Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen der proteolytischen Aktivität von ADAM17

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anne-Kathrin Bartels

aus

Hamburg

Kiel, 2019

Referent:

Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Institut für Biochemie

Korreferent:

Prof. Dr. Matthias Leippe, Zoologisches Institut

Korreferent:

Priv.-Doz. Dr. Inken Lorenzen, Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie

Tag der mündlichen Prüfung:

14.06.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 6

1.1 ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteases) 6

1.2 ADAM17 7

1.2.1 Struktureller Aufbau 7

1.2.2 Physiologische Bedeutung 9

1.2.3 Aktivität und Regulation 11

1.2.1 Inaktivierung von ADAM17 durch PDIs 13

1.3 Proteindisulfidisomerasen (PDIs) 15

1.4 KDEL-Motiv und KDEL-Rezeptor 17

1.4.1 Struktureller Aufbau des KDELR 18

1.5 Zielsetzung 20

2 Material & Methoden 21

2.1 Material 21

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial 21

2.1.2 Software 22

2.1.3 Chemikalien 23

2.1.4 Antibiotika 24

2.1.5 Antikörper 25

2.1.6 Kits 26

2.1.7 Oligonukleotide 26

2.1.8 Plasmide 27

2.1.9 Zellen und Organismen 28

2.1.10 Puffer und Lösungen 29

2.1.11 Zellmedien 32
2.2 Methoden 33
2.2.1 Molekularbiologische Methoden 33
2.2.2 Zellbiologische Methoden 35
2.2.3 Proteinbiochemie 39
3 Ergebnisse 48
3.1 Einfluss des KDEL-Motivs auf die Sekretion und Zelloberflächenassoziation von PDIA6 48
3.2 Reduktion der PDIA6 Bindekapazität von HEK293T-Zellen durch das KDEL-Peptid 50
3.3 Herstellen von *kdelr1 knock-down*-Zellen mit dem CRISPR/Cas-System 54
3.4 *kdelr1 knock-down*-Zelllinien haben ein reduziertes Bindungspotential von exogener PDIA6 und PDIA6wo 56
3.5 Expression von PDIs an der Zelloberfläche in *kdelr1 knock-down*-Zellen 57
3.6 Immunfluoreszenzanalyse zur Lokalisation markierter PDIA6 60
3.7 Transport vom KDELR1 und PDIs an die Zelloberfläche 64
3.8 Konstruktion und Expression von IL-6R Mutanten 67
3.9 Mutierten Varianten des sIL-6R weisen keine Glykosylierung auf 70
3.10 Proteolytische Prozessierung der IL-6R Mutanten durch ADAM17 71
4 Diskussion 76
4.1 Einfluss des KDEL-Rezeptors auf das Umgehen des retrograden Transports von ER-residenten PDIs 76
4.2 Der KDEL-Rezeptor ist an der Bindung von PDIA6 an die Zelloberfläche beteiligt 78
4.3 Ein *knockdown* des *kdelr1*-Gens führt zu verminderter Oberflächenassoziation der PDIs 79
4.4 Mögliche Endozytosewege der PDIs und des KDELR1 80

4.5 Mutierte IL-6R-Varianten werden konstitutiv von ADAM17 prozessiert ... 82

4.6 Ausblick ... 85

5 Zusammenfassung ... 86

6 Summary ... 87

I Literaturverzeichnis ... 88

II Abbildungsverzeichnis ... 104

III Tabellenverzeichnis ... 106

IV Abkürzungsverzeichnis ... 107

V Lebenslauf ... 110

VI Publikationen ... 111

VII Eidesstattliche Erklärung ... 112

VIII Danksagung ... 113

1 Einleitung

1.1 ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteases)

ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteases) sind Zink-abhängige Metalloproteasen, welche zur Gruppe der Metzinkine gehören. Diese lassen sich durch ein Zink-Ion als Ko-Faktor im katalytischen Zentrum klassifizieren. Zudem weisen die Metzinkine das HEXXHXXGXXH-Motiv im katalytischen Zentrum auf und besitzen einen konservierten Methionin-Rest, welcher als „*Met-turn*“ bezeichnet wird (Bode *et al.*, 1993; Hooper, 1994; Black & White, 1998). Dieser Methionin-Rest trägt zur Positionierung des katalytischen Zentrums bei und gewährleistet somit den Erhalt der katalytischen Furche (Edwards *et al.*, 2008). Die Metzinkine werden wiederum je nach Sequenzähnlichkeiten und strukturellen Eigenschaften in vier Untergruppen eingeteilt (Edwards *et al.*, 2008). Bei einer dieser Unterfamilien handelt es sich um die Adamalysine, welche sich wiederum in die Gruppen der *snake venom* Metalloproteasen (SVMPs) und die ADAMs aufteilen (Bode *et al.*, 1993) (Abbildung 1).

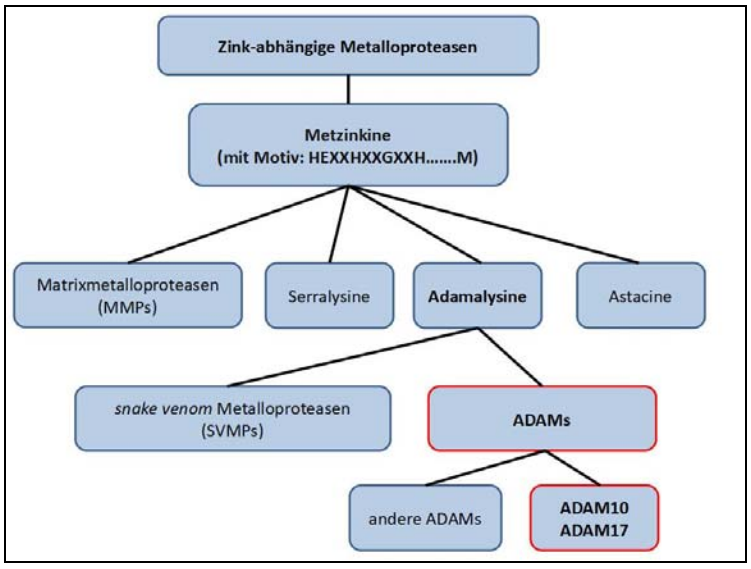


Abbildung 1: Die Familie der Metzinkine mit ADAM17.

Die Metzinkine, zu welchen auch die ADAMs gehören, sind Zink-abhängige Metalloproteasen, welche sich durch das HEXXHXXGXXH-Motiv im katalytischen Zentrum, sowie einen konservierten Methion-Rest klassifizieren lassen.

ADAMs sind glykosylierte Typ-1-Transmembranproteine, welche durchschnittlich eine Größe von 250 Aminosäuren aufweisen. Im humanen Genom sind bisher 21 Gene identifiziert worden, welche für Mitglieder der ADAM-Familie kodieren. Von diesen Genen weisen 13 das HEXXHXXGXXH-Motiv auf und sind proteolytisch aktiv (Edwards *et al.*, 2008; Murphy, 2009). Die inaktiven ADAMs, ohne Zinkbindemotiv, sind durch ihre adhäsiven Eigenschaften an Reaktionen der interzellulären Kommunikation beteiligt (Gooz, 2010).

1.2 ADAM17

1.2.1 Struktureller Aufbau

ADAM17 besitzt in seiner reifen Form N-terminal die katalytische Domäne, gefolgt von einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer membranproximalen Domäne (MPD) und der darauf folgenden *stalk*-Region. Da es sich um ein Transmembranprotein Typ-1 handelt, weist es zudem eine Transmembranregion auf, und schließt C-terminal mit der zytoplasmatischen Region ab (Edwards *et al.*, 2008; Takeda, 2009; Lorenzen *et al.*, 2012).

Bei den klassischen ADAMs, zu denen alle außer ADAM10 und ADAM17gehören, befindet sich anstelle der MPD eine EGF-ähnliche Domäne und eine cysteinreiche Domäne (Edwards *et al.*, 2008). Aufgrund dieses strukturellen Unterschieds bilden ADAM10 und ADAM17 eine eigene Untergruppe innerhalb der Familie der ADAMs (Abbildung 2). In dem Zymogen befindet sich zunächst N-terminal von der katalytischen Domäne eine Prodomäne. Die Prodomäne inhibiert ADAM17 intramolekular indem es mit dem Zinkion im aktiven Zentrum interagiert, sodass die Protease zunächst proteolytische inaktiv vorliegt (Gonzales *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2008). Während des Transports zur Zelloberfläche wird die Prodomäne durch Proteinkonvertasen, wie Furin, im Golgi-Apparat prozessiert, sodass das aktive Zentrum von ADAM17 nicht länger inhibiert wird (Schlöndorff *et al.*, 2000; Endres *et al.*, 2003; Seals & Courtneidge, 2003). Nach Entfernen der inhibitorischen Prodomäne ist das katalytische Zentrum aktiv und kann letztendlich die Substrate von ADAM17 auf der Zelloberfläche proteolytisch prozessieren (Gonzales *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2008). Die Disintegrin-

ähnliche Domäne schließt sich C-terminal an die katalytische Domäne an. Sie ist daran beteiligt benachbarte Domänen korrekt zum Substrat auszurichten, also sie in eine bestimmte Orientierung zueinander zu bringen (Janes *et al.*, 2005; Takeda, 2009). Zudem interagiert sie mit α5β1-Integrinen und nimmt somit Einfluss auf Zelladhäsion und Zellmigration (Bax *et al.*, 2004; Trad *et al.*, 2013). Die MPD ist zusammen mit der *stalk*-Region an der Substraterkennung und Substratprozessierung beteiligt. Jedoch scheint die MPD nicht bedeutsam für die Prozessierung aller Substrate von ADAM17 zu sein. So konnte eine Interaktion mit dem IL-6R oder IL-$1R_{II}$ gezeigt werden, jedoch nicht mit pro-TNF-α oder TNF-R_{II} (Reddy *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 2012). Von besonderer Bedeutung ist ein Segment innerhalb der *stalk*-Region namens CANDIS (Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence). Dieses ist hoch konserviert und spielt bei der Interaktion mit der Zellmembran, sowie mit Substraten und der Dimerisierung von ADAM17 Proteasen eine wichtige Rolle (Düsterhöft *et al.*, 2014). Neben der Substraterkennung und der Interaktion mit der Zellmembran, spielt das CANDIS-Motiv, zusammen mit der MPD, außerdem eine Rolle bei der Multimerisierung von ADAM17 (Reddy *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 2011; Lorenzen *et al.*, 2012). An die *stalk*-Region schließt sich die Transmembranregion an. Für diese wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der korrekten Ausrichtung der extrazellulären Domänen zueinander spielt (X. Li *et al.*, 2007). Eine Deletion der Transmembrandomäne zusammen mit der zytoplasmatischen Region führt zu löslichem inaktivem ADAM17, welches nicht mehr in der Lage ist seine membranständigen Substrate zu prozessieren (Itai *et al.*, 2001). Wird hingegen nur die zytoplasmatische Region deletiert, so ist ADAM17 voll funktional und kann seine membrangebundenen Substrate prozessieren (Reddy *et al.*, 2000; X. Li *et al.*, 2007). Die zytoplasmatische Region liegt am C-terminalen Ende von ADAM17. Sie interagiert mit intrazellulären Proteinen und es wird angenommen, dass diese ADAM17 modifizieren können (Edwards *et al.*, 2008). So weist die zytoplasmatische Region putative Phosphorylierungsstellen auf (Gechtman *et al.*, 1999), welchen eine Rolle bei der Regulation, wie dem Transport zur Zelloberfläche und der Aktivierung, zugeschrieben werden (Edwards *et al.*, 2008).

Es wird vermutet, dass die extrazellulären Domänen von ADAM17 C-förmig

ausgerichtet sind. Dadurch liegen die einzelnen Ektodomänen räumlich nah beieinander und beeinflussen sich somit gegenseitig (Mancia & Shapiro, 2005; Takeda *et al.*, 2006; Igarashi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

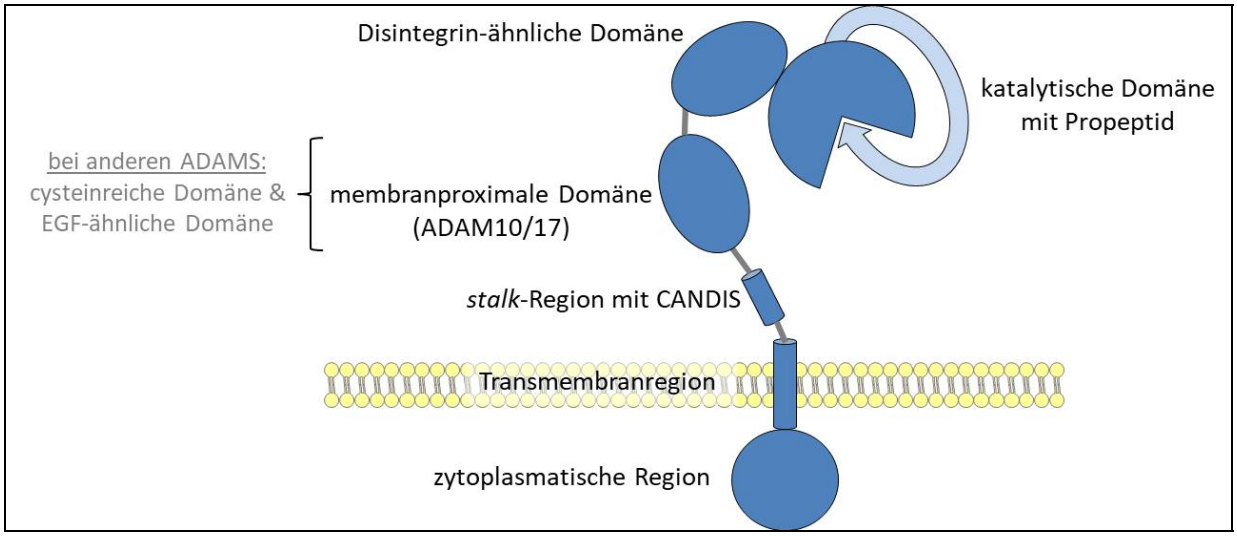


Abbildung 2: Schematische Darstellung von ADAM17.

