISA analysiert. Dieses Experiment steht für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Um zu ermitteln, ob es eine Abweichung in der zeitabhängigen Freisetzung von TNFR-I zwischen iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen und den Kontrollzellen gibt, wurde der oben beschriebene Versuch unter gleichen Bedingungen wiederholt und die Entnahme der Überstände erfolgte nach zwei, vier und sechs Stunden. Die TNFR-I-Konzentration in den Überständen der iRhom2 transgenen Zellen ist zu den ermittelten Zeitpunkten sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach PMA-Stimulation zwischen 1,3-fache bis 2-fache erhöht. Dabei konnte im zeitlichen Verlauf kein Unterschied im Anstieg der TNFR-I-Konzentration durch Überexpression von iRhom2 beobachtet werden. Beide Zelllinien setzten zeitabhängig eine ansteigende Menge von löslichem TNFR-I frei. Das Verhältnis der Intervalle ist dabei gleich.

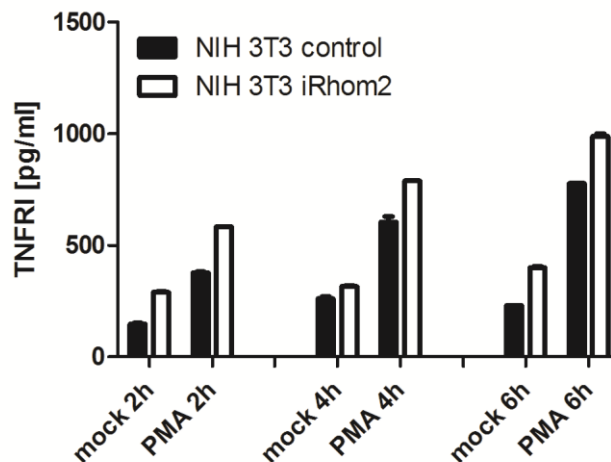


Abbildung 3.6: TNFR-I und TNFR-II Shedding von iRhom2 überexprimierenden NIH 3T3-Zellen und Kontrollzellen im zeitlichen Verlauf. Analog zum oben beschriebenen Experiment wurden stabil transfizierte Zelllinien NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iR2 in gleicher Zellzahl ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte nach Mediumwechsel die Stimulation der Zellen für zwei, vier und sechs Stunden mit 100 nM PMA. Die Konzentration von TNFR-I und TNFR-II der Überstände wurden mittels ELISA analysiert. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt.

Analog zu dem oben beschriebenen Versuch wurden die Zelllinien C2C12_iRhom2 und C2C12_cv in gleicher Zellzahl ausgesät und mit 100 nM PMA für zwei Stunden stimuliert und die Konzentration von TNFR-I und TNFR-II in den Überständen mittels ELISA ermittelt. Dabei wurde in den Überständen der iRhom2-transgenen C2C12-Zellen deutlich höhere Konzentrationen von löslichem TNFR-I und TNFR-II nachgewiesen. Die TNFR-I-Konzentration ist in den Überständen der C2C12_iRhom2-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach PMA-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollzellen verdoppelt. Die Freisetzung von TNFR-II durch iRhom2 transgene C2C12-Zellen ist konstitutiv verdoppelt und nach PMA-Stimulation 1,5-fach gesteigert. Auch in diesem Versuch konnte keine Differenz des Verhältnisses von löslichem TNFR-I von unstimulierten zu PMA-stimulierten Zellen zwischen den beiden Zelllinien C2C12_cv und C2C12_iRhom2 nachgewiesen werden.

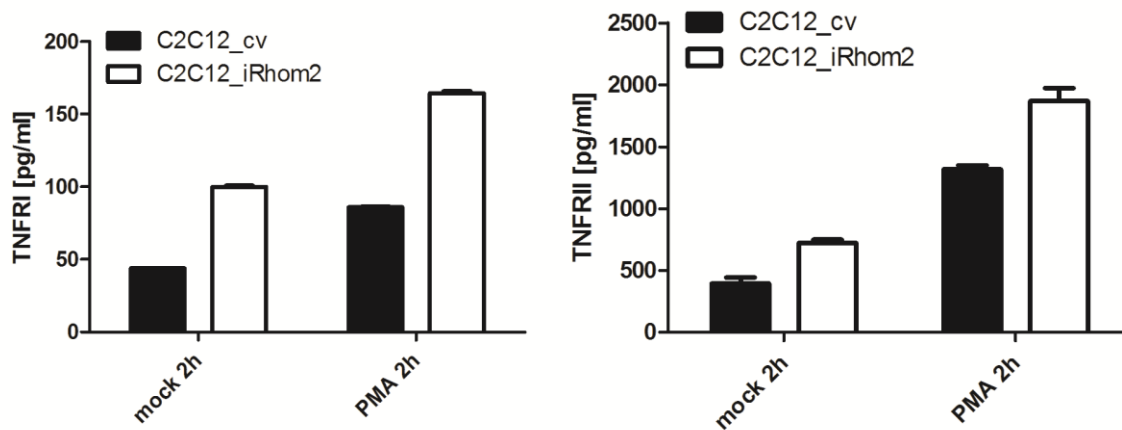


Abbildung 3.7: Konzentration von TNFR-I und TNFR-II in Überständen iRhom2 transgener C2C12-Zellen und Kontrollzellen im Vergleich. Die Zelllinien C2C12_cv und C2C12_iR2 wurden in gleicher Zellzahl ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und die Stimulation der Zellen für zwei Stunden mit 100 nM PMA. Die TNFR-I und TNFR-II-Konzentrationen der Überstände wurden mittels ELISA analysiert. Dieser Versuch steht exemplarisch für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TNFR-I- und TNFR-II-Konzentrationen in den Überständen sowohl konstitutiv als auch nach PMA-Stimulation durch die Überexpression von iRhom2 in einem Bereich von 1,5-fach bis 2-fach gesteigert sind. Nach PMA-Stimulation sind die TNFR-I- und TNFR-II-Konzentrationen in den Überständen aller untersuchten Zelllinien gesteigert. Es kann dabei kein Unterschied im Anstieg der Konzentrationen zwischen iRhom2 überexprimierenden und Kontrollzellen nachgewiesen werden.

3.3. Untersuchung von Maturierung und Transport von ADAM17 in iRhom2 transgenen Zellen

3.3.1. Deglycosylierung von Zelllysaten von iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen

Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass iRhom2 die Maturierung von ADAM17 beeinflusst (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012). Daher soll untersucht werden, ob die Erhöhung der Konzentration von löslichem TNFR-I und TNFR-II in den Überständen iRhom2-transgener Zellen mit einer beschleunigten Maturierung von ADAM17 erklärt werden kann. Dazu soll die Untersuchung verschiedener Glykosylierungsstufen von ADAM17 durch enzymatische Deglycosylierung genutzt werden. Die Glykosylierung eines Proteins dient als Schutz vor proteolytischem Abbau und erhöht seine Stabilität. Darüber hinaus wird durch das Anhängen der Oligosaccharide der Transport des Proteins zur Zellmembran reguliert. Posttranslational erfolgt die Glykosylierung von ADAM17 mit N-Glykanen im ER. Die Zuckerreste werden im Golgi-Apparat modifiziert und können dann vom Enzym

Endoglykosidase H (Endo-H) nicht mehr abgespalten werden (Adrain et al., 2012). Die Peptid N-Glycosidase F (PNGase F) spaltet alle N-Glykane. Durch die Behandlung von Zelllysaten mit Endo-H und PNGase F können verschiedene Glykosylierungsstufen nachgewiesen und somit der Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche nachvollzogen werden.

NIH 3T3_cv- und NIH 3T3_iRhom2-Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät und nach 24 Stunden lysiert. Es folgte eine Konzentrierung aller Glykoproteine mit Concanavalin A und die Behandlung der Proben mit Endo-H und PNGase F wie unter Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels *Western Blot* werden durch die Immunfärbung mit einem gegen ADAM17 gerichteten Primärantikörper verschiedene Glykosylierungsstufen von ADAM17 sichtbar. Die unbehandelten Lysate der NIH 3T3_cv-Zellen zeigen im unbehandelten Zustand eine Bande bei 130 kDa und eine schwächere Bande bei ca. 115 kDa (erste Bahn). Nach Endo-H-Behandlung wird in der zweiten Spur eine starke Bande bei 120 kDa und ein breiter Schleier bei 110 kDa detektiert. Die mit PNGase F behandelten Lysate zeigen eine Bande auf der Höhe von 120 kDa und eine schwächere Bande bei 80 kDa. In der fünften, sechsten und siebten Bahn sind analog dazu die Lysate der NIH 3T3_iRhom2-Zellen in gleicher Abfolge aufgetragen. Die detektierten Banden entsprechen dabei denen der Kontrollzellen.

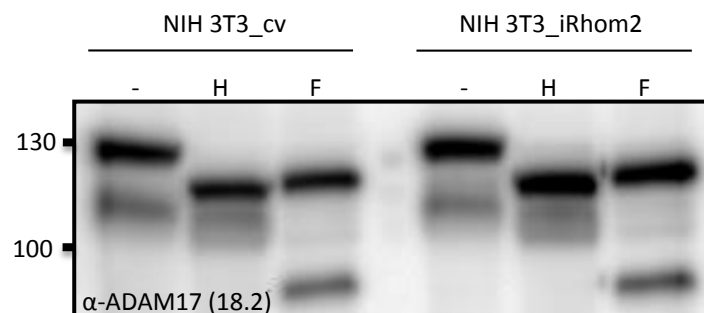


Abbildung 3.8: Deglycosylierung von ADAM17 in NIH 3T3_iRhom2- und NIH 3T3_cv-Zelllysaten. Lysate von NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2 wurden mit Concanavalin A gefällt und mit Endo-H und PNGase F wie unter Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben behandelt, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunfärbung erfolgte mit dem Primärantikörper α -ADAM17 18.2 und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit #31462 (Konzentrationen entsprechend Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5)

Da der oben beschriebene Versuch der Deglycosylierung von Lysaten der Zelllinien NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2 keine Differenz zwischen iRhom2 überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen gezeigt hat, wurden die Zellen im folgenden Versuch für zwei Stunden mit PMA stimuliert. Das Bandenmuster der Lysate der unstimulierten NIH 3T3_cv- und NIH 3T3_iRhom2 ist im *Western Blot*, welcher mit einem gegen ADAM17 gerichteten Antikörper inkubiert wurde, ist identisch mit dem oben beschriebenen Ergebnis. Nach zwei Stunden PMA-Stimulation sind die

jeweils niedriger laufenden Banden der unbehandelten, Endo-H behandelten und PNGase F behandelten Lysate weniger deutlich ausgeprägt. Dies gilt gleichermaßen für die Lysate der iRhom2 transgenen Zellen sowie für die Lysate der Kontrollzellen. Die Banden der iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen sind sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach PMA-Stimulation stärker als die der Kontrollzellen. Darüber hinaus kann zwischen iRhom2 transgenen Zellen und den Kontrollzellen kein Unterschied nachgewiesen werden.

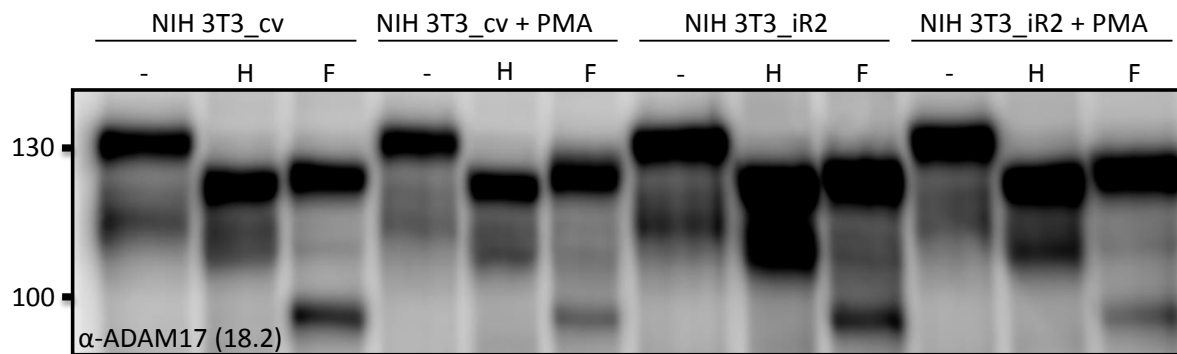


Abbildung 3.9: Deglycosylierung von ADAM17 Lysaten von PMA-stimulierten NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2. NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2 wurden in gleicher Zellzahl ausgesät und nach 24 Stunden mit 100 nM PMA für zwei Stunden stimuliert und anschließend lysiert. Die Glykoproteine der Lysate wurden wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben mit Concanavalin A konzentriert, mit Endo-H und PNGase F behandelt und per SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Immunfärbung erfolgte mit dem Primärantikörper α -ADAM17 18.2 und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit #31462 (Konzentrationen entsprechend Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5)

Das oben beschriebene Experiment wurde mit den Zelllinien C2C12_cv und C2C12_iRhom2 wiederholt, da diese Zelllinien den *Toll-like Receptor 4* (TLR 4) exprimieren, der als Teil des angeborenen Immunsystems Lipopolysachcharide (LPS), ein Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien, rezeptiert (Akira et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass während der darauf folgenden Immunantwort die Shedding-Aktivität von ADAM17 gesteigert werden kann (Chanthaphavong et al., 2012). Die Lysate der C2C12_cv- und C2C12_iRhom2-Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immunfärbung mit einem gegen ADAM17 gerichteten Antikörper (18.2). Die unbehandelten Lysate der Kontrollzellen zeigen eine Bande bei 130 kDa und eine schwächere bei 115 kDa. Nach Endo-H-Behandlung wird eine Bande auf der Höhe von 120 kDa und eine weitere, schwächere bei 110 kDa detektiert. Alle PNGase F-behandelten Proben der Kontrollzellen zeigen eine breite Bande bei 120 kDa, eine sehr schwache bei 110 kDa und eine schwache bei 80 kDa. Durch PMA-Stimulation werden die in der jeweiligen Bahn tiefer laufenden Banden nach Endo-H und PNGase F sowie unbehandelt abgeschwächt. Nach LPS-Stimulation werden in den Lysaten der Kontrollzellen keine Unterschiede mittels *Western Blot*-Analyse erkennbar.

Die Lysate der iRhom2 transgenen C2C12-Zellen zeigen ohne enzymatische Behandlung eine Bande bei 130 kDa und eine bei 115 kDa. Nach Endo-H-Behandlung wird eine Bande bei 120 kDa und eine bei 110 kDa detektiert. In der Spur der PNGase F-behandelten Lysate wird eine Bande bei 120 kDa und eine Bande bei 80 kDa sichtbar. Nach PMA-Stimulation werden die jeweilig tiefer laufenden Banden in jeder der drei Bahnen im Fall der C2C12_iRhom2-Zellen schwächer, während die höher laufenden Bahnen stärker werden. Nach LPS-Stimulation wird keine Differenz in Intensität oder Höhe der detektierten Bahnen sichtbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nachgewiesenen Glykosylierungsformen von ADAM17 durch Überexpression von iRhom2 nicht beeinflusst wurden.

