

Aus dem Biochemischen Institut  
(Direktor Prof. Dr. Stefan Rose-John)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLUSS VON DER MEMBRANPROXIMALEN DOMÄNE UND  
TEILEN DER *STALK*-REGION AUF DIE METALLOPROTEASE  
ADAM17**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

**JONA RÖSELER**

aus Hamburg

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grötzinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Tholey

Tag der mündlichen Prüfung: 02.08.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 03.02.2017

gez.: Prof. Dr. Christof Dörfer

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen lieben Eltern  
und dem Deutschen Staate,  
welche mir mein Studium  
und diese Arbeit ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
2.1	Eine Metalloprotease schreibt Geschichte.....	8
2.2	<i>Shedding</i> als Phänomen zellulärer Interaktion.....	9
2.3	ADAM17: zwischen Krankheit und Genesung .....	10
2.3.1	Tumornekrosefaktor-Alpha .....	10
2.3.2	Interleukin-6-Rezeptor .....	11
2.3.3	Interleukin-1-Rezeptor Typ-II .....	12
2.3.4	Transformierender-Wachstumsfaktor-Alpha .....	12
2.3.5	Phänotyp nach ADAM17-Deletion.....	12
2.3.6	ADAM17 im Kontext Krankheit und Entwicklung.....	13
2.4	Struktureller Aufbau ADAM17s .....	14
2.5	Die membranproximale Domäne als Schlüssel zu Regulation ADAM17s.....	15
2.6	Die Protein-Disulfid-Isomerase und ADAM17: Einblick in neue Regulationsmechanismen.....	16
<b>3</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Methoden und Material .....</b>	<b>18</b>
4.1	Methoden .....	18
4.1.1	<i>Western-blotting</i> .....	18
4.1.2	<i>Western-blot strippen</i> .....	18
4.1.3	Zellen auftauen .....	19
4.1.4	Zellen einfrieren .....	19
4.1.5	Zellen <i>splitten</i> .....	19
4.1.6	Zellen aussähen .....	20
4.1.7	Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen .....	20
4.1.8	Transiente Transfktion von mEF-Zellen.....	20
4.1.9	Ko-Präzipitationsexperimente durch Nickel- <i>beads</i> .....	21
4.1.10	Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Sepharose- <i>beads</i> .....	21
4.1.11	Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Protein-G- <i>beads</i> .....	22
4.1.12	<i>Shedding</i> -Aktivitätsassays.....	23
4.1.13	ELISA .....	24
4.2	Material.....	25
4.2.1	<i>Kits</i> , Entwickler und Marker .....	25
4.2.2	Zelllinien .....	25
4.2.3	Vektoren .....	26
4.2.4	Zellmedien, Trasfektionsreagenzien, Selektionsantibiotika und <i>beads</i> .....	26
4.2.5	Geräte.....	27

4.2.6	Labormaterial.....	28
4.2.7	Computer-Programme.....	30
4.2.8	Chemikalien.....	30
4.2.9	Puffer und Lösungen .....	30
4.2.10	SDS-PAGE .....	32
4.2.11	Antikörper.....	33
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
5.1	Mögliche Interaktionspartner der Protein-Disulfid-Isomerase-A6 (PDIA6).....	34
5.1.1	Methodenetablierung.....	34
5.1.2	Interaktionsnachweis von Galektin9 und GRP78.....	35
5.1.3	Interaktion von Galektin9 und GRP78 nach Stimulation .....	36
5.1.4	Interaktion von PDIA6 und GRP78 .....	38
5.2	Abhängigkeit der Multimerisierung ADAM17s von der MPD und der CANDIS ...	39
5.2.1	Expressionsversuche der ADAM17-Chimären.....	39
5.2.2	Multimerisierung von ADAM17-Wildtyp und ADAM17-ADAM10-Chimären.....	41
5.2.3	Multimerisierung homogener ADAM17-ADAM10-Chimären .....	43
5.3	Abhängigkeit der Substratbindung ADAM17s von der MPD und der CANDIS.....	46
5.3.1	Bindung des hIL6Rs an ADAM17-ADAM10-Chimären.....	46
5.4	Einfluss der MPD und der CANDIS auf die <i>shedding</i> -Aktivität ADAM17s.....	49
5.4.1	Methodenetablierung für Aktivitätsassays.....	49
5.4.2	Expressionslevel stabil ADAM17-transfizierter Zellklone.....	52
5.4.3	Aktivitätsassays mit stabil ADAM17-transfizierten Zellen.....	54
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
6.1	Galektin9 als mögliches Transportprotein für PDIA6 und GRP78.....	57
6.2	Exprimierbarkeit von ADAM17-Chimären in HEK-293T-Zellen .....	59
6.3	Einfluss der MPD und der CANDIS auf die Multimerisierung von ADAM17 .....	60
6.4	Die Rolle der CANDIS und der MPD bei der Substratbindung von ADAM17 .....	63
6.5	Die <i>shedding</i> -Aktivität ADAM17s wird reguliert durch MPD und CANDIS .....	65
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>69</b>
8.1	Sequenzen.....	69
8.2	Literaturverzeichnis.....	71
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	76
8.4	Tabellenverzeichnis .....	78
8.5	Publikation .....	79
8.6	Danksagung.....	80
8.7	Lebenslauf.....	81

## 1 Abkürzungen

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über alle in dieser Schrift verwendeten Abkürzungen. Alle Abkürzungen sind überdies beim ersten Nennen ausgeschrieben.

**Tabelle 1: Abkürzungen**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
-AP	Alkaline-Phosphatase
ADAM	<i>A-Disintegrin-And-Metalloproteinase</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines-Serumalbumin
CANDIS	<i>Conserved-ADAM-Seventeen-Dynamic-Interaction-Sequence</i>
DMEM	<i>Dulbecco's-modified-Eagle's-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	erhöht-Grün-Fluoreszierendes-Protein
EGFR	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Gal9	Galektin9
gp130	Glycoprotein 130
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP78	Glukose-Reguliertes-Protein-78
h-	human
IL1R <sub>II</sub>	Interleukin-1-Rezeptor Typ-II
IL6R	Interleukin-6-Rezeptor
JAK	Janus-Kinase
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
<i>met-turn</i>	Methionin-Schleife
MPD	membranproximale Domäne
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i>
PDIA6	Protein-Disulfid-Isomerase, Familie A, Typ 6
PEI	Polyethylenimin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
s-	löslich
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate-PolyAcrylamide-Gel-Electrophoresis</i>
SVMP	Schlangengiftmetalloprotease

## Abkürzungen

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TBS	<i>tris-buffered-saline</i>
TBST	<i>tris-buffered-saline-with-tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF $\alpha$	Transformierender-Wachstumsfaktor-Alpha
TNBC	Dreifach-Negativer-Brustkrebs
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-Alpha
VAP1	Vaskuläres-Apoptoseinduzierendes-Protein-1
Zn <sup>2+</sup>	Zinkkation

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Eine Metalloprotease schreibt Geschichte

*A-Disintegrin-And-Metalloproteinase-17*, kurz ADAM17, ist eine typ-I-transmembranäre Metalloprotease. Ihre Entdeckung reicht zurück in das Jahr 1997. Dort wurde gleichzeitig von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen die Entdeckung eines Enzyms beschrieben und publiziert, welches das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF $\alpha$ ) von seiner membrangebundenen in eine lösliche Form überführt (1,2). Somit wurde das Enzym zunächst Tumornekrosefaktor-Alpha-*Converting-Enzyme*, kurz TACE, genannt. Schon zu diesem Zeitpunkt lag die immense Wichtigkeit des Verständnisses von ADAM17 auf der Hand. Durch seine Einbindung in zahlreiche physiologische, sowie pathologische Prozesse ist ADAM17 bis heute ins Zentrum intensiver Forschungsbemühungen gerückt (3–5).

ADAM17 gehört als Mitglied der ADAMs zur Superfamilie der Metzinkine, welche allesamt ein charakteristisches HEXXHXXGXXH-Motiv in ihrem katalytischen Zentrum und eine C-terminal davon liegende Methionin-Schleife (*met-turn*) aufweisen (5). Durch die Histidinreste (H) kann ein Zinkkation (Zn<sup>2+</sup>) koordiniert werden, während der Glutaminsäurerest (E) als katalytische Base fungiert. Der *met-turn* schafft dabei ein hydrophobes Milieu (6). Durch Unterscheidung in Struktur und Funktion werden die Metzinkine weiter unterteilt, sodass die ADAMs zusammen mit den Schlangengift-Metalloproteasen (SVMPs) zur Unterfamilie der Adamalysine gehören (5).

Im Genom der Säuger sind 40 für ADAMs codierende Bereiche identifiziert worden, wovon 21 auch im menschlichen Genom zu finden sind (3). Allerdings sind nicht alle Mitglieder der ADAM-Familie proteolytisch aktiv. Nur 13 der im Menschen identifizierten ADAMs besitzen ein katalytisches Zentrum und sind damit zur Proteolyse befähigt (ADAMDEC1, ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33) (5). Von diesen nehmen die Proteasen ADAM17 und ADAM10 eine gesonderte Rolle ein (siehe auch 2.4). Genom-Sequenzanalysen ergaben, dass orthologe Bereiche in verschiedensten Spezies vorkommen. Dazu gehören die Hefe *Schizosaccharomyces pombe*, die Taufliege *Drosophila melanogaster*, sowie einige primitive Chordaten (7,8). Diese evolutionär hoch konservierten Sequenzen lassen auf eine enorme Wichtigkeit schließen. ADAM17 stellt in seiner Sequenz eine Besonderheit dar. Weniger als 30 Prozent der Sequenz ist homolog zu dem nächsten Verwandten aus der ADAM-Familie ADAM10 (3).

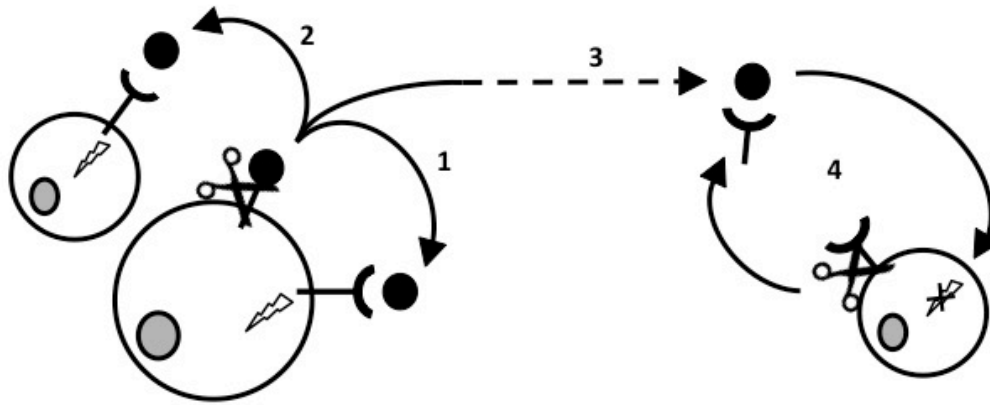


Für die Metalloprotease ADAM17 werden bis heute unterschiedliche Synonyme verwendet. So sind in der Literatur neben ADAM17 auch die Bezeichnungen TACE, CD156b, cSVP und MGC1942 zu finden. In dieser Arbeit soll durchweg die Bezeichnung ADAM17 verwendet werden.

### **2.2 *Shedding* als Phänomen zellulärer Interaktion**

ADAM17 ist als membranständige Metalloprotease in einen Prozess der Ektodomänenproteolyse eingebunden. Die Ektodomänenproteolyse, auch *shedding* genannt, bezeichnet ein Phänomen, bei welchem zunächst membrangebundene Proteine von der Zelloberfläche geschnitten werden, um so in eine lösliche Form überführt zu werden. Die Prozessierung erfolgt dabei dicht oberhalb der Zellmembran und ist auf Typ-I- und Typ-II-Transmembranproteine beschränkt (9). So stellt das *shedding* neben der Ubiquitylierung, der Glykosylierung und der Phosphorylierung eine weitere posttranslationale Modifikation dar, welche allerdings irreversibel ist.

Daraus ergeben sich mehrere Konsequenzen. So kann ein von der Zellmembran durch *shedding* freigesetzter Ligand beispielsweise an einen Rezeptor auf der eigenen Zelle (autokrin) oder auf einer benachbarten Zelle (parakrin) binden und stimulieren. Auch können Liganden in den Blutstrom übergehen und somit an Rezeptoren in weiterer Entfernung binden und damit einen endokrinen Effekt entfalten. Für die *shedding*-aktive Zelle ergeben sich allerdings noch weitere Konsequenzen. So kann eine Zelle durch das Abspalten membrangebundener Rezeptoren ihre Sensitivität gegenüber Stimuli und Signalen verlieren, während die gelösten Rezeptoren ihrerseits Liganden abfangen und somit deren Effekt noch weiter herabsetzen. Übertragen auf eine Tumorzelle kann dieser Mechanismus im negativen Sinne genutzt werden, um tumormarkierende Oberflächenstrukturen zu entfernen und sich somit vor dem Immunsystem oder einer zielgerichteten Antikörpertherapie unkenntlich zu machen (10).



**Abbildung 1: Shedding als Mechanismus zellulärer Interaktion.** 1: autokriner Effekt; 2: parakriner Effekt; 3: endokriner Effekt; 4: shedding von membranständigen Rezeptoren und Oberflächenstrukturen und damit einhergehender Resistenz der Zelle gegenüber Stimuli sowie Bindung des Liganden durch den löslichen Rezeptor.

### 2.3 ADAM17: zwischen Krankheit und Genesung

Bislang sind über 70 Substrate von ADAM17 beschrieben (11). Ihre Diversität reicht von proinflammatorischen Zytokinen bis hin zu antiinflammatorischen und wachstumsstimulierenden Effektoren. Damit ist ADAM17 sowohl an immunologischen, als auch an Regenerations- und Entwicklungsprozessen beteiligt (3). Im Folgenden sollen einige Substrate, ihre Wirkweisen und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für Krankheitsentwicklung und Therapieansätze beschrieben werden.

#### 2.3.1 Tumornekrosefaktor-Alpha

Das Zytokin TNF $\alpha$  gehört zu den wohl prominentesten Substraten ADAM17s. Es wird als Typ-II-Transmembranprotein exprimiert, und kann nach proteolytischer Freisetzung von der Zelloberfläche diffundieren. Die Aufgaben, die es dabei erfüllt sind mannigfaltig und für den Organismus überlebenswichtig. So ist beispielsweise nach Invasion gram-negativer Bakterien und der damit verbundenen Akkumulation von Lipopolysacchariden (LPS) als Bestandteil der bakteriellen Zellmembran TNF $\alpha$  als Initiator der angeborenen Immunantwort bekannt. Ausgeschüttet von Monozyten und Mastzellen können so neutrophile und eosinophile Granulozyten angelockt und stimuliert werden. Weitere Monozyten werden rekrutiert und ein fein abgestimmtes System verschiedener Interleukine, Interferone und weiterer Chemokine führt zur Einleitung einer Akute-Phase-Reaktion mit Fieber, lokaler Rötung und Schwellung (12). Damit sind optimale Bedingungen zur Bekämpfung pathogener Keime gegeben.

Gleichzeitig kann aber eine zu hohe Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$ , beispielsweise durch Akkumulation großer Mengen LPS, zum endotoxischen Schocksyndrom und Tod führen. In Experimenten an Primaten, bei welchen Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper eingesetzt wurden, konnte die Schocksymptomatik verhindert werden (13). Ähnliche Beobachtungen wurden in Mäusen nach Einsatz von ADAM17-Inhibitoren gemacht (14). Auch zeigten konditioniert transgene Mäuse, in welchen die ADAM17-Expression in allen myeloischen Zelllinien blockiert wurde, keine Schocksymptomatik nach LPS-Injektion (15). Diese Erkenntnisse heben ADAM17 als möglichen therapeutischen Angriffspunkt in der akuten Schocksymptomatik hervor.

Aber nicht nur an der akuten Immunantwort ist  $\text{TNF}\alpha$  beteiligt. So weiß man heute, dass das von ADAM17 prozessierte Zytokin eine große Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie den chronisch-entzündlicheren Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis sowie der multiplen Sklerose, als Erkrankung des zentralen Nervensystems, spielt (16). Auch hier wird über einen therapeutischen Ansatz an ADAM17 nachgedacht (17).

### **2.3.2 Interleukin-6-Rezeptor**

Ein weiteres von ADAM17 prozessiertes Protein ist der Interleukin-6-Rezeptor (IL6R) (5). Dieser  $\alpha$ -Rezeptor ist ein Typ-I-Transmembranprotein und vor allem an Entzündungs- und immunologischen Prozessen beteiligt. Nach Bindung des Liganden Interleukin-6 (IL6) an seinen Rezeptor bildet dieser mit zwei homologen  $\beta$ -Rezeptoren, dem Glycoprotein 130 (gp130), einen Komplex. Dadurch können intrazellulär Janus-Kinasen (JAK) verschiedene STAT-Signalwege aktivieren, welches letztlich zur Produktion verschiedener Akute-Phase-Proteine in der Leber sowie der Stimulation neutrophiler Granulozyten und B-Zell-Differenzierung führt.

Während die Expression des IL6Rs beschränkt ist auf Hepatozyten, Monozyten sowie einige T- und B-Zellen, wird der  $\beta$ -Rezeptor gp130 von allen Körperzellen gebildet (18). Dies ermöglicht das sogenannte *trans-signalling*, bei welchem eine lösliche Form des IL6Rs (sIL6R) nach IL6-Ligandenbindung an ein gp130-Homodimer bindet und so eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst. Anders als der klassische Signalweg ist das *trans-signalling* mit verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen assoziiert worden. Dazu gehören chronische Darmerkrankungen wie der Morbus Crohn, die rheumatoide Arthritis sowie Asthma Bronchiale und Peritonitis (19). Die Bildung des sIL6Rs geht

dabei vor allem auf *shedding* zurück. Als hauptverantwortliche Proteasen wurden ADAM10 und ADAM17 identifiziert, wobei ADAM17 das induzierbare *shedding* nach Stimulation übernimmt, während ADAM10 für das konstitutive IL6R-*shedding* zuständig zu sein scheint (18).

### 2.3.3 Interleukin-1-Rezeptor Typ-II

Neben diesen proinflammatorischen Substraten von ADAM17 vermittelt der Interleukin-1-Rezeptor Typ-II (IL1R<sub>II</sub>), welcher als Typ-I-Transmembranprotein strukturell dem IL6R ähnlich ist, eine antiinflammatorische Wirkung. Nach ADAM17-vermitteltem *shedding* (20) kann dieser als löslicher Rezeptor zirkulierendes Interleukin-1- $\alpha$  und - $\beta$  (IL1 $\alpha/\beta$ ) abfangen und so einer akuten Immunantwort entgegenwirken (21).

### 2.3.4 Transformierender-Wachstumsfaktor-Alpha

Aber nicht nur an immunologischen Prozessen ist ADAM17 beteiligt. Das Substrat Transformierender-Wachstumsfaktor-Alpha (TGF $\alpha$ ) ist als Ligand des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) an diversen entwicklungs- und wachstumsphysiologischen Prozessen beteiligt. So spielt es eine besondere Rolle in der Zahnentwicklung, dem Haarwachstum sowie der Regeneration epithelialer Wunden (22,23).

Des Weiteren wurde TGF $\alpha$  ein wachstumsstimulierender Effekt im Epithel der Brustdrüsen zugeschrieben (24). Dieser Zusammenhang rückt besonders in der Entwicklung von Mammakarzinomen ins Zentrum wissenschaftlichen Interesses. So konnte für Zelllinien des Dreifach-Negativen-Brustkrebses (TNBC) gezeigt werden, dass eine Blockade von ADAM17 zu einem erheblichen Rückgang von Invasion, Migration und Kolonieformierung führt (25). Daher lässt sich zur Optimierung zukünftiger Behandlungen des TNBCs eine kombiniert zielgerichtete Antikörpertherapie gegen EGFR und ADAM17 diskutieren (25).

### 2.3.5 Phänotyp nach ADAM17-Deletion

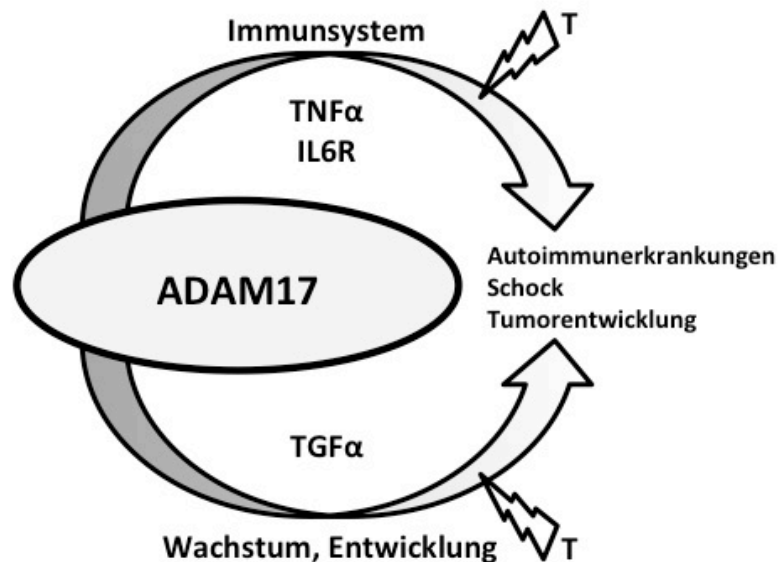
Die enorme Wichtigkeit ADAM17s für unseren Organismus wird besonders deutlich durch Betrachtung des ADAM17-defizienten Phänotyps. So sterben Mäuse, welche statt des Wildtyps eine inaktive Variante von ADAM17 exprimieren, perinatal (26). Für hypomorphe ADAM17-Mäuse (ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäuse), in welchen die ADAM17-

Produktion in allen Geweben auf etwa 5 Prozent reduziert ist, ist ein spezifischer Phänotyp bekannt. So sind Augen-, Fell- und Hautdefekte sowie eine höhere Anfälligkeit für induzierte Entzündungserkrankungen und eine geringere Regenerationsfähigkeit beschrieben (27).

Beim Menschen scheint das Fehlen von ADAM17 nicht zwangsläufig letal zu sein, allerdings sind schwere Haut- und Darmerkrankungen bei einem Patienten mit ADAM17-Deletion beschrieben (28).

### 2.3.6 ADAM17 im Kontext Krankheit und Entwicklung

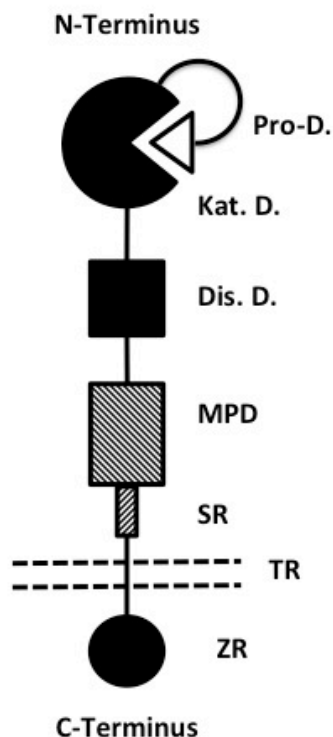
Allein anhand dieser Auswahl an Substraten wird die Relevanz und Wichtigkeit des Verständnisses von ADAM17 deutlich. Eingebunden in Wachstums- und Immunprozesse übernimmt ADAM17 die Rolle eines Schlüsselenzyms bei der Freisetzung von Liganden und Rezeptoren. Damit wird deutlich, dass ADAM17 zumindest in Mausmodellen überlebenswichtig ist, dass es aber bei einer Überaktivierung von ADAM17 in spezifischen Geweben zu Autoimmun- und Tumorerkrankungen kommt. Gerade beim Übergang von physiologischen in pathologische Prozesse wird bereits über zielgerichtete Therapieansätze gegen die Aktivität ADAM17s, zumindest als unterstützende Maßnahme zu bisher etablierten Therapien, diskutiert (29).



**Abbildung 2: ADAM17 zwischen Krankheit und Genesung.** Durch die Vielzahl an Substraten ist ADAM17 sowohl an immunologischen, als auch an Wachstums-, Wundheilungs- und Entwicklungsprozessen beteiligt. Während ein physiologisches Maß an ADAM17-Aktivität überlebenswichtig ist, kann eine Überaktivität zu Autoimmunerkrankungen, Schocksymptomatik und Tumorentwicklung führen. Daher wird im Falle einer Überaktivität über einen spezifischen Therapieansatz (T) an ADAM17 nachgedacht.