Das Typ-1-Transmembranprotein ADAM17 besteht aus einer zytoplasmatischen Region am C-Terminus, gefolgt von der Transmembranregion, einer *stalk*-Region mit dem CANDIS-Motiv, der membranproximalen Domäne (MPD), der Disintegrin-ähnlichen Domäne und der katalytischen Domäne mit der Prodomäne am N-terminalen Ende. Die MPD ist bei allen anderen ADAMs, außer ADAM10 und ADAM17, durch eine cysteinreiche- und eine EGF-ähnliche Domäne ersetzt.

1.2.2 Physiologische Bedeutung

ADAM17 ist eine der am meist erforschten ADAMs und der Protease konnte somit eine Vielzahl bedeutender Rollen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zugeordnet werden. Im Jahr 1997 wurde ADAM17 erstmals beschrieben und zunächst TACE (Tumor Necrosis Factor-α-Converting Enzyme) genannt, da TNF-α als erstes Substrat von ADAM17 entdeckt wurde (Black *et al.*, 1997; Moss, Jin, Becherer*, et al.*, 1997; Moss, Jin, Milla*, et al.*, 1997). Inzwischen sind über 80 Substrate bekannt, wobei es sich hauptsächlich um Zytokine wie TNF-α (Moss et al 1997) oder Wachstumsfaktoren wie TGF-α (Peschon *et al.*, 1998), und Zytokinrezeptoren, wie den IL-6R (Althoff *et al.*, 2000), sowie Adhäsionsmoleküle, wie L-Selektin (Peschon *et al.*, 1998), handelt. Durch das breite Spektrum an

Substraten, sowie der Tatsache, dass es ubiquitär exprimiert wird, spielt die Protease eine große Rolle bei vielen biologischen Prozessen. So beeinflusst ADAM17 die Immunantwort und Entzündungsreaktionen und spielt zudem eine Rolle bei entwicklungsbiologischen und regenerativen Prozessen. Jedoch ist die Protease auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt, wie unkontrollierten Entzündungen und Tumorentwicklung (Horiuchi *et al.*, 2007; Scheller *et al.*, 2011).

Ein prominentes Substrat von ADAM17 ist der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R). Der IL-6R wird von Hepatozyten und einigen Leukozyten, wie Neutrophilen und T-Zellen exprimiert (Garbers & Scheller, 2013; Garbers, Aparicio-Siegmund *et al*., 2015; Garbers, Hermanns *et al.,* 2015). Als membranständiger Rezeptor bindet er sein Substrat IL-6 und es kommt durch Interaktion mit dem Transmembranprotein gp130 (Glykoprotein 130) zum IL-6-*classic-signaling*. Dieser Signalweg hat Auswirkungen auf regenerative und protektive Prozesse der Zelle. ADAM17 ist in der Lage den IL-6R proteolytisch zu prozessieren und ihn in eine lösliche Form zu überführen: den sIL-6R (*soluble* IL-6R). In diesem Zustand kann der Rezeptor agonistisch auf Zellen wirken, welche keinen IL-6R, jedoch gp130 exprimieren, wobei gp130 ubiquitär exprimiert wird. Dieser Prozess wird als *trans-signaling* bezeichnet und spielt eine Rolle bei proinflammatorischen Prozessen der Zelle (Rose-John & Heinrich, 1994; M. Peters *et al.*, 1998; Scheller *et al.*, 2011). An diesem Beispiel wird deutlich, dass die proteolytische Prozessierung durch ADAM17 ein bedeutender Prozess ist um lösliche Proteine zu generieren, welche immense Auswirkungen auf Signalkaskaden und physiologische Prozesse der Zelle haben. Die proteolytische Prozessierung von Substraten durch ADAM17 lässt sich somit in eine Reihe von posttranlationalen Modifikationen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung einreihen. Im Gegensatz zu allen anderen, handelt es sich dabei jedoch um eine irreversible Modifikation.

Die Relevanz dieser Protease für den Organismus wird zudem deutlich, wenn man Mäuse betrachtet, welche eine inaktive Variante von ADAM17 exprimieren. Es kommt in diesem Fall zu perinataler Letalität bzw. zum Absterben kurz nach der Geburt (Peschon *et al.*, 1998). Bei Menschen wurde ein Patient mit homozygoter Deletion des ADAM17-Gens beschrieben, welche zwar nicht zum Tod, jedoch zu schwerwiegenden Haut- und Darmerkrankungen führte (Blaydon *et al.*, 2011).

Aufgrund der hohen physiologischen Bedeutung ist eine strikte Regulation der Protease zwangsläufig erforderlich.

1.2.3 Aktivität und Regulation

Aufgrund der Tatsache, dass ADAM17 bei einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologicher Prozesse involviert ist, ist eine genaue Regulation der Proteaseaktivität unerlässlich. Bei der Aktivität von ADAM17 muss zwischen konstitutiver und stimulierter proteolytischer Aktivität unterschieden werden (Sommer *et al.*, 2016; Grötzinger *et al.*, 2017; Reiss & Bhakdi, 2017). Bei beiden handelt es sich um *shedding*, jedoch muss letzteres induziert werden. Es wurde beschrieben, dass die katalytische Domäne von ADAM17 immer proteolytisch aktiv ist und somit konstitutiv jederzeit lösliche Substrate prozessieren kann. So wurde gezeigt, dass ein lösliches, fluorogenes Substrat auch unter unstimulierten Bedingungen prozessiert wird (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). Für das Prozessieren membranständiger Substrate ist die katalytische Domäne im inaktiven Zustand nicht richtig positioniert. Hierfür ist eine Stimulation der Protease notwendig. Unter physiologischen Bedingungen kann ADAM17 bei bakteriellen Infektionen durch Lipopolysaccharide (LPS), welche Bestandteil der Bakterienmembran sind, stimuliert werden und spielt somit eine Rolle bei der Immunabwehr (Gooz, 2010). Ein weiterer physiologischer Stimulator von ADAM17 ist Thrombin während der Zellregeneration. Thrombin wird bei Verletzungen und Entzündungen als Enzym der Koagulation gebildet. (Arora *et al.*, 2008). Als besonders starker, jedoch unphysiologischer, Stimulator für die *shedding*-Aktivität ist Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) beschrieben. In ruhenden, d. h. nicht-aktivierten, Zellen befinden sich die negativ geladenen Phosphatidylserine (PS) der Lipiddoppelschicht hauptsächlich auf der inneren Seite der Plasmamembran. Wird die Zelle aktiviert (z. B. durch PMA), kommt es zur Externalisierung von PS und somit zu einer Anreicherung von negativer Ladung auf der äußeren Seite der Zellmembran. Die negativen Ladungen des PS interagieren mit dem positiv geladenen RKGK-Motiv der flexiblen, offenen MPD von ADAM17. Dies führt die MPD17 dicht an die Zellmembran. Durch die postulierte C-förmige Anordnung der Ektodomänen wird das katalytische Zentrum von ADAM17 nah an die Zellmembran geführt und kann somit seine membranständigen Substrate

prozessieren (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017) (Abbildung 3).

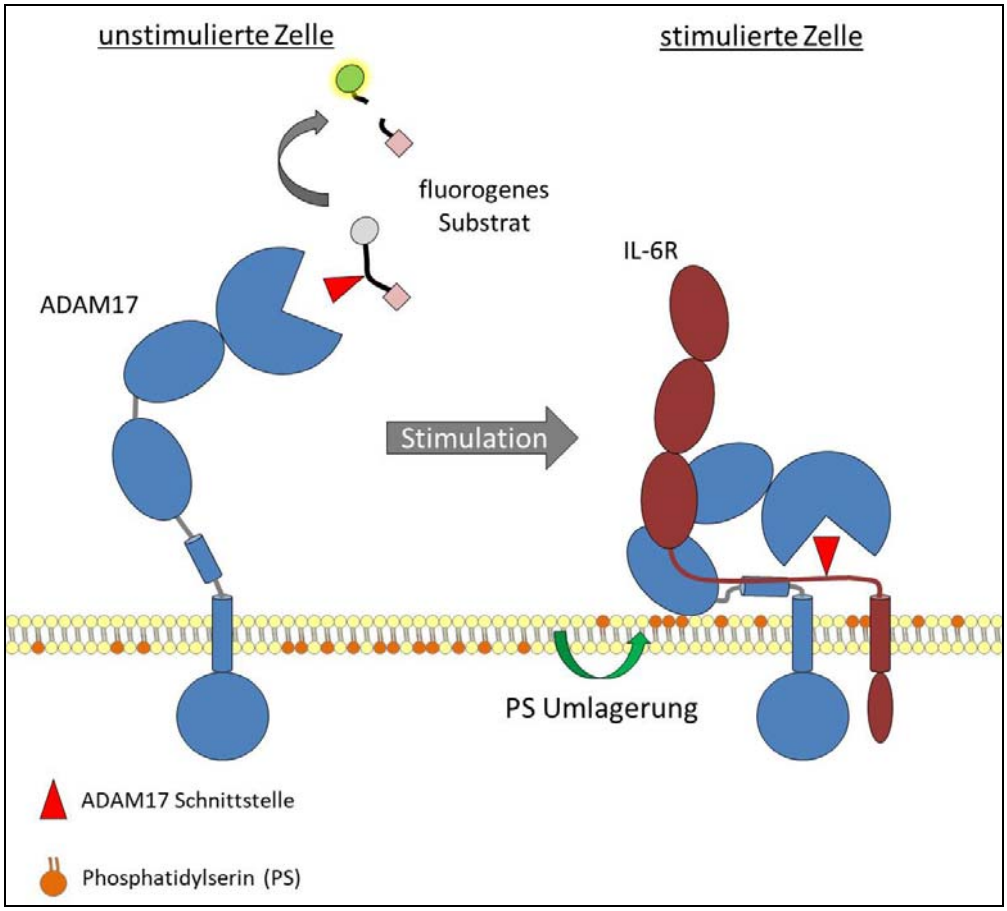


Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteolytischen Aktivität von ADAM17 in stimulierten und unstimulierten Zellen.

In unstimulierten Zellen ist die katalytische Domäne von ADAM17 konstitutiv proteolytisch aktiv und kann ein lösliches fluorogenes Substrat spalten. In diesem Zustand können die membranständigen Substrate von ADAM17 nicht prozessiert werden, da die ADAM17-Schnittstelle bei allen Substraten nah an der Zellmembran lokalisiert ist. Aufgrund der großen Distanz zueinander kann die katalytische Domäne von ADAM17 die Schnittstelle seiner Substrate nicht erreichen und somit nicht prozessieren. Dementsprechend ist die Protease inaktiv und es erfolgt kein *shedding*.

Werden die Zellen stimuliert (z. B. durch PMA), lagern sich die negativ geladenen Phosphatidylserin-Moleküle (PS) von der intrazellulären Seite auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran um. Dadurch kann das positiv geladene RKGK-Motiv der flexiblen, offenen MPD17 mit den PS-Molekülen interagieren. Es kommt infolgedessen zu einer Annäherung der MPD17 an die Zellmembran. Hierdurch wird der gesamte extrazelluläre Bereich von ADAM17 näher an die Zellmembran geführt und die katalytische Domäne kann die Schnittstelle seiner membranständigen Substrate erreichen und diese proteolytisch prozessieren (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017).

Zudem wird ein Teil an ADAM17 intrazellulär im Bereich des rauen ERs gelagert. Nach PMA-Stimulation erfolgt zunächst eine schnelle Steigerung von ADAM17 auf der Zelloberfläche, gefolgt von einer Abnahme aufgrund von Internalisierung und lysosomaler Degradation (Doedens & Black, 2000, Lorenzen *et al*., 2016). Ein weiterer Inaktivierungsmechanismus von ADAM17 ist die Überführung der offenen Form der MPD in die geschlossene. Dies wird durch Proteindisulfidisomerasen (PDIs) katalysiert).

1.2.1 Inaktivierung von ADAM17 durch PDIs

Es wurde gezeigt, dass extrazelluläre PDIs ADAM17, durch die Isomerisierung zweier Disulfidbrücken, inaktivieren (Sommer *et al.*, 2016; Grötzinger *et al.*, 2017). Die betroffenen Cystein-Reste befinden sich innerhalb der MPD17 an den Positionen 600, 630, 635 und 640. Zunächst liegt die MPD17 in einem flexiblen, offenen Zustand vor. Dabei sind Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten C600 – C630 und C635 – C640 ausgebildet (Düsterhöft *et al.*, 2013). Durch die lineare Anordnung der Cysteinbrücken innerhalb der MPD17 liegt der N-terminale Bereich flexibel vor. Hier befindet sich das Aminosäure-Motiv RKGK (Arginin – Lysin – Glycin – Lysin), welches als Phosphatidylserin-Bindungsmotiv beschrieben wurde (Sommer *et al.*, 2016; Grötzinger *et al.*, 2017). Bei Arginin und Lysin handelt es sich um Aminosäuren, welche unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind. Kommt es bei der Stimulation von ADAM17 (Kapitel 1.2.3) zur Umlagerung des PS auf die äußere Seite der Zellmembran, interagiert das positiv geladenen RKGK-Motiv mit dem negativ geladenen PS, wodurch es zur proteolytischen Prozessierung der membranständigen Substrate kommt (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). Reduzierte PDIs katalysieren eine Isomerisierung der linear angeordneten Disulfidbrücken, wodurch eine überlagernde Anordnung der Disulfidbrücken zwischen C600 – C635 und C630 – C640 erfolgt (Abbildung 4). Durch diese Änderung kommt es zu einer kompakten Struktur mit einem rigiden, geschlossenen Zustand der MPD17 (Düsterhöft *et al.*, 2013). Infolgedessen liegt das PS-Bindemotiv (RKGK) in einer geordneten Struktur vor und kann nach Stimulation nicht mehr mit dem PS in der Zellmembran interagieren (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). Dies führt dazu, dass ADAM17 keine membranständigen Substrate mehr

prozessieren kann, da das katalytische Zentrum nicht in die Nähe der Zellmembran gebracht wird, in dessen Nähe sich die Schnittstellen der möglichen Substrate befinden (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). Die PDIA6 ist, wie die PDIA1 und PDIA3, demnach in der Lage die Protease zu inaktivieren (Krossa *et al.*, 2018).