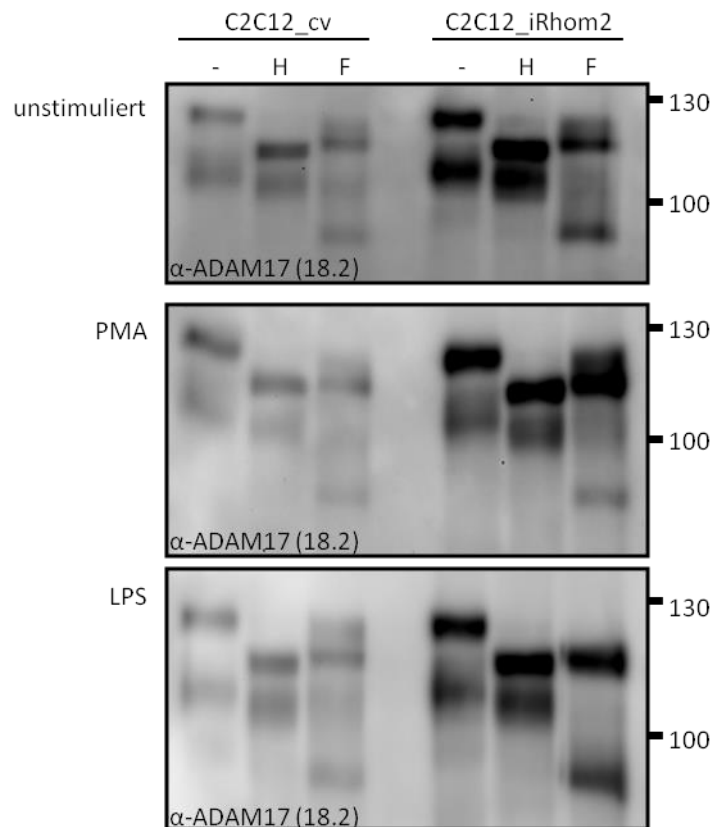


Abbildung 3.10: Deglycosylierung von Lysaten von LPS- und PMA-stimulierten C2C12_cv-Zellen und C2C12_iRhom2-Zellen. iRhom2 transgene C2C12-Zellen und Kontrollzellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät und nach 24 Stunden mit 100 nM PMA bzw. 10 µg/ml LPS stimuliert. Die Lysate wurden wie oben beschrieben (Abschnitt 2.2.3.3) mit Endo-H (500 U) und PNGase F (500 U) für 180 min behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels *Western Blot* erfolgte die Immunfärbung mit dem Primärantikörper α-ADAM17 18.2 und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit #31462 (Konzentrationen entsprechend Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5)

3.3.2. Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen

Um zu untersuchen, ob durch Überexpression von iRhom2 eine erhöhte Oberflächenexpression von ADAM17 erzielt wird, soll die Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche iRhom2-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen mittels Durchflusszytometrie verglichen werden.

NIH 3T3_cv- und NIH 3T3_iRhom2-Zellen wurden für eine Stunde mit 100 nM PMA stimuliert. Es erfolgte eine Immunfärbung der lebenden Zellen mit einem gegen ADAM17 gerichteten Antikörper und einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper. Um zu ermitteln, in welchem Ausmaß der Sekundärantikörper unspezifisch bindet, wurden Zellen nur mit diesem inkubiert. Dieser Anteil wird als Sekundärkontrolle bezeichnet und ist im Histogramm grau dargestellt. Die Messung zeigt eine höhere Fluoreszenzintensität der NIH 3T3_iRhom2-Zellen (grün) im Vergleich zu den Kontrollzellen (blau). Das heißt, dass die Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen höher ist, als auf den Kontrollzellen. Die Stimulation mit PMA führte zur keiner weiteren Erhöhung der Oberflächenexpression.

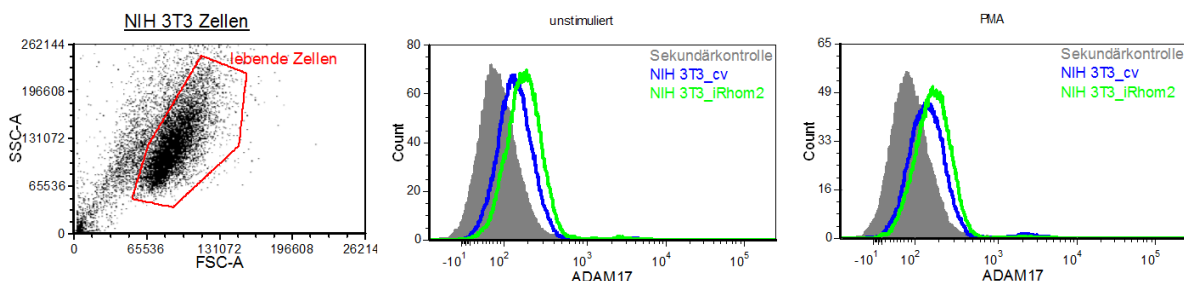


Abbildung 3.11: Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen und den dazugehörigen Kontrollzellen. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben mit einem gegen ADAM17 gerichteten Primärantikörper K133 (Tabelle 2.4) und dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (Tabelle 2.5) inkubiert. Die Fluoreszenzmessung mit dem Durchflusszytometer erfolgte im FITC-Kanal. Das dargestellte Ergebnis steht für vier unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Der oben beschriebene Versuch wurde mit den Zelllinien C2C12_iRhom2 und C2C12_cv mit identischer Vorgehensweise durchgeführt. Die gemessene Fluoreszenzintensität der iRhom2 transgenen Zellen war gegenüber den Kontrollzellen deutlich erhöht. Daraus folgt, dass die Oberflächenexpression von ADAM17 der C2C12_iRhom2-Zellen gegenüber den Kontrollzellen

erhöht ist. Durch PMA-Stimulation konnte die Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen C2C12-Zellen und den Kontrollzellen gesteigert werden.

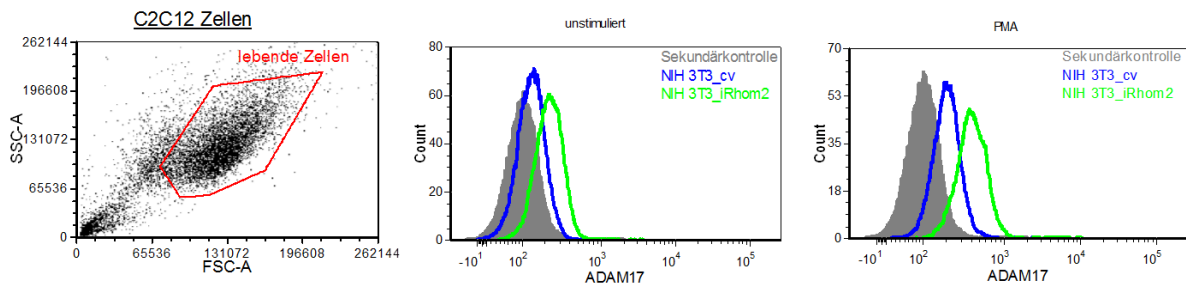


Abbildung 3.12: Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen C2C12-Zellen und den dazugehörigen Kontrollzellen. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben mit dem gegen ADAM17 gerichteten Primärantikörper K133 (Tabelle 2.4) und dem Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (Tabelle 2.5) inkubiert. Die Fluoreszenzmessung mit dem Durchflusszytometer erfolgte im FITC-Kanal. Das dargestellte Ergebnis steht für vier unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.4. Studien zum Interaktionsmotiv von ADAM17 bei der Bindung mit iRhom2

Adrain et al. haben nachgewiesen, dass ADAM17 und iRhom2 einander binden und ADAM17 durch Immunopräzipitation von iRhom2 ebenfalls gefällt wird (Adrain et al., 2012). Um die Domäne von ADAM17 zu identifizieren, die an der Bindung von iRhom2 beteiligt ist, wurden Plasmide mit verschiedenen ADAM17-Deletionsmutanten kloniert oder von Arbeitsgruppenmitgliedern und Kooperationspartnern freundlicherweise zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2)

3.4.1. Expressionsnachweis der ADAM17-Mutanten in HEK-Zellen

Nach der Klonierung von Plasmiden, die verschiedene ADAM17-Mutanten enthalten (siehe Tabelle 2.6), wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot* die Expression dieser Mutanten kontrolliert. Da den Mutationsformen verschiedene Domänen von ADAM17 fehlen, wurden zwei unterschiedliche Antikörper eingesetzt. Der Primärantikörper α -ADAM17 18.2 detektiert den intrazellulären Teil von ADAM17 und wird daher zum Nachweis der Mutanten ADAM17kat, ADAM17dis und ADAM17egf genutzt. ADAM17-Mutanten, denen der c-terminale Teil fehlt, können mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden. Der Primärantikörper α -ADAM17 10.1 detektiert den extrazellulären Teil von ADAM17 und wird daher zum Nachweis der Mutanten ADAM Δ 700, ADAM17 Δ CT und ADAM17gpi eingesetzt. ADAM17ttkt kann von beiden Primärantikörpern nachgewiesen werden.

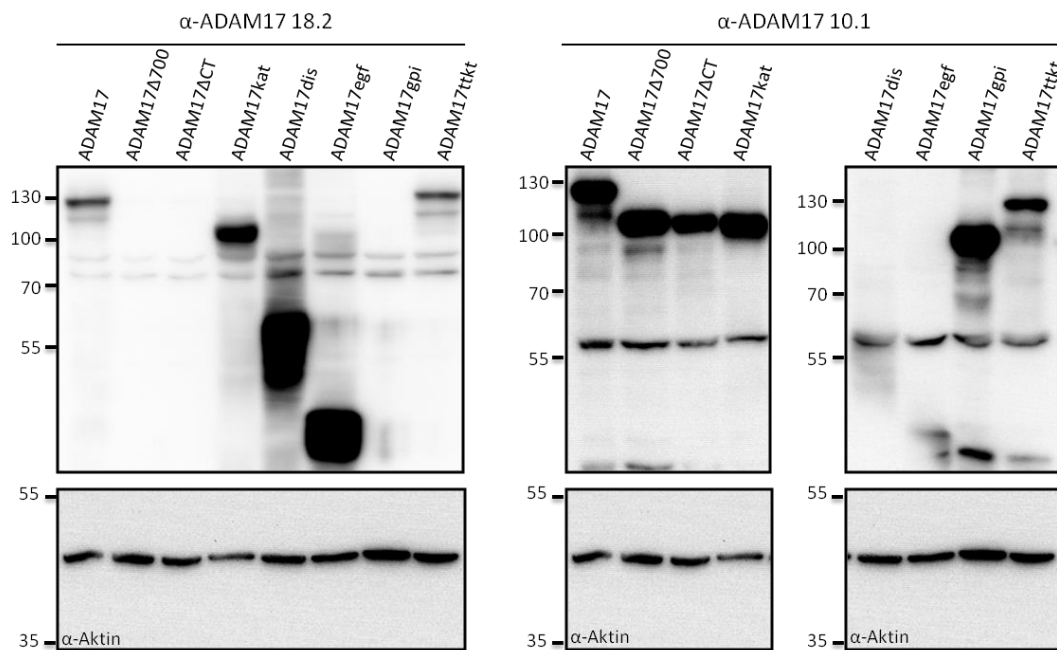


Abbildung 3.13: Expressionsnachweis von ADAM17-Mutanten mit verschiedenen Antikörpern. HEK-Zellen wurden mit ADAM17, ADAM17 Δ 700, ADAM17 Δ CT, ADAM17kat, ADAM17dis, ADAM17egf, ADAM17gpi und ADAM17ttkt transfiziert. Die Lysate dieser Zellen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Immunfärbung erfolgte mit den α -ADAM17-Antikörpern 10.1 und 18.2. und mit α -Aktin (siehe Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5).

3.4.2. Oberflächenexpression der klonierten ADAM17-Mutanten in HEK-Zellen

Zur Überprüfung der Oberflächenexpression der klonierten ADAM17-Mutationsformen wurden HEK-Zellen mit den Konstrukten ADAM17, ADAM17kat, ADAM17dis, ADAM17egf und ADAM17gpi transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben die Immunfärbung für die Fluoreszenzmessung im Durchflusszytometer. Dabei wurde als Referenzwert die Fluoreszenzintensität von HEK-Zellen, die mit mCherry transfiziert wurden, gemessen (schwarz im Histogramm dargestellt). Da das Fluoreszenzprotein mCherry mit 587 nm angeregt wird und Fluoreszenz der Wellenlänge 610 nm emittiert, wird dieses nicht im FITC-Kanal (EX=488; EM=519) detektiert, in dem die ADAM17-Expression detektiert wird. Um zu ermitteln, in welchem Maß der Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper unspezifisch bindet, wurden die Zellen nur mit diesem inkubiert. Ihre Fluoreszenz ist als Sekundärkontrolle im Histogramm grau dargestellt. Die Durchflusszytometrie der HEK-Zellen, die mit den oben genannten Plasmiden transfiziert wurden, zeigt, dass die Intensität der emittierten Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich erhöht ist.

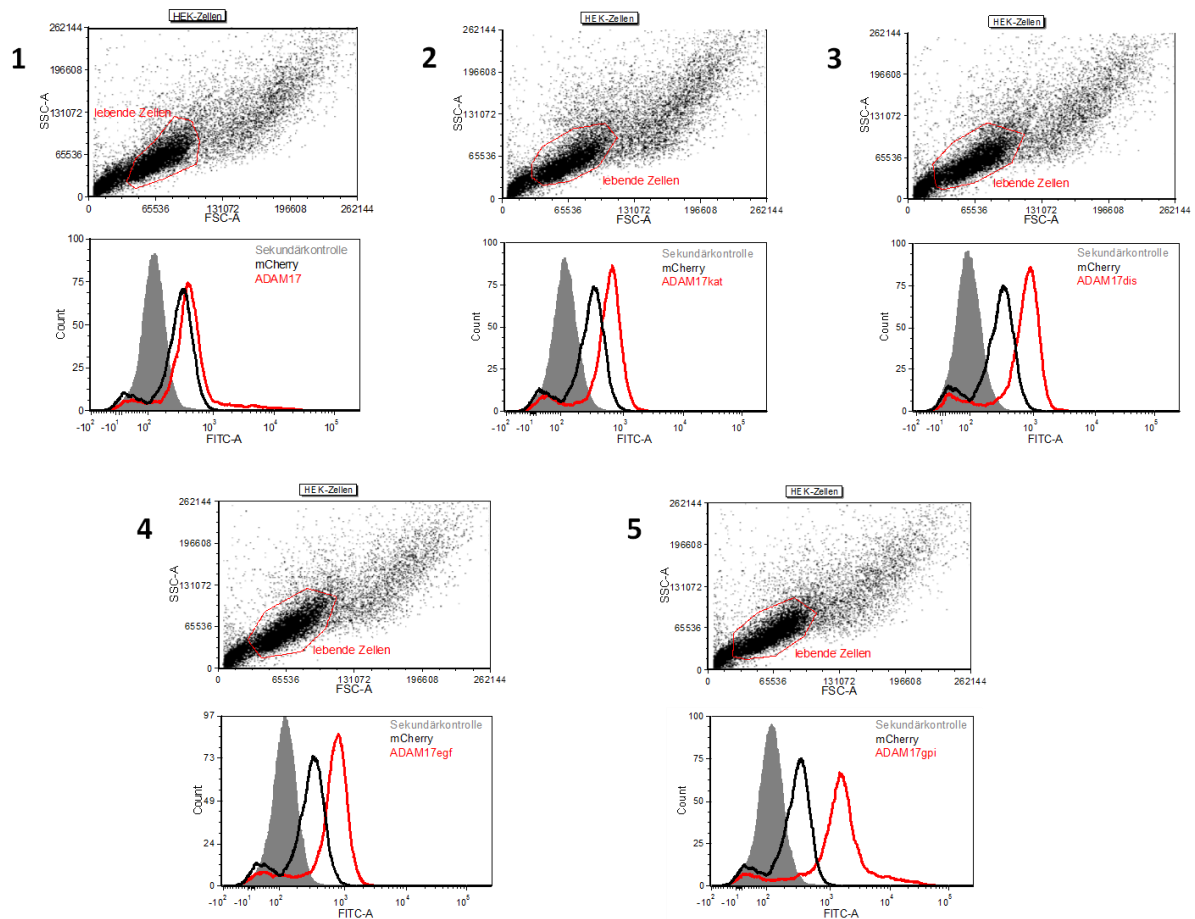


Abbildung 3.14: Fluoreszenzmessung von mit ADAM17 und ADAM17-Mutanten transfizierten HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit einem gegen ADAM17 gerichteten Primärantikörper (K133, siehe Tab. 2.4) und einem fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit, siehe Tab. 2.5) gefärbt. Als Sekundärkontrolle dienen Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden (grau). mCherry-transfizierte HEK-Zellen dienen als Referenzwert (schwarz), die Fluoreszenz der mit der jeweiligen ADAM17-Form transfizierten HEK-Zellen ist rot dargestellt. **1)** Fluoreszenzmessung von mit ADAM17 transfizierten HEK-Zellen. **2)** Fluoreszenzmessung von mit ADAM17kat transfizierten HEK-Zellen. **3)** Fluoreszenzmessung von mit ADAM17dis transfizierten HEK-Zellen. **4)** Fluoreszenzmessung von mit ADAM17egf transfizierten HEK-Zellen. **5)** Fluoreszenzmessung von mit ADAM17gpi transfizierten HEK-Zellen.