## 2.4 Struktureller Aufbau ADAM17s

Als Typ-I-Transmembranprotein reicht der N-Terminus ADAM17s in den extrazellulären Raum, während sich der C-Terminus in der Zelle befindet. Insgesamt besteht ADAM17 aus 824 Aminosäuren (3) und folgt im Aufbau, bis auf wenige Ausnahmen dem der anderen ADAMs. So beginnt ADAM17 N-terminal mit einem Signalpeptid, welches an die Pro-Domäne grenzt. Diese inhibiert die angrenzende katalytische Domäne und wird während des Transports zur Zelloberfläche von der Pro-Proteinkonvertase Furin abgespalten (30,31). C-terminal der katalytischen Domäne folgt die disintegrinähnliche Domäne, welche zur Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten und damit einhergehender Inhibition ADAM17s, sowie zur Positionierung der katalytischen Domäne zum Substrat gebraucht wird (32–34). In der folgenden Domäne unterscheidet sich ADAM17 von den anderen ADAM-Proteasen. So hat ADAM17, wie auch ADAM10, eine membranproximale Domäne (MPD) (weitere Erläuterungen siehe 2.5), während die typischen Mitglieder der ADAM-Familie eine cysteinreiche und eine



**Abbildung 3: Domänen-Struktur ADAM17s.** Pro-D.: Pro-Domäne; Kat. D.: katalytische Domäne; Dis. D.: disintegrinähnliche Domäne; MPD: membranproximale Domäne; SR: *stalk*-Region; TR: Transmembran-Region; ZR: zytoplasmatische Region.

EGF-ähnliche Domäne besitzen (34,35). C-terminal der MPD liegt eine kurze *stalk*-Region sowie die Transmembran- und eine zytoplasmatische Region. Letztere enthält potentielle Phosphorylierungsstellen, wodurch die *shedding*-Aktivität ADAM17s reguliert werden kann (36–38).

Durch Vergleiche mit dem SVMP Vasculäres-Apoptoseinduzierendes-Protein-1 (VAP1) kann für den extrazellulären Bereich von ADAM17 eine C-förmige Orientierung angenommen werden, bei welcher die katalytische Domäne der Zelloberfläche und damit der MPD nahe kommt (39).

ADAM17 besitzt eine molekulare Masse von 120 kDa für die Pro-Form und 85 kDa für die reife Form.

## 2.5 Die membranproximale Domäne als Schlüssel zu Regulation ADAM17s

Wie bereits in 2.4 erwähnt, weist ADAM17, wie auch ADAM10, als atypisches Mitglied der ADAM-Familie, eine Besonderheit in seiner Domänenstruktur auf. An Stelle der cysteinreichen und EGF-ähnlichen Domänen zeigen ADAM17 und ADAM10 eine membranproximale Domäne (MPD), welche sich in ihrer Struktur von der EGF-ähnlichen Domäne der typischen ADAM-Mitglieder unterscheidet (34,35).

In Ko-Immunopräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die MPD ADAM17s (MPD17) als kleinste notwendige Einheit für deren Multimerisierung verantwortlich ist (40). Die bei diesen Experimenten verwendeten MPD17-Konstrukte waren mittels eines Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-)Ankers in der Zellmembran verhaftet, besaßen allerdings noch den kleinen Bereich der *stalk*-Region. Mit Hilfe der selben Konstrukte konnte in Folgeexperimenten gezeigt werden, dass neben der Multimerisierung auch die Substraterkennung, im Falle der typ-I-transmembranären Substrate IL6R und IL1R<sub>II</sub>, durch die MPD ADAM17s erfolgt (35). Für das typ-II-transmembranäre Substrat TNF $\alpha$  konnte dies nicht gezeigt werden, welches auf einen anderen Erkennungsmechanismus im Falle von Typ-II-Transmembranproteinen schließen lässt (35).

Bald darauf wurde ein hoch konservierter Bereich von 14 Aminosäuren direkt unterhalb der MPD17 in der *stalk*-Region identifiziert, welcher eine  $\alpha$ -helikale Struktur mit einem amphipathischen Charakter bildet und unter den ADAMs für ADAM17 einzigartig ist (41). Untersuchungen ergaben, dass die Substraterkennung des IL6Rs sowie des IL1R<sub>II</sub>, nicht wie zunächst erwartet direkt an der MPD17 erfolgen, sondern an eben jener Sequenz von 14 Aminosäuren (41). Ebenso konnte der für die Multimerisierung zuständige Bereich weiter auf diese Sequenz eingegrenzt werden (42). Daher wurde der Bereich Conserved-ADAM-Seventeen-Dynamic-Interaction-Sequence (konservierte dynamische ADAM17-Interaktionssequenz), kurz CANDIS, genannt.

Für die MPD in ADAM17 wurde eine spezifische Konformationsänderung durch Modifikation von Disulfidbrücken nachgewiesen (43). Durch Inkubation ADAM17s mit der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) konnte die MPD17 irreversibel von einer sogenannten offenen, flexiblen in eine geschlossene, rigide Konformation überführt werden. Letztere ähnelt in ihrer Struktur stark der MPD von ADAM10 (43). Während die offene Form ADAM17s ihr Substrat, den IL6R, binden konnte, war dies für die

geschlossene Form nicht möglich (43). Auch das *shedding* sowohl typ-I- als auch typ-II-transmembranärer Substrate wurde mit der Konvertierung in die geschlossene Form aufgehoben (43).

Insgesamt ergab sich aus diesen Erkenntnissen ein neues Bild zum Verständnis der Regulation von ADAM17: So nehmen die MPD und die CANDIS eine essentielle Funktion in der Multimerisierung ADAM17s ein (42), wobei nicht abschließend geklärt werden konnte, ob dies einen aktiven oder einen inaktiven Zustand darstellt (40). Des Weiteren fungiert die MPD als eine Art Schalter. Durch sie kann die aktive, offene Form ADAM17s durch die PDI in eine geschlossene, inaktive Konformation überführt werden (43). Dabei schließt sich die MPD und blockiert so den Zugang der Substrate zu der ADAM17-spezifischen Bindungsstelle CANDIS (41).

## **2.6 Die Protein-Disulfid-Isomerase und ADAM17: Einblick in neue Regulationsmechanismen**

Die PDIs bilden eine Familie von Oxidoreduktasen und Chaperonen, welche durch eine KDEL-Retentionssequenz im endoplasmatischen Retikulum (ER) gehalten werden. Dort sind sie über Öffnung, Schließung und Isomerisierung von Disulfidbrücken an der Faltung von Proteinen beteiligt (44). Für die Regulation ADAM17s wurde bislang die PDIA6, auch ERp5 oder P5 genannt, identifiziert (41,42). Ob dies das einzige beteiligte Mitglied der PDIs ist, ist noch unklar (42).

Da die Regulation ADAM17s durch die PDIs eine recht neue Erkenntnis ist (42,43,45), ist bislang sehr wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt. Insbesondere ist nicht bekannt, wie die ER-ständigen PDIs an die Zelloberfläche gelangen, um dort mit ADAM17 in Interaktion zu treten. Denkbar ist eine Maskierung der KDEL-Retentionssequenz durch ein zweites Protein. In einem anderen Zusammenhang wurde hierfür das Lektin Galektin9 beschrieben (46).

Auch ist beschrieben worden, dass die PDIA6 bei der Modifizierung von Zelloberflächenstrukturen mit einem weiteren Chaperon, dem Glukose-Regulierten-Protein-78 (GRP78), als Komplex zusammenarbeitet (47). Auch dieses wurde zunächst als ER-ständiges Protein beschrieben (48).

Alle drei Proteine (PDIA6, GRP78 und Galektin9) konnten in einem Experiment von Dr. Stefan Düsterhöft durch ADAM17 präzipitiert und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert werden (42).



### 3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion und Bedeutung der MPD sowie der ADAM17-spezifischen CANDIS weiter zu ergründen und zu verstehen. Es soll die Abhängigkeit der Multimerisierung ADAM17s von der MPD und der CANDIS sowie deren Bedeutung bei der Substratbindung untersucht werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten, in welchen stets Deletionskonstrukte verwendet wurden, sollen in dieser Arbeit zum ersten Mal Vollängen-ADAM17-Konstrukte genutzt werden. Schließlich soll der Einfluss der MPD und der CANDIS auf die *shedding*-Aktivität von ADAM17 in stabil transfizierten Zellen beleuchtet werden.

Überdies ist es Ziel dieser Arbeit den Mechanismus hinter der Inaktivierung ADAM17s durch die PDIs weiter zu ergründen und speziell deren Transport an die Zelloberfläche zu verstehen. Zu diesem Zwecke sollen Interaktionsstudien zwischen der PDIA6, Galektin9 und dem GRP78 durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Vollängen-ADAM17-Konstrukte sollen murinen Ursprungs und in ihrer Domänenstruktur verändert sein. Dabei sollen die MPD und/oder die CANDIS gegen die entsprechenden Elemente des nächsten Verwandten ADAM10 oder dem typischen ADAM-Mitglied ADAM22 getauscht sein. Die MPD von ADAM10 weist große strukturelle Ähnlichkeiten mit der geschlossenen Konformation der MPD ADAM17s auf, während das CANDIS-entsprechende Peptid von ADAM10 keine Gemeinsamkeiten mit dieser zeigt (siehe Abbildung 4) (41,43).



CANDIS:	RVQDV IERFW DFIDQ LS
ADAM10-Peptid:	VDADG PLARL KKAIF SP

**Abbildung 4: MPD17 und CANDIS im Vergleich zu ADAM10.** Links: aus Düsterhöft et al. 2013, Superposition der geschlossenen MPD17 (dunkel) mit der MPD10 (hell). Rechts: Sequenzvergleich (human) der CANDIS mit dem entsprechenden Peptid von ADAM10 aus Düsterhöft et al. 2014.

## 4 Methoden und Material

### 4.1 Methoden

Im Folgenden sollen die verwendeten Methoden dargestellt und erläutert werden. Bei Verwendung von Fertig-kits wird auf die Protokolle des Herstellers verwiesen.

#### 4.1.1 *Western-blotting*

Das *Western-blotting* dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Diese werden nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch spezifische Primärantikörper detektiert. Nach Zugabe von enzym-gekoppelten Sekundärantikörpern, welche an den primären binden, kann nach Substratzugabe eine Fluoreszenz detektiert werden.

Lysate wurden mit Lämmli-Puffer red. 5x oder 2,5x versetzt und 4 Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf selbst hergestellte *sodium-dodecyl-sulfate*- (SDS)-Gele (10 oder 12,5 Prozent) überführt und 55 bis 75 Minuten bei 150 V aufgetrennt. Das Gel wurde nun auf eine zuvor 4 Minuten in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid- (PVDF-)Membran gelegt und unter Kühlung 120 Minuten bei 95 V *geblottet*. Zunächst wurde die PVDF-Membran in *tris-buffered-saline* (TBS) + 5 Prozent Bovines-Serumalbumin (BSA) 2 Stunden zum Blockieren gerollt. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers in 5 ml *tris-buffered-saline-with-tween* (TBST) + 1 Prozent BSA (Verdünnung siehe Tabelle 12) über Nacht bei 4 °C. Nach dreifachem Waschen der Membran mit TBST wurde diese in 5 ml TBST + 1 Prozent BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 13). Letztlich wurde die PVDF-Membran zweimal in TBST und zweimal in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit SuperSignal-ECL-Lösung nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 4.1.2 *Western-blot stripping*

Das *strippen* eines *Western-blots* dient dem Entfernen der Antikörper von der PVDF-Membran, sodass mit neuen Antikörpern andere Proteine auf derselben Membran detektiert werden können. Da beim *strippen* eine vollständige Entfernung vor allem der primären Antikörper nicht gewährleistet ist, muss der nach dem *strippen* eingesetzte Primärantikörper aus einer anderen Spezies stammen.

Die PVDF-Membran wurde 1 Stunde in *stripping*-Puffer bei Raumtemperatur gerollt. Anschließend 5 Minuten in 100 mM Tris/ HCl pH 8,8. Nach dreimaligem Waschen in TBS konnte die Membran erneut in TBS + 5 Prozent BSA für 2 Stunden blockiert werden.

#### **4.1.3 Zellen auftauen**

Ein bei - 80 °C gelagertes Cryoröhrchen wurde etwa 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das enthaltene Einfriermedium mit den Zellen (1 ml) wurde vorsichtig resuspendiert und zu 9 ml *Dulbecco's-modified-Eagle's-Medium*<sup>+/+</sup> (DMEM) gegeben. Diese Zellsuspension wurde anschließend 5 Minuten bei 1000 g zentrifugieren. Das Medium wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM<sup>+/+</sup> aufgenommen und zu 8 ml DMEM<sup>+/+</sup> in eine 10-cm-Zellkulturschale gegeben.

#### **4.1.4 Zellen einfrieren**

Das Medium einer 10-cm-Zellkulturschale wurde abgenommen. Die Zellen wurden mit etwa 6 ml *phosphate-buffered-saline* (PBS) gewaschen. Dann wurde 1 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (-EDTA) auf die Zellen gegeben und bis zu 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen konnten nun resuspendiert und von der Kulturschale gelöst werden und in 9 ml DMEM<sup>+/+</sup> überführt werden. Daraufhin wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Cryoröhrchen überführt. Das Cryoröhrchen wurde bei - 80 °C eingefroren.

#### **4.1.5 Zellen splitten**

Das *splitten* der Zellen dient dazu Zelllinien über längere Zeit in Kultur zu halten. Dabei werden Zellkulturen gewaschen, dezimiert und in neues Medium überführt, um dafür zu sorgen, dass Zellen sich nicht überlagern und mit ausreichend Nährstoffen versorgt sind.

Das Medium einer 10-cm-Zellkulturschale wurde abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend bis zu 5 Minuten mit 1 ml Trypsin-EDTA bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden die Zellen resuspendiert und von der Kulturschale gelöst. Je nach Zelldichte wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 bis 1:30 in eine 10-cm-Zellkulturschale mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup>(+Selektionsantibiotikum) überführt.

#### 4.1.6 Zellen aussähen

Zu Beginn eines Versuches werden Zellen in definierter Dichte ausgesät um beste Transfektionseffizienz und eine standardisierte Zelldichte zu erhalten.

Zunächst wurde vorgegangen wie beim *splitten* der Zellen (4.1.5). Die Zellsuspension wurde in etwa 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> überführt und nach Neubauer gezählt. Anschließend wurden die Zellen in gewünschter Zahl in DMEM<sup>+/+</sup>(+Selektionsantibiotikum) ausgesät.

#### 4.1.7 Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen

Die transiente Transfektion dient dem Einbringen von DNA in eukariote Zellen. Dadurch kommt es zu einer Überexpression der durch diese DNA kodierten Proteine, welches anschließend zu experimentellen Zwecken genutzt werden kann.

HEK-293T-Zellen wurden stets in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen auf 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> in 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät (siehe 4.1.6). Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei einer Konfluenz von etwa 30 Prozent konnten sie mit der entsprechenden DNA transfiziert werden. Der Transfektionsansatz bestand aus 8 µg DNA, 20 µl Polyethylenimin (PEI) plus 1000 µl DMEM<sup>-/-</sup> und wurde nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur über der Zellschale ausgeträufelt. Schließlich wurden die Zellen erneut bei 37 °C inkubiert.

#### 4.1.8 Transiente Transfktion von mEF-Zellen

Grund und Nutzen der Durchführung siehe 4.1.7.

mEF-Zellen wurden stets in einer Dichte von  $0,2 \times 10^6$  Zellen auf 2 ml DMEM<sup>+/+</sup>(+Selektionsantibiotikum) auf 6-*well*platten ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und einer Konfluenz von etwa 30 Prozent wurde das Medium abgenommen. Anschließend wurde pro *well* 900 µl DMEM<sup>+/+</sup> sowie 100 µl Transfektionsansatz, bestehend aus 2 µg DNA, 4 µl TurboFect plus 94 µl DMEM<sup>-/-</sup>, auf die Zellen gegeben. Vor dem Einsatz wurde der Transfektionsansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden die Zellen erneut bei 37 °C inkubiert.

#### **4.1.9 Ko-Präzipitationsexperimente durch Nickel-*beads***

Die Ko-Präzipitation wird benutzt um spezifische Interaktionen und Bindungen zwischen Proteinen zu untersuchen. Dabei wird ein definiertes Protein präzipitiert und anschließend analysiert, ob sich andere Proteine durch das erste ko-präzipitieren ließen.

Die hier beschriebenen Ko-Präzipitationsexperimente wurden durchgeführt, um eine Interaktion von Galektin9 mit PDIA6 und GRP78 zu untersuchen. Zunächst wurden HEK-293T-Zellen ausgesät und mit pcDNA3.1 transient transfiziert (siehe 4.1.7). Die DNA wurde im Verhältnis 1:1:1 eingesetzt. Das Galektin9-Konstrukt war N-terminal mit einem *His*- sowie einem *Myc-tag* versehen, PDIA6 und GRP78 ausschließlich mit einem N-terminalen *Myc-tag*. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 1 ml PBS+NaN<sub>3</sub> pro Zellschale geerntet.

In allen nachfolgenden Schritten wurden die Zellen bei 4 °C gehalten. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1000 g wurde der Überstand gegen 1 ml Lysepuffer II getauscht. Dieser war mit je 50 oder 75 mM Imidazol versetzt. Die Probe wurde geschüttelt und 30 Minuten gerollt. Nach abgeschlossener Lyse wurden die Proben 20 Minuten bei 17.000 g zentrifugiert. Je 800 µl des Überstandes wurden zu 500 µl des jeweiligen Lysepuffers gegeben und mit 70 µl Nickel- (Ni-)*beads* vermengt. So wurden die Lysate abermals 30 Minuten gerollt. Die Pellets wurden mit 50 µl Lämmli-Puffer red. 5x versetzt und 4 Minuten bei 95 °C gekocht.

Die Ni-*beads* wurden nun fünfmal in dem jeweiligen Lysepuffer gewaschen. Pro Waschschritt wurden die Proben 3 Minuten bei 500 g zentrifugiert, vom Überstand befreit und mit 1 ml Lysepuffer versetzt und 8 mal invertiert. Abschließend wurden die Ni-*beads* mit 50 µl Lämmli-Puffer red. 2,5x versetzt und 4 Minuten bei 95 °C gekocht.

Alle Proben wurden per *Western-blot* in 10-prozentigem SDS-Gel analysiert.

#### **4.1.10 Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit Sepharose-*beads***

Die Ko-Immunpräzipitation wird genutzt um spezifische Interaktionen und Bindungen zwischen Proteinen zu untersuchen. Dabei wird ein definiertes Protein mittels spezifischer Antikörper präzipitiert und anschließend analysiert, ob sich Interaktionspartner durch das erste Protein ko-präzipitieren ließen.

Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Sepharose-*beads* wurden durchgeführt um Interaktionen von PDIA6 mit GRP78 oder ADAM17-Konstrukten untereinander zu analysieren. Zunächst wurden HEK-293T-Zellen transient mit pcDNA3.1 transfiziert wie in 4.1.7 beschrieben. Das eingesetzte Verhältnis der DNA war 1:1. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in 1 ml PBS+NaN<sub>3</sub> geerntet.

Bei allen folgenden Schritten wurden die Proben bei 4 °C gehalten. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1000 g wurde der Überstand gegen 450 µl Lysepuffer I getauscht. Die Proben wurden geschüttelt und 30 Minuten gerollt. Nach abgeschlossener Lyse wurden die Proben 20 Minuten bei 17.000 g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden je 200 µl zu 800 µl Lysepuffer gegeben und mit 70 µl Sepharose-*beads* vermengt. Für jede Probe wurden so zwei Proben generiert: eine mit positivem Antikörper und eine mit Nonsens-Antikörper (JL2) als Kontrolle. Die Kopplung der Antikörper an die *beads* erfolgte vor Verwendung nach dem Protokoll des Herstellers. Die restlichen 50 µl des Lysats wurden als *input*-Kontrollen mit 20 µl Lämmli-Puffer red. 5x versehen und bei 95 °C für 4 Minuten gekocht.

Die mit *beads* versehenen Proben wurden 30 Minuten gerollt und anschließend fünfmal gewaschen. Zu jedem Waschschrift wurden die Proben 3 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 1 ml Lysepuffer I ersetzt. Die Proben wurden 8 mal invertiert. Abschließend wurden die *beads* mit 50 µl Lämmli-Puffer red. 2,5x versetzt und 4 Minuten bei 95 °C gekocht.

Alle Proben wurden per *Western-blot* in 10- oder 12,5-prozentigem SDS-Gel analysiert.

#### **4.1.11 Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Protein-G-*beads***

Grund und Nutzen des Experiments sind wie 4.1.10, einzig werden andere *beads* und Lysepuffer verwendet.

Die Ko-Immunopräzipitationen mit Protein-G-*beads* wurden durchgeführt, um die Bindung von ADAM17-Konstrukten zum hIL6R zu analysieren. Es wurde äquivalent zu 4.1.10 vorgegangen, nur wurden Protein-G-*beads* und Lysepuffer III verwendet. Die Koppelung der Antikörper an die *beads* erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 4.1.12 *Shedding*-Aktivitätsassays

Das Durchführen von *shedding*-Aktivitätsassays dient der Bestimmung einer proteolytischen Aktivität.

Mit den hier durchgeführten *shedding*-Aktivitätsassays sollte die Proteaseaktivität der untersuchten ADAM17-Konstrukte analysiert werden. Zunächst wurden mEF-Zellen ausgesät und transient transfiziert wie in 4.1.8 beschrieben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium von den Zellen genommen und pro *well* mit 1 ml Stimulationsansatz getauscht. Verwendet wurden folgende Ansätze pro *well*:

Unstimuliert: 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> + 4 µl Dimethylsulfoxid (DMSO).

Stimuliert: 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> + 2 µl DMSO + 100 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (in DMSO).

Stimuliert mit Inhibitor: 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> + 100 nM PMA (in DMSO) + 100 µM Marimastat (in DMSO).

Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Überstände gesammelt und die Zellen in 1 ml PBS+NaN<sub>3</sub> pro *well* geerntet.

In allen nachfolgenden Schritten wurden die Proben bei 4 °C gehalten. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und die PBS-Überstände verworfen. Anschließend wurde 100 µl Lysepuffer I auf jedes Pellet gegeben. Die Proben wurden geschüttelt und 30 Minuten gerollt. Nach anschließender Zentrifugation bei 17.000 g für 20 Minuten wurden je 50 µl der Lysate in neue Reaktionsgefäße überführt und erneut 20 Minuten bei 17.000 g zentrifugiert. Mit den Zell-Überständen wurde ebenso verfahren.

Nun wurden die Proben zum Messen auf eine 96-*well*platte überführt. Je Probe wurden Dreierbestimmungen durchgeführt: für die Lysate pro *well* 10 µl mit 40 µl DMEM<sup>-/-</sup> und 50 µl AP-Substratpuffer mit gelöstem AP-Substrat; für die Zell-Überstände pro *well* 150 µl plus 150 µl AP-Substratpuffer mit gelöstem AP-Substrat.

Gemessen wurde die Absorption bei 405 nm, welche proportional zur Alkaline-Phosphatase- (AP-)Aktivität ist. Um die *shedding*-Aktivität der ADAM17-Konstrukte zu ermitteln wurden die nach einer Zeit gemessenen Daten wie folgt berechnet: Zunächst wurden die Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen berechnet, anschließend die

Messwerte der Überstände durch die der Lysate dividiert. Dieses Verhältnis wurde nun auf die Werte der Proben *Stimuliert mit Inhibitor* normalisiert.

Die so erhaltenen Daten wurden stets auf 100 Prozent normalisiert wobei der höchste Messwert als 100 Prozent gesetzt wurde.

### 4.1.13 ELISA

Der *Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay* (ELISA) dient dem Nachweis von Proteinen und niedermolekularen Stoffen. Mit Hilfe eines spezifischen enzym-gekoppelten Antikörpers können Antigene erkannt werden. Nach Substratzugabe kommt es zu einem Farbumschlag, welcher gemessen und quantitativ ausgewertet werden kann.