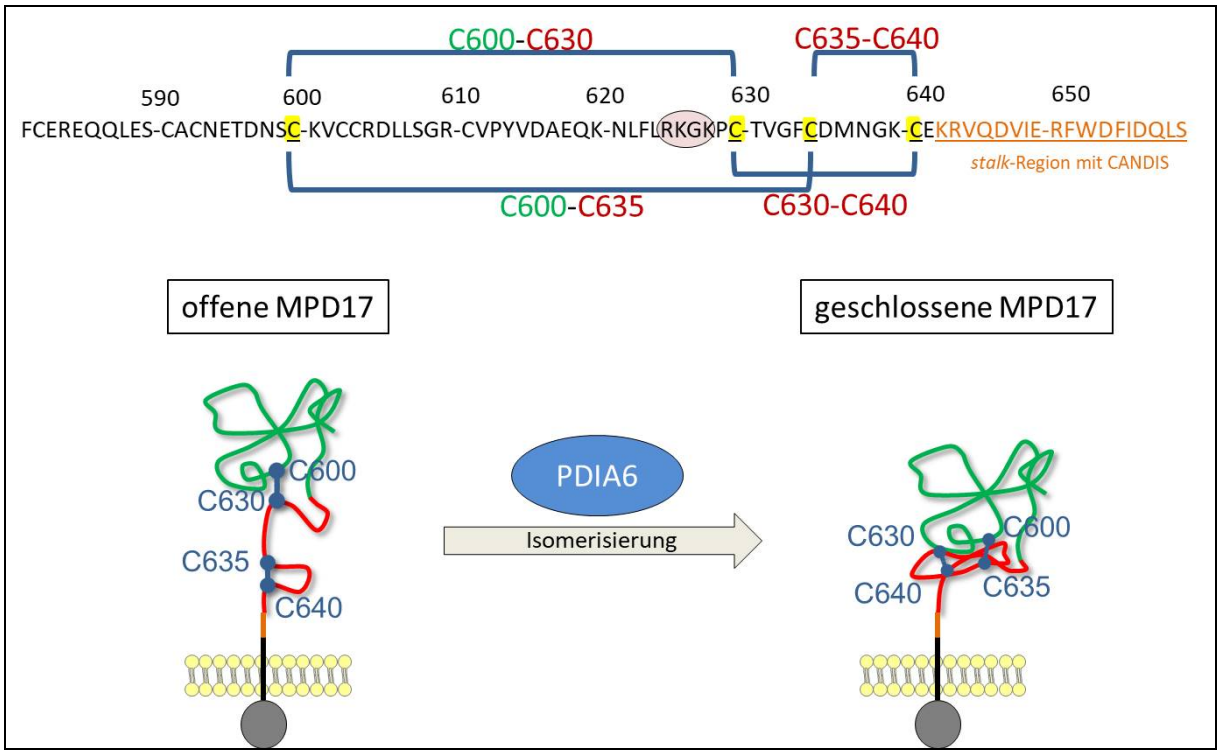


Abbildung 4: Isomerisierung der MPD17 durch PDIA6.

In der offenen Form befindet sich die MPD17, durch die linear ausgebildeten Disulfidbrücken zwischen C600-C630 und C635-C640, in einem flexiblen Zustand und das PS-Bindemotiv RKGK liegt frei. Durch Interaktion mit der PDIA6 kommt es zu einer Isomerisierung der Disulfidbrücken, sodass sich Brückenbindungen zwischen C600-C635 und C630-C40 ausbilden. Da sich die Cysteinbrücken überlappen wird die offene Form der MPD17 in eine rigide, geschlossene Form überführt. In diesem Zustand liegt das RKGK-Motiv verdeckt vor und kann nicht mit PS interagieren. Die Protease ADAM17 kann in diesem Zustand keine Substrate prozessieren und liegt somit inaktiv vor (Düsterhöft *et al.*, 2013).

1.3 Proteindisulfidisomerasen (PDIs)

Bisher wurden 21 verschiedene PDIs beschrieben, welche als Oxidoreduktasen und Chaperone fungieren. Es handelt sich um ER-residente Proteine, welche bei der posttranslationalen Modifikation, genauer bei der korrekten Faltung von anderen Proteinen involviert sind (Laurindo et al., 2012). Dabei können sie in ihrer oxidierten Form Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein-Resten schließen und in ihrer reduzierten Form öffnen bzw. isomerisieren (Xu et al., 2014) (Abbildung 5). Nachdem lange nur PDIA1 als alleinige PDI bekannt war, wurden später weitere Isoformen entdeckt. Eine besondere Rolle kommt der PDIA3 zu, da sie zusammen mit den Lektin-Chaperonen Calreticulin und Calnexin an der Faltung von Glykoproteinen beteiligt ist (Ellgaard & Frickel, 2003).

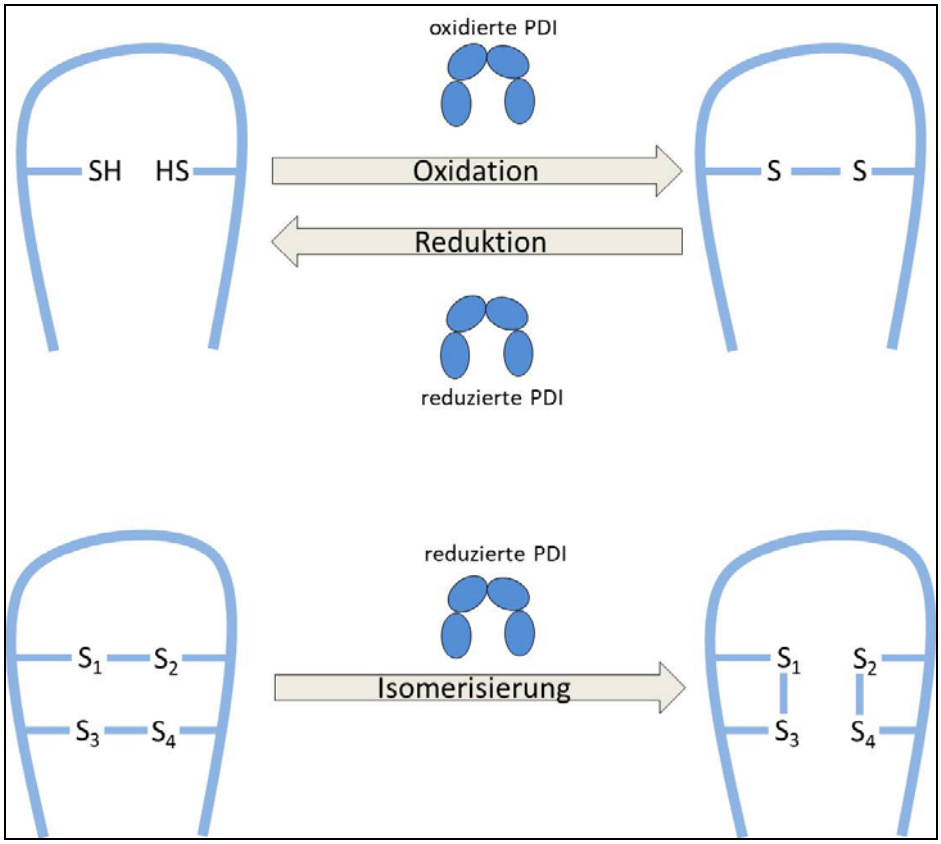


Abbildung 5: Reaktionsverhalten der Proteindisulfidisomerasen.

Aktive PDIs sind in ihrer oxidierten Form in der Lage Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen auszubilden und diese in ihrer reduzierten Form zu öffnen. Außerdem können sie durch ihr Oxidoreduktaseverhalten Disulfidbrücken isomerisieren (Xu *et al.*, 2014).

PDIs bestehen aus enzymatisch-aktiven und inaktiven Thioredoxin-ähnlichen Domänen, weshalb sie zur Oxidoreduktion fähig sind (Xu *et al.*, 2014). Die enzymatisch-aktiven Thioredoxin-ähnlichen Domänen weisen als aktives Zentrum Thioredoxinmotive auf (CXXC). Die Anzahl der Domänen ist innerhalb verschiedener PDIs unterschiedlich. Für PDIA1 wurden vier C-förmig angeordnete Thioredoxin-ähnliche Domänen beschrieben (Wang *et al.*, 2013). Dabei sind die äußeren Domänen (a und a') aktiv und die Inneren (b und b') inaktiv. PDIA6 weist zwei aktive Domänen (a und a') auf und besitzt C-Terminal nur eine inaktive Domäne (b) (Abbildung 6) (Kozlov *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014). Für die inaktiven Domänen b und b‘ wurde beschrieben, dass sie wahrscheinlich an der Substraterkennung und dessen Bindung beteiligt sind. Somit kann diesen Domänen die Chaperonaktivität zugeschrieben werden (Kozlov *et al.*, 2010).

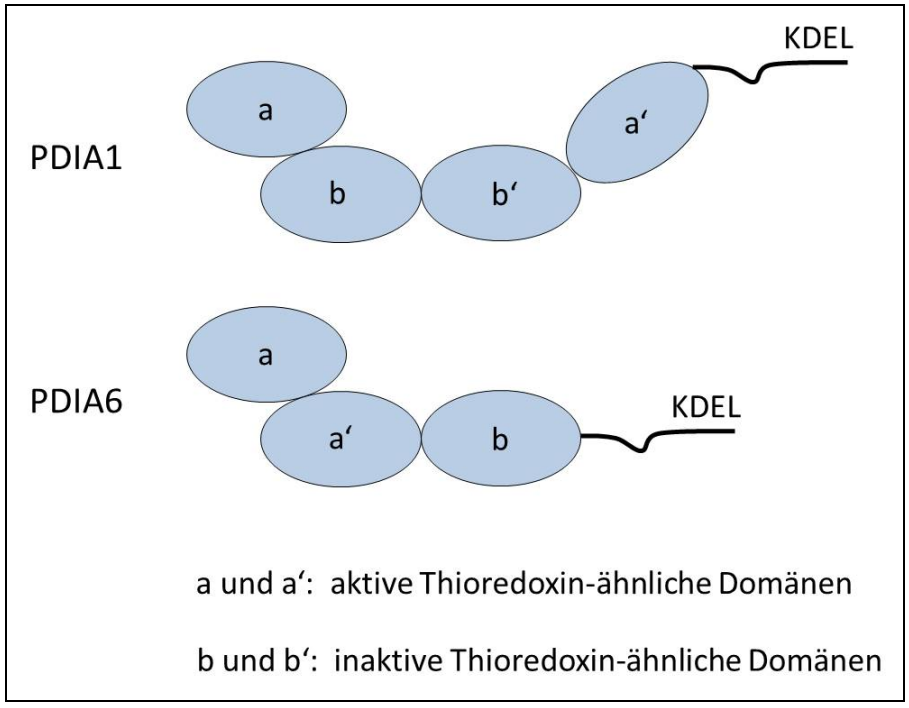


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der PDIs.

PDIs bestehen aus aktiven (a und a‘) und inaktiven (b und b‘) Thioredoxin-ähnlichen Domänen und tragen am C-terminalen Ende die ER-Retentionssequenz KDEL. Die Anzahl der Domänen variiert dabei innerhalb der unterschiedlichen PDIs (Xu *et al.*, 2014).

Neben ihren Funktionen im ER wurde gezeigt, dass sie mit der Zelloberfläche assoziiert sind und an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt sind (Terada *et al.*,

1995; Xiao *et al.*, 1999; Jordan & Gibbins, 2006; Kaiser *et al.*, 2007). So spielen PDIs eine Rolle bei der Aufnahme von Stickstoffmonooxid (NO). Die PDI-Aktivität auf der Zelloberfläche ist dabei für den Transport von NO in die Thrombozyten notwendig (Zai *et al.*, 1999; Ramachandran *et al.*, 2001). Außerdem findet man PDIs bei der Aktivierung von Integrinen während der Koagulation (Lahav *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2008; Holbrook *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Passam *et al.*, 2015), beim Viruseintritt des HIV bzw. Dengue-Virus (Bi *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2012) und es ist bekannt, dass sie einen Komplex mit MICA bzw. MICB bilden, wodurch es zur proteolytischen Prozessierung durch ADAM17 und somit zur Abspaltung der MIC-Proteine von der Zelloberfläche kommt. Letzteres spielt eine Rolle bei Tumorzellen, welche durch diesen Mechanismus dem Zelltod durch natürliche Killerzellen entgehen (Kaiser *et al.*, 2007). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Inaktivierung von ADAM17 (beschrieben in Kapitel 1.2.1) (Bennett *et al.*, 2000; Willems *et al.*, 2010; Düsterhöft *et al.*, 2013).

Als ER-residente Proteinfamilie weisen sie C-terminal eine ER-Retentionssequenz auf: das KDEL-Motiv. Es wird angenommen, dass das KDEL-Motiv und somit der KDEL-Rezeptor (KDELR) eine Rolle beim Transport der PDIs an die Zelloberfläche spielen.

1.4 KDEL-Motiv und KDEL-Rezeptor

Das C-terminale KDEL-Motiv ist ein ER-Retentionssignal für das ER. Proteine mit einem KDEL-Motiv, wie eine Vielzahl an löslichen Chaperonen und PDIs, sind ER-resident und dort bei der Faltung und Ausbildung von Disulfidbrücken von heranreifenden Proteinen von Bedeutung. PDIs, die zusammen mit sekretorischen Proteinen über den sekretorischen Weg mittels COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat gelangen (Barlowe *et al.*, 1994; Barlowe, 1998), binden dort an den KDELR. Für die Bindung zwischen dem KDELR und seinen Liganden wird ein leicht saures Milieu benötigt, welches im cis-Golgi-Bereich mit pH 6,5 gegeben ist. Im neutralen Bereich (pH 7) hingegen, z. B. im ER, wird die Bindung aufgehoben und der Ligand wird freigegeben (Wilson *et al* 1993). Während die sekretorischen Proteine, wie Zytokine und Wachstumshormone, im Golgi-Apparat modifiziert und in den sekretorischen Transportweg eingeschleust werden, werden die PDIs aufgrund ihres KDEL-Motivs,

und damit verbundenen Bindung an den KDELR, retrograd zum ER zurückgeführt. Dabei induziert die Bindung des Cargos eine Aktivierung des KDELR im Golgi-Apparat. Es kommt zu einer Induktion verschiedener Signalwege durch die Interaktion mit den G-Proteinen Gs, Gq bzw. $G\alpha_o$. Über Gs erfolgt eine Aktivierung von Protein-Kinase A (PKA), die eine direkte Phosphorylierung von Komponenten der retrograden Transportmaschinerie katalysiert. Beim retrograden Transport, zurück ins ER, wird für den KDELR eine aktive Rolle in der COPI-abhängigen Sortierung und bei der Regulation des COPI-Vesikel-Transports angenommen (Aoe *et al*., 1997). Die Bindung eines KDEL-Proteins an den KDELR führt zur Rekrutierung der membranaktiven GTPase Arf1 wodurch das Vesikel mit der ER-Membran fusioniert und das KDEL-Protein zurück ins ER gelangt. (Tanigawa *et al*. 1993, Yoshihisa *et al*. 1993; Cukierman *et al*. 1995). Der KDELR wird dann über COPI-vermittelten Transport anterograd zum Golgi-Apparat recycelt (Townsley *et al.*, 1993). Die KDELR-abhängige Retention ist zwischen den Spezies hochkonserviert, wobei das KDEL-Motiv z. B. bei der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) leicht abgewandelt vorliegt (Semenza *et al.*, 1990). Bei *Saccharomyces cerevisiae* befindet sich in dem Motiv ein Histidin anstelle des Lysins (HDEL-Motiv).