3.4.3. Co-Immunopräzipitation von iRhom2 und ADAM17 und ADAM17-Mutanten

Zum Nachweis der Bindung von ADAM17 und iRhom2 wurden HEK Zellen einfach mit ADAM17 oder doppelt mit iRhom2 und ADAM17 transfiziert und lysiert. Ein Teil der Lysate wurde für den Expressionsnachweis von ADAM17 und iRhom2 per SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Nach Immunfärbung mit dem Primärantikörper α -flag M2 wird in den Lysaten der Zellen, die nur mit ADAM17 transfiziert wurden, kein Signal detektiert. In den Lysaten der mit ADAM17 und iRhom2 transfizierten Zellen wird eine Bande bei 110 kDa sichtbar. Im *Western Blot*, der mit einem gegen

ADAM17 gerichteten Antikörper gefärbt wurde, sieht man in der ersten Bahn eine starke Bande bei 130 kDa und in der zweiten Bahn eine schwächere Bande auf gleicher Höhe. Die Expression von ADAM17 wird durch zusätzliche Transfektion mit iRhom2 stark reduziert. Um diesen Effekt abzuschwächen, wurde im Transfektionsansatz die DNA-Menge von ADAM17 relativ zur iRhom2-DNA vervierfacht (siehe Absatz 2.2.2.3). Dennoch bleibt die Expression von ADAM17 nach Doppeltransfektion stark reduziert.

Der Großteil der Lysate wurde mit einem Antikörper, der gegen das an iRhom2 gekoppelte *3xflag-tag* gerichtet ist, inkubiert und mit Hilfe von DynaBeads® immunopräzipitiert (siehe Abschnitt 2.2.3.2). Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine per *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Der *Western Blot* der immunopräzipitierten Lysate zeigt nach α -flag-Immunfärbung nur bei dem doppelt transfizierten HEK-Zellen eine Bande bei 110 kDa. Nach Immunfärbung mit dem ADAM17-Antikörper wird keine Bande in den Lysaten der mit ADAM17 transfizierten Zellen sichtbar. In den Lysaten der zusätzlich mit iRhom2-transfizierten Zellen ist eine Bande bei 130 kDa erkennbar. Nach Immunopräzipitation von iRhom2 kann folglich ADAM17 in den Proben nachgewiesen werden.

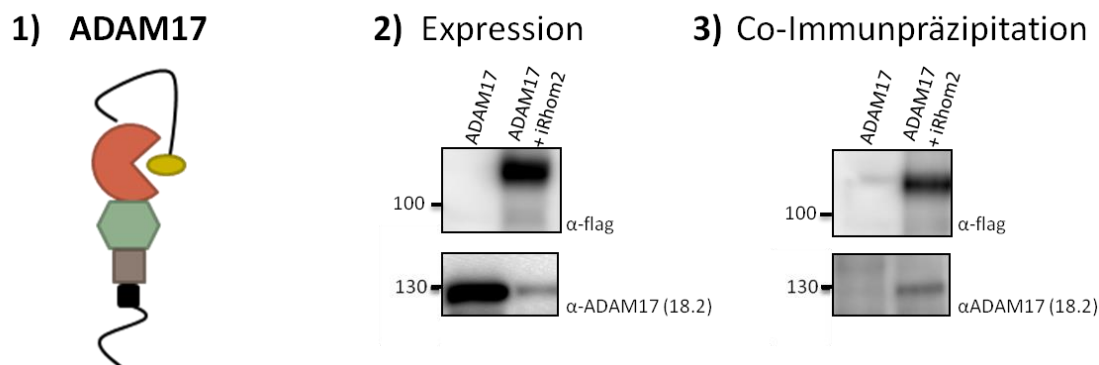


Abbildung 3.15: Co-Immunopräzipitation von iRhom2 und ADAM17. 1) Das verwendete Plasmid enthält die cDNA von ADAM17. 2) HEK-Zellen wurden mit ADAM17 oder mit ADAM17 und iRhom2 transfiziert, lysiert und mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Immunfärbung erfolgte mit den Primärantikörpern α -flag M2 und α -ADAM17 18.2 (Tabelle 2.4). 3) Ein Teil der Lysate wurden mit dem Antikörper α -flag M2 (Tabelle 2.4) inkubiert, mit DynaBeads® gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunfärbung fand mit den Primärantikörpern α -flag M2 und α -ADAM17 18.2 (Tabelle 2.4) statt. Das gezeigte Ergebnis steht exemplarisch für zehn unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Um das Bindungsmotiv für die nachgewiesene Interaktion zwischen ADAM17 und iRhom2 zu identifizieren, wurde dieser Versuch mit den nachfolgenden Mutationsformen von ADAM17 (siehe Tabelle 2.6) wiederholt. Dazu wurden HEK-Zellen analog zum oben beschriebenen Versuch einfach mit einer ADAM17-Mutante oder doppelt mit derselben ADAM17-Mutante und iRhom2 transfiziert. Um nachzuweisen, dass die transfizierten Zellen diese Proteine exprimieren, wurden sie lysiert und

mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Nach Immunfärbung gegen *3xflag-tag* wurde jeweils nur in den Lysaten der doppelt transfizierten Zellen eine Bande bei 110 kDa detektiert. In den Lysaten der einfach transfizierten HEK-Zellen wurde kein Signal nachgewiesen. Nach Immunfärbung gegen ADAM17 wurden in den Lysaten der einfach und doppelt transfizierten HEK-Zellen die ADAM17-Mutanten auf ihrer jeweiligen spezifischen Höhe (siehe Abschnitt 3.4.1) nachgewiesen. Dabei war die Expression der ADAM17-Mutanten, mit Ausnahme von ADAM17egf, in doppelt transfizierten HEK-Zellen stets deutlich geringer als in einfach transfizierten Zellen. Auch durch das DNA-Verhältnis von 1:4 von iRhom2 zu den ADAM17-Mutanten konnte dieser Effekt nicht kompensiert werden.

Nach Immunopräzipitation mit einem α -flag-Antikörper (siehe Abschnitt 2.2.3.2) wurden die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach Immunfärbung mit dem α -flag-Antikörper wurde in den Proben der einfach transfizierten Zellen kein Signal detektiert. In den Proben der zusätzlich mit iRhom2 transfizierten Zellen wurde eine Bande bei 110 kDa nachgewiesen. Die Immunfärbung gegen ADAM17 zeigt nach Immunopräzipitation via *3xflag-tag* in den Proben der mit einer ADAM17-Mutante und iRhom2 doppelt transfizierten Zellen ein Signal auf der spezifischen Höhe der jeweiligen Mutante (siehe Abschnitt 3.4.1). In den Proben von ADAM17dis ist mit und ohne Co-Expression von iRhom2 zusätzlich eine schwache Bande bei 55 kDa sichtbar (Tabelle 3.3, e). Diese wird durch den in die Proben applizierten Antikörper bedingt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle hier verwendeten ADAM17-Mutanten durch Co-Expression von iRhom2 und Immunopräzipitation mittels des an iRhom2 gekoppelten *3xflag-tag* co-immunopräzipitiert werden.

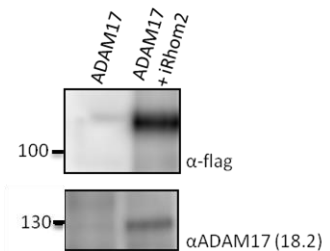
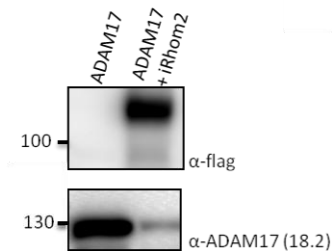
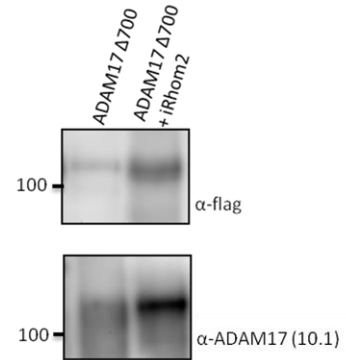
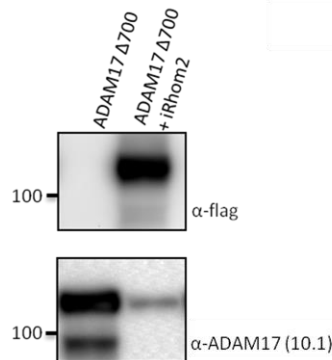
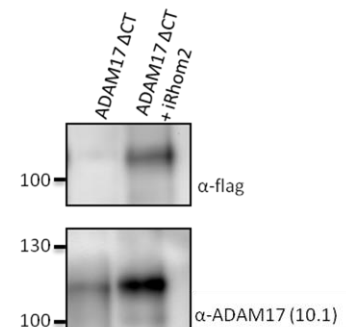
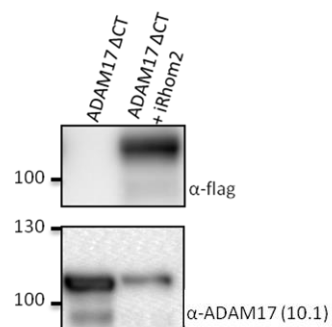
Tabelle 3.3: Expressionsnachweis und Co-Immunopräzipitation von ADAM17 oder ADAM17-Mutanten und iRhom2. 1) Schematische Darstellungen der Struktur von ADAM17 bzw. dessen Mutanten 2) HEK-Zellen wurden einfach mit ADAM17 (bzw. einer ADAM17-Mutante) oder doppelt mit ADAM17 (bzw. einer ADAM17-Mutante) und iRhom2 transfiziert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Immunfärbung erfolgte mit den Primärantikörpern α -flag M2 und α -ADAM17 18.2 (Tabelle 2.4). 3) Ein Teil der Lysate wurden mit dem Antikörper α -flag M2 (Tabelle 2.4) inkubiert, mit DynaBeads® gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunfärbung erfolgte mit den Primärantikörpern α -flag M2 und α -ADAM17 18.2 (Tabelle 2.4). Das gezeigte Ergebnis steht exemplarisch für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

1) ADAM17-Mutante

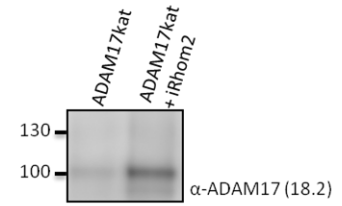
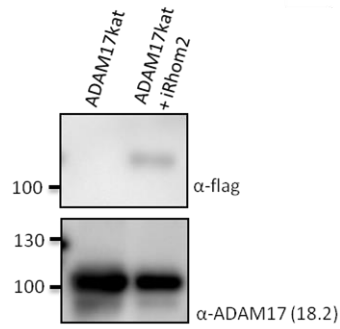
2) Expressionsnachweis

3) Co-Immunopräzipitation

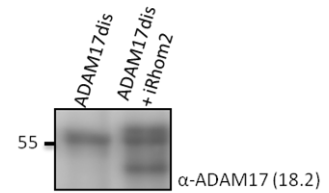
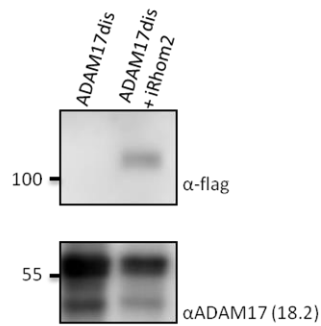
a) ADAM17

b) ADAM17 Δ 700c) ADAM17 Δ CT

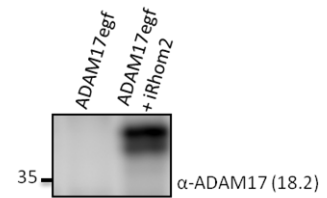
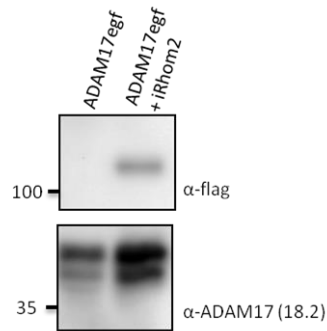
d) ADAM17kat



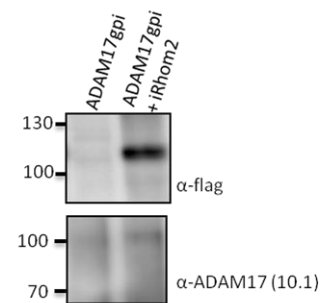
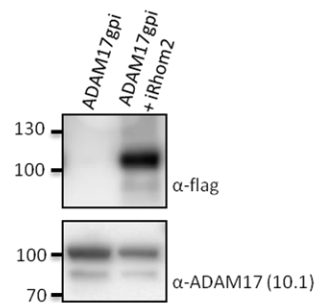
e) ADAM17dis