Eine ELISA-96-*well*platte wurde mit 50 µl pro *well* 1:1000 in PBS verdünntem 4-11-Antikörper (Anti-hIL6R) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl ELISA-Waschpuffer pro *well* wurde die Platte mit 200 µl ELISA-Blockier-Lösung pro *well* 2 Stunden bei Raumtemperatur einwirken lassen. Nach erneutem Waschen wurde eine Hyper-IL6-Standardreihe (2000 pg/ml bis 15,625 pg/ml) sowie die 1:20 bis 1:30 in ELISA-Puffer verdünnten Proben mit 50 µl pro *well* aufgetragen. Jede Probe wurde dreifach aufgetragen. Die Platte wurde erneut 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 50 µl BAF227-Antikörper pro *well*, 1:1000 verdünnt in ELISA-Puffer, für erneute 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Waschen wurden pro *well* 100 µl Streptavidin-POD-Lösung 1:1000 verdünnt in ELISA-Puffer auf die Platte gegeben und für 30 bis 45 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur einwirken lassen. Erneut wurde die Platte gewaschen. Pro *well* wurden 75 µl POD-Substrat gegeben und etwa 15 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 75 µl 1,8 M Schwefelsäure pro *well* gestoppt und die Absorption bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

Zur Auswertung der Daten wurde aus den Mittelwerten der Standardreihe die Formel der Ausgleichsgeraden ermittelt. In diese wurden die Messdaten der Proben eingesetzt und anschließend mit ihrem Verdünnungsfaktor (1:20, 1:30) multipliziert. Aus diesen Daten konnten die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen errechnet werden.

Um per ELISA *shedding*-Aktivitäten zu bestimmen, wurde mit den so errechneten Werten wie in 4.1.12 verfahren.



## 4.2 Material

Die folgenden Auflistungen geben einen Überblick über alle verwendeten Labormaterialien, Geräte, Puffer und Lösungen sowie Zelllinien und Antikörper.

### 4.2.1 *Kits, Entwickler und Marker*

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die verwendeten Fertig-*kits*, Entwickler und Marker.

**Tabelle 2: *Kits, Entwickler und Marker.***

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Protein Assay	Thermo Scientific (Bonn)
BM Blue POD-Substrat	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Prestained Molecular Weight Marker 20 – 120 kDa	Thermo Scientific-Pierce, Perbio Science (Bonn)
Streptavidin-POD	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
SuperSignal Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Bonn)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Bonn)

### 4.2.2 *Zelllinien*

In der Tabelle 3 werden alle verwendeten Zelllinien genannt.

**Tabelle 3: *Zelllinien.***

<b>Name</b>	<b>Ursprung</b>
HEK-293T	humane embryonale Nierenzellen, spontan immortalisiert
mEF-ADAM17-ADAM10 <sup>-/-</sup>	murine embryonale Fibroblasten, ADAM17-ADAM10-Doppel- <i>knock-out</i> , spontan immortalisiert
mEF-ADAM17 <sup>ex/ex</sup>	murine embryonale Fibroblasten aus hypomorphen ADAM17 <sup>ex/ex</sup> -Mäusen, spontan immortalisiert

Verwendete stabil ADAM17-transfizierte Zellen waren mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup> mit retroviral transduziertem Vektor. Als retrovirale Vektoren wurde für die ADAM17-Konstrukte pQCXIP mit integrierter Puromycin-Resistenz genutzt. Als retroviraler Leervektor

wurde pQCXIH mit integrierter Hygromycin-Resistenz verwendet. Beide Vektoren stammen von Addgene (Teddington, Middlesex, UK).

#### 4.2.3 Vektoren

Als Vektoren für transiente Transfektionen wurde durchweg pcDNA3.1 von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet. Alle Plasmide wurden vor Gebrauch durch die GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert und anschließend eigens durch Sequenzvergleich überprüft.

#### 4.2.4 Zellmedien, Transfektionsreagenzien, Selektionsantibiotika und *beads*

Die Tabelle 4 listet die verwendeten Zellmedien auf. In Tabelle 5 sind die genutzten Selektionsantibiotika samt Konzentration und Hersteller aufgelistet.

**Tabelle 4: Zellmedien.**

Name	Hersteller und Bezeichnung
DMEM <sup>-/-</sup>	Dulbecco's modified Eagle's Medium high Glucose (4,5 g/l), mit stabilem L-Glutamin (29,2 g/l), Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM <sup>+/+</sup>	Dulbecco's modified Eagle's Medium high Glucose (4,5 g/l), mit stabilem L-Glutamin (29,2 g/l), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), GE Healthcare (München) und 1 % Penicillin- (10.000 Units/ml) Streptomycin- (10 mg/ml) Natriumchlorid- (0,9 %) Lösung, GE Healthcare (München)
Einfriermedium	DMEM <sup>-/-</sup> mit 1 % Penicillin- (10.000 Units/ml) Streptomycin- (10 mg/ml) Natriumchlorid- (0,9 %) Lösung, GE Healthcare (München), 20 % FCS, GE Healthcare (München) und 10 % DMSO

Als Transfektionsreagenzien wurden Polyethylenimin MAX, Polyscience Inc. (Eppelheim) für HEK-293T-Zellen und TurboFect Transfection Reagent, Thermo Scientific (Schwerte) für alle mEF-Zelllinien verwendet.

**Tabelle 5: Selektionsantibiotika.**

Name	Zelllinie	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Hygromycin B	Stabil transfizierte mEF-ADAM17 <sup>ex/ex</sup>	300 µg/ml	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg)
Puromycin	Stabil transfizierte mEF-ADAM17 <sup>ex/ex</sup>	3 µg/ml	GE Healthcare (München)

Zur Präzipitation von Proteinen wurden Sepharose-*beads* (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, München), Protein-G-*beads* (Thermo Scientific-Pierce, Perbio Science, Bonn) und Nickel-*beads* (Ni-NTA Agarose, QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet.

#### 4.2.5 Geräte

In den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 6 und Tabelle 7) sind die verwendeten Geräte alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 6: Elektrische Geräte.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Elektrophorese <i>power supply</i>	Peqlab (Erlangen)	EV243
	Consort (Turnhout, Belgien)	E331
	Bio-Rad (München)	Power Pac™ Basic
ELISA- <i>reader</i>	TECAN (Männedorf, Schweiz)	Rain-Bow
Flaschenroller	Hecht-Assistent (Sondheim/Rhön)	RM5
Gefrierschrank	Premium (Hamburg)	No Frost
Heizblock	HLC (Dougulan, China)	BT 130-2
Heizrührer	Eydam (Kiel)	Heidolph
	Heidolph (Kiel)	MR Hei-Standard
Kühlschrank	Liebherr (Hamburg)	Profi line
Mikroskop	Olympus (Hamburg)	CKX41
Mikroskop <i>power supply</i>	Olympus (Hamburg)	U-RFLT50
Multiimager	Alpha Innotech (Kasendorf)	FlourChem MultiImage® III
pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen)	SevenEasy pH
Pipette	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)	Easypet
Schüttler	Bender & Hobein AG (Ismaning)	Vortex Genie 2™
Spectrophotometer	Peqlab (Erlangen)	Nanodrop ND-1000
Sterilbank	Nuair (Plymouth, USA)	Class II Type A/B 3
Thermomixer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)	Thermomixer Compact
Tischzentrifuge	Biozym (Hessisch Oldendorf)	Sprout™
Waage	Kern & Sohn GmbH (Balingen)	Kern EW
Wasserbad	GFL (Kennbrunk, USA)	Wasserbad 14 L
Wasserfilter	MILLIPORE (Darmstadt)	Milli-Q PLUS

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Zellinkubator	Thermo Electron Corporation (Bonn)	Enviro-San™
Zentrifuge groß	Sigma (Taufkirchen) Hermle Labortechnik (Gosheim)	4-16K Z 206 A
Zentrifuge klein	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) Thermo Scientific (Bonn)	Centrifuge 5417R Heraeus FRESCO 17

**Tabelle 7: Manuelle Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
<i>Blotting</i> -Kammern	Bio-Rad (München)	Mini-Protean® Tetra Cell
Gelkammer	Bio-Rad (München)	Mini Trans-Blot® Cell
<i>Glass plate</i>	Bio-Rad (München)	Short Plates
Multipette	Socorex (Ecublens, Schweiz)	Avira 855 20-200 µl
Pipetten	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)	10 µl 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl
<i>Spacer</i>	Bio-Rad (München)	Spacer Plates 1,0 mm

#### 4.2.6 Labormaterial

Die Tabelle 8 zeigt alle verwendeten Labormaterialien in alphabetischer Reihenfolge.

**Tabelle 8: Labormaterial**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Becherglas 50 ml 250 ml 1000 ml	Vitlab (Grossostheim)
Biosphere <i>Filter Tips</i> 0,5 – 20 µl 100 – 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
<i>Blotting</i> -Membran, 0,45 µm PVDF Immobilon®-P	GE Healthcare Life Sciences Millipore (Darmstadt)
ELISA 96 well solid plate	Nunc-Immuno™, Micro Well™, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## Methoden und Material

<b>Produkt</b>		<b>Hersteller</b>
Flaschen	100 ml	Schott Duran (Wertheim/Main)
	500 ml	
	1000 ml	
	250 ml	
Handschuhe	rotiprotect®-Nitril	Roth (Karlsruhe)
	HANSA-MEDICAL 24	Kirchhoff-Group (Iserlohn)
Lagerkästen 100 Mikror		Sarstedt (Nümbrecht)
Messzylinder	50 ml	Vitlab (Grossostheim)
	250 ml	
	1000 ml	
Mikroschraubröhre 2 ml, PP		Sarstedt (Nümbrecht)
Multiwellplatte, Steril	6 Well	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
	12 Well	
	24 Well	
	96 Well	
Pipettenspitze	10 µl farblos	Sarstedt (Nümbrecht)
	200 µl gelb	
	1000 µl blau	
Pipettenspitze Multiflex		Sorenson BioScience, Inc. (Salt Lake City, USA)
Reagiergefäß	1,5 ml, PP	Sarstedt (Nümbrecht)
	2 ml, PP	
Röhre 15 ml, 120x77 mm, PP		Sarstedt (Nümbrecht)
Röhre 50 ml, 114x28 mm, PP		Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 10 ml		Sarstedt (Nümbrecht)
Vernichtungsbeutel		Sarstedt (Nümbrecht)
<i>Whatmanpaper™, Chromatography paper</i>		GE Healthcare Life Sciences (München)
Zellschale, TC-Schale 100 Standard		Sarstedt (Nümbrecht)

#### 4.2.7 Computer-Programme

In der Tabelle 9 sind alle verwendeten Computer-Programme samt ihrer Version gelistet.

**Tabelle 9: Computer-Programme.**

<b>Programm</b>	<b>Version</b>
Adobe Photoshop	CS4
Cell^B analySIS Image Processing	
CLC Sequence Viewer	6
Flow Chem Q	
Image Studio Lite	3.1
Magellan	3
NB-1000	3.5.2
R i386	3.0.2
Unipro UGENE	1.8.0
Word Mac 2011	14.4.3

#### 4.2.8 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich AG (Taufkirchen) erworben.

#### 4.2.9 Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle 10 sind alle verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 10: Puffer und Lösungen.**

<b>Puffer</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>Konzentration</b>
AP-Substratpuffer	Glycin	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	ZnCl <sub>2</sub>	1 mM
		mit NaOH auf pH 10,8
ELISA-Blockier-Lösung	PBS 1x	
	BSA	1 %
	Saccharose	5 %
ELISA-Puffer	PBS 1x	
	BSA	1 %
ELISA-Waschpuffer	PBS 1x	
	Tween-20	0,05 %

Methoden und Material

<b>Puffer</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>Konzentration</b>
Lämmlis red. 5x	SDS	10 mM
	Natriumphosphatpuffer (pH 7,5)	40 %
	Glycerol	35 %
	β-Mercaptoethanol	25 %
	Bromphenolblau	6 μM
Lysepuffer I	EDTA	2 mM
	NaCl	150 mM
	Tris	20 mM
	TritonX-100	1 %
		mit HCl auf pH 7,5
	CaCl	4 mM
	Complete-Lösung*	1:1000
	Marimastat	5 mM
Lysepuffer II	Tris	50 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1,5 mM
	TritonX-100	1 %
	Glycerol	5 %
		mit HCl auf pH 7,5
Lysepuffer III	EDTA	2 mM
	NaCl	150 mM
	Tris	20 mM
	TritonX-100	0,05 %
	CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	4 mM
		mit HCl auf pH 7,6
	Complete-Lösung*	1:1000
	Marimastat	5 mM
PBS 10x	NaCl	1,4 M
	KCl	26,8 mM
	NaHPO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O	80,9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM
PBS+NaN <sub>3</sub>	PBS 10x	10 %
	NaN <sub>3</sub>	0,025 %
SDS-Laufpuffer 10x	Tris	0,25 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 %
<i>Stripping</i> -Puffer	NaCl	1 M
	Essigsäure	6,4 %
TBS 10x	Tris	0,5 M
	NaCl	1,5 M
		mit HCl auf pH 7,4

<b>Puffer</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>Konzentration</b>
TBST 1x	TBS 1x	
	Tween-20	0,05 %
Transferpuffer 10x	Tris	0,25 M
	Glycin	1,9 M
Transferpuffer 1x	Transferpuffer 10x	10 %
	Methanol	20 %

\* 1 Complete-Tablette auf 50 ml H<sub>2</sub>O ergibt eine 25fache Lösung.

#### 4.2.10 SDS-PAGE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich folgende SDS-Gele für *Western-blots* genutzt.

**Tabelle 11: SDS-Gele.**

<b>Puffer</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>Menge</b>
Sammelgel 7,5 %	H <sub>2</sub> O	3,725 ml
	1,5 mM Tris/ HCl pH 8,8	0,625 ml
	SDS 10 %	50 µl
	Acrylamid	0,67 ml
	Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	50 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µl
Trenngel 10 %	H <sub>2</sub> O	3,87 ml
	1,5 mM Tris/ HCl pH 8,8	2,55 ml
	SDS 10 %	100 µl
	Acrylamid	3,33 ml
	APS 10 %	100 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel 12,5 %	H <sub>2</sub> O	3,06 ml
	1,5 mM Tris/ HCl pH 8,8	2,55 ml
	SDS 10 %	100 µl
	Acrylamid	4,14 ml
	APS 10 %	100 µl
	TEMED	10 µl



#### 4.2.11 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 gelistet.

**Tabelle 12: Antikörper.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Aus Spezies</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung <i>Western-blot</i></b>
10.1	Katalytische Domäne ADAM17	Kaninchen	Pineda (Berlin)	1:1000
4-11	hIL6R	Maus	Eigenproduktion	1:500
9E10	<i>Myc-tag</i>	Maus	Eigenproduktion	1:500
Anti-PDIA6 antibody	PDIA6	Kaninchen	Abcam (Cambridge, MA, USA)	1:1000
BAF227	hIL6R	Ziege	R&D Systems (Minneapolis, USA)	-
DYKDDDDK	<i>Flag-tag</i>	Kaninchen	Cell Signalling Technology (Leiden, Niederlande)	1:1500
HA-Tag (C29F4)	<i>HA-tag</i>	Kaninchen	Cell Signalling Technology (Leiden, Niederlande)	1:1500
HPC4	<i>PC-tag</i>	Maus	Eigenproduktion	1:500
JL2	Nonsense – als Negativkontrolle	Maus	Eigenproduktion	-
β-Actin (C4)	h/mβ-Aktin	Maus	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)	1:250

**Tabelle 13: Sekundärantikörper *Western-blot*.**

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
Kaninchen IgG	Ziege	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)	1:2500
Maus IgG	Ziege	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)	1:2500

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Mögliche Interaktionspartner der Protein-Disulfid-Isomerase-A6 (PDIA6)

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt um eine mögliche Interaktion der ER-ständigen Chaperone PDIA6 und GRP78 mit dem Lektin Galektin9 zu untersuchen. Damit könnte auf einen Transportmechanismus der beiden Chaperone an die Zelloberfläche mit Hilfe von Galektin9 geschlossen werden.

#### 5.1.1 Methodenetablierung

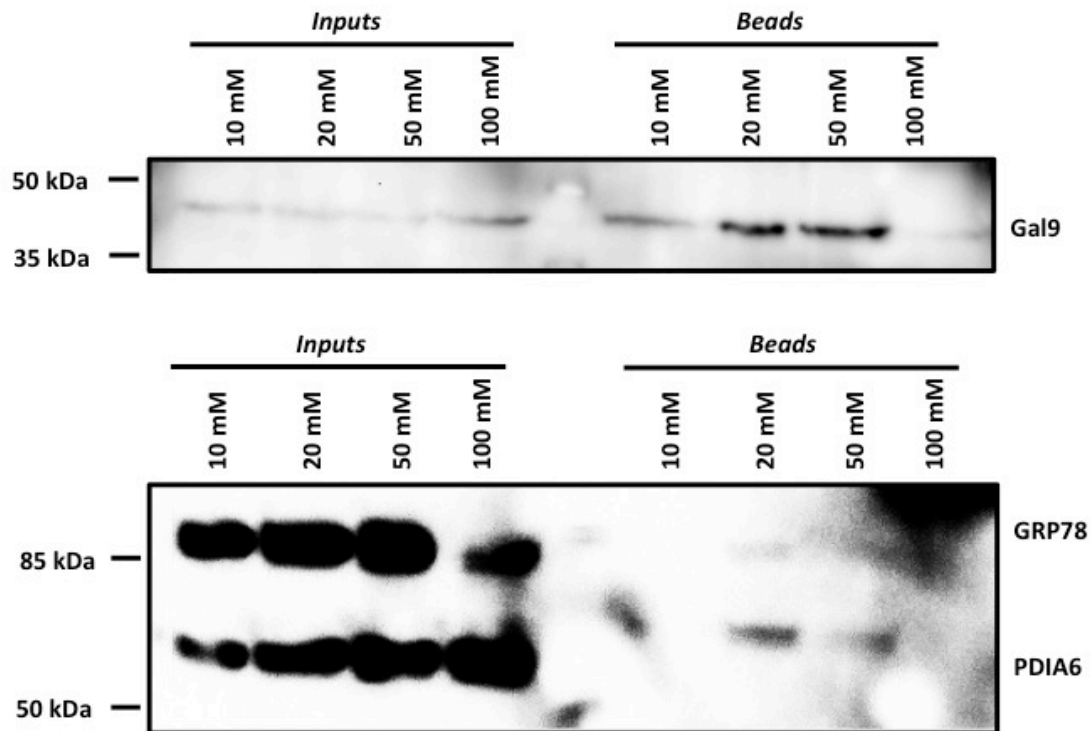
Zunächst musste eine geeignete Methode gefunden werden, um eine Interaktion der drei Proteine PDIA6, GRP78 und Galektin9 zu detektieren. Dies sollte mittels Ko-Präzipitation und anschließendem *Western-blotting* geschehen. Also wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Eine mit *His-tag* versehene Galektin9-Variante sollte mit Hilfe von Nickel- (Ni-)beads präzipitiert werden. Nicht mit *His-tag* versehene Varianten der anderen beiden Proteine PDIA6 und GRP78 könnten so durch Galektin9 ko-präzipitiert und anschließend im *Western-blot* detektiert werden. Die Ni-beads binden bei diesem Verfahren bevorzugt an die Histidin-Reste des *His-tags*. Unspezifische Bindungen sollten durch Zugabe von Imidazol aufgehoben werden.

Zunächst musste also eine Imidazol-Konzentration gefunden werden, bei welcher der *His-tag* noch an Ni-beads bindet, unspezifische Bindungen zu PDIA6 und GRP78 aber aufgehoben werden. Zu diesem Zweck wurde ein N-terminal mit *His-* und *Myc-tag* versehene Galektin9 in HEK-293T-Zellen transfiziert. Nach Ernte und Lyse der Zellen in vier separaten Lysepuffern mit jeweils unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen (10, 20, 50, 100 mM) wurde das Galektin9 durch Ni-beads präzipitiert. Nach anschließendem Waschen der *beads* mit den selben Lysepuffern konnten die Proben mittels *Western-blot* analysiert werden (siehe Abbildung 5).

Gleichermaßen wurde verfahren mit PDIA6 und GRP78. Hier wurden ausschließlich mit N-terminalem *Myc-tag* versehene Varianten verwendet.

Während Galektin9 bis zu einer Konzentration von 50 mM Imidazol eine starke und bei 100 mM eine schwache Bindung an die Ni-beads zeigte, konnten unspezifische Bindungen von PDIA6 und GRP78 bereits bei einer Konzentration von 50 mM Imidazol beinahe vollständig aufgehoben werden (siehe Abbildung 5).

Folglich wurde für spätere Experimente eine Imidazol-Konzentration von 50 und 75 mM eingesetzt..



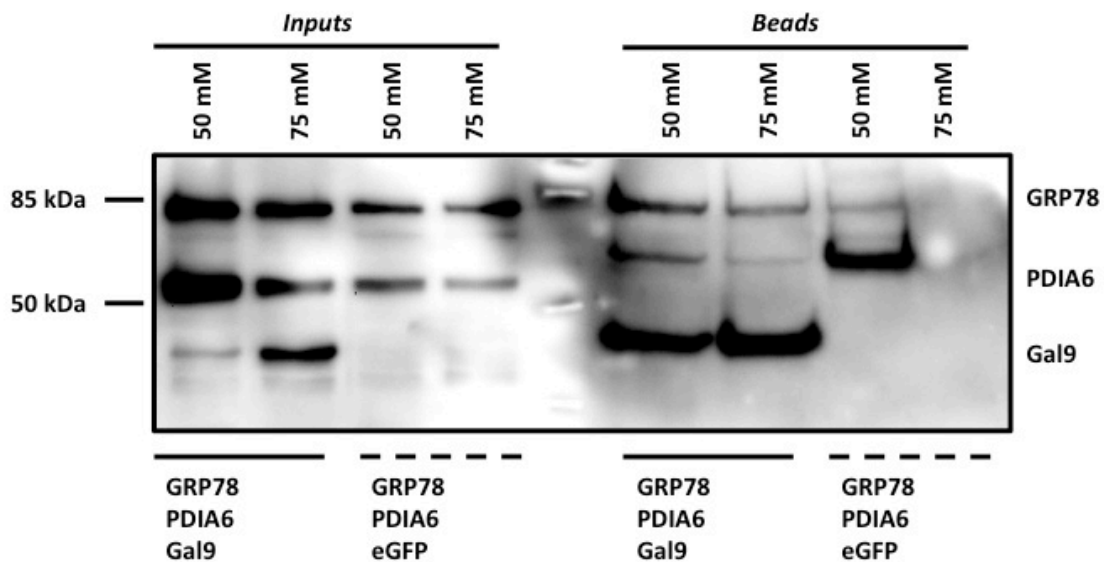
**Abbildung 5: Unterschiedliche Bindungsaffinitäten der verwendeten Konstrukte an Nickel-beads.** Die Spalten zeigen die steigenden Imidazol-Konzentrationen, bei welchen die Nickel- (Ni-)beads gewaschen wurden. Auf der linken Seite sind die *inputs* zu sehen. Die rechte Seite zeigt die Präzipitate (*Beads*). Während das mit einem *His-tag* versehene Galektin9 (Gal9) bis zu einer Konzentration von 50 bis 100 mM Imidazol von Ni-beads gebunden wurde, konnten unspezifische Bindungen von GRP78 und PDIA6 an die Ni-beads bei einer Konzentration von 50 bis 100 mM Imidazol aufgehoben werden. Detektion mittels Anti-*Myc-tag*-Antikörper.

### 5.1.2 Interaktionsnachweis von Galektin9 und GRP78

Nachdem die Methode etabliert war, konnten die Experimente zum Nachweis einer Interaktion von PDIA6, GRP78 und Galektin9 durchgeführt werden. HEK-293T-Zellen wurden mit den drei Konstrukten im gleichen Verhältnis (1:1:1) ko-transfiziert. Alle drei Konstrukte waren zum späteren Nachweis im *Western-blot* mit einem N-terminalen *Myc-tag* versehen. Ausschließlich Galektin9 hatte zusätzlich einen N-terminalen *His-tag*. Als Negativkontrolle wurden HEK-293T-Zellen mit PDIA6, GRP78 und erhöht-Grün-Fluoreszierendem-Protein (eGFP) ebenfalls im gleichen Verhältnis ko-transfiziert.