Zudem kommt es durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zur erhöhten Expression von Genen, dessen Proteine am retrograden und am anterograden Vesikeltransport beteiligt sind (Cancino *et al*., 2014). Die Interaktion mit Gq resultiert in einer direkten SFK (Src-*family kinases*)-vermittelten Aktivierung von anterograden Transportprozessen zur Plasmamembran. Auch die Interaktion mit $G\alpha_o$ führt, durch die Aktivierung von Rab1/Rab3, zur Aktivierung des anterograden Transports. Somit spielt der KDELR bei der Aufrechterhaltung der Golgi-Homöostase eine entscheidende Rolle (Pulvirenti *et al*., 2008, Giannotta *et al*., 2012; Cancino *et al*., 2014; Solis *et al*., 2017).

1.4.1 Struktureller Aufbau des KDELR

Der KDELR weist eine Molekülmasse von 26 kDa auf (Townsley *et al.*, 1993) und besteht aus sieben konservierten Transmembrandomänen (Lewis & Pelham, 1990; Scheel & Pelham, 1998). Dabei liegt der N-Terminus luminal und der C-Terminus auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates (Abbildung 7). Die luminalen Teile des

Rezeptors tragen zur Bindung des KDEL-Motivs bei (Townsley *et al.*, 1993; Raykhel *et al.*, 2007). Die Struktur des KDELR weist somit Ähnlichkeiten mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) auf und beide lassen sich den heptahelikalen Transmembranproteinen zuordnen. Bei GPCRs handelt es sich um Rezeptoren der Zellmembran und Endosomenmembran, welche Signale von GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) in das Zellinnere transduzieren (Irannejad *et al*., 2013). Daraus ergibt sich, dass auch der KDELR in der Lage ist, mit G-Proteinen zu interagieren und Signalkaskaden zu initiieren (beschrieben in Kapitel 1.4).

Kodiert wird der KDEL-Rezeptor im Menschen durch das *erd2*-Gen (*ER Lumen Protein Retaining Receptor*) und es wurden drei homologe Formen des Rezeptors beschrieben: KDELR1 (*erd2.1*), KDELR2 (*erd2.2*) und KDELR3 (*erd2.3*) (Lewis *et al.*, 1990; Lewis & Pelham, 1992). Dabei wird der KDELR1 am stärksten exprimiert und der KDELR3 am schwächsten (Raykhel *et al.*, 2007). Die starke Expression des KDELR1, sowie die Tatsache, dass er als einziger der drei homologen Formen eine höhere Affinität zum KDEL- anstelle des HDEL-Motivs aufweist (Henderson *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2016), macht ihn besonders interessant für Untersuchung im Hinblick auf die Interaktion mit PDIs.

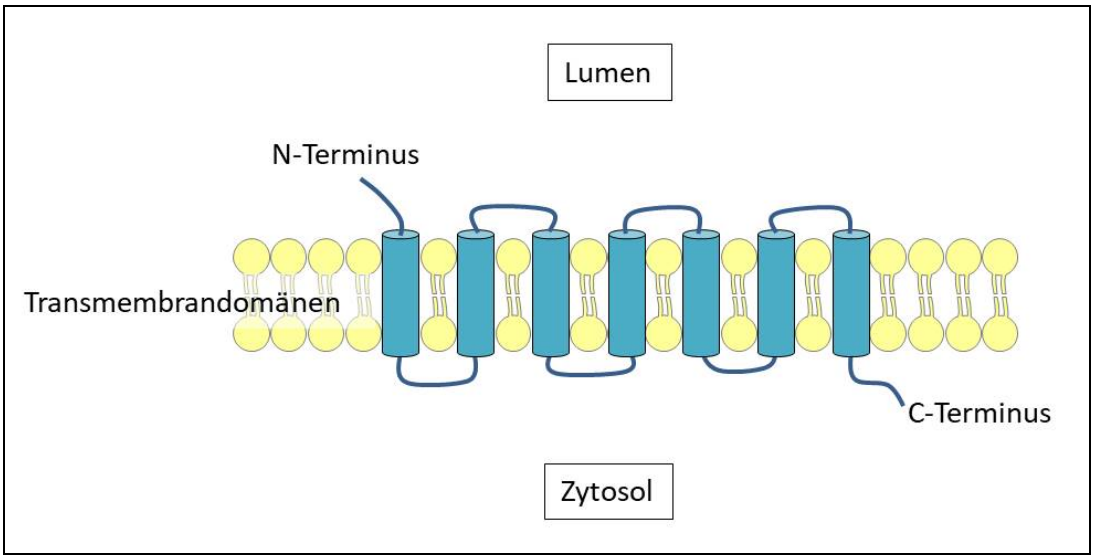


Abbildung 7: Schematische Darstellung des KDELR.

Der KDELR besteht aus sieben Transmembrandomänen, wobei der N-Terminus luminal und der C-Terminus auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert ist (Townsley *et al.*, 1993).

1.5 Zielsetzung

Um Einblicke in die biologische Aktivität von ADAM17 zu erhalten, soll untersucht werden, ob der IL-6R als membranständiges Substrat von ADAM17 unter unstimulierten Bedingungen proteolytisch prozessiert werden kann. Dafür wird die ADAM17-Schnittstelle weiter von der Zellmembran weg und somit näher an das katalytische Zentrum von ADAM17 verschoben. Dies soll erreicht werden, indem ein Motiv von 6 Aminosäuren (LPVQDS) der IL-6R *stalk*-Region, welches die Schnittstelle (Prolin-Valin) für ADAM17 enthält, um jeweils 5 Aminosäuren in Richtung N-Terminus verschoben wird. Anschließend soll für jede IL-6R Mutante sowohl die konstitutive als auch die stimulierte proteolytische Aktivität von ADAM17 analysiert werden. Hierdurch sollen mögliche Aktivierungsmechanismen von ADAM17 aufgeklärt werden.

Durch eine Konformationsänderung der MPD17, katalysiert durch extrazelluläre PDIs, wird die Aktivität von ADAM17 inhibiert. Um einen weiteren Einblick in diesen Regulationsmechanismus zu erhalten, soll untersucht werden, wie die ER-residenten PDIs an die Zelloberfläche gelangen. Dabei liegt ein besonderer Fokus auf dem KDEL-Motiv der PDIs und der damit verbundenen Interaktion mit dem KDELR. So soll untersucht werden, ob der Transport und die Assoziation der PDIs an die Zelloberfläche KDELR1-abhängig ist.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Im Folgenden findet sich eine Aufstellung zu den verwendeten Geräten (Tabelle 1) und Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2). Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, bis auf die in Tabelle 2 aufgelisteten Materialien, alle von der Firma SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland) geordert.

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerätename	**Hersteller mit Sitz**
ECL Chemocam Imager (*Western-Blot* Detektion)	INTAS, Ahmedabad, Indien
BD FACS Canto 2	BECTON DICKINSON BIOSCIENCES, New Jersey, USA
Heraeus® HERAcell® CO_2 Inkubator	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
IMT-2 Mikroskop	OLYMPUS, Tokyo, Japan
Inkubator Multitron Standard	INFORS HAT (Bottmingen, Schweiz)
NanoDrop ND1000	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH , Erlangen, Deutschland
Olympus IX 81 cLSM Mikroskop	OLYMPUS, Tokyo, Japan
pH-Meter MP225 / pH-Meter Elektrode inlab 410	METTLER TOLEDO , Gießen, Deutschland
Schüttelinkubator Multitron Standard	INFORS HT, Basel, Schweiz
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell-System	BIO-RAD LABORATORIES, Hercules, USA

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	**Hersteller mit Sitz**
Amersham™ Hybond™ PVDF Blotting Membrane (0,45 µm)	HE HEALTHCARE, Chicago USA
Mr. Frosty Einfrierbox	NALGENE, Rochester, USA
Nap5™ Säule	GE HEALTHCARE, Chicago, USA
Nap10™ Säule	GE HEALTHCARE, Chicago, USA

2.1.2 Software

Eine Auflistung der Software, welche in dieser Arbeit verwendet wurden findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Verwendete Software.

Software	**Entwickler mit Sitz**
Bioedit	IBIS THERAPEUTICS, Carlsbad, USA
Chemostar Professional	INTAS, Ahmedabad, Indien
DNAMAN	LYNNON BIOSOFT, San Ramon, USA
BD FACS Canto 2	BECTON DICKINSON BIOSCIENCES, New Jersey, USA
Excel 2010	MICROSOFT, Redmond, USA
FCS Express 3	DE NOVO SOFTWARE, Glendale, USA
FluoView FV 1000	OLYMPUS, Tokyo, Japan
FluoView FV 3000	OLYMPUS, Tokyo, Japan
Image Studio Lite 5.2	LI-COR BIOSCIENCES, Lincoln, USA
http://crispr.mit.edu	ZHANG LAB, Cambridge, USA

2.1.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, bis auf die in Tabelle 4 aufgelisteten Reagenzien, alle von der Firma CARL ROTH (Karlsruhe, Deutschland) geordert.

Tabelle 4: Gesonderte Bezugsquellen der Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller mit Sitz
APS	FLUKA, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	GIBCO/LIFE, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	RIEDEL-DE HAEN AG, Buchs, Schweiz
cOmplete Mini Protease Inhibitor Tablets	ROCHE, Basel, Schweiz
DAPCO	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
DAPI	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Dulbecco‘s Modified Eagle’s Medium (DMEM)	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	APPLICHEM GMBH, Darmstadt, Deutschland
DY-490-NHS-Ester	DYOMICS, Jena, Germany
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
FCS (fetal bovine serum)	PAA LABORATORIES GMBH, Cölbe, Deutschland
Genistein	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Marimastat	CALBIOCHEM, LaJolla, USA
Mowiol® 4-88 Reagent	CALBIOCHEM, LaJolla, USA
Pitstop® 2	ABCAM, Cambridge, UK
PMA	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

Prestained Protein Molecular Weight Marker	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
Trypsin / EDTA (UV irradiated)	PAA LABORATORIES GMBH, Cölbe, Deutschland
Turbofect Transfection Reagent	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA

2.1.4 Antibiotika

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika.

Antibiotika	**Hersteller mit Sitz**
Ampicillin	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	PAA LABORATORIES GMBH, Cölbe, Deutschland
Puromycin	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

2.1.5 Antikörper

Die verwendeten Antikörper (Tabelle 6) sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Antikörper	**Antigen**	**Hersteller mit Sitz**
4-11	humaner IL-6R	Produktion AG Grötzinger
anti-β-Actin (*Western-Blot*)	humanes β-Actin	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas, USA (mouse, sc-4779)
anti-PDIA1 (Durchflusszytometrie)	humane PDIA1	ABCAM, Cambridge, UK (rabbit, ab137110)
anti-PDIA3 (Durchflusszytometrie, IFA)	humane PDIA3	ABCAM, Cambridge, UK (rabbit, ab10287)
anti-PDIA6 (Durchflusszytometrie)	humane PDIA6	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA (rabbit, PA5-13616)
anti-PDIA6 (*Western-Blot*)	humane PDIA6	ABCAM, Cambridge, UK (rabbit, ab11432)
anti-KDEL receptor (KR-10) (Durchflusszytometrie)	humaner KDELR1	ABCAM, Cambridge, UK (mouse, ab69659)
WGA (Lektin), Alexa Fluor™ 488 (IFA)	bindet Sialinsäure und N-Acetylglucosamin-Rückständ	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA (W11261)
anti-IgG mouse APC (Durchflusszytometrie)	Sekundärantikörper (IgG mouse)	DIANOVA, Hamburg, Deutschland (115-136-146)
anti-IgG rabbit Alexa Fluor 488 (Durchflusszytometrie)	Sekundärantikörper (IgG rabbit)	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA (A11034)

anti-IgG rabbit Alexa Fluor 594 (IFA)	Sekundärantikörper (IgG rabbit)	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA (A32740)

2.1.6 Kits

In Tabelle 7 sind die verwendeten Kits aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Kits.

Kit	**Hersteller mit Sitz**
DNA Purification Kit NucleoBondPC500	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
GeneJET PCR Purification Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
PierceTM BCA Protein Assay Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
T4 Polynukleotidkinase-Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA
T4 DNA Ligase Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA

2.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, welche für diese Arbeit genutzt wurden (Tabelle 8), wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH (St.Louis, USA) synthetisiert und es wurden 100 µM Stocklösungen in ddH_2O angesetzt.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide.