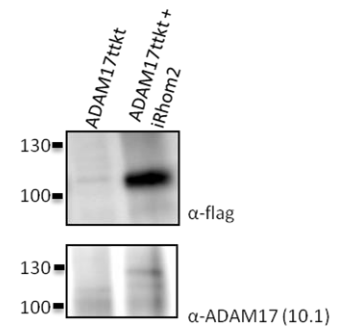
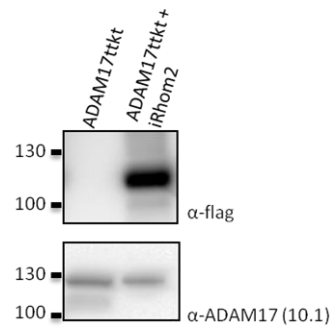
f) ADAM17egf



g) ADAM17gpi



h) ADAM17ttkt



4. Diskussion

4.1. Die Überexpression von iRhom2 führt zu erhöhter *Shedding*-Aktivität von ADAM17

Für den Transport und die Maturierung von ADAM17 sowie die Freisetzung von TNF- α in murinen Makrophagen ist iRhom2 notwendig (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012). Mäuse, die iRhom2 defizient sind, sind durch erniedrigte TNF- α -Produktion vor septischen Schock durch LPS geschützt, erliegen aber aufgrund der verminderten Immunreaktion deutlich schneller bakterieller Infektion durch *L.monocytogenes* (McIlwain et al., 2012). Die Resultate verschiedener Studien zeigen, dass iRhom2 ADAM17 im ER bindet und dessen Transport zum Golgi-Apparat vermittelt (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012). Da die Aktivität von ADAM17 weder *in vitro* noch *in vivo* durch Überexpression gesteigert werden kann (Merlos-Suarez et al., 1998; Yoda et al., 2013), stellt sich die Frage, ob die Überexpression von iRhom2 die Oberflächenexpression und katalytische Aktivität von ADAM17 erhöht. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die cDNA von iRhom2 in einen retroviralen Vektor kloniert, um iRhom2 überexprimierende Zellen der Linien NIH 3T3 und C2C12 zu generieren. Beide exprimieren endogen ADAM17. Um nachzuweisen, dass in den iRhom2 transgenen Zellen die katalytische Aktivität von ADAM17 erhöht ist, wurden die Überstände der Zellen nach einer bis sechs Stunden unter Kontrollbedingungen und nach PMA-Stimulation auf ihre lösliche TNFR-I- und TNFR-II-Konzentration mittels ELISA untersucht. TNFR-I und TNFR-II sind Substrate von ADAM17, sie werden von der Protease gespalten und in den extrazellulären Raum entlassen (Bell et al., 2007). Die Analyse der Überstände iRhom2 transgener Zellen und ihrer Kontrollzellen zeigt, dass durch Überexpression von iRhom2 die Freisetzung von TNFR-I und TNFR-II zwischen 1,5-2-fach gesteigert ist (siehe Abbildung 3.5, Abbildung 3.6, und Abbildung 3.7). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in iRhom2 transgenen Zellen die katalytische Aktivität von ADAM17 erhöht ist. Somit ist die Überexpression von iRhom2 eine Möglichkeit, die katalytische Aktivität von ADAM17 zu steigern.

4.2. In iRhom2 transgenen Zellen kann anhand der Glycosylierung von ADAM17 kein erhöhter intrazellulärer Transport nachgewiesen werden

Da in den Überständen iRhom2 transgener Zellen erhöhte Konzentrationen der ADAM17-Substrate TNFR-I sowie TNFR-II und damit eine gesteigerte katalytische Aktivität der Protease nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Aktivierung. In der Literatur wurde das Modellbild etabliert, dass iRhom2 als Transportrezeptor den Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche und somit dessen Maturierung vermittelt (Lichtenthaler, 2013). ADAM17 durchläuft

posttranslational verschiedene Modifizierungen. Im ER werden Glykane hinzugefügt, die im Golgi-Apparat durch das Abspalten zweier Mannoseuntereinheiten durch die α -Mannosidase II modifiziert werden und somit resistent gegen Endo-H werden. Das Enzym Endo-H ist eine spezifische Endoglykosidase, die nur Asparagin-verknüpfte Mannose-reiche Oligosaccharide spaltet. Somit kann man durch die Behandlung mit Endo-H Glykosylierungsformen von ADAM17 vor und nach dem Erreichen des Golgi-Apparats nachweisen. PNGase F ist eine Amidase, die alle N-Glykane spaltet.

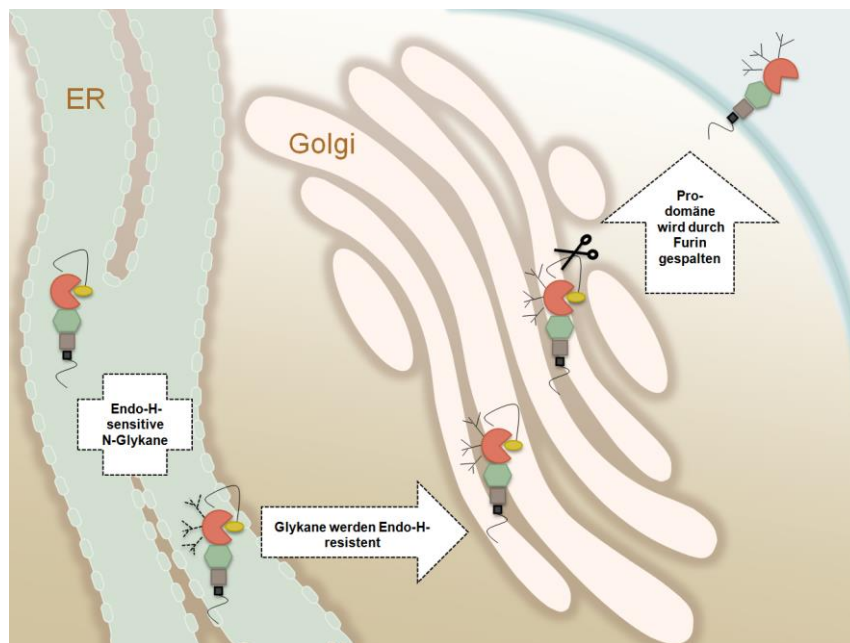


Abbildung 4.1: Transport und Maturierung von ADAM17. Nach der Synthese von ADAM17 werden N-Glykane im ER angehängt. ADAM17 verlässt das ER und gelangt zum Golgi-Apparat, wo die Glykane modifiziert werden. Die α -Mannose II spaltet zwei Mannoseuntereinheiten ab, das Enzym Endo-H kann die Glykane danach nicht mehr spalten. Die Prodomäne wird durch Furin gespalten und ADAM17 gelangt an die Zelloberfläche.

In primären Makrophagen iRhom2 defizienter Mäuse wurden nachgewiesen, dass ER-spezifische Glykane von ADAM17 abgespalten werden können, es aber keinen Endo-H-resistenten Teil oder die reife Form gibt. Daher wurde geschlossen, dass ADAM17 ohne die Interaktion mit iRhom2 im ER verbleibt und nicht an die Zelloberfläche transportiert wird (Adrain et al., 2012). Im Umkehrschluss stellt sich die Frage, ob sich eine gesteigerte Transportrate von ADAM17 in Lysaten von iRhom2 transgenen Zellen durch Deglycosylierung nachweisen lässt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Lysate der Zellen NIH 3T3_cv und NIH 3T3_iRhom2 mit den Enzymen Endo-H und PNGase F behandelt. Das resultierende Bandenmuster im *Western Blot* zeigt verschiedene Glykosylierungsstufen von ADAM17, die durch Überexpression von iRhom2 nicht beeinflusst werden. Eine erhöhte Resistenz von ADAM17 in Lysaten iRhom2 transgener Zellen gegen Endo-H aufgrund eines

verstärkten Transports zum Golgi-Apparat konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.8, Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10).

4.3. Durch Überexpression von iRhom2 wird die Oberflächenexpression von ADAM17 gesteigert

Da der Versuch bezüglich verschiedener Glykosylierungsstufen von ADAM17 keine signifikanten Unterschiede zwischen iRhom2 transgenen Zellen und Kontrollzellen gezeigt hat, wurde eine zweite Herangehensweise zur Diskussion der Frage, ob die erhöhte katalytische Aktivität von ADAM17 mit gesteigertem Transport einhergeht, gewählt. iRhom2 transgene Zellen wurden per Durchflusszytometrie bezüglich ihrer ADAM17-Oberflächenexpression analysiert. Zuvor wurden das Expressionslevel von ADAM17 in den NIH 3T3_cv- und NIH 3T3_iRhom2-Zellen mittels *Realtime-PCR* analysiert. In den iRhom2 transgenen Zellen wurde ein schwach verringertes mRNA-Expressionslevel von ADAM17 relativ zu den Kontrollzellen festgestellt. Die Differenz ist allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 3.4). Mittels Durchflusszytometrie wurde eine erhöhte emittierte Fluoreszenzintensität von iRhom2 transgenen Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12). Die Fluoreszenzintensität der ADAM17-spezifischen Immunfärbung korreliert direkt mit der Menge an ADAM17-Molekülen auf der Oberfläche. Mit diesem Experiment konnte also nachgewiesen werden, dass die Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen NIH 3T3-Zellen im Vergleich zu ihren Kontrollzellen gesteigert ist.

Aus diesen Resultaten lässt sich schließen, dass unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen die gesteigerte katalytische Aktivität von ADAM17 in iRhom2 transgenen Zellen mit einer erhöhten Oberflächenexpression von ADAM17 einhergeht. Diese Beobachtung unterstützt die herrschende Vorstellung von iRhom2 als Transportprotein von ADAM17.

4.4. Durch PMA-Stimulation wird ADAM17 in iRhom2 transgenen Zellen nicht stärker aktiviert oder an der Zelloberfläche exprimiert als in Kontrollzellen

Diverse Studien zeigen, dass die *in vitro* Stimulation von Zellen mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) das ADAM17-abhängige *Shedding* vieler Substrate steigern kann (Black et al., 2003; Blobel, 2005b). Der Mechanismus dieser Aktivierung ist noch weitgehend ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Stimulation mit PMA zu einer Konformationsänderung von ADAM17 führt, durch die die katalytische Domäne exponiert wird, sodass die Interaktion mit Substraten erleichtert wird (Le Gall et al., 2010). In Cos-7-Zellen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ADAM17 durch PMA ohne erhöhte Oberflächenexpression von ADAM17 stattfindet (Horiuchi et al., 2007b). Konsistent mit

diesen Resultaten wurde in dieser Arbeit nach PMA-Stimulation eine gleich bleibende Oberflächenexpression von ADAM17 mittels Durchflusszytometrie auf NIH 3T3_cv- und NIH3T3_iRhom2-Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 3.11). Bezüglich der C2C12-Zellen konnte jedoch sowohl in der Kontrollzelllinie als auch in den iRhom2 transgenen Zellen eine durch PMA-Stimulation gesteigerte Oberflächenexpression von ADAM17 nachgewiesen werden. Dabei ist die Oberflächenexpression in Kontrollzellen und iRhom2 transgenen Zellen gleichermaßen gesteigert (Abbildung 3.12). Die gesteigerte Oberflächenexpression von ADAM17 durch PMA-Stimulation ist diesen Beobachtungen und den Beschreibungen in der Literatur zufolge vermutlich vom Zelltyp abhängig und wird nicht durch Überexpression von iRhom2 beeinflusst.

Bei der Untersuchung des *Sheddings* der ADAM17-Substrate TNFR-I und TNFR-II wurde ersichtlich, dass durch PMA-Stimulation die proteolytische Aktivität von ADAM17, gemäß der allgemein in der Literatur vertretenen Ansicht, erhöht wird (Horiuchi et al., 2007b; Mullberg et al., 1992; Peiretti et al., 2003). Jedoch ergab die PMA-Stimulation keinen Unterschied in der Erhöhung der Sheddingrate von TNFR-I und TNFR-II zwischen iRhom2-transgenen Zellen und Kontrollzellen. Unabhängig von der Überexpression von iRhom2 wird die Freisetzung von TNFR-I und TNFR-II nach PMA-Stimulation in Verhältnis zu der konstitutiv freigesetzten Menge. Die Aktivierung von ADAM17 durch PMA ist, unter den hier angewandten Bedingungen, unabhängig von einer Überexpression von iRhom2.

4.5. iRhom2 interagiert mit allen untersuchten ADAM17-Mutanten

Um zu ergründen, welche ADAM17-Domäne für die Bindung von iRhom2 verantwortlich ist, wurden unterschiedliche ADAM17-Deletionsmutanten hergestellt, bei denen einzelne oder mehrere Domänen der Protease fehlen oder durch Domänen anderer Proteine, die nicht mit iRhom2 interagieren, ersetzt wurden (siehe Tabelle 2.6). Da proklamiert wurde, dass ADAM17 ohne die Prodomäne, welche als Chaperon fungiert, nicht an die Zelloberfläche transportiert wird (Milla et al., 1999), wurde die Oberflächenexpression der ADAM17-Mutanten ADAM17kat, ADAM17dis, ADAM17egf, die N-terminal verkürzt wurden, mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Vergleichswert wurde auch die Oberflächenexpression von ADAM17 und ADAM17gpi untersucht. Da die Fluoreszenzintensität der mit den ADAM17-Mutanten transfizierten Zellen deutlich höher ist als die der Kontrollzellen, wurde nachgewiesen, dass die verschiedenen Mutanten trotz fehlender Prodomänen an die Oberfläche transportiert werden (Abbildung 3.14). Der physiologische Transport ist Voraussetzung dafür, dass die ADAM17-Mutanten iRhom2 treffen und binden können. In den zuvor dargestellten Versuchen wurde mittels transienter Transfektion von iRhom2, ADAM17 sowie den beschriebenen ADAM17-Mutanten in HEK-Zellen und anschließender Co-Immunopräzipitation nachgewiesen, dass iRhom2 alle untersuchten ADAM17-Mutanten bindet (Tabelle 3.3). Es können somit der cytoplasmatische Teil, die

Prodomäne, die katalytische Domäne, die Disintegrindomäne und die Transmembrandomäne für die Bindung an iRhom2 ausgeschlossen werden, da ADAM17-Mutationsformen, denen eine oder mehrere dieser Domänen fehlt, dennoch mit iRhom2 interagieren. In allen ADAM17-Mutaten blieben die Aminosäuren 578 bis 670, die der EGF-Domäne entsprechen, erhalten. Um abschließend zu beweisen, dass die Interaktion mit iRhom2 im Bereich dieser Domäne stattfindet, sollte dieser Versuch mit einer ADAM17-Mutante wiederholt werden, bei der dieser Teil durch den analogen Teil von ADAM10 ausgetauscht wurde, da ADAM10 und iRhom2 nachweislich nicht miteinander interagieren (Adrain et al., 2012).