Wie zuvor wurden die Zellen geerntet und in Lysepuffern mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen (50, 75 mM) lysiert. Zur Präzipitation von Galektin9 aus den

Lysaten wurden Ni-*beads* verwendet. Nachdem diese in den Lysepuffern mit jeweiliger Imidazol-Konzentration gewaschen wurden, konnten die Proben per *Western-blot* analysiert werden (siehe Abbildung 6). Die Spalten zeigen die unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen im Lysepuffer (50, 75 mM). Die linke Seite des *blots* zeigt die *inputs* als Expressionskontrolle. Demnach wurden alle drei Proteine etwa gleich stark exprimiert. Auf der rechten Seite sind die Präzipitate (*beads*) zu sehen. Bei einer Konzentration von 75 mM Imidazol im Lysepuffer konnten alle unspezifischen Bindungen aufgehoben werden (rechte Spalte). Die Bindung der Ni-*beads* an Galektin9 war bei 75 mM Imidazol hingegen ungestört (dritte Spalte von rechts). In derselben Spalte ist eine Bande für GRP78 bei 85 kDa zu sehen, welches auf eine Interaktion von Galektin9 und GRP78 hinweist. Keine Bande ist für PDIA6 (54 kDa) zu sehen. Ein Rückschluss auf die Interaktion von PDIA6 mit den anderen Proteinen kann also aus diesem Experiment nicht gezogen werden. In den Präzipitaten zeigt sich eine nicht charakterisierte unspezifische Bande bei einer Molekularen Masse von etwa 65 kDa.



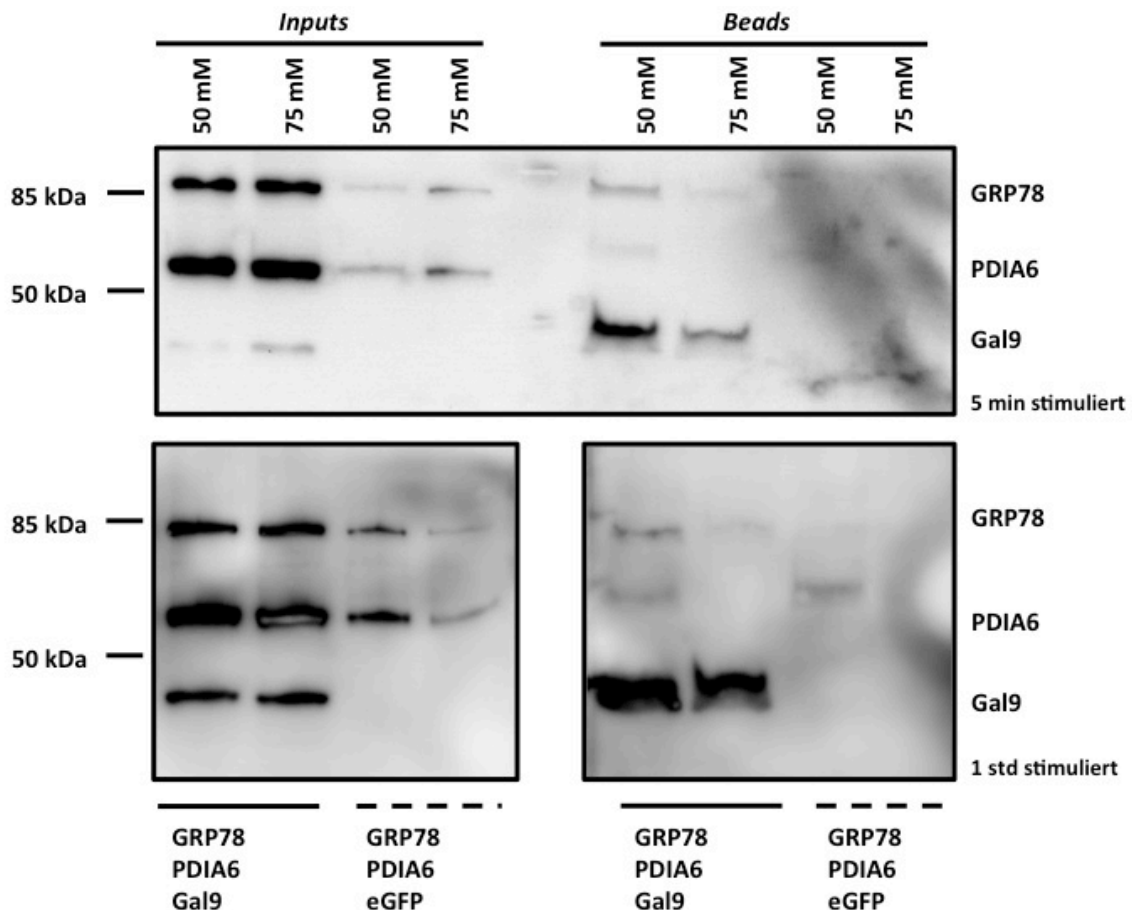
**Abbildung 6: Interaktionsnachweis von Galektin9 (Gal9) und GRP78.** Die linke Seite zeigt die *inputs*, während auf der rechten Seite die von Nickel- (Ni-)beads präzipitierten Proteine zu sehen sind. Während unspezifische Bindungen von GRP78 und PDIA6 an die Ni-*beads* bei 75 mM Imidazol aufgehoben werden (rechte Spalte), kann Gal9 bei 75 mM Imidazol von Ni-*beads* gebunden werden und selber GRP78 binden (dritte Spalte von rechts). Damit ist eine Interaktion von Gal9 und GRP78 nachgewiesen. Detektion mittels Anti-*Myc-tag*-Antikörper.

### 5.1.3 Interaktion von Galektin9 und GRP78 nach Stimulation

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob sich die Bindung von Galektin9, GRP78 und PDIA6 nach Stimulation der Zelle ändert, wurde das gleiche Experiment wie in 5.1.2

leicht modifiziert durchgeführt. Vor der Ernte wurden die Zellen entweder 5 Minuten oder 1 Stunde mit PMA stimuliert, welches intrazellulär die Proteinkinase-C aktiviert. Anschließend wurden die Zellen auf die gleiche Weise wie im vorangegangenen Experiment (siehe 5.1.2) lysiert, präzipitiert und per *Western-blot* analysiert (siehe Abbildung 7).

Der obere *Western-blot* zeigt die Lysate nach fünfminütiger Stimulation, während im unteren *blot* die Lysate nach einstündiger Stimulation zu sehen sind. Wieder ließ sich GRP78 von Galektin9 bei einer Konzentration von 75 mM Imidazol ohne unspezifische Bindungen präzipitieren (dritte Spalte von rechts). Eine Zu- oder Abnahme der Interaktion nach Zellstimulation, konnte durch eine stärkere oder schwächere Bande von GRP78 (85 kDa) im Verhältnis zu Galektin9 (45 kDa) nicht ausgemacht werden.



**Abbildung 7: Gleichbleibende Interaktionsstärke von Galektin9 (Gal9) und GRP78 nach PMA-Stimulation.** Die *Western-blots* zeigen das gleiche Ergebnis wie Abbildung 6. Vor der Ernte wurden die Zellen 5 Minuten (oberer *blot*) sowie 1 Stunde (unterer *blot*) mit PMA stimuliert. Die Stimulation hat keine Auswirkung auf die Stärke der Bindung von Gal9 und GRP78 (dritte Spalte von rechts). Detektion mittels Anti-*Myc-tag*-Antikörper.

Da dieses Experiment aus Zeitgründen nur einmal durchgeführt werden konnte, muss hier von ersten Hinweisen gesprochen werden.

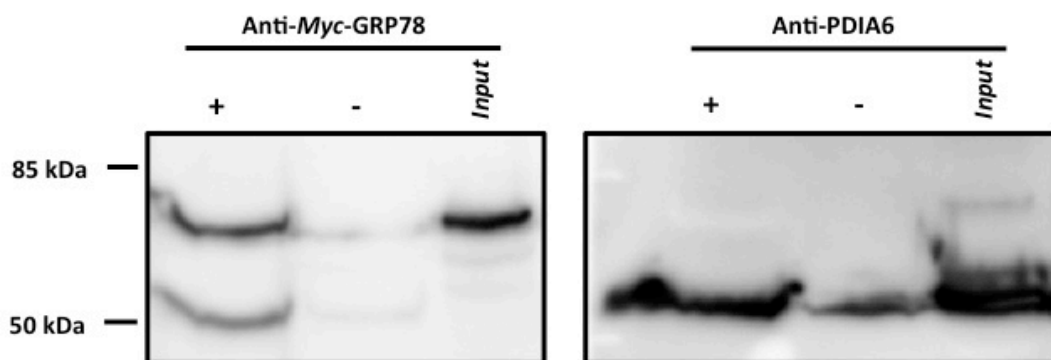
#### 5.1.4 Interaktion von PDIA6 und GRP78

Da der Nachweis einer Interaktion von PDIA6 und GRP78 in den vorangegangenen Experimenten nicht möglich war, sollte jene Interaktion wie folgt untersucht werden.

Hierzu wurde ein anderer Versuchsaufbau verwendet. Eine mit N-terminalem *Myc-tag* versehene Variante von GRP78 wurde mit PDIA6 (ohne *tag*) in HEK-293T-Zellen ko-transfiziert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde GRP78 präzipitiert. Hierzu wurden Sepharose-*beads*, welche mit einem *Anti-Myc-tag*-Antikörper gekoppelt waren, verwendet.

Die Proben des Präzipitats wurden durch zwei separate *Western-blots* analysiert (siehe Abbildung 8), wobei der eine mit einem Primärantikörper gegen den *Myc-tag* des GRP78 (linker *blot*) und der zweite mit einem Primärantikörper gegen PDIA6 (rechter *blot*) entwickelt wurde.

Durch die starke Bande von PDIA6 (54 kDa, rechter *blot*) ist auf eine Präzipitation durch GRP78 zu schließen. Dieser Versuch konnte aus Zeitgründen nur einmal durchgeführt werden.



**Abbildung 8: Interaktion von GRP78 und PDIA6.** +: *Positiv-beads*; -: *Negativ-beads*. Der linke *Western-blot* wurde gegen den *Myc-tag* des GRP78 entwickelt, der rechte spezifisch gegen PDIA6. GRP78 ließ sich erfolgreich von den *Anti-Myc-tag*-Antikörper-gekoppelten *beads* binden und konnte PDIA6 ko-präzipitieren.

## **5.2 Abhängigkeit der Multimerisierung ADAM17s von der MPD und der CANDIS**

In den folgenden Experimenten sollte die Abhängigkeit der Multimerisierung ADAM17s von der MPD sowie der CANDIS im vollständigen ADAM17 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden ADAM17-Chimären verwendet, in welchen die MPD und/ oder CANDIS ausgetauscht wurden, entweder gegen die entsprechende Regionen von ADAM10, als nahesten Verwandten ADAM17s, oder von ADAM22, als typisches Mitglied der ADAM-Familie. Alle Chimären waren murinen Ursprungs.

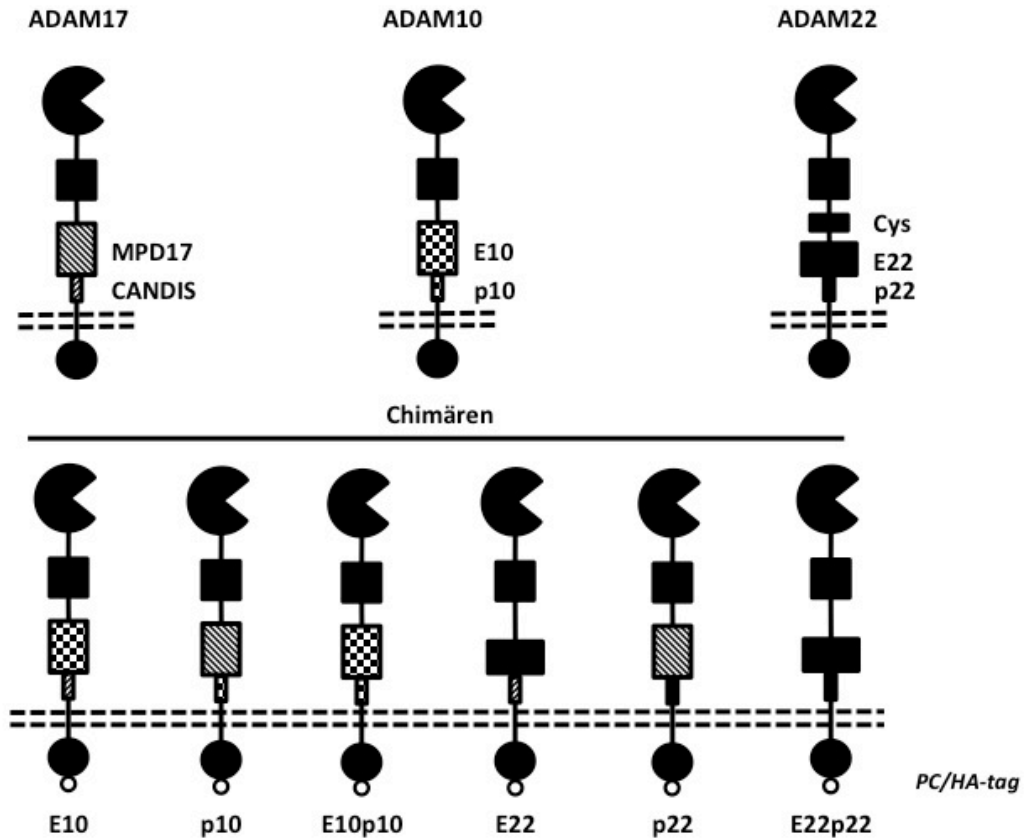
Von jeder Chimäre stand eine C-terminal mit *HA*- und eine mit *PC-tag* versehene Variante zur Verfügung. Insgesamt sollten also zwölf Chimären in den Experimenten verwendet werden: Zwei, in welchen die MPD gegen die von ADAM10 ausgetauscht waren (E10) und zwei in welchen die CANDIS durch das entsprechende Peptid von ADAM10 ersetzt wurde (p10), sowie zwei in welchen beide Regionen gegen die entsprechenden Regionen von ADAM10 ausgetauscht waren (E10p10). Selbige Chimären existierten für ADAM22, in welchen die MPD gegen die EGF-ähnlichen Domänen ersetzt waren und die CANDIS gegen das korrespondierende Peptid von ADAM22 (E22, p22, E22p22, siehe Abbildung 9).

### **5.2.1 Expressionsversuche der ADAM17-Chimären**

Vor Beginn der Versuche musste zunächst geprüft werden, ob sich die genannten Konstrukte in HEK-293T-Zellen exprimieren ließen. Hierzu wurde jedes Konstrukt einzeln in die besagten Zellen transfiziert. Diese wurden anschließend geerntet und lysiert. Die Lysate wurden per *Western-blot* analysiert (siehe Abbildung 10).

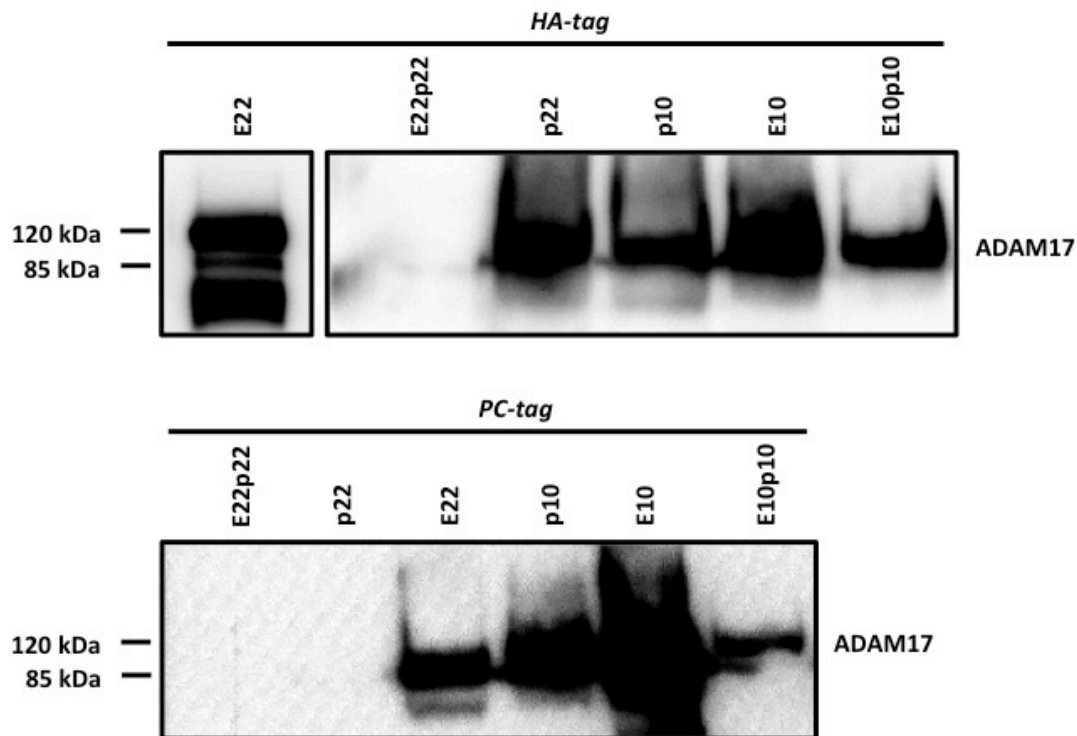
Der obere *Western-blot* zeigt die Konstrukte mit *HA-tag*, der untere jene mit *PC-tag*. Die Spalten sind benannt mit den jeweiligen Kurzbezeichnungen der Chimären (siehe 5.2). Während von den ADAM17-ADAM10-Chimären alle exprimiert wurden, ließen sich drei der ADAM17-ADAM22-Chimären nicht exprimieren. Dies waren die Chimären, in welchen sowohl die MPD, als auch CANDIS gegen die entsprechenden Regionen von ADAM22 ausgetauscht waren (E22p22), sowie die Chimäre mit dem ausgetauschten korrespondierenden CANDIS-Peptid von ADAM22 (p22) mit *PC-tag*.

Da die Reihe der ADAM17-ADAM22-Chimären unvollständig war, wurde sich in Folgeexperimenten auf die ADAM17-ADAM10-Chimären beschränkt.



**Abbildung 9: Verwendete ADAM17-Chimären.** E10: MPD10; p10: CANDIS-korrespondierendes Peptid von ADAM10; Cys: cysteinreiche Domäne; E22: EGF-ähnliche Domäne von ADAM22; p22: CANDIS-korrespondierendes Peptid von ADAM22. Oben sind die Domänenstrukturen der Wildtypen zu sehen, unten die Schemata der verwendeten ADAM17-Chimären. Die Bezeichnungen der Chimären nennen jeweils die ausgetauschte Region. Alle Chimären waren C-terminal entweder mit einem *PC*- oder *HA-tag* versehen.





**Abbildung 10: Kontrollexpression der ADAM17-Chimären nach transienter Transfektion in HEK-293T-Zellen.** Im oberen *blot* sind die Chimären mit *HA-tag* zu sehen, im unteren die mit *PC-tag*. Bis auf drei Konstrukte ließen sich alle Chimären in HEK-293T-Zellen exprimieren. Nicht exprimiert werden konnten die Konstrukte, in welchen die MPD sowie die CANDIS gegen die korrespondierenden Elemente von ADAM22 getauscht waren (E22p22) sowohl in *HA-* als auch in *PC-tag*-Variante. Ebenso wurde die mit *PC-tag* versehene Variante der Chimäre mit CANDIS-korrespondierendem Peptid von ADAM22 (p22) nicht exprimiert. Detektion mittels Anti-*HA-*/ Anti-*PC-tag*-Antikörper.

### 5.2.2 Multimerisierung von ADAM17-Wildtyp und ADAM17-ADAM10-Chimären

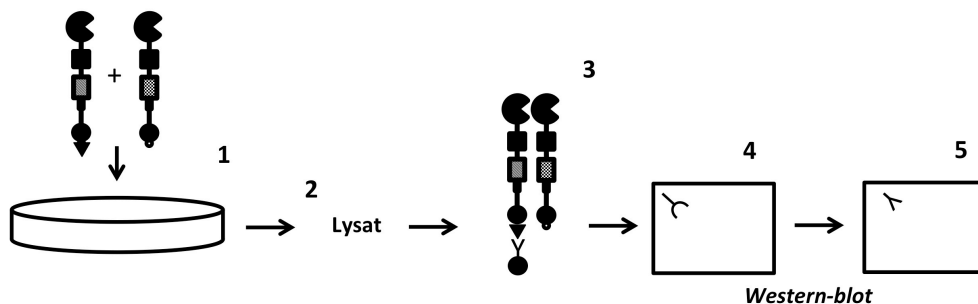
Um die Abhängigkeit der Multimerisierung ADAM17s von der MPD sowie CANDIS zu untersuchen, wurde zunächst jeweils ein ADAM17-Wildtyp (wt) mit *PC-tag* mit einem Wildtyp oder einer Chimäre mit *HA-tag* in HEK-293T-Zellen ko-transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Anschließend wurde mit den Lysaten mit Hilfe von an Sepharose-*beads* gekoppelten Anti-*PC-tag*-Antikörpern Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt. Es wurde also stets der mit *PC-tag* versehene Wildtyp präzipitiert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden Negativ-*beads* mit gekoppelten Nonsens-Antikörpern verwendet. Nachdem die *beads* gründlich in Lysepuffer gewaschen wurden, wurden die Proben mittels *Western-blot* analysiert. Dabei wurde immer zuerst gegen das ko-präzipitierte Protein mit *HA-tag* entwickelt. Nach anschließendem *strippen* der Membran wurde gegen das präzipitierte Protein mit *PC-*

*tag* entwickelt. Die Intensitäten der Banden wurden jeweils densitometrisch ausgewertet (Schema siehe Abbildung 11).

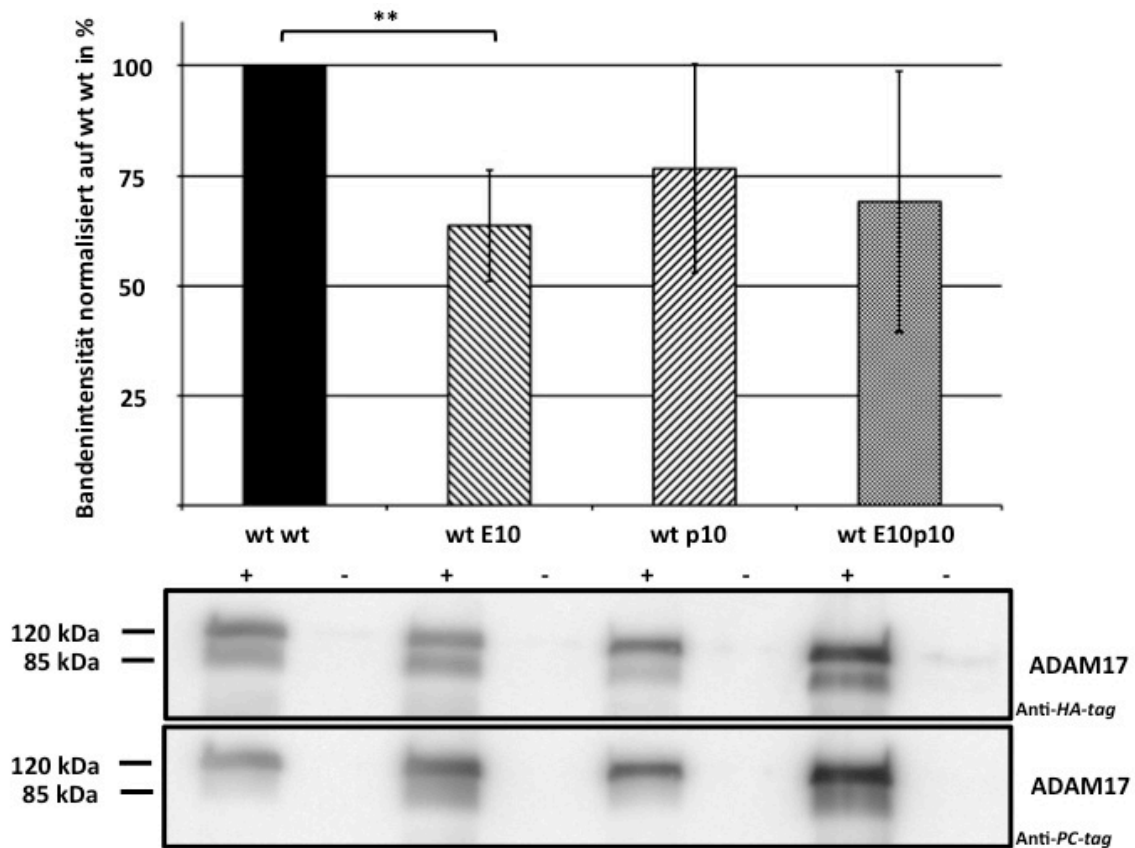
Das Verhältnis von *HA-* zu *PC*-Signal konnte nun je als Wert für die Bindungseffektivität vom Wildtyp an die jeweilige Chimäre angenommen werden. Das so gewonnene Verhältnis des Wildtyp-Paares (wt wt) wurde zu 100 Prozent gesetzt, sodass die ungleichen Paare von Wildtyp und Chimäre (wt E10, wt p10, wt E10p10) auf jenes normalisiert werden konnten. Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung sowie die *Western-blots* zeigt Abbildung 12. Die *input*-Kontrollen sind in Abbildung 14 zu sehen.