Gen	***Accessionr.***	**Sequenz 5'-3' *sense***	**Sequenz 5'-3' *antisense***
erd2.1	P24390	ACCGGTGTTCACTGCCCGATATC	AACGATATCGGGCAGTGAACACC

2.1.8 Plasmide

In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1-eGFP	grün-fluoreszierendes Protein	Dr. Inken Lorenzen
pcDNA3.1-IL-6R_wt	humaner IL-6R wildtyp	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante1	humaner IL-6R Mutante 1	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante2	humaner IL-6R Mutante 2	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante3	humaner IL-6R Mutante 3	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante4	humaner IL-6R Mutante 4	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante5	humaner IL-6R Mutante 5	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante6	humaner IL-6R Mutante 6	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante7	humaner IL-6R Mutante 7	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-IL-6R_Mutante8	humaner IL-6R Mutante 8	Produktion AG Grötzinger
pcDNA3.1-PDIA6	humane PDIA6	Dr. Inken Lorenzen
pcDNA3.1-PDIA6wo	humane PDIA6 ohne KDEL-Motiv	Dr. Inken Lorenzen

2.1.9 Zellen und Organismen

Escherichia coli DH5α: (INVITROGEN, Carlsbad, USA)	- *E. coli*-Stamm, welcher die Plasmid-DNA nicht degradiert (Woodcock *et al.*, 1989) - Genotype: *sup E44, lac U169 (f80 lacZ M15), hsd R17, rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, rel A1*
HEK293 Zellen: (Human Embryonic Kidney)	- Tranformationsprodukt von menschlichen embryonalen Nierenzellen mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus 5 - hypotriploide Epithelzellen
HEK293T-Zellen:	- Derivat von HEK293 Zellen - exprimiert zusätzlich das Simian Virus 40 (SV40) large T-Antigen. Dies ermöglicht DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40 *origin of replication* und erhöht dadurch die Proteinproduktion (Shein & Enders, 1962; Zur Hausen, 1967; Robbins *et al.*, 1986).

2.1.10 Puffer und Lösungen

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen. Sofern nicht anders angegeben erfolgte eine Verdünnungen mit doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) und die Einstellung des pH-Wertes mit 5 M NaOH und 37 % HCl. Das Autoklavieren fand bei 120 °C und 1,4 bar Dampfdruck für 20 min statt.

Puffer für SDS-PAGE

10 x SDS-Puffer	144	g	Glycin
	30	g	Tris
	10	g	SDS
	ad. 1 L		ddH_2O
5 x Lämmli Probenpuffer	3,2	mL	1 M Tris pH 6,8
	4,3	mL	Glycerin
	1,5	g	SDS
	2,5	mL	β-Mercaptoethanol
	Spatelspitze		Bromphenolblau
	ad. 10 mL		ddH_2O
0,1 % Coomassie-Färbelösung	250	mL	Methanol
	100	mL	Ethanol
	1	g	Brilliantblau
	ad. 1 L		ddH_2O

Coomassie-Entfärbelösung	100	mL	Methanol
	100	mL	Essigsäure
	ad. 1 L		ddH_2O

Puffer für *Western-Blots*

10 x Transferpuffer	1,92	M	Glycin
	2,5	M	Tris
	ad. 1 L		ddH_2O

1 x Transferpuffer	100	mL	10x Transferpuffer
	700	mL	ddH_2O
	200	mL	Methanol

10 x TBS	2	M	NaCl
	0,5	M	Tris
	ad. 1 L		ddH_2O
	pH		7,5

1 x TBS/Tween	100	mL	10 x TBS
	900	mL	ddH_2O
	500	µL	Tween20

Blockierlösung	5	mL	TBS
	5	% (w/v)	BSA

Puffer für Durchflusszytometrie

FACS Flow	1	L	PBS pH 7,4
	0,05	% (v/v)	Na-azid
FACS-Puffer			
(extrazelluläre Färbung)	1	% (w/v)	BSA
	ad. 1 L		PBS pH 7,4
FACS-Puffer			
(intrazelluläre Färbung)	1	% (w/v)	BSA
	0,1	% (w/v)	Saponin
	ad. 1 L		PBS pH 7,4

Herstellen kompetenter Zellen

Kompetenz-Puffer	60	mM	$CaCl_2$
	15	% (v/v)	Glycerin
	ad. 250 mL		ddH_2O

Puffer für IFA:

Permeabilisierungspuffer	0,2	% (w/v)	Saponin
	ad. 50 mL		PBS pH 7,4
Fixierungspuffer	4	% (v/v)	PFA
	ad. 50 mL		PBS pH 7,4
Quenching-Puffer	0,12	% (v/v)	Glycin
	ad. 50 mL		PBS pH 7,4
Blockierlösung	10	% (v/v)	FCS
	ad. 50 mL		PBS pH 7,4

2.1.11 Zellmedien

10 x PBS	1,62	M	Na_2HPO_4
	30	mM	KH_2PO_4
	1,37	M	NaCl
	54	mM	KCl
	ad. 1 L		ddH_2O
	pH		7,4

Einfriermedium	5	mL	DMSO
	25	mL	FCS
LB-Medium (Bertani, 1951)	25	g	Lennox L Broth Base
	ad. 1 L		ddH_2O
Zelllysepuffer	20	mM	Tris-HCl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	2	mM	EDTA
	1	% (v/v)	Triton-X100
	5	% (v/v)	Glycerin
	1 Tablette		cOmplete
	100	µL	Marimastat

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Tranformation von DH5α-Zellen

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren, wurde die entsprechende DNA zunächst in kompetente DH5α Zellen transformiert. Dazu wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 50 µL Bakterien mit 1 µL Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C, bei welchem die Plasmid-DNA aufgenommen wurde, und die direkte Überführung zurück auf Eis. Nachdem die Bakteriensuspension wieder abgekühlt war, wurden 500

µL LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden für 5 min bei 3500 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µL LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/mL) ausgestrichen und über Nacht (ü. N.) bei 37 °C inkubiert. Alternativ konnte die Bakteriensuspension direkt für eine Übernachtkultur genutzt werden. Für Übernachtkulturen und Amplifikation der Plasmid-DNA wurden am folgenden Tag Klone von den Platten gepickt und in 300 mL LB-Medium mit Ampicillin in Schikane-Kolben inokuliert. Die Großkultur wurde unter Schütteln (160 rpm) ü. N. bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag für die Präparation und Reinigung der Plasmid-DNA benutzt.

2.2.1.2 Präparation und Reinigung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde in DH5α Zellen vervielfältigt und anschließend mit dem Plasmid-DNA Purification Kit NucleoBondPC500 (MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt.

2.2.1.3 Sequenzierung von DNA

Um die Plasmide, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet wurde, zu überprüfen wurden diese sequenziert. Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma GATC BIOTECH AG/EUROFINS (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 5 µL DNA (100 ng/µL) pro Ansatz und 2 µL des entsprechenden Primers (5 pmol/µL) in 1,5 mL Eppendorfgefäße gegeben und zum Sequenzieren geschickt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Software Bioedit (IBIS THERAPEUTICS, Carlsbad, USA) und DNAMAN (LYNNON BIOSOFT, SAN RAMON, USA).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in DMEM-Medium (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) (PAA LABORATORIES GMBH, Cölbe, Deutschland), Penicillin (60 mg/L) und Streptomycin (100 mg/L) (PAA LABORATORIES GMBH, Cölbe, Deutschland) (im Folgenden als DMEM-FCS-P/S bezeichnet) in 10 cm *Tissue Culture* (TC)-Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO_2 unter humiden Konditionen kultiviert. Die Zellen wurden im *Monolayer* gehalten und die Zelldichte wurde mikroskopisch (IMT-2 Mikroskop, OLYMPUS, Tokyo, Japan) analysiert.

Je nach Wachstum wurden die Zellen nach einigen Tagen geteilt. Dazu wurden zunächst tote Zellen mit warmem PBS pH 7,4 weggewaschen. Die adhärenten Zellen wurden enzymatisch mit 5 mL 5 % Trypsin in PBS pH 7,4 (warm) von der Platte gelöst und die Reaktion durch Zugabe gleicher Menge DMEM-FCS-P/S abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 1000 x g bei Raumtemperatur (RT) für 10 min wurde das entstehende Zellpellet in 1 mL DMEM-FCS-P/S resuspendiert. Je nach Bedarf wurden verschiedene Mengen der HEK293T-Zellen anschließend in neue TC-Kulturschalen mit jeweils 10 mL warmem DMEM-FCS-P/S überführt und inkubiert. Alle Arbeitsschritte wurden dabei unter einer sterilen Werkbank durchgeführt um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.2.2 Herstellung von Stocks

Um Zellstocks von HEK293T-Zellen anzulegen, wurde eine Kulturschale herangezogen, welche zu etwa 70 % bewachsen war. Die Zellen wurden zunächst geerntet und das dabei entstandene Zellpellet in 500 µL DMEM + 10 % FCS (v/v) resuspendiert und in ein Cryoröhrchen gegeben. Es wurden 750 µL Einfrierreagenz (25 mL FCS + 5 mL DMSO) zugegeben und das Cryoröhrchen in eine Mr. Frosty Einfrierbox (NALGENE, Rochester, USA) gestellt. Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren und konnten bei dieser Temperatur einige Wochen gelagert werden. Für eine längere Dauer wurden die Stocks nach einigen Tagen bei -150 °C gelagert.

2.2.2.3 Zellernte & Lyse von HEK293T-Zellen

Zu lysierende Zellen wurden zunächst mit PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend bei 1000 x g für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde, je nach Größe, mit etwa 200 - 300 µL Lysepuffer versetzt. Zu jeweils 50 mL Lysepuffer wurden kurz vor Gebrauch eine Tablette Proteaseinhibitoren *cOmplete Mini Protease Inhibitor* (ROCHE, Basel, Schweiz), sowie 50 µL Marimastat (5 mM) als Metalloprotease Inhibitor, gegeben. Die Lyse erfolgte für 30 min bei 4 °C unter rotierenden Bedingungen. Um anschließend die lösliche Fraktion von den Zelltrümmern zu trennen wurde 30 min bei 17000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, sodass mit dem entstandenen Zelllysat anschließend weitergearbeitet werden konnte.

2.2.2.4 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Die transiente Transfektion wurde in 10 cm TC-Kulturschalen mit HEK293T-Zellen in DMEM-FCS-P/S, welche zu etwa 70 % bewachsen waren, durchgeführt. Der Transfektionsansatz wurde vorbereitet indem zunächst 1 mL DMEM mit 20 µL PEI (1 mg/mL) in ein Reaktionsgefäß gegeben wurde. Zuletzt wurden 8 µg der zu transfizierenden DNA zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden ü. N. inkubiert.

Für eine Transfektion in 6-Well-Platten wurden 200 µL DMEM mit 8 µL PEI und 4 µg DNA als Transfektionsansatz vorbereitet.

Als Transfektionskontrolle wurde ein pcDNA3.1 Plasmid genutzt, welches die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (eGFP) enthielt. So konnte am nächsten Tag mikroskopisch überprüft werden, ob die Zellen das Plasmid aufgenommen haben um methodische Fehler auszuschließen.

2.2.2.5 CRISPR/Cas9: Herstellen von *kdelr1 knock-down*-Zellen

a. CRISPR/Cas9: Herstellen des Vektors

Für die Mutangenese des *kdelr1*-Gens (*erd2.1*, 1557 bp, 5 Exons) wurde die CRISPR/Cas9-Methode angewendet. Das Design der *guide*-RNA wurde dabei nach dem Algorithmus der Homepage http://crispr.mit.edu (ZHANG LAB, Cambridge, USA) durchgeführt. Für eine spätere Klonierung in den Zielvektor LeGO-Cas9-iC-puro + cgRNA_Sap I (zur Verfügung gestellt von Boris Fehse, Zentrum für Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurde an die Sequenz die *SapI* Schnittstelle (ACC) eingefügt (blau). Die designten Oligonukleotide wurden bei SIGMA-ALDRICH (St.Louis, USA) bestellt und mit ddH_2O auf 100 µM eingestellt.

Gen	**Sequenz 5'-3' *sense***	**Sequenz 5'-3' *antisense***
erd2.1 Sequenz	ACCGGTGTTCACTGCCCGATATC	AACGATATCGGGCAGTGAACACC

Die Oligonukleotide wurden über die *SapI*-Schnittstellen in den Vektor pLeGO kloniert (Ran *et al.*, 2013). Dazu wurde der Vektor zunächst mit *SapI* in entsprechendem Puffer inkubiert und die Linearisierung des Vektors im Agarosegel überprüft. Der Vektor wurde anschließend mit dem FastAP-Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) dephosphoryliert und mit dem GeneJET PCR Purification Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) gereinigt (linearisierter Vektor wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Björn Rabe).

Die georderten Oligonukleotide wurden mit dem T4 Polynukleotidkinase-Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) hybridisiert und phosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde, wie in Tabelle 10 beschrieben, angesetzt und im Thermocycler für 30 min bei 37 °C inkubiert, gefolgt vom Erhitzen für 5 min auf 95 °C und anschließendem Abkühlen auf 20 °C mit einer Abkühlrate von 5 °C/min.

Tabelle 10: Hybridisieren der Oligonukleotide für CRISPR/Cas9.

Komponente	**Volumen**
Oligonukleotid *sense*	1 µL (100 nmol)
Oligonukleotid anti*sense*	1 µL (100 nmol)
10x Reaktionspuffer für T4 PNK	4 µL
10 mM ATP	8 µL
T4 PNK	4 µL (10 units)
ddH2O	22 µL

Die hybridisierten Oligonukleotide wurden 1:250 in ddH_2O verdünnt und, wie in Tabelle 11 beschrieben, mit dem T4 DNA Ligase Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) in den linearisierten pLeGO Vektor ligiert. Als Re-Ligationskontrolle diente ein Ansatz ohne Oligonukleotide. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 16 °C im Thermomixer. Die fertigen Konstrukte wurden im Anschluss in DH5α Zellen transformiert (Ampicillin Resistenz) und Kulturen für die Plasmidreinigung mittels Midi angelegt, um das Plasmid zu vervielfältigen.

Tabelle 11: Ligationsansatz für CRISPR/Cas9.