4.6. Ausblick

4.6.1. iRhom2 als therapeutisches Ziel in der Therapie TNF- α -assoziierter Entzündungserkrankungen

Die Fehlregulation der TNF- α -Produktion ist an der Pathogenese diverser Entzündungserkrankungen wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis und Parodontitis beteiligt (Papadopoulos et al., 2013; Saxne et al., 1988). Da iRhom2 als Transportprotein von ADAM17 durch Überexpression die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 steigern kann und ADAM17 in seiner Funktion als Schlüsselenzym der Freisetzung von TNF- α auch an der Entstehung von TNF- α -assozierten Autoimmunerkrankungen maßgeblich beteiligt ist, kommt iRhom2 als Transportprotein in myeloiden Zellen ebenfalls eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese dieser Erkrankungen zu. Zur Therapie TNF- α -assoziierter Erkrankungen werden verschiedene Therapeutika eingesetzt, die lösliches TNF- α in seiner Wirkung inhibieren. Diese sogenannten TNF- α -Blocker finden ihren Einsatz in der Therapie gegen Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis und Psoriasis (Solovic et al., 2010). Die durch diese Medikamente verursachten Nebenwirkungen sind vor allem Infektionen der oberen Atemwege, wie zum Beispiel Lungenentzündung oder Tuberkulose, welche meist durch Behandlung mit TNF- α -Blockern wieder ausbricht. Bei diesen Therapeutika handelt es sich meist um monoklonale Antikörper, die subkutan injiziert werden. Sie wirken also systemisch und hemmen die Wirkung von TNF- α im gesamten Körper. Durch Inhibierung der Interaktion zwischen iRhom2 und ADAM17 könnte man die TNF- α -Produktion hingegen spezifisch in myeloischen Zellen drosseln. Die Inhibierung von iRhom2 könnte erschwert sein, da iRhom2 im Zellinneren lokalisiert ist, wo es größtenteils in der Doppellipidschicht verborgen liegt. Darüber hinaus ist iRhom2 kein Enzym und kann somit nicht in seiner enzymatischen Aktivität blockiert werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand müsste zur Inhibierung der TNF- α -Freisetzung die Interaktion zwischen ADAM17 und iRhom2 blockiert werden. Dazu ist es notwendig, den für die Bindung verantwortlichen Bereich von ADAM17

zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die EGF-Domäne von ADAM17 für die Bindung mit iRhom2 verantwortlich ist.

Die Nebenwirkung des erhöhten Infektionsrisikos von TNF- α -Blockern würde wahrscheinlich auch durch Inhibierung der ADAM17-iRhom2-Interaktion auftreten, da gezeigt wurde, dass iRhom2 defiziente Mäuse durch Infektion mit *L. monocytogenes* eine niedrigere Überlebensrate gegenüber Wildtyp-Mäusen haben, während sie vor einen lethalen LPS-induzierten septischen Schock geschützt sind (McIlwain et al., 2012). Darüber hinaus bedarf es weiterer Erforschung, ob die Inhibierung von iRhom2 auch die Freisetzung anderer ADAM17-Substrate beeinflusst. Wäre dies der Fall, würden die durch iRhom2-Blockade resultierenden Nebenwirkungen in ihrer Auswirkung auf den gesamten menschlichen Organismus sehr drastisch, kaum abschätzbar und womöglich nicht vertretbar sein.

iRhom2 bietet als therapeutisches Ziel durch sein Expressionsmuster einerseits die Möglichkeit, die TNF- α -Freisetzung spezifisch in myeloiden Zellen zu blockieren. Andererseits ist es durch seine Lokalisation schwer zugänglich und die Auswirkung auf das *Shedding* weiterer ADAM17-Substrate könnte zu starken Nebenwirkungen führen. Es erfordert also noch der Abklärung einiger Fragen, bevor festgestellt werden kann, ob iRhom2 als therapeutisches Ziel zur Therapie von TNF- α -assoziierten Erkrankungen in Frage kommt.

4.6.2. iRhom2-Expression in primären Makrophagen von Patienten mit rheumatoider Arthritis

Kürzlich wurde gezeigt, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis ein signifikant gesteigertes Expressionslevel von iRhom2 in synovialen Makrophagen aufweisen (Issuree et al., 2013). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass daraus eine gesteigerte katalytische Aktivität von ADAM17 resultieren kann. Daher ist denkbar, dass der für rheumatoide Arthritis charakteristisch hohe Serumspiegel von löslichem TNF- α (Moelants et al., 2013) durch die erhöhte Expression von iRhom2 bedingt ist und die Überexpression von iRhom2 somit an der Pathogenese von rheumatoider Arthritis beteiligt ist. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass durch die Aktivierung des TNF- α -Signalwegs die Expression von iRhom2 gesteigert wird (Adrain et al., 2012). Es entsteht eine positive Rückkopplung, die die Freisetzung von löslichem TNF- α verstärkt. In Bezug auf die Entstehung von rheumatoider Arthritis bleibt abzuklären, ob die erhöhte Expression von iRhom2 ursächlich ist oder als Konsequenz der verstärkten TNF- α -Signaltransduktion resultiert und der Signalverstärkung dient.

4.6.3. Die Generierung einer iRhom2 transgenen Mauslinie

Die Generierung einer gentechnisch manipulierten Mauslinie ist ein etabliertes Mittel, um die Funktion von Proteinen *in vivo* zu untersuchen. Dabei stellt der *Knock-out*, also das Inaktivieren eines kompletten Gens, die drastischste Manipulation dar. Durch den *Knock-out* von iRhom2 in Mäusen wurde nachgewiesen, dass dieses Protein für die Freisetzung von löslichem TNF- α von Makrophagen unerlässlich ist. Entsprechend der oben beschriebenen Forschungsergebnisse wäre durch die Generierung einer iRhom2 transgenen Maus ein schwächerer Effekt zu erwarten. Die Steigerung des ADAM17-vermittelten TNFR-I- und TNFR-II-*Sheddings* bewegte sich in den Untersuchungen im Bereich zwischen 1,5-fach bis 2,5-fach. Berücksichtigt man jedoch die Rolle von ADAM17 in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungserkrankungen und Krebsentstehung (Lin et al., 2008; Wong et al., 2008), so steht außer Frage, dass der Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie dieser Protease eine überaus wichtige medizinische Bedeutung zukommt. Da die Überexpression von ADAM17 *in vivo* keine Erhöhung der katalytischen Aktivität der Protease bewirkt hat (Yoda et al., 2013), könnte die Überexpression von iRhom2 ein probater Weg sein, um diesen Effekt zu erzielen. Die Überexpression von iRhom2 wäre in diesem Zusammenhang die erste gentechnische Methode, um die katalytische Aktivität von ADAM17 *in vivo* zu steigern.

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden alle im Rahmen von *in vitro* Experimenten erzielt. Von anderen Forschungsarbeiten ist allgemein bekannt, dass ein *in vitro* beschriebenes Phänomen unter Umständen *in vivo* nicht zu rekonstruieren ist. Zellkultorexperimente sind ein System, das im Verhältnis zu Tierexperimenten unkompliziert und kostengünstig ist und sich dazu eignet, eine erste experimentelle Annäherung zur Ergründung eines Sachverhalts zu unternehmen. Zelllinien sind allerdings kein funktionelles Gewebe in einem komplexen Organismus, sondern artifiziell kultivierte Zellen. Darüber hinaus handelt es sich bei den hier verwendeten Zelllinien um Krebszelllinien, deren Genexpression von normalen somatischen Zellen stark abweicht. Unter anderem ist auch die Expression von ADAM17 in diversen Tumorarten erhöht (Kenny and Bissell, 2007; Merchant et al., 2008; Yu et al., 2013). Es stellt sich also die Frage, ob die *in vitro* nachgewiesene Steigerung der katalytischen Aktivität von ADAM17 durch Überexpression von iRhom2 auch *in vivo* beobachtet werden kann. Die Generierung einer iRhom2 transgenen Maus könnte zur Folge haben, dass die transgenen Tiere eine erhöhte ADAM17 Aktivität, beispielsweise im Darm, aufweisen. Studien mit ADAM17 defizienten Mäusen haben gezeigt, dass diese empfindlicher gegenüber Dextransulfat-induzierter Kolitis waren, ADAM17 also eine Rolle im Zuge der Regenerierung spielte (Chalaris et al., 2010). Im Umkehrschluss könnte die Regenerationsfähigkeit der iRhom2 transgenen Tiere nach DSS-induzierter Kolitis durch eine Steigerung der ADAM17-Aktivität durch vermehrte Stimulatioin des EGF-Rezeptors und damit Phosphorylierung von STAT3, die zu Zellproliferation

führt, erhöht sein. Gleichzeitig ist mit einer erhöhten TNF- α -Freisetzung zu rechnen, die durchaus zur Sepsis führen könnte.

Da ADAM17 für die proteolytische Spaltung zahlreicher Substrate zuständig ist, sind die Auswirkungen einer gesteigerten ADAM17-Aktivität in iRhom2 transgenen Mäusen nicht absehbar. Durch die zentrale Rolle von ADAM17 in vielen Signalwegen ist es von großer Bedeutung für die weitere Erforschung der Funktion dieser Protease die Effekte einer Aktivitätssteigerung zu untersuchen. Nachdem die *in vitro* Versuche dieser Doktorarbeit erste Hinweise auf eine Aktivitätssteigerung von ADAM17 durch iRhom2 gegeben haben, ist die Untersuchung dieses Zusammenhangs und die Auswirkung einer eventuellen Aktivitätssteigerung von ADAM17 *in vivo* der nächste Schritt, um weitere Erkenntnisse über die Regulation und Funktion von ADAM17 zu erlangen.

5. Zusammenfassung

Die membranständige Protease *a disintegrin and metalloprotease 17* (kurz ADAM17) spaltet zahlreiche Oberflächenproteine proteolytisch von der Zellmembran und entlässt diese in den Extrazellularraum, wo sie verschiedene Signalwege initiieren. Zu den Substraten von ADAM17 zählen Zytokine, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren. Durch die Beteiligung dieser Substrate an physiologischen und pathophysiologischen Signalwegen wird ersichtlich, dass ADAM17 eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort, Gewebsregeneration und Krebsentstehung zukommt. Die Aktivierung von ADAM17 ist noch weitgehend unerforscht. Es wurde gezeigt, dass das inaktive Rhomboid 2 iRhom2 notwendig ist, damit ADAM17-vermittelte proteolytische Spaltung von Pro-TNF- α stattfindet. iRhom2 ist ein intrazelluläres Transmembranprotein, welches hauptsächlich von Immunzellen exprimiert wird und im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert ist. In Makrophagen von Mäusen in denen das Gen RHBDF2 deletiert wurde, welches für iRhom2 codiert, wird ADAM17 nicht an die Zelloberfläche transportiert, sondern bleibt im ER und die Freisetzung von TNF- α wird inhibiert. Folglich ist iRhom2 für den Transport von ADAM17 in murinen Immunzellen unerlässlich, iRhom2 kommt die Funktion eines Transportrezeptors zu.

Eine Steigerung der proteolytischen Aktivierung von ADAM17 konnte bislang weder *in vitro* noch *in vivo* durch Überexpression von ADAM17 erreicht werden. Daraus resultiert die Frage, ob durch eine Überexpression von iRhom2 die enzymatische Aktivität von ADAM17 gesteigert werden kann und ob eine gesteigerte katalytische Aktivität mit einer erhöhten Oberflächenexpression korreliert. Darüber hinaus soll diskutiert werden, ob die Generierung einer iRhom2 transgenen Maus ein sinnvoller Schritt zur weiteren Erforschung der Funktion von ADAM17 ist.

Um diese Fragestellung zu beantworten wurden iRhom2 transgene Zellen hergestellt und die Oberflächenexpression von ADAM17 analysiert. Es konnte eine gesteigerte Oberflächenexpression von ADAM17 auf iRhom2 transgenen Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde die Freisetzung der ADAM17-Substrate TNFR-I und TNFR-II durch iRhom2 transgene Zellen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Freisetzung von TNFR-I und TNFR-II von iRhom2 transgenen Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen zwischen 1,5-fach bis 2-fach gesteigert ist. Die ADAM17-vermittelte proteolytische Freisetzung von TNFR-I und TNFR-II wird folglich durch die Überexpression von iRhom2 erhöht. Wenn dieser Zusammenhang *in vivo* durch die Generierung einer iRhom2 transgenen Maus rekonstruierbar ist, verspräche dies neue Erkenntnisse über die Funktion von ADAM17 und wäre somit ein sinnvoller Schritt in der Erforschung der Protease.

6. Literaturverzeichnis

Adrain, C., and Freeman, M. (2012). New lives for old: evolution of pseudoenzyme function illustrated by iRhoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 489-498.

Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N., and Freeman, M. (2012). Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* 335, 225-228.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

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

Bell, J.H., Herrera, A.H., Li, Y., and Walcheck, B. (2007). Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF-alpha and its receptors by neutrophils and macrophages. *J Leukoc Biol* 82, 173-176.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Black, R.A., Doedens, J.R., Mahimkar, R., Johnson, R., Guo, L., Wallace, A., Virca, D., Eisenman, J., Slack, J., Castner, B., Sunnarborg SW, Lee DC, Cowling R, Jin G, Charrier K, Peschon JJ, Paxton R. (2003). Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem Soc Symp*, 39-52.

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 KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP.. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.

Blobel, C.P. (2005a). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.

Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock T, Matthews V, Häsler R, Becker C, Neurath MF, Reiss K, Saftig P, Scheller J, Rose-John S. (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* 207, 1617-1624.

Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C.A., Jones, S.A., Rose-John, S., and Scheller, J. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110, 1748-1755.

Chanthaphavong, R.S., Loughran, P.A., Lee, T.Y., Scott, M.J., and Billiar, T.R. (2012). A role for cGMP in inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-induced tumor necrosis factor (TNF) alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) activation, translocation, and TNF receptor 1 (TNFR1) shedding in hepatocytes. *J Biol Chem* 287, 35887-35898.

Cho, C., Primakoff, P., White, J.M., and Myles, D.G. (1996). Chromosomal assignment of four testis-expressed mouse genes from a new family of transmembrane proteins (ADAMs) involved in cell-cell adhesion and fusion. *Genomics* 34, 413-417.

- Deuss, M., Reiss, K., and Hartmann, D. (2008). Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 5, 187-201.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29, 258-289.
- Freeman, M. (2008). Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet* 42, 191-210.
- Garton, K.J., Gough, P.J., and Raines, E.W. (2006). Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 79, 1105-1116.
- Gooz, M. (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 146-169.
- Hall, K.C., and Blobel, C.P. (2012). Interleukin-1 stimulates ADAM17 through a mechanism independent of its cytoplasmic domain or phosphorylation at threonine 735. *PLoS One* 7, e31600.
- Holgate, S.T., Yang, Y., Haitchi, H.M., Powell, R.M., Holloway, J.W., Yoshisue, H., Pang, Y.Y., Cakebread, J., and Davies, D.E. (2006). The genetics of asthma: ADAM33 as an example of a susceptibility gene. *Proc Am Thorac Soc* 3, 440-443.
- Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y., and Blobel, C.P. (2007a). Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol* 179, 2686-2689.
- Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2007b). Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol Biol Cell* 18, 176-188.
- Issuree, P.D., Maretzky, T., McIlwain, D.R., Monette, S., Qing, X., Lang, P.A., Swendeman, S.L., Park-Min, K.H., Binder, N., Kalliolias, G.D., Yamilina A, Horiuchi K, Ivashkiv LB, Mak TW, Salmon JE, Blobel CP. (2013). iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 123, 928-932.
- Kenny, P.A., and Bissell, M.J. (2007). Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest* 117, 337-345.
- Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D., Niu, X.D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., and Blobel, C.P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci* 123, 3913-3922.
- Lemberg, M.K., and Freeman, M. (2007b). Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Res* 17, 1634-1646.
- Li, X., Perez, L., and Fan, H. (2011). Inhibitory role of TACE/ADAM17 cytotail in protein ectodomain shedding. *World J Biol Chem* 2, 246-251.
- Li, X., Yan, Y., Huang, W., and Yang, Y. (2009). The study of the inhibition of the recombinant TACE prodomain to endotoxemia in mice. *Int J Mol Sci* 10, 5442-5454.
- Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A., and Walcheck, B. (2006). ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood* 108, 2275-2279.
- Lichtenthaler, S.F. (2013). iRHOM2 takes control of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 123, 560-562.