Im Ergebnis zeigt sich für alle Chimären eine verringerte Fähigkeit zur Multimerisierung verglichen zum Wildtyp (wt wt). Während für die Chimären p10 und E10p10 klare Tendenzen zu erkennen sind, zeigt sich bei der Chimäre E10 nach einseitiger Testung eine signifikante Abnahme der Multimerisierung mit einem p-Wert kleiner 0,05 (t(3) - 4,98; p=0,0078).

Die Experimente wurden unabhängig voneinander jeweils vierfach durchgeführt.



**Abbildung 11: Schema der Ko-Immunopräzipitation in Multimerisierungsexperimenten.** 1: Ko-Transfektion eines Wildtyps (wt) mit *PC-tag* mit einem zweiten wt oder einer Chimäre mit *HA-tag*; 2: Ernte und Lyse der Zellen; 3: Ko-Immunopräzipitation durch Anti-*PC-tag*-Antikörper-*beads*; 4: *Western-blot* mit primärem Anti-*HA-tag*-Antikörper; 5: nach *strippen* der Membran Entwicklung des *Western-blots* mit primärem Anti-*PC-tag*-Antikörper.



**Abbildung 12: Multimerisierung von ADAM17-Wildtyp mit ADAM17-ADAM10-Chimären.** wt: Wildtyp; E10: ADAM17-Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: ADAM17-Chimäre mit CANDIS-korrespondierendem Peptid von ADAM10; E10p10: ADAM17-Chimäre mit MPD und CANDIS von ADAM10; +: Positiv-beads; -: Negativ-beads; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Das Diagramm zeigt die Verhältnisse der ADAM17-Chimären-Signale (*HA-tag*) zum jeweiligen Signal des präzipitierten ADAM17-Wildtyp (wt, *PC-tag*) im *Western-blot*, normalisiert auf das Wildtyp-Paar. So konnte die Multimerisierungsfähigkeit der ADAM17-Chimären mit dem wt, verglichen an der normalen Multimerisierung ADAM17s (wt wt), ermittelt werden. Die *blots* zeigen die Ko-Immunopräzipitation mit Positiv- (+) und Negativ-beads (-).

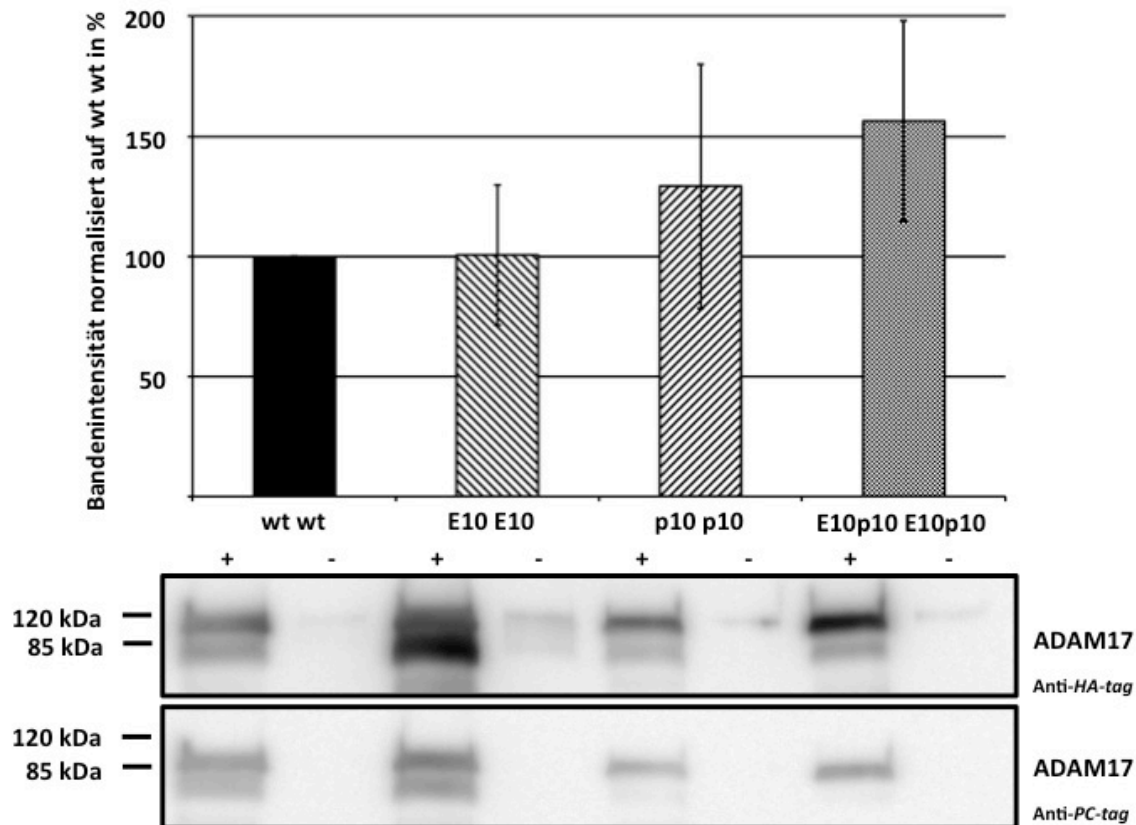
### 5.2.3 Multimerisierung homogener ADAM17-ADAM10-Chimären

Nachdem die Multimerisierung mit Hilfe von Ko-Immunopräzipitationen anhand Wildtyp und Chimäre untersucht wurde, sollte anschließend die Fähigkeit der Multimerisierung von jeweils gleichen Chimären getestet werden. Hierzu wurde genau wie im vorangegangenen Experiment (5.2.2) vorgegangen. Allerdings wurden nun nicht jeweils unterschiedliche Konstrukte ko-transfiziert, sondern jeweils die gleichen Chimären, eine mit *PC-* und eine mit *HA-tag*. Die Ko-Immunopräzipitation erfolgte dabei wie zuvor mit an Sepharose-beads gekoppelten Anti-*PC-tag*-Antikörper.

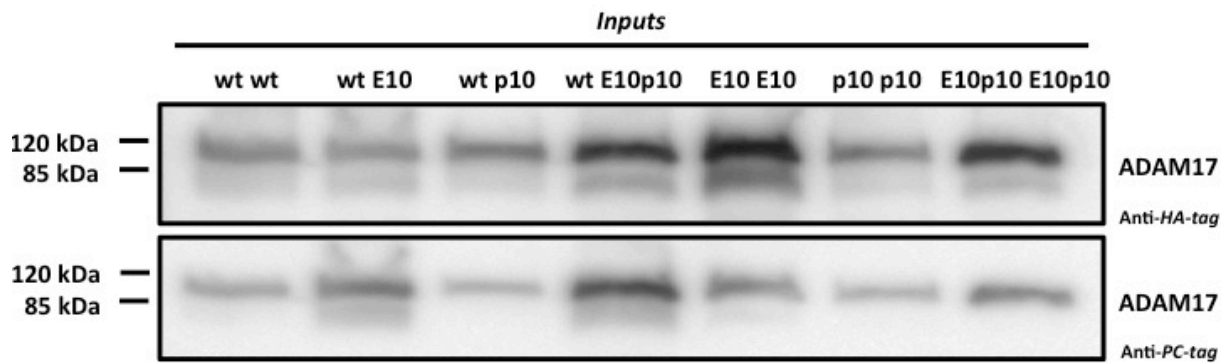
Die densitometrische Auswertung der *Western-blots* wurde ebenfalls wie in 5.2.2 durchgeführt. Die Multimerisierung des Wildtyps wurde zu 100 Prozent gesetzt, sodass die Chimären darauf normalisiert werden konnten.

Im Ergebnis (siehe Abbildung 13) zeigte sich für die Chimären, in welchen nur die MPD durch die entsprechende Domäne ADAM10s ausgetauscht war (E10), eine Schwankung um den Wert des Wildtyps. Die Chimären mit dem CANDIS-korrespondierenden Peptid von ADAM10 (p10) hatten eine, verglichen zum Wildtyp, gesteigerte Tendenz zur Multimerisierung, während die Chimären in welchen beide Bereiche durch die Elemente von ADAM10 ersetzt waren (E10p10) nach einseitiger Testung eine nahezu signifikant höhere Tendenz zur Multimerisierung zeigten ( $t(3)=-2,31$ ;  $p=0,051$ ).

Die *input*-Kontrollen zeigt Abbildung 14. Die Experimente wurden zu unabhängigen Zeitpunkten jeweils vierfach wiederholt.



**Abbildung 13: Multimerisierung homogener ADAM17-ADAM10-Chimären.** wt: Wildtyp; E10: ADAM17-Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: ADAM17-Chimäre mit CANDIS-korrespondierendem Peptid von ADAM10; E10p10: ADAM17-Chimäre mit MPD und CANDIS von ADAM10; +: Positiv-beads; -: Negativ-beads. Das Diagramm zeigt die Verhältnisse der Chimären-Signale mit *HA-tag* zum jeweiligen Signal der präzipitierten Chimäre mit *PC-tag* im *Western-blot*, normalisiert auf das Wildtyp-Paar. Damit kann die Multimerisierungsfähigkeit homogener Chimären-Paare ermittelt werden, verglichen zum ADAM17-wt. Die *blots* zeigen die Ko-Immunopräzipitation mit Positiv- (+) und Negativ-beads (-).



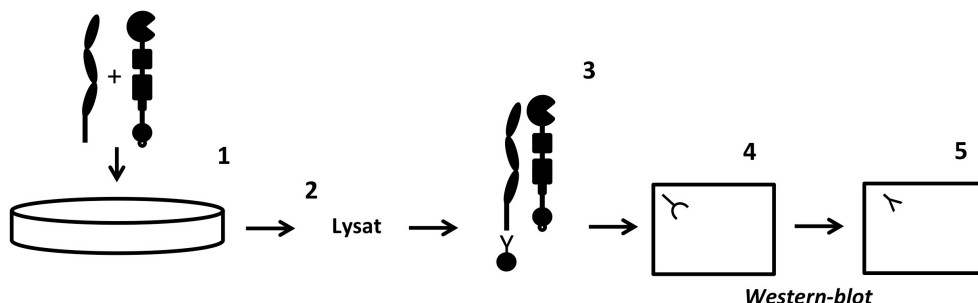
**Abbildung 14: Expressions (*input*)-Kontrollen der Multimerisierungsexperimente.** wt: Wildtyp; E10: Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: Chimäre mit CANDIS-korrespondierendem Peptid von ADAM10; E10p10: Chimäre in welchen MPD und CANDIS ausgetausch sind durch die korrespondierenden Elemente von ADAM10. Die *Western-blot*s zeigen die *input*-Kontrollen der vorangegangenen Ko-Immunopräzipitationen.

### 5.3 Abhängigkeit der Substratbindung ADAM17s von der MPD und der CANDIS

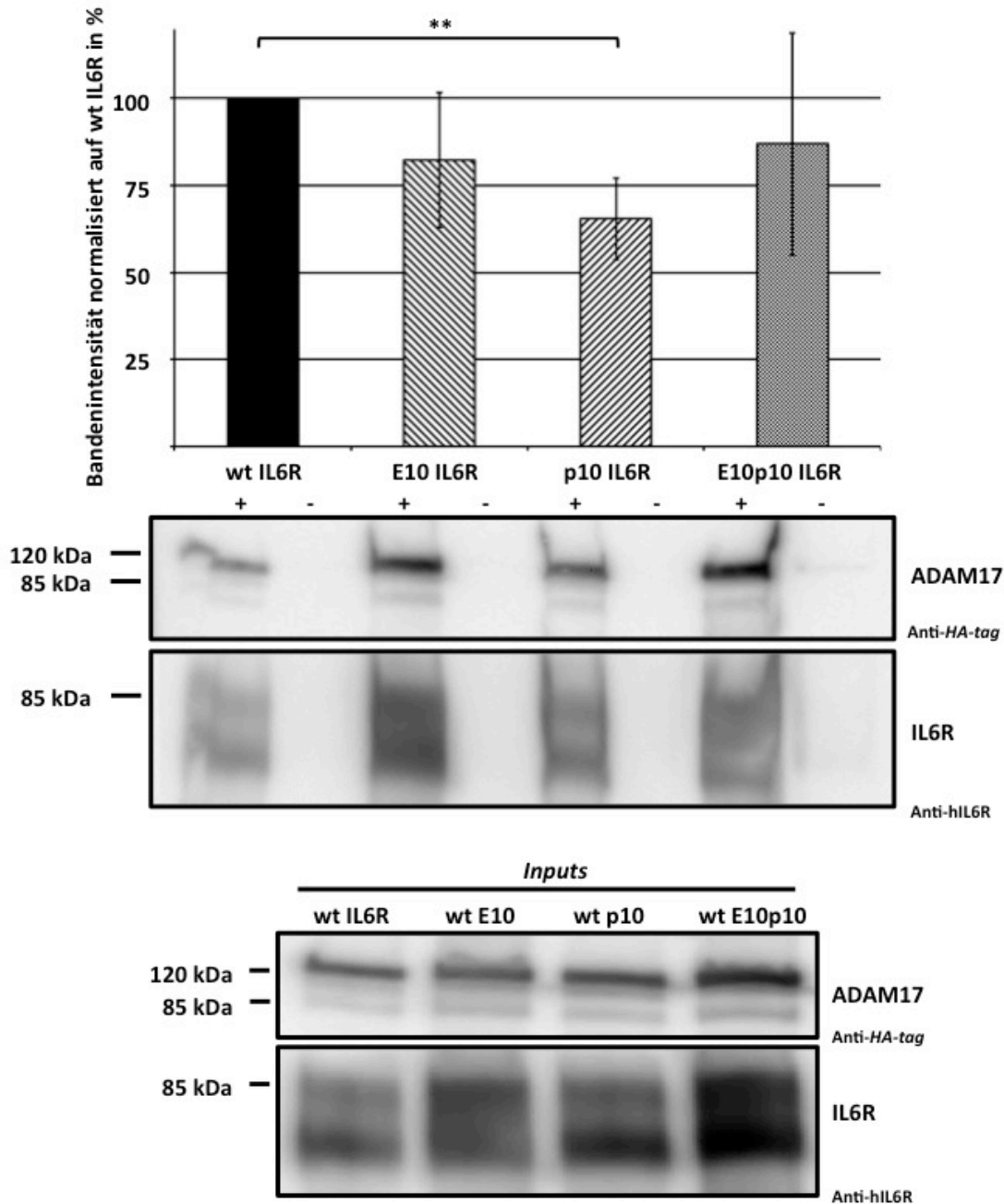
Im folgenden Experiment sollte die Abhängigkeit der Substratbindung ADAM17s von der MPD sowie CANDIS anhand des hIL6Rs untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden dieselben Chimären wie in 5.2 mit *HA-tag* verwendet (siehe Abbildung 9). Da die Expressionsfähigkeit der ADAM17-ADAM10-Chimären in HEK-293T-Zellen bereits vollständig gezeigt worden war (siehe 5.2.1), wurde sich auf diese beschränkt.

#### 5.3.1 Bindung des hIL6Rs an ADAM17-ADAM10-Chimären

Zunächst wurden HEK-293T-Zellen im Verhältnis 1:1 mit dem hIL6R und einem Wildtyp-ADAM17 oder einer ADAM17-ADAM10-Chimäre ko-transfiziert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde mit Hilfe von anti-hIL6R-antikörper-gekoppelter Protein-G-*beads* der hIL6R aus den Lysaten präzipitiert. Als Negativkontrolle wurden nonsens-antikörper-gekoppelte *beads* verwendet. Nach Waschen der *beads* wurde das Präzipitat mittels *Western-blot* analysiert. Zunächst wurde der *blot* mit Anti-*HA-tag*-Primärantikörper analysiert und nach erfolgreichem *strippen* der PVDF-Membran mit Anti-hIL6R-Primärantikörper (siehe Schema Abbildung 15). Die *Western-blots* wurden densitometrisch ausgewertet. Hierfür wurde für die ADAM17-Konstrukte die charakteristische Doppelbande bei 120 und 85 kDa und für den hIL6R die Doppelbande bei 85 kDa, welche durch unterschiedliche Glykosylierungsformen entsteht, gewählt (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 15: Schema der Ko-Immunopräzipitation in Substratbindungsexperimenten.** 1: Ko-Transfektion einer Chimäre oder eines Wildtyps mit *HA-tag* mit dem hIL6R; 2: Ernte und Lyse der Zellen; 3: Ko-Immunopräzipitation durch Anti-hIL6R-Antikörper-*beads*; 4: *Western-blot* mit primärem Anti-*HA-tag*-Antikörper; 5: nach *strippen* der Membran Entwicklung des *Western-blots* mit primärem Anti-hIL6R-Antikörper.



**Abbildung 16: Substratbindung von ADAM17-Chimären an den hIL6R.** wt: Wildtyp; E10: Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: Chimäre mit CANDIS-korrespondierendem Peptid von ADAM10; E10p10: Chimäre, in welcher MPD und CANDIS gegen die korrespondierenden Regionen ADAM10s ausgetauscht wurden; +: Positiv-beads; -: Negativ-beads; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Das Diagramm zeigt die Verhältnisse der Chimären-Signale mit *HA-tag* zum jeweiligen Signal des präzipitierten hIL6R im *Western-blot*, normalisiert auf das des wt mit hIL6R. Damit kann die Bindungsaffinität der jeweiligen Chimäre zum hIL6R ermittelt werden. Die *blots* zeigen die Ko-Immunopräzipitation mit Positiv- (+) und Negativ-beads (-). Im unteren *Western-blot* werden die *input*-Kontrollen dargestellt.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde stets das Verhältnis von *HA*-Signal (ADAM17-Chimäre) zu dem des hIL6Rs ermittelt. Diese Verhältnisse wurden auf das Verhältnis des Wildtyps (wt IL6R) normalisiert. Durch dieses Verfahren konnte die Ab- oder Zunahme der Substratbindung der Chimären, verglichen zum Wildtyp, ermittelt werden. Das Ergebnis zeigt Abbildung 16. Die *input*-Kontrollen sind ebenfalls in Abbildung 16 gezeigt.

Die Ko-Immunopräzipitationen waren für alle Konstrukte erfolgreich. Eine Substratbindung fand bei allen Chimären statt (+). Unspezifische Bindungen der *beads* konnten durch die Negativ-*beads* (-) ausgeschlossen werden.

Eine deutliche reduzierte Tendenz von etwa 80 Prozent der Substratbindung des Wildtyps war für die Chimäre zu erkennen, in welcher die MPD gegen die ADAM10s getauscht wurde (E10). Eine nach einseitiger Testung signifikant niedrigere Affinität zum Substrat zeigte das Konstrukt mit dem CANDIS-korrespondierenden Peptid von ADAM10 (p10) ( $t(3)=-5,07$ ;  $p=0,0074$ ). Für die Chimäre in welcher sowohl die MPD, als auch die CANDIS gegen die korrespondierenden Regionen ADAM10s getauscht wurden (E10p10), zeigte sich eine vergleichsweise große Schwankung mit einer Tendenz zu reduzierter Substratbindung.

Dieses Experiment wurde jeweils vierfach durchgeführt.



#### **5.4 Einfluss der MPD und der CANDIS auf die *shedding*-Aktivität ADAM17s**

Die folgenden Experimente dienten dazu, die Auswirkungen der MPD sowie CANDIS auf die *shedding*-Aktivität ADAM17s zu untersuchen. Hierzu sollten erneut ADAM17-Chimären verwendet werden, in welchen die MPD und/ oder CANDIS gegen die entsprechenden Elemente von ADAM10 bzw. ADAM22 ausgetauscht worden waren.

Für alle nachfolgenden Experimente wurden murine embryonale Fibroblasten (mEF) als Zelllinie gewählt. In diesen ist zwar die Transfektionseffizienz gering, allerdings lassen sich vergleichsweise leicht *knock-down*- oder *knock-out*-Zellen aus ihnen generieren. Dies war Grundlage zum Ausschluss von Fehlerquellen bei den nachfolgenden Experimenten.

##### **5.4.1 Methodenetablierung für Aktivitätsassays**

Zur Methodenetablierung wurden zunächst mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen gewählt, in welchen die endogene ADAM17-Produktion auf etwa 5 Prozent des Ursprungswertes reduziert ist. Damit konnte sichergestellt werden, dass die gemessene *shedding*-Aktivität nicht auf endogenes ADAM17, sondern nahezu ausschließlich auf die transfizierten ADAM17-Konstrukte zurückging.

Zunächst sollte eine optimale Zelldichte für transiente Transfektionen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen zu  $0,1 \times 10^6$ ,  $0,15 \times 10^6$ ,  $0,2 \times 10^6$ ,  $0,25 \times 10^6$  und  $0,3 \times 10^6$  in je 2 ml Medium ausgesät und nach 24 Stunden mit dem erhöht-Grün-Fluoreszierenden-Protein (eGFP) transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Fluoreszenz der Zellen sowie deren Dichte bestimmt. Dabei stellte eine möglichst große Zelldichte ohne Zellüberlagerungen sowie eine möglichst starke Fluoreszenz, als Folge erfolgreicher Transfektion, das Optimum dar.

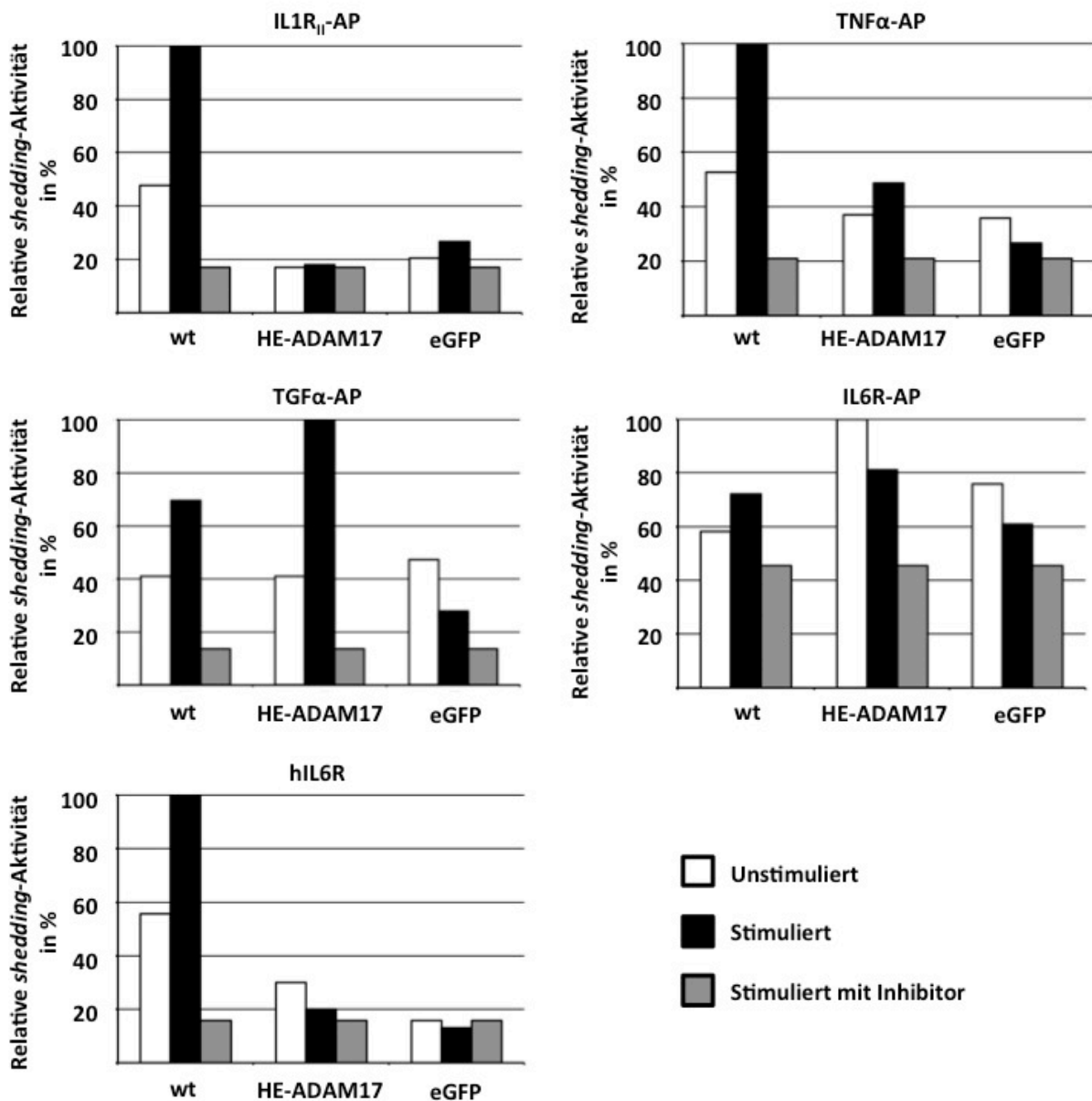
Die größte Transfektionseffizienz von etwa 95 Prozent fand sich bei den zu  $0,1 \times 10^6$  ausgesäten Zellen. Allerdings war die Zelldichte recht gering. Eine Transfektionseffizienz von etwa 90 Prozent bei optimaler Zelldichte hingegen zeigten die zu  $0,2 \times 10^6$  ausgesäten Zellen. Folglich wurde dies als Standard für spätere Transfektionen gewählt.