Komponente	**Volumen**
pLeGO	50 ng
Oligos annealed (1:250)	2 µL
10x Ligasepuffer	2 µL
T4 DNA-Ligase (1 Weiss)	1 µL
ddH_2O	ad. 20 µL

b. CRISPR/Cas9: Einbringen des Vektors und Selektion der HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden mit dem zuvor hergestellten CRISPR/Cas9 Plasmid transfiziert. Um die Zellen zu selektieren, wurden die Zellen in DMEM-FCS-P/S mit Puromycin (1,5 µg/mL) zur Selektion gegeben. Nach 24 h wurde die Puromycin-Konzentration im Medium auf 3 µg/mL erhöht. Um eine *knock-down*-Zelllinie aus einem Klon zu erhalten, wurden die Zellen vereinzelt. Dabei wurden 0,5 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und mit DMEM-FCS-P/S für etwa 2-3 Wochen bei 37 °C inkubiert. Als das Wachstum der Klone sichtbar war, wurden sie in 6-Well-Platten überführt und der mögliche *knockdown* des *kdelr1* Gens mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.2.6 Herstellen kompetenter *E. coli* DH5α Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* DH5α Zellen mittels $CaCl_2$ wurden 50 mL einer DH5α *E. coli* Vorkultur mit LB-Medium (Resistenz Ampicillin) angesetzt und ü. N. bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 500 mL Hauptkultur mit 5 mL der Übernachtkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden zu je 50 mL aufgeteilt und für 15 min bei 300 x g zentrifugiert. Die dabei entstandenen Zellpellets wurden jeweils in 10 mL Kompetenz-Puffer (Kapitel 2.1.10) resuspendiert und wieder wie zuvor zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die Pellets in 25 mL Kompetenz-Puffer resuspendiert und ein drittes Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in 2,5 mL Kompetenz-Puffer resuspendiert und jeweils 200 µL in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Biotinylierung

Zur Detektion von Proteinen an der Zelloberfläche wurden alle Oberflächenproteine auf intakten Zellen mittels EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (THERMO FISHER SCIENTIFIC,

Waltham, USA) markiert. Nach Zellaufschluss wurde das Lysat mit Streptavidin-*beads* inkubiert, da Biotin mit sehr hoher Affinität und Spezifität an Streptavidin bindet. Die markierten Proteine wurden in einem letzten Schritt isoliert und anschließend per SDS-PAGE getrennt und mittels *Western-Blot* detektiert werden.

Die HEK293T-Zellen wurden zunächst mit den Plasmiden, welche für die zu untersuchenden Proteine PDIA6 und PDIA6wo kodieren, transfiziert. Zudem wurden untransfizierte Zellen als Kontrolle herangezogen, und um die endogene Oberflächenexpression von PDIA3 und PDIA6 zu untersuchen. Pro experimentellen Ansatz wurden zwei 10 cm-Zellkulturschalen benutzt. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS pH 7,4 (kalt) und anschließend mit PBS pH 8,0 (kalt) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 5 mL Biotinlösung inkubiert. Zur Herstellung der Biotinlösung wurde das Biotin mit einer Konzentration von 0,25 mg/mL in PBS pH 8,0 (kalt) angesetzt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 4 °C wurde die Biotinlösung abgenommen und die Reaktion mit 100 mM Glycin in PBS pH 7,4 für 5 min bei 4 °C abgestoppt. Die Zellen wurden in der Glycinlösung geerntet und 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Lysepuffer versetzt um die Zellen aufzuschließen und die Proteinkonzentration anschließend mittels BCA-Assay bestimmt. Zur Präzipitation der biotinylierten Proteine wurden die Zelllysate auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL mit einem Gesamtvolumen von 1 mL eingestellt und 100 µL als Lysat-Kontrolle abgenommen. Bevor das Lysat zu 60 µL Streptavidin-*beads* gegeben wurde, wurden die *beads* zunächst dreimal mit Lysepuffer/5 % BSA (w/v) gewaschen. Dabei durften die *beads* maximal mit 500 x g zentrifugiert werden. Die Bindung des Biotins an die Streptavidin-*beads* erfolgte für 1 h bei 4 °C auf einem Rollinkubator. Um ungebundene Proteine zu entfernen wurden die *beads* fünfmal mit Lysepuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurden die gebundenen Proteine durch 5-minütiges Kochen bei 95 °C mit 100 µL Lämmli-Puffer eluiert. Für die Detektion wurden pro Probe 15 µL auf ein SDS-Gel gegeben und die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Proteine im *Western-Blot* mit dem entsprechenden Antikörper (Tabelle 6), für die zu untersuchenden Proteine, detektiert.

2.2.3.2 BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Proteinkonzentration von Zelllysaten zu bestimmen, wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Hierzu wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden in einer 96-Well-Platte mit Flachboden in Dreifachansätzen über eine BSA-Kalibrationskurve pipettiert. Die Kalibrationskurve wurde ebenfalls in Dreifachansätzen mit folgenden Konzentrationen pipettiert: 25 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL und 2000 µg/mL. Außerdem wurde eine Kontrolle ohne Protein pipettiert. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:5 oder 1:10 in Lysepuffer verdünnt. Die Platte wurde im Tecan Rainbow Microplate Reader (TECAN, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 562 nm ausgelesen und mit der Software Magellan™ 3 (TECAN, Männedorf, Schweiz) analysiert. Die Auswertung fand mit der Software Excel 2010 (MICROSOFT, Redmond, USA) statt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zunächst wurde das Trenngel mit 12,5 % oder 15 %, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, in einer Gelkassette mit einer Dicke von 1,0 mm gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel nach ca. 3 h bei RT auspolymerisiert war, wurde die Isopropanol-Schicht abgegossen und restliches Isopropanol mit Filterpapier entfernt. Im Anschluss wurde das Sammelgel mit 7,5 % auf das ausgehärtete Trenngel gegossen, sowie ein Kamm zur Taschenbildung in die Gelkassette gesteckt. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel kann Tabelle 12 entnommen werden. Nach Aushärten des Sammelgels bei RT für einige Stunden konnten die gegossenen Gele direkt für die SDS-PAGE verwendet werden oder zunächst in feuchten Tüchern bei 4 °C bis zur Nutzung gelagert werden.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

	Trenngel 12,5 %	**Trenngel 15 %**	**Sammelgel 7,5 %**
H_2O	1,88 mL	1,38 mL	1,23 mL
30 % Acrylamid-Stammlösung	2,5 mL	3,0 mL	0,63 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,5 mL	1,5 mL	--
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	--	--	0,63 mL
10 % SDS-Lösung	0,06 mL	0,06 mL	0,03 mL
10 % APS	0,06 mL	0,06 mL	0,03 mL
TEMED	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL

Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst mit 5x Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Die Gelkammer wurde mit 1 x SDS-Laufpuffer (Kapitel 2.1.10) gefüllt und das Gel hineingestellt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, wobei die Auftragsmenge versuchsabhängig war. Als Größenstandard wurden etwa 5 µL *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 120 V und 400 mA solange, bis die Lauffront eine gewünschte Höhe erreicht hatte.

Zur Detektion der Proteine wurde eine Coomassie-Färbung oder eine *Western-Blot*-Analyse durchgeführt.

2.2.3.4 Färben & Entfärben von SDS-Gelen mit Coomassie

Für die Coomassie-Färbung wurde das SDS-Gel in einer Schale mit Coomassie-Färbelösung (Kapitel 2.1.10) für 30 min inkubiert. Das Entfernen von ungebundenem Farbstoff erfolgte mit Coomassie-Entfärbelösung (Kapitel 2.1.10), wobei das Gel für

mehrere Stunden oder ü. N. in der Entfärbelösung inkubiert wurde, bis die Hintergrundfärbung des Gels nicht mehr sichtbar war.

2.2.3.5 Western-Blot

Die Proteine wurden vom SDS-Gel auf eine 0,45 µm Amersham™ Hybond™ PVDF Blotting Membran (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, Chicago USA) transferiert. Die Membran wurde zunächst 90 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend in 1x Transferpuffer (Kapitel 2.1.10) überführt. Das Gel aus der SDS-PAGE wurde anschließend luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Es wurden zusätzlich Filterpapier und Schwämme zwischen Elektrode und Gel bzw. Elektrode und Membran gelegt. Dieses Sandwich wurde in eine Blottingkammer gestellt, sodass die Seite mit der Nitrozelllulose-Membran zur Anode ausgerichtet war. Hierfür wurde das System Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell-System (BIO-RAD LABORATORIES, Hercules, USA) genutzt. Die Kammer wurde mit 1x Transferpuffer gefüllt und der Transfer erfolgt für 2 h bei einer Stromstärke von 400 mA und einer Spannung von 100 V. Nachdem der Transfer abgeschlossen war, wurde die Membran in ein 50 mL Röhrchen gegeben und mit TBS-Tween/5 % BSA (w/v) für 1 h bei RT auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tabelle 6) erfolgte rollend ü. N. bei 4 °C. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit TBS-Tween (Kapitel 2.1.10) entfernt. Der sekundäre Antikörper (Tabelle 6) wurde zugegeben und für 1 h rollend bei RT inkubiert. Dieser war mit HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde die Membran zunächst dreimal mit TBS-Tween für jeweils 10 min, und anschließend mindestens dreimal für je 10 min mit TBS gewaschen um sie anschließend zu detektieren.

Die Detektion erfolgte mit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat oder mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Entwicklerlösung wurde auf die Membran gegeben und nach kurzer Inkubation im Detektor (ECL Chemocam Imager, INTAS, Ahmedabad, Indien) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten entwickelt. Zur Aufnahme der Bilder wurde die Software

Chemostar Professional (INTAS, Ahmedabad, Indien) genutzt.

2.2.3.6 Fluoreszenzmarkierung von PDIA6, PDIA6wo und IL-6

Rekombinant hergestellte PDIA6 und PDIA6wo (PDIA6 ohne KDEL-Motiv) (Produktion Arbeitsgruppe Grötzinger) in PBS pH 7,4 wurde für Durchflusszytometrie- und Immunofluoreszenzmikroskopie-Experimente mit einem Fluorophor markiert. Das Interleukin IL-6 wurde als Kontrolle auf die gleiche Weise markiert. Als Fluorophor wurde DY-490-NHS-Ester (DYOMICS, Jena, Germany) verwendet. Dieses bindet an die Lysin-Reste der Proteine. PDIA6 weist 29 Lysin-Reste auf und IL-6 hat 14 Lysin-Reste.

Die Proteine wurden mit einem 5-fachen Überschuss des grün-fluoreszierenden DY-490-NHS-Ester (DYOMICS, Jena, Germany) ü. N. bei 4 °C inkubiert. Um anschließend ungebundenen Farbstoff zu entfernen wurden die Proteine zunächst auf eine, mit PBS pH 7,4 equilibrierte, Nap5^{TM} Säule und danach auf eine Nap10^{TM} Säule (GE HEALTHCARE, Chicago, USA) gegeben und in beiden Fällen mit PBS pH 7,4 eluiert. Die finale Konzentration wurde mit dem NanoDrop (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH , Erlangen, Deutschland) ermittelt.

2.2.3.7 Markieren von HEK293T-Zellen mit fluoreszenzmarkierter PDIA6 und PDIA6wo

HEK293T-Zellen wurden am Vortag mit einer Zellzahl von $1*10^5$ in 6-Well-Platten ausgesät und bis zum nächsten Tag zu einem *Monolayer* kultiviert. Das DMEM-FCS-P/S-Medium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit warmen PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurden jeweils 0,5 µM fluoreszenzmarkierte PDIA6 oder PDIA6wo in 0,5 mL DMEM zu den Zellen gegeben. Zudem wurde fluoreszenzmarkiertes IL-6 in gleicher Konzentration zu den Zellen gegeben. Dies diente als Kontrolle, da die Zellen keinen IL-6R exprimieren. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C mit den markierten Proteinen inkubiert.

Zudem wurde nicht-markiertes PDIA6 Protein und das KDEL-Peptid (Sequenz: CYDVELDDLGKDEL) (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA) mit fluoreszenzmarkierter

PDIA6 bzw. PDIA6wo ko-inkubiert. Dabei wurde das KDEL-Peptid in den Konzentrationen 2 µM, 5 µM und 10 µM zu den Zellen gegeben.

Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit warmen PBS pH 7,4 gewaschen um ungebundene markierte Proteine zu entfernen. Die Zellernte erfolgte mit kaltem PBS pH 7,4 mit Natriumazid (0,05 %) und die Zellen wurden für Durchflusszytometrie und Immunofluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

2.2.3.8 Durchflusszytometrie

Um extrazelluläre Proteine auf der Zelloberfläche von HEK293T-Zellen zu analysieren, wurden $1*10^6$ Zellen geerntet und mit PBS pH 7,4 mit Natriumazid (0,05 %) gewaschen (Zentrifugation bei 1000 x g für 10 min). Der Primärantikörper (Tabelle 6) wurde nach Angaben des Herstellers in 100 µL FACS-Puffer (Kapitel 2.1.10) verdünnt oder 1 µg Antikörper in 100 µL FACS-Puffer für $1*10^6$ Zellen verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h auf Eis. Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (1000 x g für 10 min) und anschließend einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 6) wurde 1:100 pro Probe in 100 µL FACS-Puffer verdünnt und im Dunkeln auf Eis für 1 h mit den Zellen inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Sekundärantikörpers wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 500 µL FACS-Flow (Kapitel 2.1.10) aufgenommen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Primär-, jedoch mit Sekundärantikörper, herangezogen, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers auszuschließen.

Um intrazelluläre Proteine mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, wurden die Zellen nach der Ernte zunächst mit 4 % PFA (v/v) in PBS pH 7,4 für 20 min fixiert und anschließend überschüssiges PFA durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 0,1 % (w/v) Saponin in FACS-Puffer für 15 min, gefolgt von einem Waschschritt. Da es sich bei der Permeabilisierung mit Saponin um eine reversible Methode handelt, wurden im Folgenden alle Puffer mit 0,1 % Saponin versetzt. Die Bindung der Antikörper erfolgte wie zuvor beschrieben und das Zellpellet wurde am Schluss in FACS-Flow ohne Saponin aufgenommen.

Die Proben wurden am BD FACS Canto 2 Gerät (BECTON DICKINSON BIOSCIENCES,

New Jersey, USA) gemessen und die ermittelten Daten mit der Software BD FACS Canto 2 aufgezeichnet (BECTON DICKINSON BIOSCIENCES, New Jersey, USA). Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express 3 (DE NOVO SOFTWARE, Glendale, USA) und Excel 2010 (MICROSOFT, Redmond, USA).