Lin, J., Ziring, D., Desai, S., Kim, S., Wong, M., Korin, Y., Braun, J., Reed, E., Gjertson, D., and Singh, R.R. (2008). TNF α blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin Immunol* 126, 13-30.

Lorenzen, I., Trad, A., and Grotzinger, J. (2011). Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* 415, 330-336.

Maretzky, T., McIlwain, D.R., Issuree, P.D., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P.A., Mak, T.W., and Blobel, C.P. (2013). iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11433-11438.

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 KS, Häussinger D, Wakeham A, Itie-Youten A, Khokha R, Ohashi PS, Blobel CP, Mak TW. (2012). iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science* 335, 229-232.

Merchant, N.B., Voskresensky, I., Rogers, C.M., Lafleur, B., Dempsey, P.J., Graves-Deal, R., Revetta, F., Foutch, A.C., Rothenberg, M.L., Washington, M.K., Coffey RJ. (2008). TACE/ADAM-17: a component of the epidermal growth factor receptor axis and a promising therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1182-1191.

Merlos-Suarez, A., Fernandez-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., and Arribas, J. (1998). Pro-tumor necrosis factor- α processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J Biol Chem* 273, 24955-24962.

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 TA, Burkhart W, Moyer M, Blackburn RK, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR, Becherer JD. (1999). Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 274, 30563-30570.

Mochizuki, S., and Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 98, 621-628.

Moelants, E.A., Mortier, A., Van Damme, J., and Proost, P. (2013). Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol*.

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 CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* 385, 733-736.

Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P.C., and Rose-John, S. (1992). Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 794-800.

Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 8, 929-941.

Papadopoulos, G., Weinberg, E.O., Massari, P., Gibson, F.C., 3rd, Wetzler, L.M., Morgan, E.F., and Genco, C.A. (2013). Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J Immunol* 190, 1148-1157.

- Peiretti, F., Canault, M., Deprez-Beauclair, P., Berthet, V., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., and Nalbone, G. (2003). Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp Cell Res* 285, 278-285.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281-1284.
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., and Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 69, 2919-2932.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J., and Black, R.A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275, 14608-14614.
- Reiss, K., and Saftig, P. (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 126-137.
- Rose-John, S. (2013). ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol Res* 71, 19-22.
- Rousseau, S., Papoutsopoulou, M., Symons, A., Cook, D., Lucocq, J.M., Prescott, A.R., O'Garra, A., Ley, S.C., and Cohen, P. (2008). TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci* 121, 149-154.
- Saftig, P., and Reiss, K. (2011). The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *European journal of cell biology* 90, 527-535.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, 769-779.
- Saxne, T., Palladino, M.A., Jr., Heinegard, D., Talal, N., and Wollheim, F.A. (1988). Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 31, 1041-1045.
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., and Rose-John, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 32, 380-387.
- Schlondorff, J., Becherer, J.D., and Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347 Pt 1, 131-138.
- Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Muller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrucker, H.W., Rabe B, Rose-John S, Chalaris A. (2013). Short-term TNFalpha shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3355-3367.
- Siggs, O.M., Xiao, N., Wang, Y., Shi, H., Tomisato, W., Li, X., Xia, Y., and Beutler, B. (2012). iRhom2 is required for the secretion of mouse TNFalpha. *Blood* 119, 5769-5771.
- Solovic, I., Sester, M., Gomez-Reino, J.J., Rieder, H.L., Ehlers, S., Milburn, H.J., Kampmann, B., Hellmich, B., Groves, R., Schreiber, S., Wallis RS, Sotgiu G, Schölvinck EH, Goletti D, Zellweger JP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P, Bossink A, Duarte R, Erkens C, Clark J, Migliori

GB, Lange C.. (2010). The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *The European respiratory journal* 36, 1185-1206.

Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W., and Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118, 2371-2380.

Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., and Tak, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117, 244-279.

University of Virginia School of Medicine Department of Cell Biologie. (2014) Tabel of the ADAMs. Abgerufen am 12. Februar 2014 auf http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html

Urban, S. (2009). Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 7, 411-423.

Van Wart, H.E., and Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5578-5582.

Wong, M., Ziring, D., Korin, Y., Desai, S., Kim, S., Lin, J., Gjertson, D., Braun, J., Reed, E., and Singh, R.R. (2008). TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol* 126, 121-136.

Xu, P., and Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 37, 551-566.

Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., and Derynck, R. (2012). TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Sci Signal* 5, ra34.

Yoda, M., Kimura, T., Tohmonda, T., Morioka, H., Matsumoto, M., Okada, Y., Toyama, Y., and Horiuchi, K. (2013). Systemic overexpression of TNFalpha-converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. *PLoS One* 8, e54412.

Yu, C.C., Tsai, L.L., Wang, M.L., Yu, C.H., Lo, W.L., Chang, Y.C., Chiou, G.Y., Chou, M.Y., and Chiou, S.H. (2013). miR145 Targets the SOX9/ADAM17 Axis to Inhibit Tumor-Initiating Cells and IL-6-Mediated Paracrine Effects in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 73, 3425-3440.

Zettl, M., Adrain, C., Strisovsky, K., Lastun, V., and Freeman, M. (2011). Rhomboid family pseudoproteases use the ER quality control machinery to regulate intercellular signaling. *Cell* 145, 79-91.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger danke ich für die Förderung durch ein Promotionsstipendium der *Integrated Research Training Group Proteases and Pathophysiology* des Sonderforschungsbereiches 877 *Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology*.

Mein besonderer Dank gilt Univ. Prof. Dr. Stefan Rose-John für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Daüber hinaus möchte ich Dr. Athena Chalaris-Rissmann für die geduldige Einarbeitung, die Betreuung und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe danken. Vielen Dank für die großartige Unterstützung und die schöne Zeit.

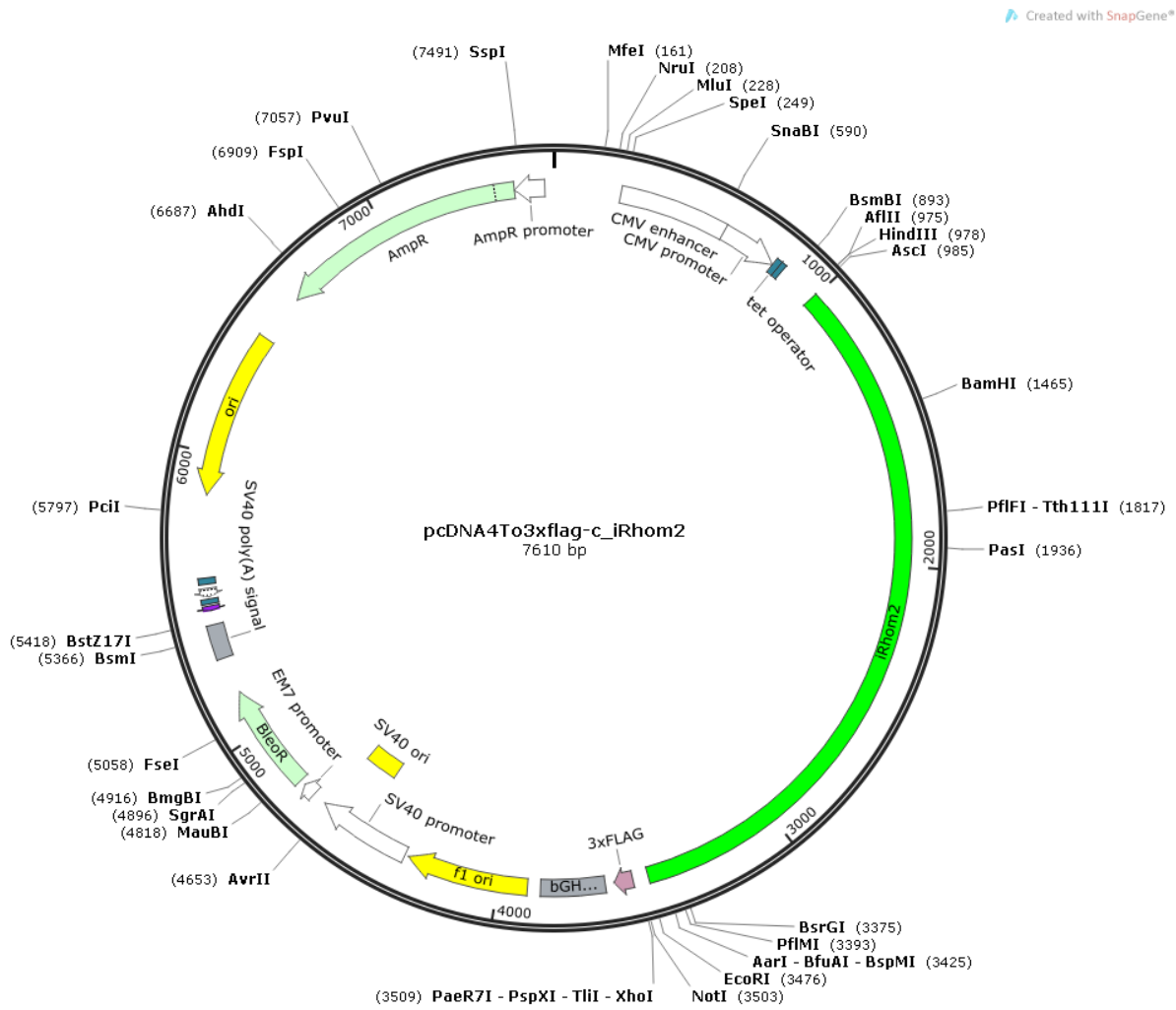
Großer Dank gilt außerdem Dip. Biol. Jeanette Schwarz und Dipl. Biochem. Stefanie Schmidt für die praktische Einweisung, die tägliche Betreuung mit großer Geduld und die kollegiale Teamarbeit. Ich danke euch von Herzen für fachlichen und menschlichen Beistand während meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der kompletten AG Chalaris bedanken. Danke für die große Hilfsbereitschaft, den kollegialen Umgang und die schöne Zusammenarbeit.

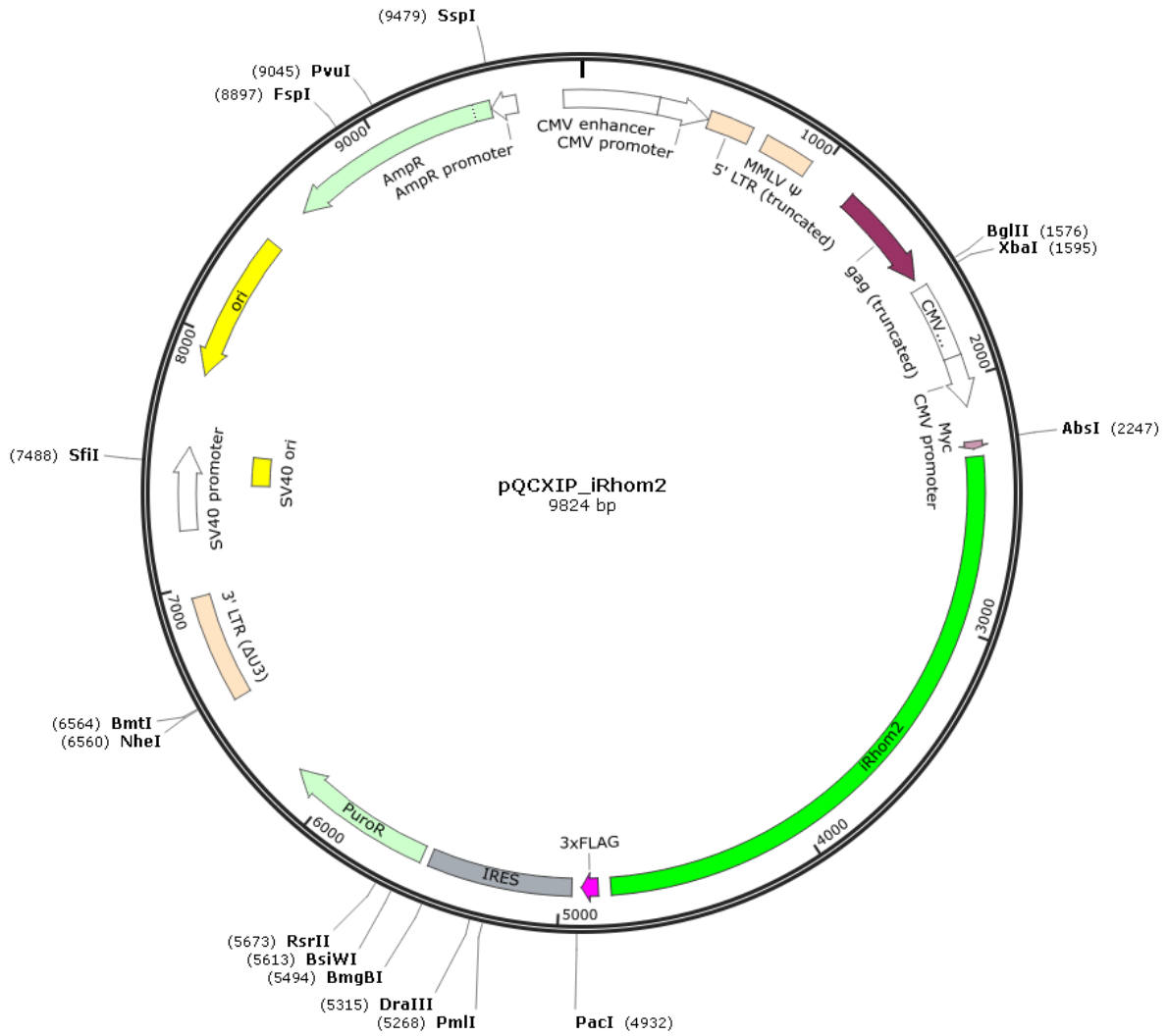
Ich danke außerdem André Mauermann für stetige Inspiration und gedanklichen Austausch und Janine Ficker für ihre interdisziplinäre Unterstützung.

Neben den kollegialen Dankesbekundungen richtet sich mein besonderer Dank an meine Eltern, Brüder und Freunde für den emotionalen Beistand und stetige Motivation in dieser Zeit. Ich danke vor allem Dennis Giwoleit, der durch seine tägliche Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht hat.