Anschließend sollte ermittelt werden, welche Substrate sich bei einem Alkaline-Phosphatase- (AP-)Assay eigneten, um die *shedding*-Aktivität von ADAM17-Chimären experimentell zu erfassen. Hierzu wurden mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen transient mit dem ADAM17-Wildtyp (wt), einem inaktiven ADAM17 Konstrukt (HE-ADAM17) (41,42) oder

eGFP als *mock*-Kontrolle, sowie jeweils einem Substrat im Verhältnis 1:4 ko-transfiziert. Die typ-I-transmembranären Substrate waren N-terminal mit einer Alkalinen-Phosphatase versehen, die typ-II-transmembranären C-terminal. Als Substrate wurden verwendet: IL1R<sub>II</sub>-AP, TNF $\alpha$ -AP, TGF $\alpha$ -AP und IL6R-AP. Alle waren humanen Ursprungs. Nach 24 Stunden wurden die Zellen unstimuliert gehalten, um das konstitutive *shedding* zu erfassen, stimuliert mit PMA, um das induzierte *shedding* zu messen, oder stimuliert und inhibiert mit dem Breitspektrum-Matrix-Metalloproteasen-Inhibitor Marimastat als Kontrollwert. Die Messdaten wurden auf den letztgenannten Kontrollwert und schließlich auf den jeweils höchsten Ausschlag als 100 Prozent normiert (siehe auch 4.1.12).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Bei dem IL1R<sub>II</sub>-AP zeigte sich für den stimulierten ADAM17-Wildtyp (wt) eine nahezu sechsfach höhere *shedding*-Aktivität verglichen mit der *mock*-Kontrolle (eGFP) und der inaktiven Mutante HE-ADAM17. Das konstitutive *shedding* des Wildtyps ließ sich durch Stimulation etwa verdoppeln. Hingegen HE-ADAM17 und *mock*-Kontrolle zeigten, sowohl für das konstitutive *shedding* als auch nach Stimulation, keine nennenswerten Unterschiede zum Kontrollwert (stimuliert mit Inhibitor). Bei dem Substrat TNF $\alpha$ -AP zeigte sich ebenfalls nach Stimulation eine Verdopplung der konstitutiven *shedding*-Aktivität des Wildtyps. Die Aktivität nach Stimulation zeigte für den Wildtyp einen etwa verdoppelten Wert, verglichen mit HE-ADAM17 und eine etwa dreifache Steigerung verglichen zur *mock*-Kontrolle. Trotz des klaren Unterschiedes von HE-ADAM17 zum Wildtyp zeigte die inaktive Mutante eine nahezu zweifache Steigerung der Aktivität der *mock*-Kontrolle für den stimulierten Wert. Für das Substrat TGF $\alpha$ -AP zeigten sich andere Verhältnisse als für die zwei zuvor genannten Substrate. Zwar ließ sich das konstitutive *shedding* durch Stimulation beim Wildtyp nahezu verdoppeln und bei der inaktiven Mutante mehr als verdoppeln, allerdings zeigte letztere nach Stimulation den höchsten Ausschlag. Ein ähnliches Resultat war für den IL6R-AP zu sehen. Hier wies das unstimulierte HE-ADAM17 die höchste *shedding*-Aktivität auf. Klare Tendenzen für Unterschiede in der *shedding*-Aktivität zwischen Wildtyp, inaktiver Mutante und *mock*-Kontrolle waren nicht auszumachen.

Die unplausiblen *shedding*-Ergebnisse für TGF $\alpha$ -AP sowie dem IL6R-AP könnten in der gegenüber anderen Assays anfälligeren Methode des AP-Assays gelegen haben.



**Abbildung 17: Messbare *shedding*-Aktivität verschiedener ADAM17-Substrate im AP-Assay oder ELISA.** wt: ADAM17-Wildtyp; HE-ADAM17: inaktive ADAM17-Vollängenmutante; eGFP: erhöht grün flureszierendes Protein als *mock*-Kontrolle. Die oberen vier Diagramme zeigen die messbaren *shedding*-Aktivitäten für die jeweiligen Substrate, gemessen mittels AP-Assay. Im unteren Diagramm wurde mittels ELISA gemessen. Auf der Abszisse ist die relative Aktivität in Prozent, normiert auf den jeweils höchsten Ausschlag angegeben.

Um die *shedding*-Aktivität für den IL6R doch erfassen zu können, wurde anschließend eine weitere Methode verwendet. Statt der mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen wurden ADAM17-ADAM10-Doppel-*knock-out*-Zellen (mEF-ADAM17-ADAM10<sup>-/-</sup>) verwendet. Die Zellen wurden gleichermaßen ausgesät, transfiziert, stimuliert und lysiert. Statt des IL6R-AP wurde hIL6R verwendet und die Messung erfolgte nicht mittels AP-Assay sondern mit Hilfe eines *sandwich*-ELISAs.

Das Ergebnis ist ebenfalls in Abbildung 17 gezeigt (unteres Diagramm). Für den Wildtyp zeigte sich nach Stimulation eine fünffach höhere *shedding*-Aktivität gegenüber der inaktiven Mutante und eine mehr als fünffach höhere Aktivität gegenüber der *mock*-Kontrolle. Das konstitutive *shedding* des Wildtyps ließ sich durch Stimulation etwa verdoppeln. Die *shedding*-Aktivität des HE-ADAM17 war sowohl unstimuliert als auch nach Stimulation etwa gleich mit der *mock*-Kontrolle.

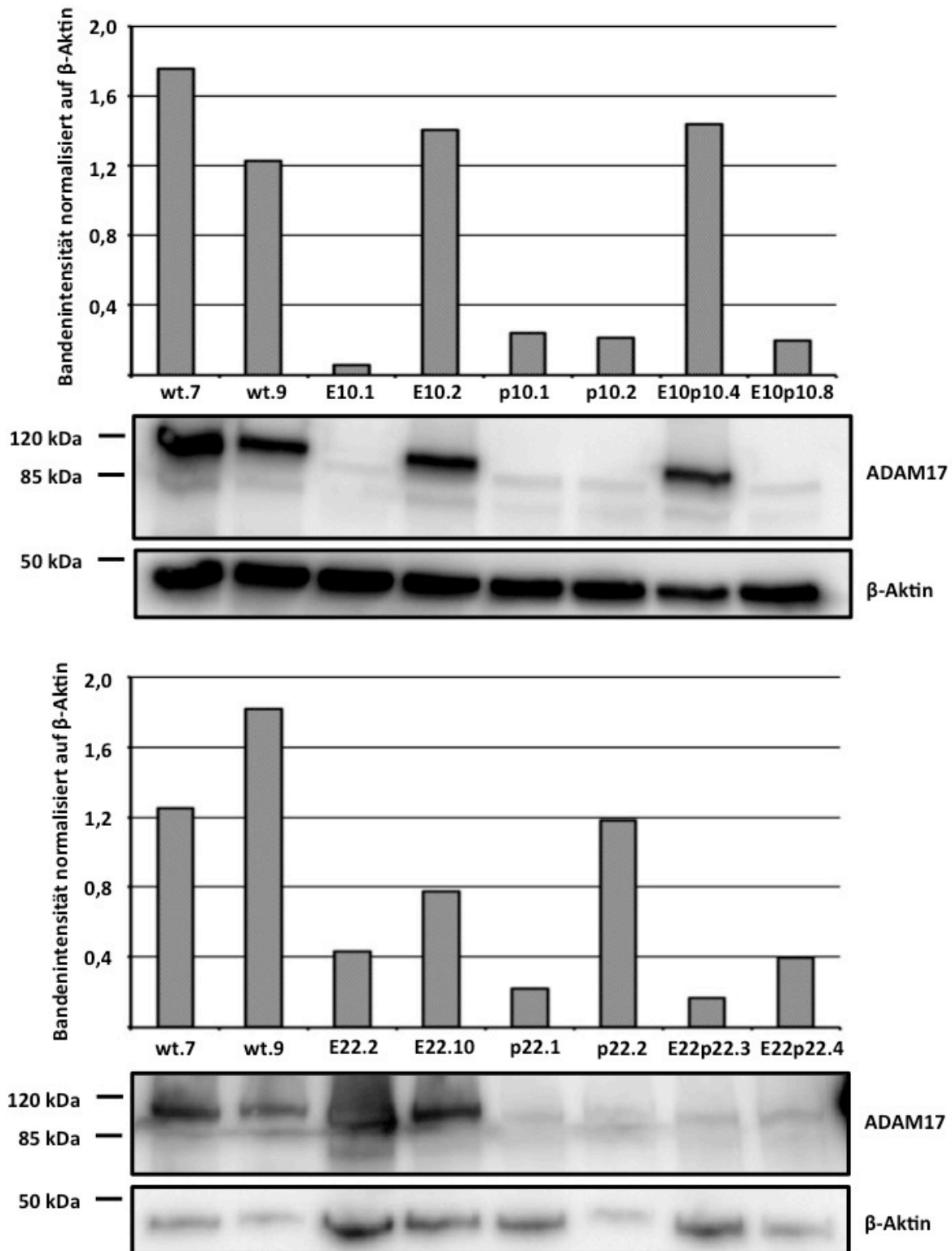
Alle Test-Experimente wurden für jedes Substrat zweimal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. In Folgeexperimenten wurde sich unter Verwendung eines AP-Assays auf die Substrate IL1R<sub>II</sub>-AP und TNF $\alpha$ -AP beschränkt.

### 5.4.2 Expressionslevel stabil ADAM17-transfizierter Zellklone

Nach der erfolgreichen Etablierung der Methode wurden zur Messung der *shedding*-Aktivität in Abhängigkeit von der MPD sowie CANDIS in Folgeexperimenten stabil mit ADAM17-ADAM10- sowie ADAM17-ADAM22-Chimären transfizierte mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise generiert und bereitgestellt von PD Dr. Inken Lorenzen und Jessica Schneider. Alle Zellen waren monoklonal. Zu jeder Chimäre existierten zwei Klone. Zur Detektion im *Western-blot* besaß jedes Konstrukt einen C-terminalen *HA-tag*.

Zunächst sollten die Expressionslevel der Zellklone ermittelt werden. Hierzu wurden die Zelllysate per *Western-blot* analysiert. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 18.

Leider waren die so ermittelten Expressionslevel nicht einheitlich. Etwa die gleichen Expressionslevel zeigten die Wildtypen (wt.7, wt.9) sowie eine ADAM17-ADAM10-Chimäre mit ausgetauschter MPD (E10.2) und eine Chimäre, in welcher sowohl die MPD als auch die CANDIS gegen die entsprechenden Regionen ADAM10s ausgetauscht waren (E10p10.4).



**Abbildung 18: Expressionslevel der stabil ADAM17-transfizierten mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellklone.** wt: Wiltyp; E10/ E22: ADAM17 mit MPD/ EGF-ähnlicher Domäne von ADAM10/ ADAM22; p10/ p22: ADAM17 mit CANDIS-korrespondierender Region von ADM10/ ADAM22; E10p10/ E22p22: ADAM17 mit MPD/ EGF-ähnlicher Domäne und CANDIS-korrespondierendem Peptid von ADAM10/ ADAM22. Die Nummern zeigen den jeweiligen Klon an. Je zwei Klone mit dem selben Konstrukt wurden getestet. Die Diagramme zeigen die Bandenintensitäten der ADAM17-Konstrukte im *Western-blot*, normalisiert auf die jeweilige  $\beta$ -Aktin-Bande, als Maß für die Expression der stabil transfizierten ADAM17-Konstrukte. Unter den Diagrammen sind die jeweiligen *Western-blots* gezeigt. Detektion mittels Anti-HA-tag-/ Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper.

Ein ähnliches Bild bot sich für die Expressionslevel der ADAM17-ADAM22-Chimären. Etwa vergleichbare Expressionslevel wurden für die Wildtypen (wt.7, wt.9) sowie eine Chimäre mit dem CANDIS-entsprechenden Peptid von ADAM22 (p22.2) ermittelt.

Die Testung der Expressionslevel wurden für die ADAM17-ADAM22-Klone zweimal wiederholt und für die ADAM17-ADAM10-Klone dreimal. Aufgrund des einheitlicheren Bildes der Expression der ADAM17-ADAM10-Chimären wurde sich in Folgeexperimenten auf diese beschränkt.

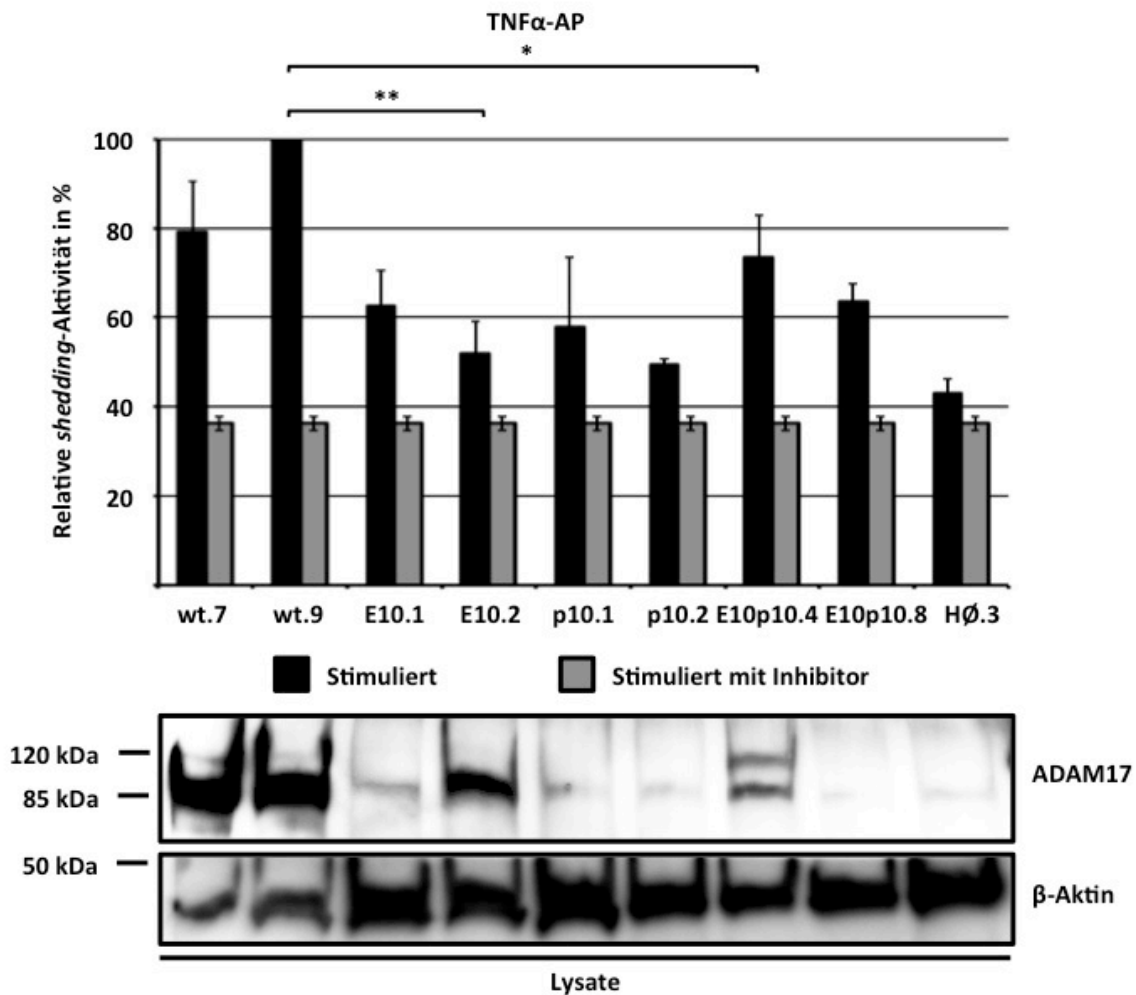
### 5.4.3 Aktivitätsassays mit stabil ADAM17-transfizierten Zellen

Mit den stabil mit ADAM17-ADAM10-Chimären transfizierten mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen sollte nun das TNF $\alpha$ - sowie das IL1R<sub>II</sub>-*shedding* ermittelt werden. Dies sollte Rückschlüsse auf den Einfluss der MPD, sowie der CANDIS auf die *shedding*-Aktivität ADAM17s im Falle typ-I- und typ-II-transmembranärer Substrate erlauben.

Trotz unterschiedlicher Expressionslevel (siehe 5.4.2) wurden alle Zellklone in die Experimente einbezogen. Pro Chimäre existierten also zwei Klone. Zunächst wurden die Zellen wie in 5.4.1 ausgesät und mit den Substraten TNF $\alpha$  und IL1R<sub>II</sub> transfiziert. Beide Substrate waren wie in 5.4.1 extrazellulär mit einer Alkalinen-Phosphatase versehen und humanen Ursprungs. Als Negativ-Kontrolle wurden für den IL1R<sub>II</sub> nicht stabil transfizierte mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen und für TNF $\alpha$  stabil mit Leervektor transfizierte mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 2 Stunden mit PMA stimuliert oder stimuliert und inhibiert mit Marimastat als Kontrolle. Anschließend konnte in den Zellüberständen und -lysaten die AP-Aktivität gemessen werden. Das Ergebnis für TNF $\alpha$  zeigt Abbildung 19, das für den IL1R<sub>II</sub> ist in Abbildung 20 dargestellt.

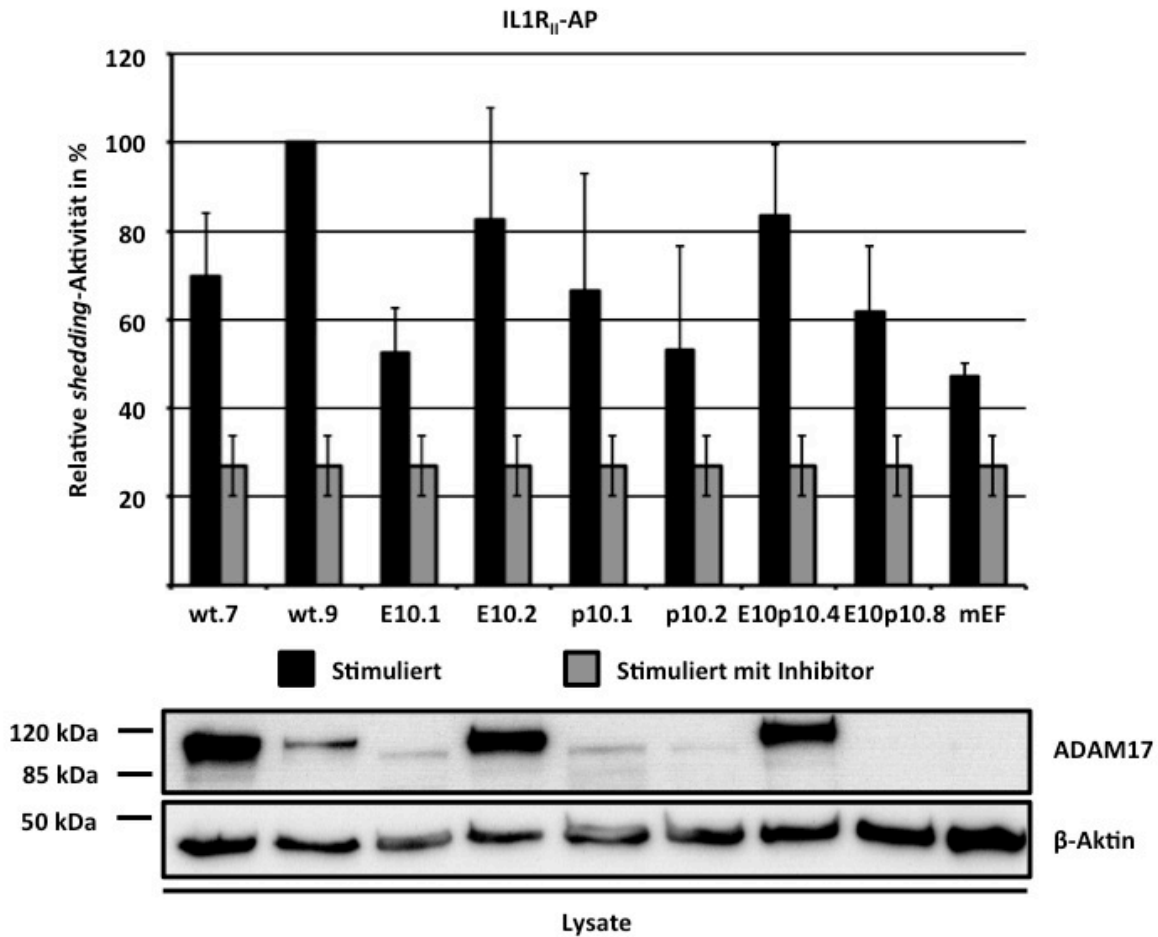
In den Diagrammen ist auf der Abszisse die relative *shedding*-Aktivität in Prozent angegeben. Die Werte sind auf den Wildtyp wt.9 als 100 Prozent normiert. Unter den Balken sind die jeweiligen Kurzbezeichnungen (siehe auch 5.2 und Abbildung 9) der stabil transfizierten Chimären gezeigt. Unter den Diagrammen sind die *Western-blots* der Lysate als Expressionskontrollen zu sehen. Der obere *blot* zeigt ADAM17, der untere  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle.

Für TNF $\alpha$  zeigt sich bei allen Chimären eine niedrigere *shedding*-Aktivität als beim Wildtyp wt.9. Aus den Lysaten geht eine uneinheitliche Expression der ADAM17-Chimären hervor. Etwa vergleichbare Expressionen zeigen die Wildtypen (wt.7, wt.9) sowie ein Klon mit stabil transfizierter Chimäre mit ausgetauschter MPD von ADAM10 (E10.2), und ein Klon mit der Chimäre in welcher MPD und CANDIS gegen entsprechende Elemente ADAM10s ausgetauscht waren (E10p10.4). Diese beiden zeigten nach einseitiger Testung eine signifikante Abnahme der *shedding*-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wt.9 (E10.2:  $t(2)=-9,34$ ;  $p=0,0056$ , E10p10.4:  $t(2)=-4,03$ ;  $p=0,028$ ).



**Abbildung 19: Aktivitätsmessung des TNF $\alpha$ -sheddings in stabil mit ADAM17-Chimären transfizierten Zellen.** wt: Wildtyp; E10: Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: Chimäre mit eingetauschter CANDIS von ADAM10; E10p10: Chimäre, in welcher MPD und CANDIS gegen die korrespondierenden Regionen ADAM10s eingetauscht sind; HØ: Leervektor; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Die Nummern geben die Bezeichnung der Zellklone an. Das Diagramm zeigt die relative *shedding*-Aktivität normalisiert auf wt.9 als 100 Prozent. Für alle Klone mit stabil transfizierten ADAM17-ADAM10-Chimären zeigt sich eine reduzierte *shedding*-Aktivität verglichen an wt.9. Unter dem Balkendiagramm sind die *Western-blots* der Lysate als Expressionskontrolle gezeigt. Der Obere *blot* zeigt ADAM17, der untere  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle. Detektion im *Western-blot* mittels Anti-ADAM17-/ Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper.