2.2.3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Platten mit einer Zellzahl von $1*10^5$ auf 13 mm TC-Coverslips ausgesät und zwei Tage bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Inkubation mit 3 µM der fluoreszenzmarkierten PDIA6 erfolgte für 3 h bei 37 °C. Außerdem erfolgte eine Vorinkubation für 30 min mit 20 µM KDEL-Peptid oder 10 µM PDIA6. Um das ungebundene markierte Protein zu entfernen wurden die Zellen fünfmal mit warmen PBS pH 7,4 gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4 % (v/v) PFA für 20 min bei RT, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS pH 7,4. Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen im nächsten Schritt mit 0,2 % (w/v) Saponin in PBS pH 7,4 für 5 min permeabilisiert und im Folgenden alle Puffer mit 0,2 % (w/v) Saponin versetzt. Die Zellen wurden mit 0,12 % (v/v) Glycin in PBS pH 7,4 für 10 min inkubiert. Es folgt die Blockierung der Zellen mit 10 % (v/v) FCS in PBS pH 7,4 für 1 h bei RT. Die primären oder bereits fluoreszenzgekoppelten Antikörper wurden in Blockierlösung nach Angaben des Herstellers (Tabelle 6) verdünnt und zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte unter humiden Konditionen für 1 h bei 4 °C. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurden die Zellen dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Tabelle 6) wurde in Blockierlösung nach Angaben des Herstellers verdünnt und mit den Zellen für 1 h bei 4 °C unter humiden Bedingungen inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Coverslips viermal mit PBS pH 7,4 und anschließend zweimal mit ddH_2O gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Coverslips auf mikroskopische Objektträger aufgezogen. Hierfür wurde ein Mix aus 1 mL Mowiol® 4-88 Reagenz (Endkonzentration 151 mg/mL) (CALBIOCHEM, LaJolla, USA) und 100 µL DAPCO (Endkonzentration 18 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA) mit 1 µL DAPI (Endkonzentration 1 µg/mL) (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA) versetzt. Die Coverslips wurden luftblasenfrei auf etwa 20 µL des Mowiol/DAPCO-DAPI-Mixes aufgezogen. Die Objektträger wurden ü. N. im Dunkeln getrocknet und konnten anschließend mikroskopische analysiert

werden (Olympus IX 81 cLSM Mikroskop mit Software FluoView 1000, ObjectiveLens UPLSAPO 60X O NA:1.35; OLYMPUS, Tokyo, Japan). Die Bildbearbeitung fand mit der Software Fluoview FV 3000 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) statt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss des KDEL-Motivs auf die Sekretion und Zelloberflächenassoziation von PDIA6

Ein möglicher Inaktivierungsmechanismus von ADAM17 ist das Konvertieren der offenen MPD17 in die geschlossene Form, sodass ADAM17 seine Substrate nicht mehr prozessieren kann. Dies geschieht durch eine Isomerisierungsreaktion von zwei Disulfidbrücken innerhalb der MPD und wird durch PDIs hervorgerufen. Da diese Reaktion an der Zelloberfläche stattfindet, ist es erforderlich, dass sich die PDIs in der Nähe der Zelloberfläche befinden. Darüber, wie ER-residente KDEL-Motiv tragende Proteine sekretiert werden können und damit dem Retentionsmechanismus entgehen können, sind unterschiedliche Mechanismen vorstellbar. So wurde eine Sekretion von PDIA1 unabhängig vom Golgi-Apparat, als auch eine Sekretion über den Golgi-Apparat, beschrieben (Araujo, Fernandes*, et al.*, 2017; Araujo, Zeidler*, et al.*, 2017). Im letzteren Fall ist es vorstellbar, dass das KDEL-Motiv, wie im Fall für GRP78, durch die Interaktion mit anderen Proteinen maskiert wird. Andererseits ist es zudem vorstellbar, dass bei einer hohen Expressionsrate von KDEL-Motiv tragenden Proteinen die Bindungskapazität der KDEL-Rezeptoren gesättigt ist. Dies wäre z. B. bei ER-Stress vorstellbar, bei dem eine Vielzahl von Chaperonen exprimiert wird. Um einen ersten Einblick zu erhalten, welche Rolle das KDEL-Motiv von PDIA6 während der Sekretion bzw. Zelloberflächenassoziation spielt, wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Fehlen des KDEL-Motivs von überexprimierter PDIA6 (PDIA6wo), im Gegensatz zur überexprimierten Wildtyp Variante, zur Sekretion führte (Abbildung 8, Bartels *et al.*, 2019). Dies geschah sowohl in den N-terminal myc-markierten, als auch in den unmarkierten Varianten von PDIA6. Dementsprechend reichte die Deletion des KDEL-Motivs aus, um die Retention der PDIA6 aufzuheben und das Protein zu sekretieren.

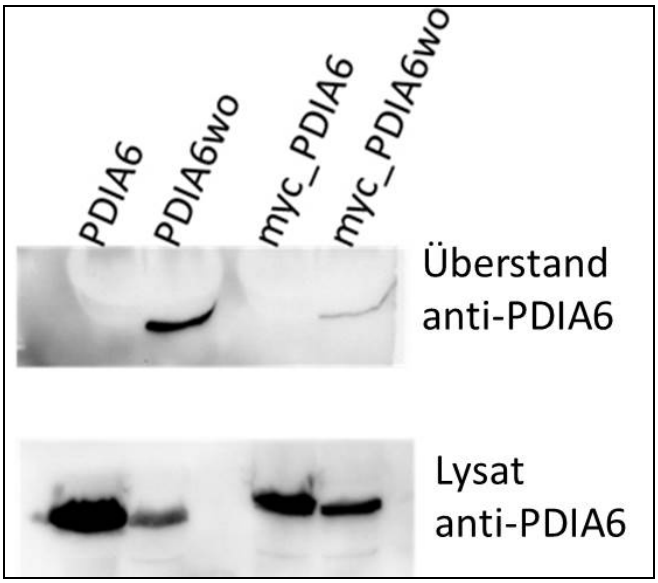


Abbildung 8: **PDIA6wo wird in den Überstand sekretiert.**

Wildtyp PDIA6 und PDIA6 ohne KDEL-Motiv (PDIA6wo), sowie jeweils N-terminale myc-markierte Varianten, wurden in HEK293T-Zellen überexprimiert. Die Proteine des Überstands und der entsprechenden Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit *Western-Blot* analysiert. PDIA6wo wurde, unabhängig von der myc-Markierung, sekretiert.

Als nächstes sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Deletion des KDEL-Motivs auf die Assoziation von PDIA6 mit der Zelloberfläche hatte. Dafür wurde eine Oberflächen-Biotinylierungsstudie durchgeführt. PDIA6 und PDIA6wo wurden in HEK293T-Zellen überexprimiert und anschließend sämtliche Oberflächenproteine mit Biotin markiert. Nach Lyse der Zellen wurden die biotinylierten Proteine präzipitiert und mittels SDS-Page getrennt. Anschließend erfolgte die Analyse im *Western-Blot* mit Antikörpern gegen PDIA6 und β-Actin. β-Actin diente dabei, durch seine Eigenschaft als *housekeeping*-Gen, als Kontrolle und konnte in allen Zelllysaten gleichermaßen nachgewiesen werden (Abbildung 9). Es konnte festgestellt werden, dass eine Überexpression von PDIA6 zu einem Anstieg dieser PDI an der Zelloberfläche führte. Im Gegensatz dazu zeigte die Variante ohne KDEL-Motiv (PDIA6wo) keine erhöhte Oberflächenassoziation und war mit der untransfizierten mock-Kontrolle vergleichbar. Die Integrität der biotinylierten Zellen konnte mit dem *Western-Blot* gegen β-Actin als zytoplasmatisches *housekeeping*-Gen bestätigt werden, da es nicht in den Präzipitaten nachgewiesen wurde.

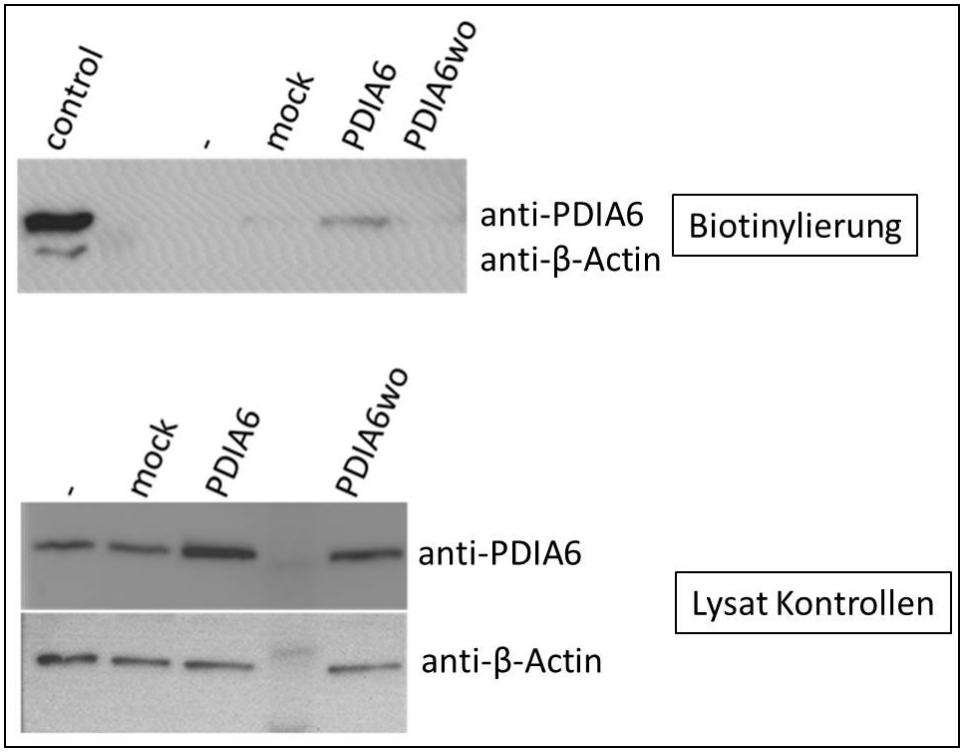


Abbildung 9: Überexprimierte PDIA6 ist mit der Zelloberfläche assoziiert.

PDIA6 und PDIA6wo wurden in HEK293T-Zellen überexprimiert. Nachdem alle Oberflächenproteine biotinyliert, präzipitiert und mit SDS-PAGE getrennt wurden, wurde eine *Western-Blot* Analyse mit den Antikörpern gegen PDIA6 und β-Actin durchgeführt. Als Kontrolle diente Zelllysat. PDIA6 mit KDEL-Motiv konnte auf der Zelloberfläche detektiert werden.

3.2 Reduktion der PDIA6-Bindekapazität von HEK293T-Zellen durch das KDEL-Peptid

Um die Notwendigkeit des KDEL-Motivs für die Interaktion zwischen PDIA6 und der Zelloberfläche weiter zu verifizieren, wurde rekombinant hergestellte PDIA6 und PDIA6wo mit einem grünen Fluorophor markiert (im Folgenden als PDIA6* bzw. PDIA6wo* bezeichnet). In einem ersten experimentellen Ansatz wurden jeweils 0,5 µM PDIA6* bzw. PDIA6wo*, sowie PBS als Kontrolle, mit HEK293T-Zellen inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Proben auf die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von den mit PDIA6* inkubierten Zellen, welche auf 100 %

gesetzt wurden, normalisiert. Diese Probe stellte die maximale Oberflächenbindung bzw. PDIA6-Aufnahme dar (Abbildung 10).

Die Analyse der Experimente zeigte, dass sowohl PDIA6* als auch PDIA6wo* mit der Zelloberfläche interagieren. Zudem ist die Bindungskapazität von PDIA6wo* an HEK293T-Zellen signifikant geringer als die von PDIA6*.

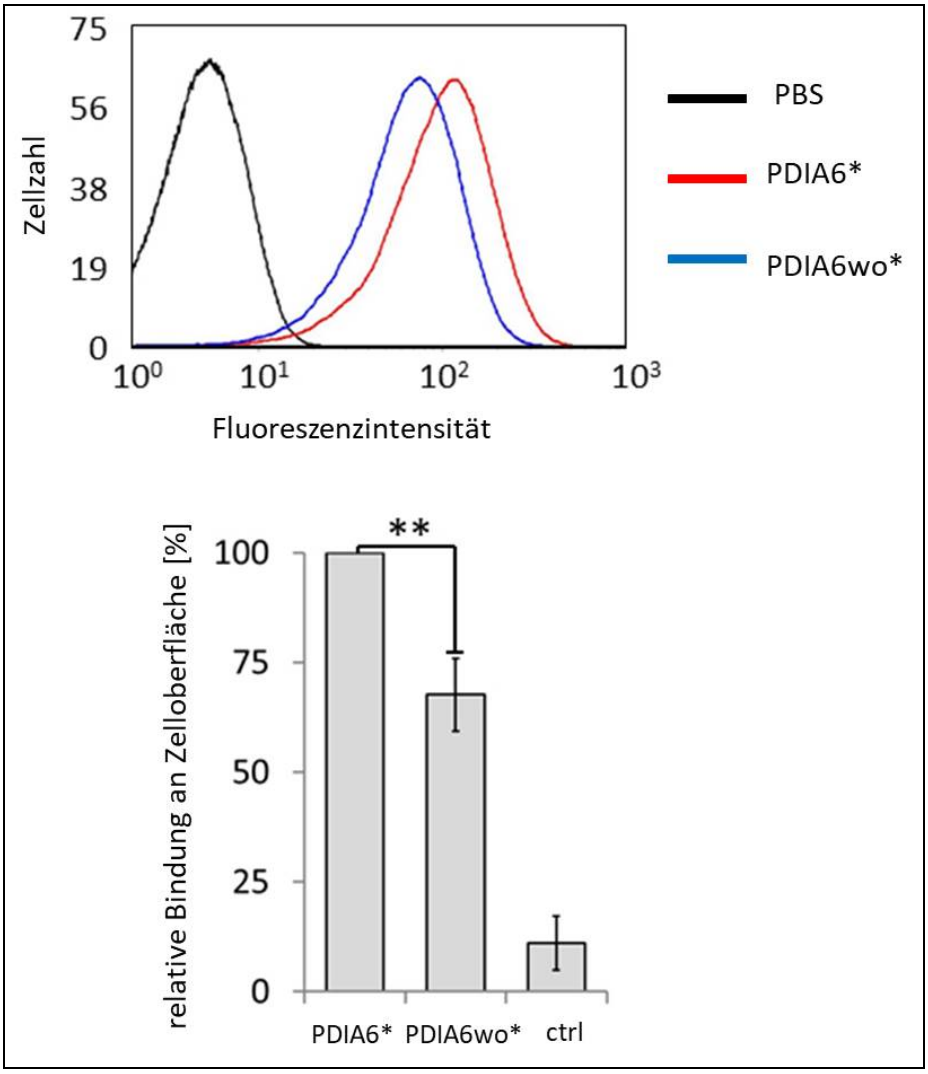


Abbildung 10: Analyse der Bindungskapazitäten von HEK293T-Zellen für PDIA6 in Abhängigkeit des KDEL-Motivs.