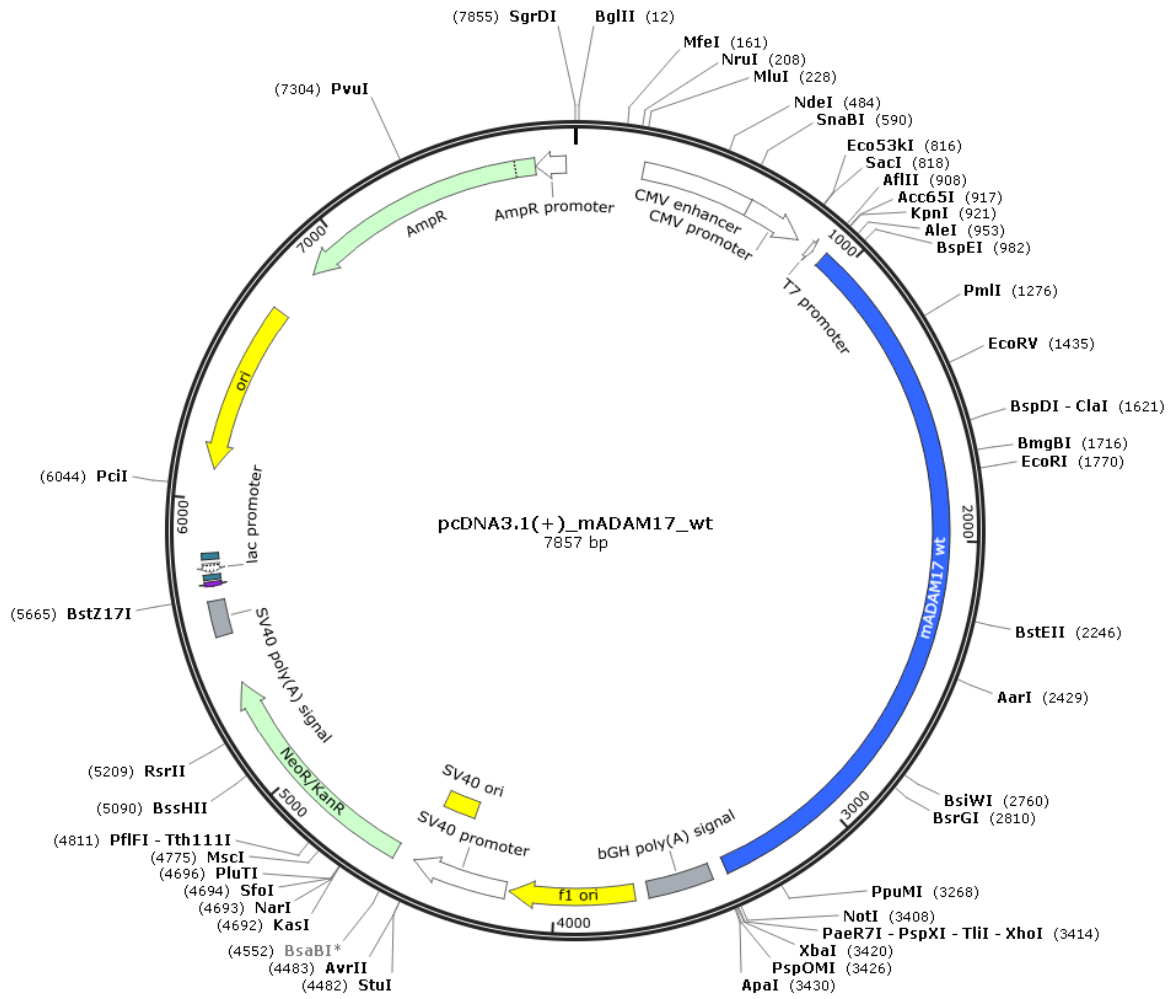
Anhang



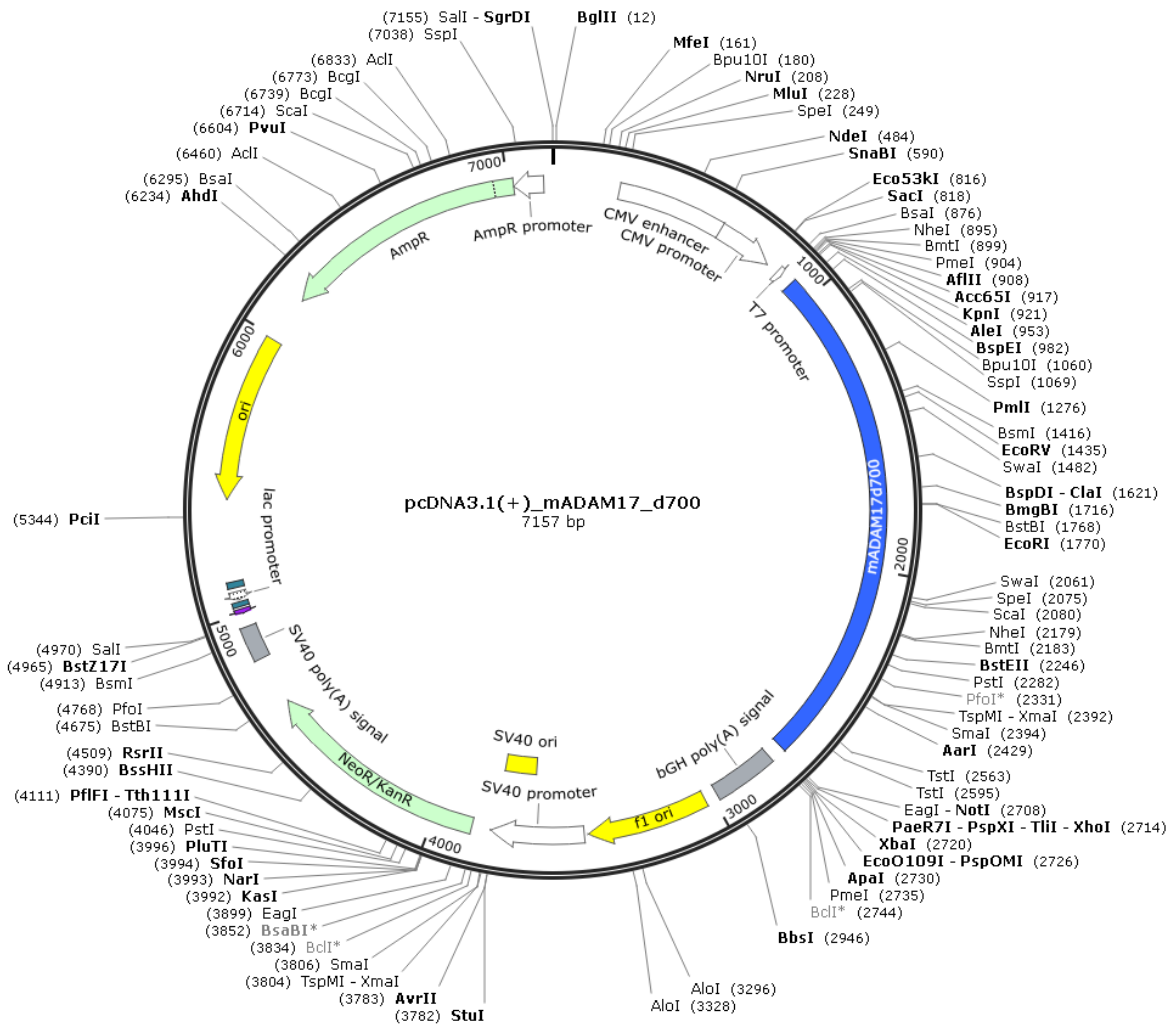
Anhang I: Vektorkarte des Vektors pcDNA4To3xflag-c_iRhom2



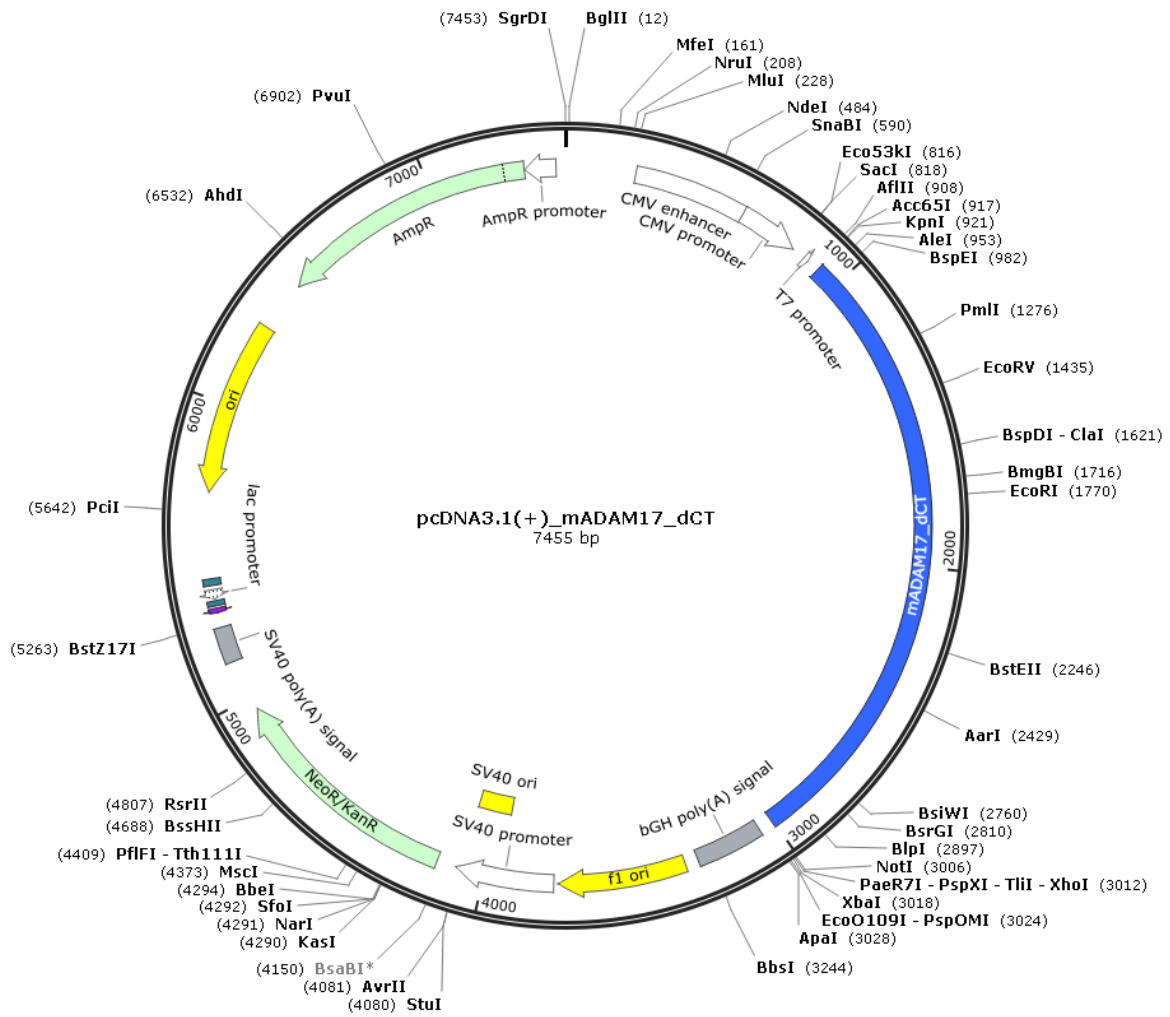
Anhang II: Vektorkarte des Vektors pQCXIP_iRhom2



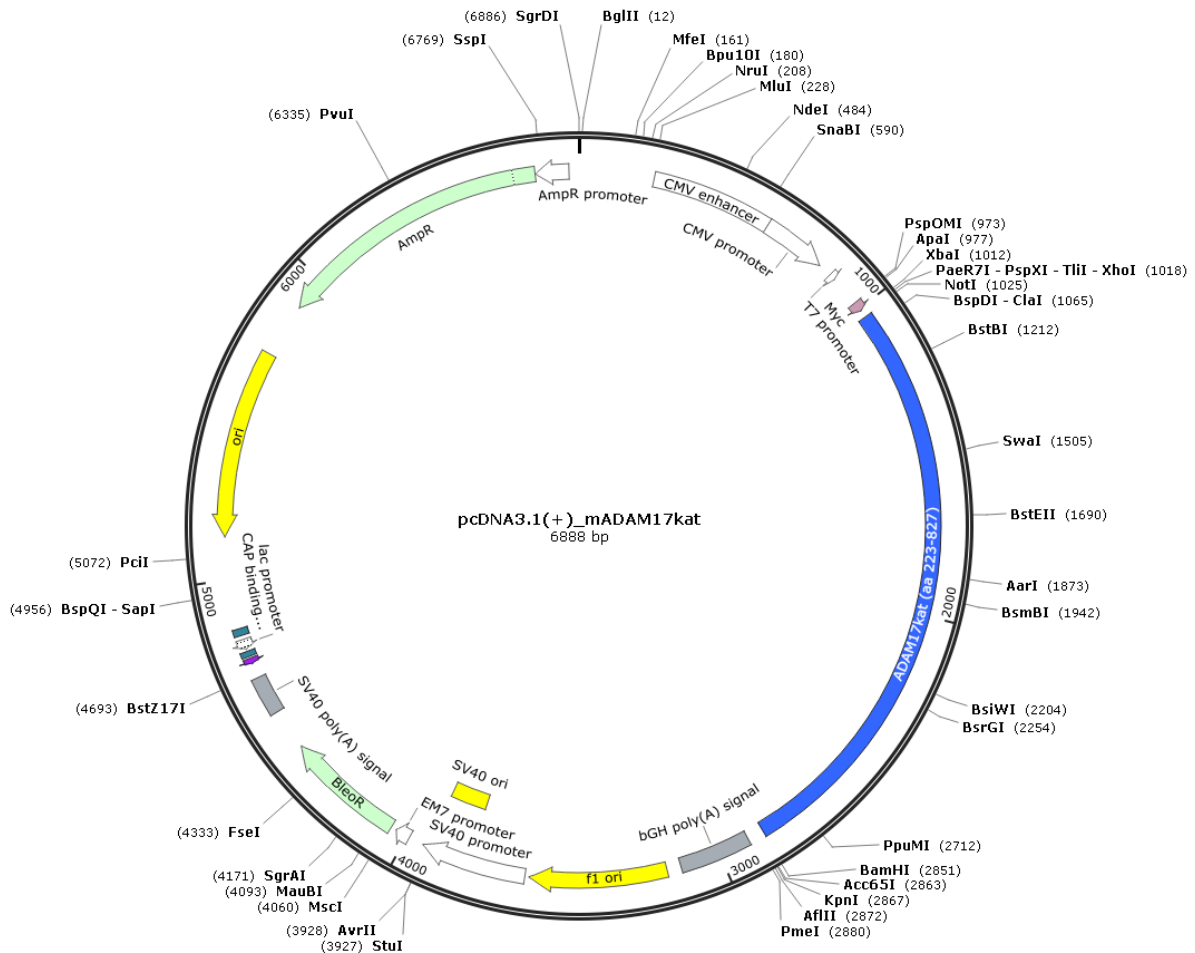
Anhang III: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_wt