Für das *shedding* des IL1R<sub>II</sub> zeigt sich ein ähnliches Bild wie das bei TNF $\alpha$ . Gegenüber dem Wildtyp wt.9 zeigten alle Chimären eine verringerte *shedding*-Aktivität. Die Expressionen der Chimären sind ebenfalls ungleichmäßig. Ähnliche Expressionslevel sind für die Wildtypen (wt.7, wt.9) sowie die Chimären E10.2 und E10p10.4 zu erkennen. Beide zeigten eine Abnahme der *shedding*-Aktivität verglichen mit wt.9 jedoch keine Signifikanzen. Verglichen zu wt.7 ist für die genannten Chimären keine Abnahme der *shedding*-Aktivität erkennbar.



**Abbildung 20: Aktivitätsmessung des IL1R<sub>II</sub>-sheddings in stabil mit ADAM17-Chimären transfizierten Zellen.** wt: Wildtyp; E10: Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: Chimäre mit eingetauschter CANDIS von ADAM10; E10p10: Chimäre, in welcher MPD und CANDIS gegen die korrespondierenden Regionen ADAM10s eingetauscht sind; mEF: nicht stabil transfizierte mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen. Die Nummern geben die Bezeichnung der Zellklone an. Das Diagramm zeigt die relative *shedding*-Aktivität normalisiert auf wt.9 als 100 Prozent. Für alle Klone mit stabil transfizierten ADAM17-ADAM10-Chimären zeigt sich eine reduzierte *shedding*-Aktivität verglichen zu wt.9. Unter dem Balkendiagramm sind die *Western-blot*s der Lysate als Expressionskontrolle gezeigt. Der obere *blot* zeigt ADAM17, der untere β-Aktin als Ladekontrolle. Detektion im *Western-blot* mittels Anti-HA-tag-/ Anti-β-Aktin-Antikörper.



## 6 Diskussion

### 6.1 Galektin9 als mögliches Transportprotein für PDIA6 und GRP78

Von Willems et al. und Düsterhöft et al. wurde die Einbindung der PDIs, speziell der PDIA6, in die Regulation ADAM17s durch Isomerisierung von Disulfidbrücken beschrieben (41–43,45). Die dabei stattfindende Interaktion scheint sich an der Zelloberfläche zu ereignen. Der Mechanismus der Translokation von PDIs an die Zelloberfläche ist für diese zunächst als ER-ständig beschriebenen Proteine bislang ungeklärt (44). Verschiedene mögliche Mechanismen werden dazu diskutiert (49). Hierzu wurde für die PDIA6 eine Interaktion mit dem Lektin Galektin9 an der Zelloberfläche von T-Zellen beschrieben wodurch es an der Zellaußenseite gehalten wird (46). Da für Galektin9 der Transport von Proteinen an die Zelloberfläche über einen alternativen Sekretionsweg bekannt ist (50), könnte dieses das gesuchte Transportprotein darstellen.

Sowohl Galektin9, als auch PDIA6 ließen sich in einem Experiment von Dr. Stefan Düsterhöft durch ADAM17 ko-präzipitieren (42). Bei diesem Experiment konnte auch das ebenfalls als ER-ständig beschriebene Chaperon GRP78 (48) identifiziert werden. Von diesem war bereits eine Interaktion mit der PDIA6 auf B-Zelloberflächen beschrieben worden (47).

Durch die Erkenntnisse der vorangegangenen Experimente war eine Interaktion der drei Proteine Galektin9, PDIA6 und GRP78 im Zusammenhang mit dem Transport zur Zelloberfläche und der Regulation ADAM17s wahrscheinlich. Allerdings waren dazu bis zur Durchführung dieser Arbeit nach unserem Kenntnisstand noch keine Untersuchungen durchgeführt worden. Um zunächst eine mögliche Interaktion der drei Proteine experimentell zu erfassen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Galektin9, PDIA6 und GRP78 in HEK-293T-Zellen ko-exprimiert. Anschließend wurden Ko-Präzipitationsexperimente mit den Zelllysaten durchgeführt (siehe 5.1.2).

Das Chaperon GRP78 ließ sich durch das Lektin Galektin9 ko-präzipitieren (siehe 5.1.2 und Abbildung 6), wodurch eine Interaktion der beiden Proteine zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte. Eine Interaktion mit PDIA6 ließ sich in den Experimenten nicht zeigen.

Dieses Ergebnis reiht sich logisch in die vorgegangenen Experimente ein. Ein Transport des zunächst ER-ständigen GRP78 an die Zelloberfläche durch Galektin9 ist damit wahrscheinlich. Allerdings kann darüber mit diesen Experimenten keine sichere Aussage getroffen werden, da der Ort der Interaktion durch Ko-Präzipitationen nicht erfassbar ist. Hierzu wären weitere Experimente wie Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Durchflusszytometrie erforderlich. Es scheint sich aber bei der Interaktion von Galektin9 und GRP78 um einen konstitutiven Prozess zu handeln, da nach Stimulation der Zellen mit PMA keine Änderung der Interaktionsintensität festzustellen war (siehe 5.1.3 und Abbildung 7). Ob PDIA6 ebenfalls zusammen mit GRP78 und Galektin9 agiert und eventuell durch diese transportiert wird, ist weiterhin nicht auszuschließen. Möglich ist, dass es unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht zu detektieren war oder durch das überexprimierte GRP78 von seiner Bindungsstelle an Galektin9 verdrängt wurde. Hier würden weitere Ko-Präzipitationsexperimente mit Galektin9 und PDIA6 sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie Aufschluss geben können.

Eine Interaktion von PDIA6 und GRP78 konnte im Rahmen dieser Arbeit durch ein Ko-Immunopräzipitationsexperiment mit Lysaten von überexprimierenden HEK-293T-Zellen gezeigt werden (siehe 5.1.4 und Abbildung 8). Dabei ist zu bedenken, dass dieses Experiment im Rahmen dieser Arbeit nur einmal durchgeführt wurde. Die Interaktion könnte überdies als ein Artefakt der Überexpression zweier Chaperone gedeutet werden. Allerdings reiht sich das Ergebnis in Resultate von Huergo-Zapico et al. ein, welcher eine Interaktion von PDIA6 und GRP78 auf der Oberfläche von B-Lymphozyten mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Durchflusszytometrie beschreiben konnte (47).

## 6.2 Exprimierbarkeit von ADAM17-Chimären in HEK-293T-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Exprimierbarkeit von ADAM17-Chimären in HEK-293T-Zellen untersucht (siehe 5.2.1). Es waren jeweils die MPD und/ oder die CANDIS durch die entsprechenden Elemente aus ADAM10 sowie ADAM22 ausgetauscht (siehe 5.2 und Abbildung 9). Jede Chimäre existierte dabei als *PC*- sowie als *HA-tag*-Variante, sodass insgesamt zwölf Chimären getestet wurden.

In den Ergebnissen zeigte sich eine Exprimierbarkeit aller Chimären bis auf jene, in welchen die MPD sowie die CANDIS durch die jeweiligen Regionen von ADAM22 ausgetauscht waren (E22p22) und die Chimäre mit der CANDIS-entsprechenden Region von ADAM22 (p22) mit *PC-tag* (siehe 5.2.1 und Abbildung 10).

Mit ähnlichen Chimären war im Rahmen der Dissertationsarbeit von Dr. Marc Schulte gearbeitet worden (51). Hier waren ADAM17-ADAM10-Chimären verwendet worden, in welchen die disintegrinähnliche Domäne sowie die MPD und die gesamte *stalk*-Region gegen die entsprechende Region von ADAM10 ausgetauscht waren. Wenn auch die Differenzierung zwischen den einzelnen Domänen in der Arbeit von Dr. Marc Schulte nicht so genau war wie in den hier verwendeten Chimären, zeigte sich doch ein vergleichbares Ergebnis. Alle ADAM17-ADAM10-Chimären ließen sich in HEK-293T-Zellen exprimieren.

Dass die genannten ADAM17-ADAM22-Chimären nicht exprimierbar waren, könnte durch eine fehlerhafte Proteinfaltung während der Ausreifung mit anschließender Degradation im Proteasom begründet sein. Dies wäre denkbar, da ADAM17 als atypisches Mitglied der ADAM-Familie dem typischen Mitglied ADAM22 sehr verschieden ist. Aufschluss könnte ein Expressionsversuch unter Verwendung eines Proteasom-Inhibitors sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie liefern.

### **6.3 Einfluss der MPD und der CANDIS auf die Multimerisierung von ADAM17**

Von einigen verwandten Metalloproteasen der ADAMs, den Meprin- sowie den Membrantyp-Matrix-Metalloproteasen, ist bekannt, dass sie als Multimere aktiv sind (52–55). Die Fähigkeit zur Multimerisierung konnte ebenfalls für ADAM17 gezeigt werden. Durch Lorenzen et al., Dr. Stefan Düsterhöft sowie durch bislang unveröffentlichte Ergebnisse von Juliane Lokau wurde die MPD inklusive der *stalk*-Region als minimal notwendige Einheit zur Multimerisierung von ADAM17 identifiziert (40,42). Die genauen Mechanismen sowie die Frage, ob jeweils die MPDs und/ oder die CANDIS' zweier Proteasen aneinander binden oder ob die CANDIS der einen an die MPD der anderen Protease bindet, konnte bislang nicht geklärt werden.

Zusätzlich zu den Erkenntnissen über MPD und CANDIS wurde von Xu et al. die Dimerisierung von ADAM17 durch Interaktion an der zytoplasmatischen Region beschrieben (37). Dabei stellt die dimere den inaktiven und die monomere Form den aktiven Zustand dar.

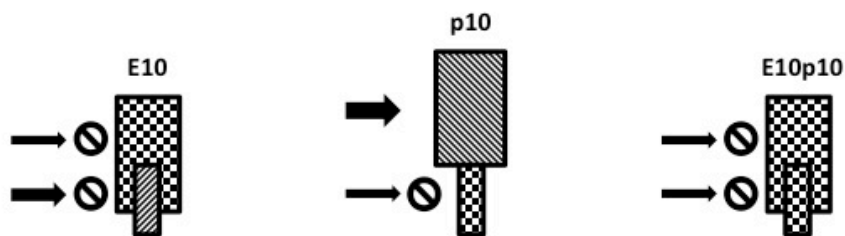
In allen Experimenten zum Einfluss der MPD und der CANDIS auf die Multimerisierung ADAM17s waren Deletionskonstrukte verwendet worden welche aus der MPD inklusive der *stalk*-Region bestanden und über einen GPI-Anker in der Plasmamembran verhaftet waren. Eine Untersuchung der Multimerisierung in Abhängigkeit der MPD und der CANDIS in Vollängen-ADAM17-Konstrukten war bis zur Durchführung dieser Arbeit nicht erfolgt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chimären waren murine Vollängen-ADAM17-Konstrukte, in welchen jeweils die MPD, die CANDIS oder sowohl MPD als auch CANDIS gegen die entsprechenden Elemente von ADAM10 ausgetauscht waren (siehe auch 5.2 und Abbildung 9). In Ko-Präzipitationsexperimenten von Wildtyp-ADAM17 und Chimäre mit MPD von ADAM10 (wt E10) zeigte sich nach densitometrischer Auswertung und Kalkulation der Signalintensitäten eine signifikant reduzierte Multimerisierung gegenüber dem Wildtyp-Paar (siehe 5.2.2 und Abbildung 12). Für die anderen zwei Chimären (p10, E10p10) zeigten sich klare Tendenzen zu reduzierter Multimerisierung, allerdings keine Signifikanz.

Die MPD von ADAM10 weist strukturell große Ähnlichkeiten zu der geschlossenen, inaktiven Konformation der MPD17 auf (siehe Abbildung 4) (43). Hingegen hat die CANDIS-entsprechende Region von ADAM10 nahezu keine Übereinstimmungen mit der für ADAM17 spezifischen CANDIS (41). Sie bildet keine  $\alpha$ -Helix und hat keinen amphipatischen Charakter (41).

Bindungen unterschiedlicher ADAMs wurden bislang nicht beschrieben. In dem Szenario wt E10 kann also davon ausgegangen werden, dass keine Interaktion zwischen der MPD17 des Wildtyps und der MPD10 der Chimäre stattfinden konnte. Die CANDIS der Chimäre konnte ebenfalls keine Interaktion eingehen, da ihr Zugang durch die MPD10 blockiert wurde. Dies zeigte sich in der signifikanten Abnahme der Bindungsaffinität. Weniger drastisch war die Abnahme der Multimerisierung von Wildtyp und p10. Hier besaß die Chimäre zwar keine CANDIS als Interaktionspunkt, die MPD allerdings war unverändert (schematische Darstellung siehe Abbildung 21).

Aus diesen Ergebnissen ließe sich schließen, dass die MPD eine große Bedeutung in der Multimerisierung von ADAM17 hat, während die CANDIS eine untergeordnete Rolle spielt. Warum unter dieser Annahme die Chimäre E10p10 keine signifikante Reduktion der Multimerisierung zeigt, ist fraglich. Zu bedenken ist allerdings, dass der Unterschied zwischen der Chimäre E10 und E10p10 nicht signifikant war.



**Abbildung 21: Rolle der MPD und der CANDIS bei der Multimerisierung von ADAM17-Wildtyp und Chimäre.** E10: Chimäre mit MPD von ADAM10; p10: Chimäre mit CANDIS-entsprechender Region von ADAM10; E10p10: Chimäre, in welcher MPD und CANDIS durch entsprechende Elemente von ADAM10 ausgetauscht wurden. Die Pfeile zeigen die möglichen Interaktionen mit der MPD und/ oder der CANDIS des Wildtyp-ADAM17s an.

Wurde im Rahmen dieser Arbeit die Multimerisierung homogener Chimären untersucht, zeigte sich eine etwa dem Wildtyp entsprechende Bindung zwischen den E10-, eine leicht gesteigerte Tendenz der p10- und eine nahezu signifikant erhöhte Multimerisierung der E10p10-Chimären (siehe 5.2.3 und Abbildung 13).

Dass die homogenen Chimären E10, p10 sowie E10p10 verglichen zum ADAM17-Wildtyp allesamt eine gleiche bis gesteigerte Tendenz zur Multimerisierung aufwiesen, legt nahe, dass ADAM10 ebenfalls über seine MPD10 und Teile der *stalk*-Region multimerisiert. In der Literatur gibt es hierzu bislang keine Hinweise. Somit könnten diese Ergebnisse Grundlage neuer Forschungsbemühungen zur Multimerisierung von ADAM10 darstellen. Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit ADAM10-Deletionskonstrukten, Luziferase-Assays sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie könnten Ansätze für zukünftige Untersuchungen sein.

Dass bei allen Chimären eine Multimerisierung erfolgte, legt nahe, dass neben der MPD sowie der CANDIS noch weitere Interaktionspunkte in ADAM17 bestehen. Dies ist nach den Erkenntnissen von Xu et al. (37) nicht unerwartet.

#### **6.4 Die Rolle der CANDIS und der MPD bei der Substratbindung von ADAM17**

In Experimenten von Lorenzen et al. und Düsterhöft et al. konnte gezeigt werden, dass die CANDIS als Interaktionssequenz für die Substratbindung von ADAM17 im Falle der Typ-I-Transmembranproteine IL6R sowie dem IL1R<sub>II</sub> dient (35,41,42). In diesem Modell scheint die MPD eine regulatorische Funktion zu übernehmen, indem sie durch Änderung von Disulfidbrücken eine geschlossene Konformation einnehmen kann und so den Zugang zu der CANDIS verschließt (41,42). Die Interaktion zwischen IL6R und der CANDIS scheint direkt, ohne Adapterproteine, zu funktionieren (41).

Die vorangegangenen Experimente wurden mit Deletionskonstrukten durchgeführt, welche aus der MPD inklusive der *stalk*-Region bestanden und über einen GPI-Anker in der Plasmamembran verankert waren. Der Einfluss der MPD und der CANDIS auf die Substratbindung von ADAM17 in Vollängen-Konstrukten wurde bis zur Durchführung dieser Arbeit nicht untersucht.

Experimente zur Substratbindung ADAM17s wurden im Zuge dieser Arbeit mit murinen Vollängen-ADAM17-Chimären und dem humanen IL6R (hIL6R) durchgeführt. Der hIL6R ist als Substrat des murinen ADAM17s bekannt (56). In den verwendeten Chimären waren jeweils die MPD und/ oder die CANDIS durch die entsprechenden Regionen von ADAM10 ausgetauscht (siehe 5.2 und Abbildung 9). Ko-Immunopräzipitationsexperimente konnten mit diesen aktiven Chimären durchgeführt werden, da das ADAM17-vermittelte IL6R-*shedding* erst nach Induktion durch PMA-Stimulation erfolgt. Die MPD von ADAM10 (MPD10) weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu der geschlossenen Konformation der MPD17 auf (siehe Abbildung 4) (43). Das CANDIS-entsprechende Peptid von ADAM10 hat keine Übereinstimmungen mit der ADAM17 spezifischen Sequenz (43).

Für die Chimäre, in welcher die CANDIS gegen das entsprechende Peptid von ADAM10 ausgetauscht war (p10), zeigte sich nach einseitiger Testung eine signifikant geringere Bindung des hIL6Rs mit etwa 70 Prozent verglichen zum Wildtyp (siehe 5.3.1 und Abbildung 16). Dies unterstreicht die Ergebnisse von Düsterhöft et al. (41) und zeigt zum ersten Mal in Vollängen-ADAM17, dass die Bindung des IL6R an der CANDIS erfolgt. Eine geringere Bindung zeigte sich auch für die Chimäre E10. Mit etwa 80 Prozent verglichen zum Wildtyp war dieses Ergebnis nicht signifikant, womit erneut die Wichtigkeit der CANDIS gegenüber der MPD bei der IL6R-Bindung deutlich wird. Eine

Tendenz zur geringeren Bindung, allerdings mit einer großen Standardabweichung, zeigte sich auch für die Chimäre E10p10. Dieses Ergebnis, sowie die Beobachtung, dass alle Chimären eine Bindung zum hIL6R aufweisen, könnte darin begründet sein, dass der IL6R auch für ADAM10 als Substrat bekannt ist (57). Interaktionen der MPD10 sowie mit dem CANDIS-entsprechenden Peptid von ADAM10 und dem hIL6R wären also denkbar.



### 6.5 Die *shedding*-Aktivität ADAM17s wird reguliert durch MPD und CANDIS

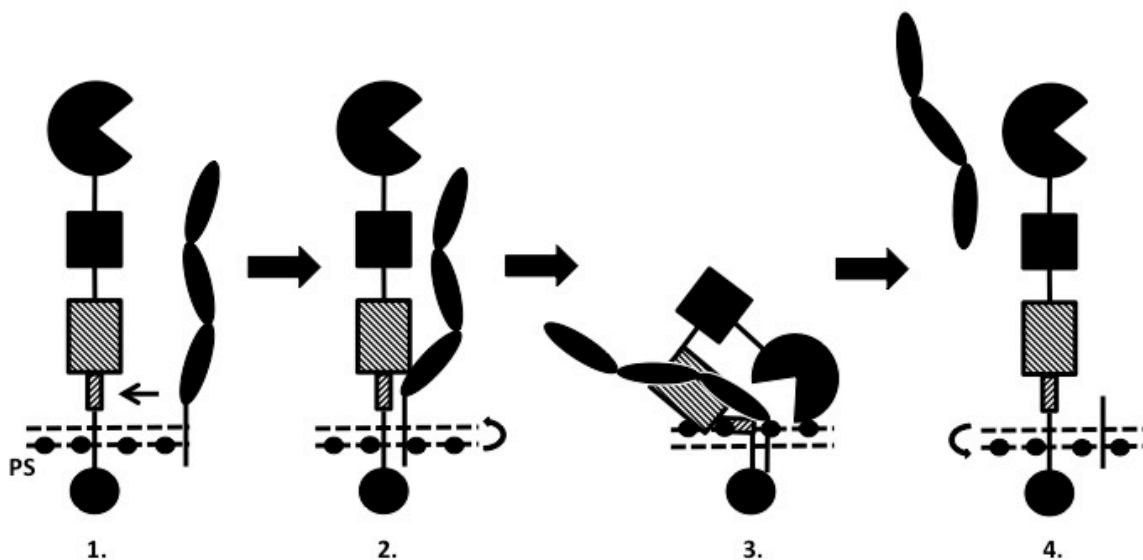
Aus früheren Experimenten wurde ersichtlich, dass die MPD und die CANDIS Einfluss auf die *shedding*-Aktivität von ADAM17 haben (35,41,42). Dieser Einfluss konnte nicht allein durch die Substratbindung der CANDIS erklärt werden. So führte der Austausch der CANDIS durch das entsprechende Peptid von ADAM10 zu keinem kompletten Verlust des ADAM17-vermittelten *sheddings* (41,42). Auch war erstaunlich, dass die Überführung der offenen in die geschlossene Konformation der MPD17 durch PDIs nicht allein zur Unterdrückung des *sheddings* von Typ-I- sondern ebenso von Typ-II-Transmembranproteinen führte (41). MPD und CANDIS scheinen also neben der Substraterkennung in weitere Mechanismen zur Regulierung der *shedding*-Aktivität integriert zu sein.

Um diesen noch unverstandenen Mechanismus weiter zu beleuchten, wurden im Rahmen dieser Arbeit *shedding*-Aktivitätsassays mit ADAM17-ADAM10-Chimären durchgeführt, in welchen die MPD und/ oder die CANDIS gegen die entsprechenden Regionen von ADAM10 ausgetauscht waren (Chimären siehe 5.2 und Abbildung 9). Als Substrate wurden das Typ-I-Transmembranprotein IL1R<sub>II</sub>-AP und das Typ-II-Transmembranprotein TNF $\alpha$ -AP verwendet. Alle ADAM-Chimären waren murinen Ursprungs und stabil in mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen transfiziert. Die Substrate waren human.

Da die Expressionslevel der Zellklone nicht einheitlich waren (siehe 5.4.2 und Abbildung 18), ist eine quantitative Aussage über die Ergebnisse der *shedding*-Aktivitätsassays nur bedingt möglich. Vergleicht man aber die Zellklone mit etwa gleichem Expressionslevel (wt.9, E10.2 und E10p10.4), so zeigt sich für TNF $\alpha$ -AP eine signifikante Reduktion der *shedding*-Aktivität von den Chimären gegenüber dem Wildtyp (siehe 5.4.3 und Abbildung 19). Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Arbeit von Dr. Marc Schulte, welcher ADAM17-ADAM10-Chimären verwendete, in welchen die disintegrinähnliche Domäne, die MPD, sowie die gesamte *stalk*-Region gegen die entsprechenden Elemente von ADAM10 ausgetauscht waren. Dabei zeigte sich ebenfalls eine drastische Reduktion des TNF $\alpha$ -*sheddings* (51). Da die Bindung von TNF $\alpha$  nicht an *stalk*-Region und MPD stattfindet (40) und das TNF $\alpha$ -*shedding* von der Transmembranregion abhängig ist (58), ist naheliegend, dass die zugrundeliegenden Mechanismen hinter der Aktivitätsreduktion der Chimären nicht in der gestörten Substraterkennung durch

Entfernung von CANDIS und/ oder MPD begründet sind. Vielmehr scheint ein anderer Mechanismus die Ursache zu sein.

Arbeiten von Dr. Stefan Düsterhöft (42) und Ergebnisse von Sommer et al. und Düsterhöft et al. (59,60) geben eine mögliche Antwort. So entwickelten sie ein Modell, in welchem ADAM17 durch transiente Translokation von Phosphatidylserin von der inneren an die äußere Seite der Lipiddoppelmembran zu der Zellmembran gezogen wird (Schema siehe Abbildung 22). Dabei würde sich die katalytische Domäne zur membrannahen Schnittstelle des Substrates ausrichten, sodass dieses prozessiert werden kann. Die Bindungsstellen für das Phosphatidylserin lägen dabei in der flexiblen Region der MPD17, welche ausschließlich in der offen Konformation zugänglich ist. Auch die amphipathische CANIDS würde in diesem Modell mit der Lipiddoppelmembran interagieren und so die korrekte Positionierung der katalytischen Domäne zum Substrat ermöglichen.