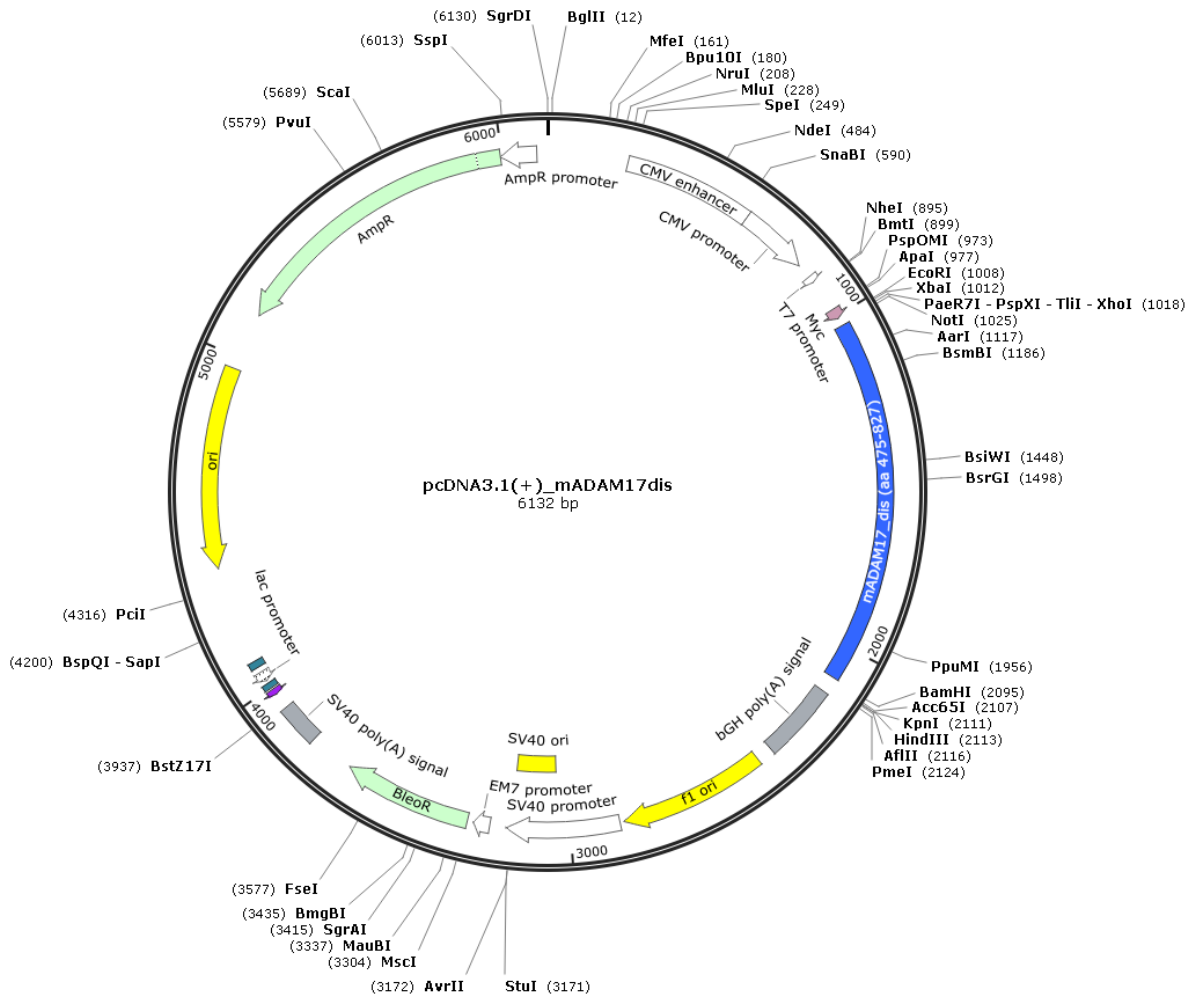
Anhang IV: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_d700



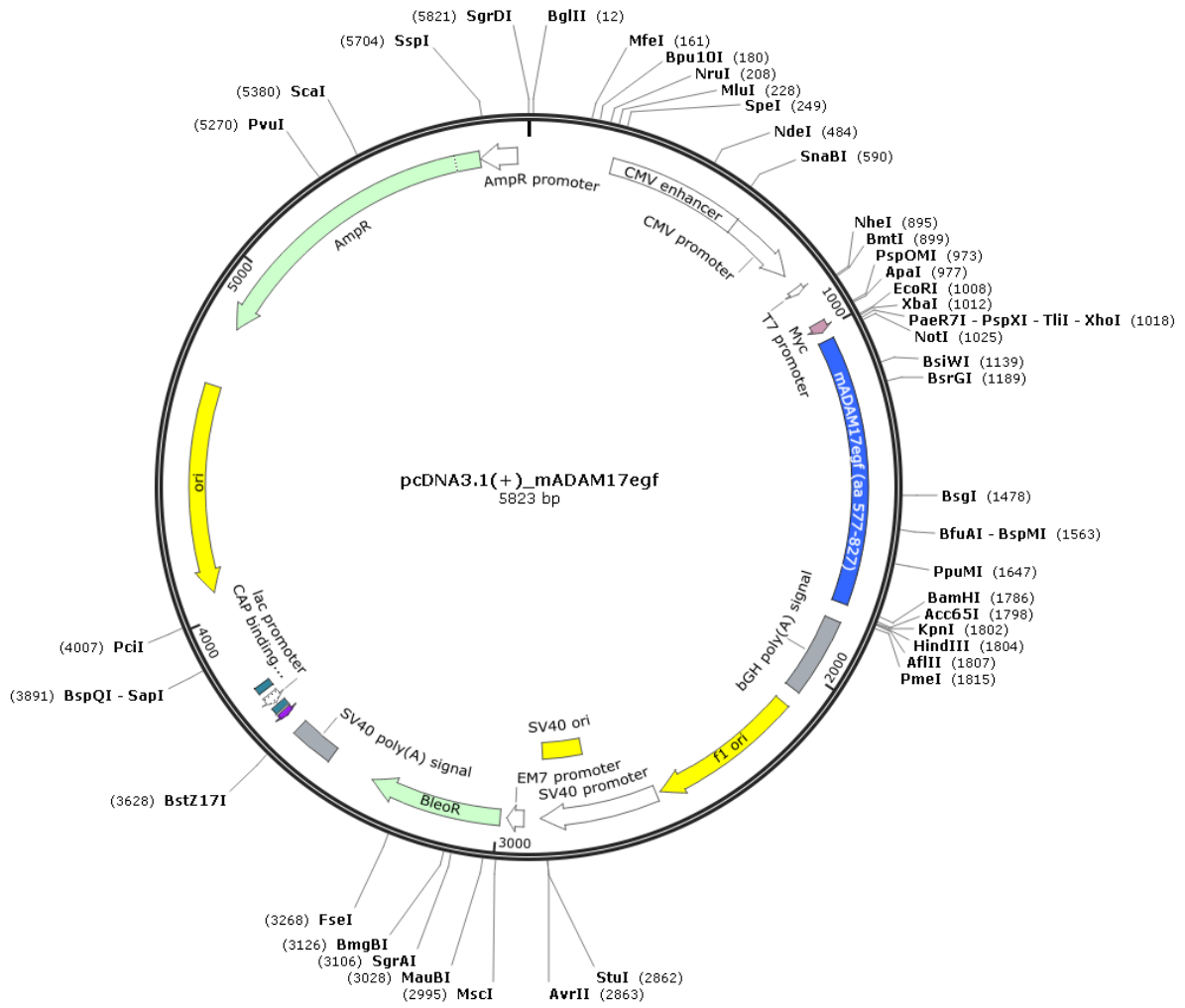
Anhang V: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_dCT



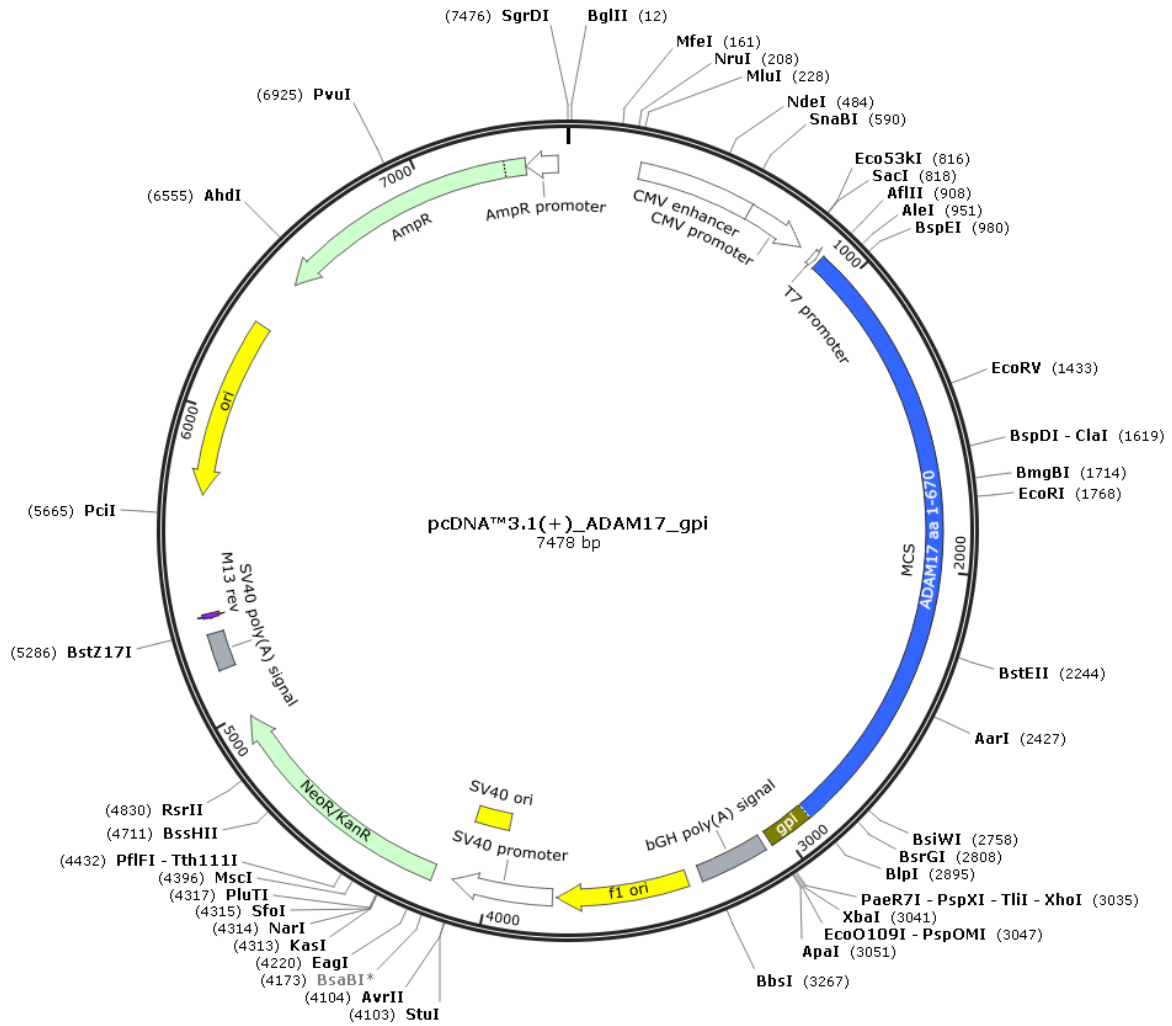
Anhang VI: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17kat



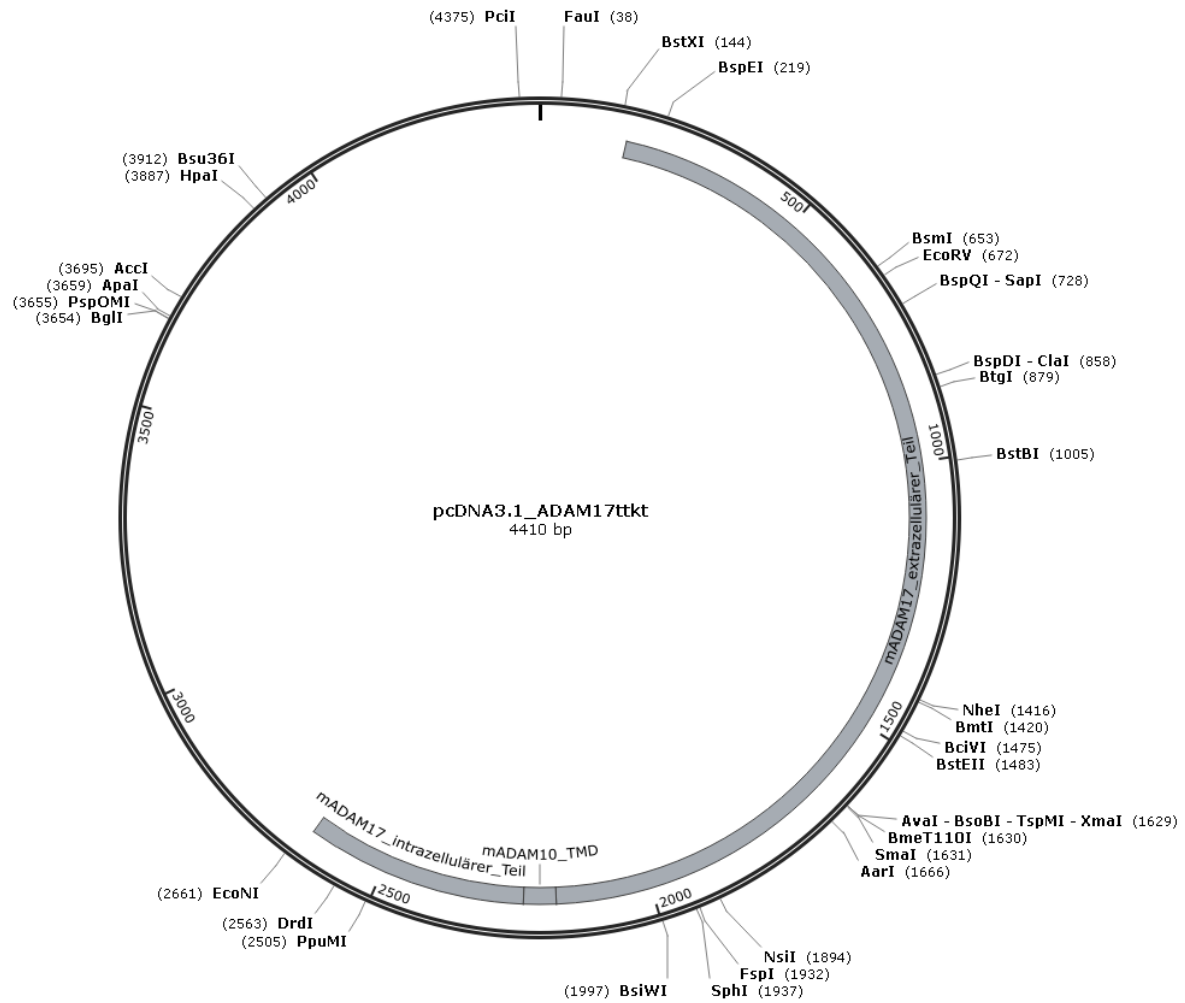
Anhang VII: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17dis



Anhang VIII: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17egf



Anhang IX: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17_gpi



Anhang X: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1(+)_mADAM17ttkt

Anhang XI: Datenträger mit PDF-Datei dieser Dissertation

Lebenslauf

Ansgard Freya Helmstetter

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	15. April 1987
Geburtsort	Leipzig
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Ausbildung

01/2012	Beginn der Promotion mit DFG-Stipendium Biochemisches Institut CAU Kiel
12/2011	Zahnärztliche Prüfung CAU Kiel
03/2009	Zahnärztliche Vorprüfung CAU Kiel
10/2007	Naturwissenschaftliche Vorprüfung CAU Kiel
10/2006	Beginn des Studiums der Zahnheilkunde CAU Kiel
06/2006	Abitur Mariengymnasium Werl

Nebenbeschäftigungen

01/2010 bis 04/2010	Wissenschaftliche Hilfskraft Institut für Pathologie UKSH Kiel
03/2009 bis 09/2010	Wissenschaftliche Hilfskraft Anatomisches Institut der CAU Kiel

Beruflicher Werdegang

Seit 09/2013

Assistentzahnärztin

Zahnarztpraxis Dipl.Stom. E. Schmidt in Wurzen

Veröffentlichung

Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrucker, H.W., Rabe B, Rose-John S, Chalaris A. (2013). Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3355-3367.