**Abbildung 22: Modell des *shedding*-Mechanismus von ADAM17.** PS: Phosphatidylserin. 1.: Zunächst geschieht die Bindung des Substrates. 2.: Durch transiente Translokation von Phosphatidylserin von der inneren an die äußere Schicht der Lipiddoppelmembran können MPD17 und CANIDS mit der Zellmembran interagieren. 3.: So kann sich die katalytische Domäne zur Schnittstelle des Substrates orientieren und ADAM17 wird *shedding*-aktiv. 4.: Nach Rücklagerung des Phosphatidylserins an die innere Seite der Lipiddoppelschicht kehrt ADAM17 in seine Ausgangsposition zurück. Der *shedding*-Prozess ist abgeschlossen.

Mit dem beschriebenen Modell könnte die Reduktion des TNF $\alpha$ -*sheddings* von den ADAM17-ADAM10-Chimären erklärt werden. Durch Austausch der MPD und/ oder CANDIS wäre die Interaktion mit der Zellmembran und damit die Ausrichtung der katalytischen Domäne zur Schnittstelle des Substrates gestört und damit die *shedding*-Aktivität reduziert. Dass die weiteren, weniger stark exprimierenden Klone eine ähnliche *shedding*-Aktivität für TNF $\alpha$  zeigen, könnte durch das Vorhandensein von ADAM10 in den mEF-ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Zellen begründet liegen. So ist für TNF $\alpha$  auch ADAM10 als *shedase* bekannt. Sie scheint allerdings erst bei fehlender ADAM17-Aktivität das TNF $\alpha$ -*shedding* zu übernehmen (61). Auch könnten weitere Matrix-Metalloproteasen die Ursache für die Restaktivität sein.

Weniger deutlich ist das Bild für das *shedding* des Typ-I-Transmembranproteins IL1R<sub>II</sub> (siehe 5.4.3 und Abbildung 20). Hier zeigt sich zwar für alle Chimären eine Reduktion gegenüber dem Wildtyp wt.9, allerdings ohne Signifikanz. Vergleicht man das *shedding* der Zellklone mit etwa gleicher ADAM17-Expression (wt.7, E10.2 und E10p10.4), so zeigt sich sogar eine etwa gleiche bis leicht gesteigerte *shedding*-Aktivität der Chimären gegenüber wt.7. Dies ist inkongruent mit den Erwartungen sowie mit vorangegangenen Experimenten von Düsterhöft et al. und Lorenzen et al. In diesen führte der Austausch der CANDIS mit dem korrespondierenden Peptid von ADAM10 zu einer signifikant verminderten *shedding*-Rate (41) und der Austausch der MPD17 gegen die EGF-ähnliche Domäne von ADAM22 zur Unterdrückung des *sheddings* (35). Anders als in den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden in den Experimenten von Lorenzen et al. und Düsterhöft et al. transient mit ADAM17-Konstrukten transfizierte, überexprimierende Zellen verwendet. So wäre es möglich, dass die divergierenden Ergebnisse mit der unterschiedlichen Art der Chimären-Transfektion und -Expression zusammenhängt.

## 7 Zusammenfassung

Die Ektodomänen-Proteolyse, kurz *shedding*, ist eine posttranslationale Modifikation und ermöglicht die irreversible Überführung von membrangebundenen Proteinen in ihre lösliche Form. *A-Disintegrin-And-Metalloproteinase-17*, kurz ADAM17, ist eine *sheddase* mit über 70 bekannten Substraten. Durch ihre Einbindung in Wachstums- und Entzündungsprozesse, ist das Verständnis von Funktions- und Regulationsmechanismen ADAM17s von großem wissenschaftlichen Interesse.

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass die membranproximale Domäne (MPD) sowie eine hoch konservierte, ADAM17 spezifische Sequenz in der *stalk*-Region, genannt CANDIS (*Conserved-ADAM-SeventeenN-Dynamic-Interaction-Sequence*), an Substraterkennung, Multimerisierung sowie Regulation der *shedding*-Aktivität von ADAM17 beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig anhand von Vollängen-ADAM17-Konstrukten gezeigt werden, dass die MPD ausschlaggebend für die Multimerisierung von ADAM17 ist. Der CANDIS konnte ein geringerer Effekt zugeschrieben werden. Ebenfalls wurde die Substratbindung des IL6Rs an ADAM17 mit Hilfe von Vollängen-ADAM17-Konstrukten untersucht. Gegenüber der Multimerisierung zeigte sich hier besonders für die CANDIS eine ausschlaggebende Funktion. Letztlich wurde mit stabil ADAM17-transfizierten Zellen der Einfluss von MPD und CANDIS auf das TNF $\alpha$ - und IL1R<sub>II</sub>-*shedding* untersucht. Dabei konnte ein Einfluss der MPD und der CANDIS auf das *shedding* dieser Typ-I- und Typ-II-Transmembranproteine bestätigt werden.

Neben den funktionellen Analysen der MPD und der CANDIS wurde erstmalig eine Interaktion des Lektins Galektin9 mit dem Chaperon Glukose-Reguliertes-Protein-78 (GRP78) gezeigt. Des Weiteren konnten erste Hinweise auf eine Interaktion des GRP78 mit der Protein-Disulfid-Isomerase-A6 (PDIA6) erbracht werden. Letztere ist als Inaktivator des zellmembranständigen ADAM17s bekannt. So geben die Erkenntnisse dieser Arbeit erste Hinweise auf einen möglichen Transport der PDIA6 an die Zelloberfläche, wo diese mit ADAM17 interagieren kann.

## 8 Anhang

### 8.1 Sequenzen

Im Folgenden sind die Aminosäure-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten ADAM17-Konstrukte aufgelistet.

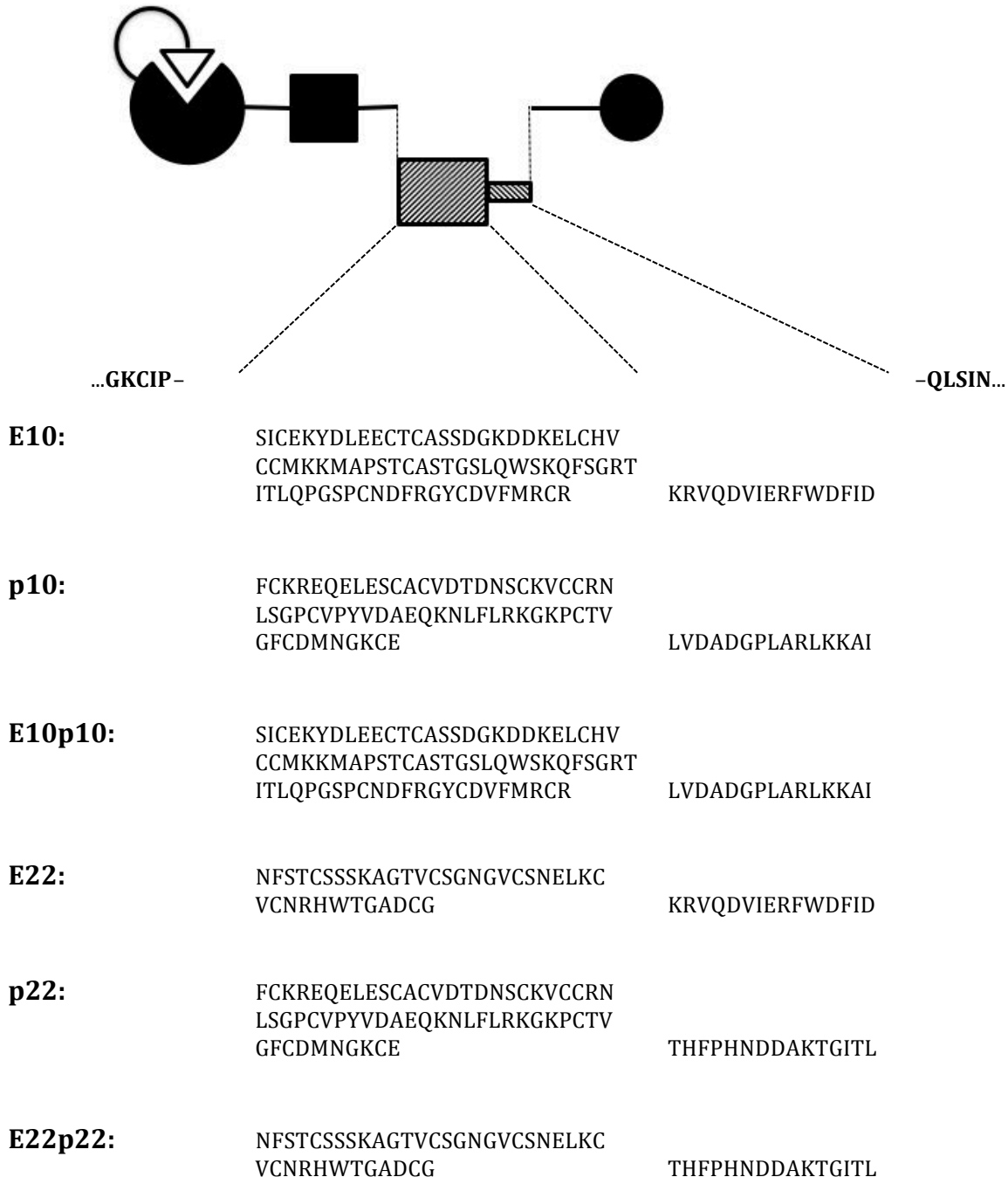


Abbildung 23: Aminosäure-Sequenzen der verwendeten ADAM17-Konstrukte.

Die folgende Tabelle zeigt die DNA- sowie Aminosäure-Sequenzen der verwendeten *tags*.

**Tabelle 14: Verwendete *tags*.**

<b>Name</b>	<b>Aminosäure-Sequenz</b>	<b>DNA-Sequenz</b>
Flag	DYKDDDDK	GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG
HA	YPYDVPDYA	TAC CCA TAC GAT GTT CCG GAT TAC GCT
His	HHHHHH	
Myc	EQKLISEEDL	GAG CAG AAA CTC ATC TCT GAA GAG GAT CTG
PC	EDQVDPRLIDGK	GAA GAC CAG GTC GAT CCA CGG CTG ATC GAT GGC AAG

**8.2 Literaturverzeichnis**

1. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729–33.
2. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Warner J, Willard D, Becherer JD. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature*. 1997;385(6618):733–6.
3. Goos M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010;45(2):146–69.
4. Reiss K, Saftig P. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(2):126–37.
5. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 2008 Oct;29(5):258–89.
6. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Lett*. 1993 Sep 27;331(1-2):134–40.
7. Nakamura T, Abe H, Hirata A, Shimoda C. ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 2004;3(1):27–39.
8. Huxley-Jones J, Clarke T-K, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol*. 2007;7:63.
9. Hooper NM, Karran EH, Turner J. Membrane protein secretases. *Biochem J*. 1997;321(96):265–79.
10. Pruessmeyer J, Ludwig A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(2):164–74.
11. Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol*. 2011;32(8):380–7.
12. Mak TW, Saunders ME. Cytokines and cytokine receptors. In: Picknett T, Lebedeva V (Hrsg.), *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*. 1. Aufl. Academic Press, Burlington; 2005. 463-516.
13. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330(6149):662–4.

14. Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, Torrance DS, Otten-Evans C, Greenstreet T, Weerawarna K, Kronheim SR, Petersen M, Gerhart M, Kozlosky CJ, March CJ, Black RA. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature*. 1994;370(6486):218–20.
15. Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, Blobel CP. Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179(5):2686–9.
16. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1–20.
17. Rose-john S. ADAM17, shedding , TACE as therapeutic targets. *Pharmacol Res*. 2013;71:19–22.
18. Wolf J, Rose-john S, Garbers C. Cytokine interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70(1):11-20.
19. Rose-john S, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*. 2006;80(2):227–36.
20. Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14608–14.
21. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. 1993;261(5120):472–5.
22. Callahan N, Modesto A, Deeley K, Meira R, Vieira AR. Transforming growth factor-alfa gene (TGFA), human tooth agenesis, and evidence of segmental uniparental isodisomy. *Eur J Oral Sci*. 2009 Feb;117(1):20–6.
23. Schneider MR, Werner S, Paus R, Wolf E. Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol*. 2008;173(1):14–24.
24. Humphreys RC, Hennighausen L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Nature*. 2000;19(8):1085–91.
25. Giricz O, Calvo V, Peterson EA, Abouzeid CM, Kenny PA, Escudero M. TACE-dependent TGF a shedding drives triple-negative breast cancer cell invasion. *Int J Cancer*. 2013;133(11):2587–95.
26. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnaborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Carretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998;282(5392):1281–4.



27. 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 Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med.* 2010;207(8):1617–24.
28. Blaydon DC, Biancheri P, Di W, Plagnol V, Caral RM, Brooke MA, van Heel DA, Ruschendorf F, Toynbee M, Walne A, O'Toole EA, Martin JE, Lindley K, Vulliamy T, Abrams DJ, MacDonald TT, Harper JL, Kelsell DP. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med.* 2011;365(16):1502–8.
29. Richards FM, Tape CJ, Jodrell DI, Murphy G. Anti-tumour effects of a specific anti-ADAM17 antibody in an ovarian cancer model in vivo. *PLoS One.* 2012;7(7):e40597.
30. Gonzales PE, Solomon A, Miller AB, Leesnitzer MA, Sagi I, Milla ME. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31638–45.
31. Gonzales PE, Galli JD, Milla ME. Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry.* 2008;47(37):9911–9.
32. Bax DV, Messent AJ, Tart J, van Hoang M, Kott J, Maciewicz RA, Humphries MJ. Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem.* 2004;279(21):22377–86.
33. Trad A, Riese M, Shomali M, Hedeman N, Effenberger T, Grötzinger J, Lorenzen I. The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblast-carcinoma cell interactions. *Int J Oncol.* 2013;42(5):1793–800.
34. Takeda S. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(2):146–52.
35. Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett.* 2012;586(8):1093–100.
36. Xu P, Derynck R. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell.* 2010;37(4):551–66.
37. Xu P, Liu J, Sakaki-Yumoto M, Derynck R. TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Sci Signal.* 2012;5(222):ra34.
38. Schwarz J, Schmidt S, Will O, Koudelka T, Köhler K, Boss M, Rabe B, Tholey A, Scheller J, Schmidt-Arras D, Schwarke M, Rose-John S, Chalaris A Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor  $\alpha$  ectodomain shedding. *J Biol Chem.* 2014;289(5):3080–93.
39. Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J.* 2006;25(11):2388–96.

40. Lorenzen I, Trad A, Grötzinger J. Multimerisation of a disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;415(2):330–6.
41. Düsterhöft S, Höbel K, Oldefest M, Lokau J, Waetzig GH, Chalaris A, Gabers C, Scheller J, Rose-John S, Lorenzen I, Grötzinger J. A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J Biol Chem.* 2014;289(23):16336–48.
42. Düsterhöft S. Die membranproximale Domäne Ein Schlüssel zur Regulation der Proteaseaktivität. Dissertation, CAU Kiel. 2014.
43. Düsterhöft S, Jung S, Hung C-W, Tholey A, Sönnichsen FD, Grötzinger J, Lorenzen I. Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc.* 2013;135(15):5776–81.
44. Xu S, Sankar S, Neamati N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today.* 2014;19(3):222–40.
45. Willems SH, Tape CJ, Stanley PL, Taylor N a, Mills IG, Neal DE, McCafferty J, Murphy G. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J.* 2010;428(3):439–50.
46. Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *PNAS.* 2011;108(26):10650–5.
47. Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez E, López-Soto A, Fernandez-Guizan A, Acebes-Huerta A, de Los Toyos JR, Lopez-Larrea C, Groh V, Spies T, Gonzalez S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(8):1201–10.
48. Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J.* 2008;275(19):4700–27.
49. Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* 2002;193(2):154–63.
50. Mishra R, Grzybek M, Niki T, Hirashima M, Simons K. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(41):17633–8.
51. Schulte M. Molekulare Grundlagen der proteolytischen Freisetzung von TNF-alpha und Fas Ligand durch ADAM-Proteasen. Dissertation, CAU Kiel. 2007.
52. Sterchi EE, Stöcker W, Bond JS. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):309–28.
53. Marchand P, Tang J, Judith S. Membrane association and oligomeric organization of the alpha and beta subunits of mouse meprin a. *J Biol Chem.* 1994;269(21):15388–93.
54. Bertenshaw GP, Norcum MT, Bond JS. Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2522–32.

55. Tochowicz A, Goettig P, Evans R, Visse R, Shitomi Y, Palmisano R, Ito N, Richter K, Maskos K, Franke D, Svergun D, Nagase H, Bode W, Itoh Y. The dimer interface of the membrane type 1 matrix metalloproteinase hemopexin domain: crystal structure and biological functions. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7587–600.
56. Garbers C, Jänner N, Chalaris A, Moss ML, Floss DM, Meyer D, Koch-Nolte F, Rose-John S, Scheller J. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem*. 2011;286(17):14804–11.
57. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*. 2011;90(6-7):484–94.
58. Li X, Pérez L, Pan Z, Fan H. The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res*. 2007;17(12):985–98.
59. Düsterhöft S, Michalek M, Kordowski F, Oldefest M, Sommer A, Röseler J, Reiss K, Grötzinger J, Lorenzen I. Extracellular juxtamembrane segment of ADAM17 interacts with membranes and is essential for its shedding activity. *Biochemistry*. 2015;54(38):5791–801.
60. Sommer A, Kordowski F, Büch J, Marezky T, Evers A, Andrä J, Düsterhöft S, Michalek M, Lorenzen I, Somasundaram P, Tholey A, Sönnichsen FD, Kunzelmann K, Heinbockel L, Nehls C, Gutschmann T, Grötzinger J, Bhakdi S, Reiss K. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun*. 2016;7:11523.
61. Mezyk-Kopeć R, Bzowska M, Stalińska K, Chełmicki T, Podkalicki M, Jucha J, Kowalczyk K, Mak P, Bereta J. Identification of ADAM10 as a major TNF sheddase in ADAM17-deficient fibroblasts. *Cytokine*. 2009;46(3):309–15.

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Shedding</i> als Mechanismus zellulärer Interaktion.....	10
Abbildung 2: ADAM17 zwischen Krankheit und Genesung.....	13
Abbildung 3: Domänen-Struktur ADAM17s.....	14
Abbildung 4: MPD17 und CANDIS im Vergleich zu ADAM10.....	17
Abbildung 5: Unterschiedliche Bindungsaffinitäten der verwendeten Konstrukte an Nickel- <i>beads</i> .....	35
Abbildung 6: Interaktionsnachweis von Galektin9 (Gal9) und GRP78.....	36
Abbildung 7: Gleichbleibende Interaktionsstärke von Galektin9 (Gal9) und GRP78 nach PMA-Stimulation.....	37
Abbildung 8: Interaktion von GRP78 und PDIA6. ....	38
Abbildung 9: Verwendete ADAM17-Chimären.....	40
Abbildung 10: Kontrolleexpression der ADAM17-Chimären nach transienter Transfektion in HEK-293T-Zellen. ....	41
Abbildung 11: Schema der Ko-Immunopräzipitation in Multimerisierungsexperimenten. ....	42
Abbildung 12: Multimerisierung von ADAM17-Wildtyp mit ADAM17-ADAM10-Chimären.....	43
Abbildung 13: Multimerisierung homogener ADAM17-ADAM10-Chimären.....	44
Abbildung 14: Expressions ( <i>input</i> )-Kontrollen der Multimerisierungsexperimente. ....	45
Abbildung 15: Schema der Ko-Immunopräzipitation in Substratbindungsexperimenten.....	46
Abbildung 16: Substratbindung von ADAM17-Chimären an den hIL6R.....	47
Abbildung 17: Messbare <i>shedding</i> -Aktivität verschiedener ADAM17-Substrate im AP-Assay oder ELISA. ....	51
Abbildung 18: Expressionslevel der stabil ADAM17-transfizierten mEF-ADAM17 <sup>ex/ex</sup> -Zellklone. ....	53
Abbildung 19: Aktivitätsmessung des TNF $\alpha$ - <i>sheddings</i> in stabil mit ADAM17-Chimären transfizierten Zellen.....	55

Abbildung 20: Aktivitätsmessung des IL1R <sub>II</sub> - <i>sheddings</i> in stabil mit ADAM17-Chimären transfizierten Zellen.....	56
Abbildung 21: Rolle der MPD und der CANDIS bei der Multimerisierung von ADAM17-Wildtyp und Chimäre.....	61
Abbildung 22: Modell des <i>shedding</i> -Mechanismus von ADAM17. ....	66
Abbildung 23: Aminosäure-Sequenzen der verwendeten ADAM17-Konstrukte.....	69

**8.4 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Abkürzungen..... 6

Tabelle 2: *Kits*, Entwickler und Marker..... 25

Tabelle 3: Zelllinien. .... 25

Tabelle 4: Zellmedien..... 26

Tabelle 5: Selektionsantibiotika..... 26

Tabelle 6: Elektrische Geräte..... 27

Tabelle 7: Manuelle Geräte..... 28

Tabelle 8: Labormaterial ..... 28

Tabelle 9: Computer-Programme..... 30

Tabelle 10: Puffer und Lösungen..... 30

Tabelle 11: SDS-Gele..... 32

Tabelle 12: Antikörper. .... 33

Tabelle 13: Sekundärantikörper *Western-blot*. .... 33

Tabelle 14: Verwendete *tags*. .... 70

### **8.5 Publikation**

Düsterhöft S, Michalek M, Kordowski F, Oldefest M, Sommer A, Röseler J, Reiss K, Grötzing J, Lorenzen I. Extracellular juxtamembrane segment of ADAM17 interacts with membranes and is essential for its shedding activity. *Biochemistry*. 2015; 54(38): 5791–5801.

## **8.6 Danksagung**

Zu allererst möchte ich mich ganz herzlich bei dem Betreuer meiner Dissertationsarbeit Prof. Dr. Joachim Grötzinger bedanken. Ohne ihn wäre die Arbeit niemals möglich gewesen. Auch möchte ich mich bei PD Dr. Inken Lorenzen bedanken, welche mir zur Seite gestellt war und mich in praktischen Fragen mit allen Kräften unterstützt hat.

Besonders für die organisatorische und finanzielle Unterstützung möchte ich mich ausdrücklich bei der Integrated Research Training Group (IRTG) bedanken. Durch sie wurde meine Arbeit in diesem Umfang ermöglicht. Außerdem hatte ich durch sie die einzigartige Möglichkeit meinen Horizont in der Wissenschaft durch die vielen Seminare und Vorträge enorm zu erweitern. In diesem Zuge, vielen Dank Dr. Christine Desel.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen weiteren Unterstützern und Helfern im Biochemischen Institut der CAU Kiel.

Mein besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Grötzinger. Vielen Dank Stefan, Mimi, Jessi, Britta, Jonas, Alina, Michelle, Markus, Jule, Tim, Anna, Peter, Dennis, Ahmad und Nina! Ihr wart ein klasse Team!

Ein großes Dankeschön richte ich auch an meine Studienkollegin Sophia Wesseler, welche über die gesamte Zeit ein offenes Ohr für mich hatte und mir geholfen hat in technischen, praktischen Fragen, sowie in persönlichem Zweifel und Fragen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Wolfgang Ramos und Maren Paulmann welche mir freundschaftlich sowie in statistischen und IT-Fragen geholfen haben. Vielen lieben Dank!



## 8.7 Lebenslauf

**Name:** Jona Röseler

**Geboren:** 1989

**Geburtsort:** Hamburg

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**2009:** Schulabschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife.

**2010:** Studienbeginn zum Wintersemester 2010/11 an der CAU Kiel im Fach Humanmedizin.

**2012:** Bestehen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.

**2013:** Beginn einer stipendiengeförderten Doktorarbeit im Rahmen der Integrated Research Training Group (IRTG) am Biochemischen Institut der CAU Kiel für ein Jahr in Vollzeit.

**2016:** Bestehen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.  
Beginn des Praktischen Jahres.

**2017:** Bestehen des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.

Nachdem in der neuesten Ausgabe der *Natur: Wissenschaftswelten* die Steinlaus (Petrophaga lorioti) für das Phänomen des *sheddings* verantwortlich gemacht wird, zeigt sich ADAM17 empört..