Rekombinante PDIA6 und PDIA6wo wurden mit einem Fluorophor markiert (PDIA6* und PDIA6wo*) und jeweils 0,5 µM mit HEK293T-Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Bindung an die Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von PDIA6* auf 100 % gesetzt. Die Bindekapazität von PDIA6wo* wurde zu diesem Wert in Relation gesetzt.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde IL-6 als Negativkontrolle verwendet. IL-6 wurde auf gleiche Weise wie die PDIA6 Varianten mit dem Fluorophor markiert (Im Folgenden als IL-6* bezeichnet) und konnte, aufgrund des Fehlens eines IL-6 Rezeptors in HEK293T-Zellen, nicht mit ihnen interagieren. Um zu analysieren, ob die höhere Bindung von PDIA6* im Vergleich zu PDIA6wo*, tatsächlich durch die Bindung des KDEL-Motivs an die Zellen erfolgte, wurden HEK293T-Zellen mit PDIA6* und dem KDEL-Peptid in steigender Konzentration (2 µM, 5 µM und 10 µM) ko-inkubiert. Durch den Überschuss an KDEL-Peptid sollten die KDELR an der Zelloberfläche, für eine Bindung des KDEL-Motivs von PDIA6*, blockiert werden. Um die Spezifität der Bindung zu verifizieren, wurde PDIA6* zudem mit gleicher Konzentration unmarkierter PDIA6 ko-inkubiert, da sie auch über andere Motive an ihre Substrate auf der Zelloberfläche binden kann (z. B. an ADAM17). Die Analyse erfolgte, wie zuvor, mittels Durchflusszytometrie und die Quantifizierung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurden auf PDIA6* normalisiert (Abbildung 11).

Die Auswertung ergab, dass die Interaktion von PDIA6* mit der Zelloberfläche spezifisch erfolgte, da die Fluoreszenzintensität wesentlich höher ist, als die der Zellen, welche mit IL-6* inkubiert wurden. Das KDEL-Peptid blockierte mit steigender Konzentration die Bindung von PDIA6* um etwa 25 % für 2 µM KDEL-Peptid, und 40 % für 5 µM und 10 µM KDEL-Peptid. Eine Ko-Inkubation mit gleicher Konzentration unmarkierter PDIA6 zeigte eine Reduktion der Bindung um etwa 25 %. Diese, im Vergleich zu mit KDEL-Peptid behandelten Zellen, starke Reduktion der Bindung bestätigt das Vorhandensein weiterer Bindungsmotive, neben dem KDEL-Motiv, innerhalb der PDIA6.

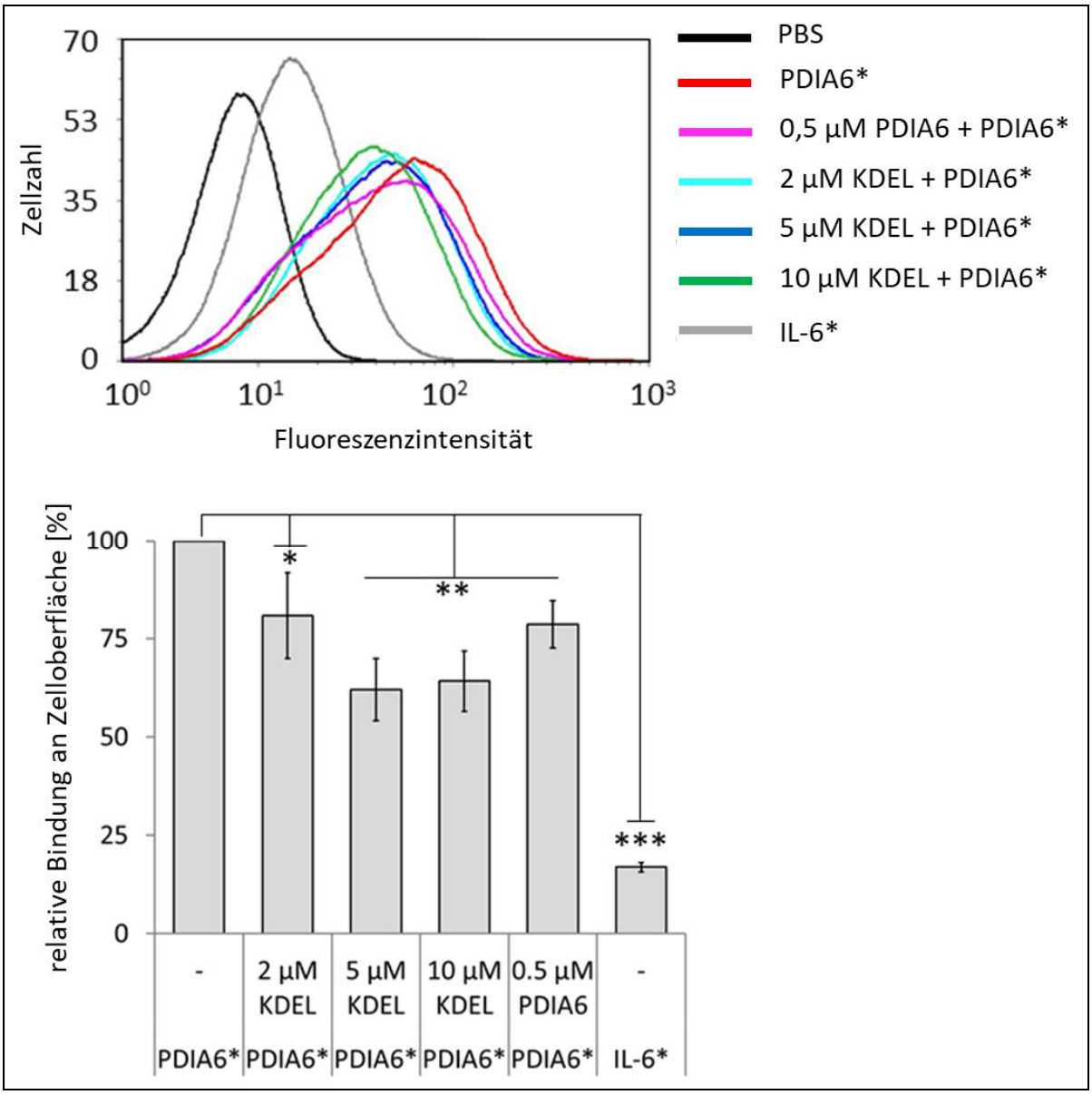


Abbildung 11: Die PDIA6*-Bindung auf der Zelloberfläche kann durch KDEL-Peptid und PDIA6 blockiert werden.

Rekombinante PDIA6 wurden mit einem Fluorophor markiert (PDIA6*) und 0,5 µM mit HEK293T-Zellen inkubiert. Um Bindestellen zu blockieren wurde zusätzlich mit steigender Konzentration des KDEL-Peptides (2 µm, 5 µM, 10 µM) oder unmarkierter PDIA6 (0,5 µM) ko-inkubiert. Da HEK293T-Zellen keinen IL-6 Rezeptor exprimieren diente markiertes IL-6 (IL-6*) als Negativkontrolle. Die Bindung an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von PDIA6* auf 100 % gesetzt und weitere Messwerte in Relation dazu gesetzt.

3.3 Herstellen von *kdelr1 knock-down*-Zellen mit dem CRISPR/Cas-System

Da das KDEL-Motiv für die Bindung von PDIA6 an die Zelloberfläche notwendig ist, war zu vermuten, dass auch der KDELR für den Transport der PDIs an die Zelloberfläche notwendig ist. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mittels des CRISPR/Cas-Systems hergestellt, welche einen *knockdown* im *kdelr1* Gen aufwiesen. Dabei wurde der KDELR1 gewählt, da er im Vergleich zu den anderen zwei homologen Formen (KDELR2 und KDELR3) am stärksten exprimiert wird (Raykhel *et al.*, 2007). Außerdem bindet er als einziger KDELR mit einer höheren Affinität an das KDEL- als an das HDEL-Motiv (Henderson *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2016). Ein kompletter *knockout* des Gens konnte nicht erreicht werden. Um das Maß der Expressionsabnahme zu untersuchen wurden zwei Zelllinien der CRISPR/Cas Klone (Klon 3 und Klon 7) gegen HEK293T-wildtyp Zellen im Durchflusszytometer, mit einem Antikörper gegen KDELR1 (Tabelle 6), analysiert (Abbildung 12). Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden. Dies erfolgte zum einen intrazellulär mit permeabilisierten Zellen, um die gesamte Menge des KDELR1 zu bestimmen, und zum anderen extrazellulär mit nicht-permeabilisierten Zellen. Letzteres diente der Untersuchung, ob der KDELR1 überhaupt auf der Zelloberfläche detektierbar war, sowie der Analyse der Auswirkungen des *kdelr1 knockdowns* auf den KDELR1 an der Zelloberfläche.

Für Klon 3 konnte eine Abnahme der *kdelr1* Expression auf 60 % für die gesamte KDELR1-Menge, und auf 70 % an der Zelloberfläche, gezeigt werden. Die Expression des KDELR1 reduzierte sich in Klon 7, bezogen auf die gesamte Proteinmenge, auf 40 % und, auf 60 % auf der Zelloberfläche. Somit konnten zwei Zelllinien für weitere Untersuchungen generiert werden, welche insgesamt weniger KDELR1 exprimieren, als die Wildtyp-HEK293T-Zellen, und auch weniger KDELR1 auf der Zelloberfläche aufweisen.

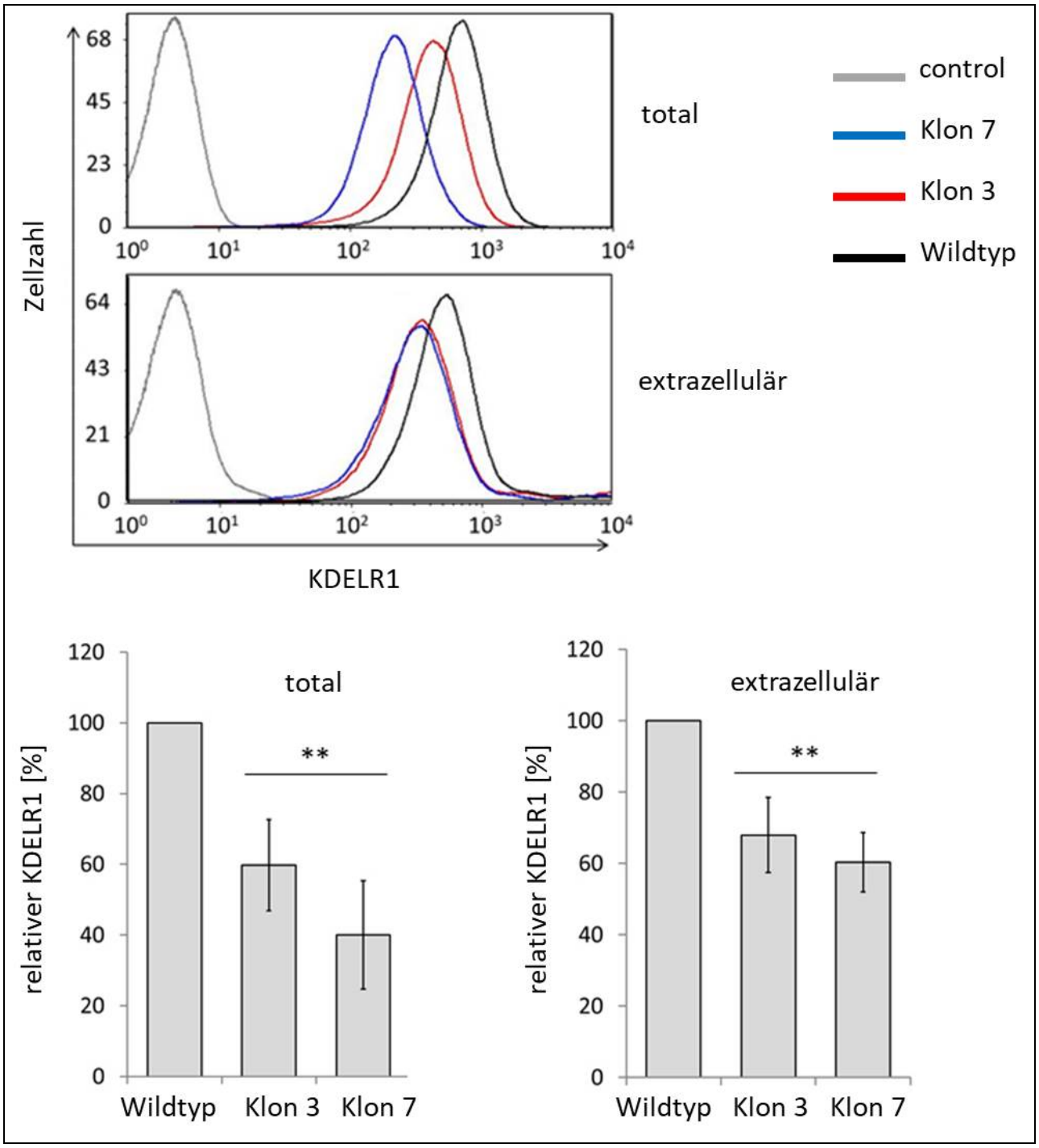


Abbildung 12: Analyse der *kdelr1 knock-down*-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Mittels der CRISPR/Cas-Methode wurde ein *knockdown* im *kdelr1* Gen in zwei HEK293T-Zelllinien erzielt. Das Maß des *knockdowns* wurde sowohl intrazellulär (gesamte Menge des KDELR1) als auch extrazellulär (KDELR1 an der Zelloberfläche) mittels Durchflusszytometrie mit einem KDELR1-Antikörper (ab69659, ABCAM, Cambridge, UK) bestimmt. Als Kontrolle dienten HEK293T-Zellen, welche nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden.

3.4 *kdelr1 knock-down*-Zelllinien haben ein reduziertes Bindungspotential von exogener PDIA6 und PDIA6wo

Um zu verifizieren, dass die Assoziation von PDIA6 auf der Zelloberfläche vom KDELR1 abhängt, wurden HEK293T-Wildtyp-Zellen und *kdelr1 knock-down*-Zellen mit 0,5 µM fluoreszenzmarkierter PDIA6* bzw. PDIA6wo* inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 13). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit 0,5 µM fluoreszenzmarkiertem IL-6* bzw. mit PBS inkubiert. Es wurde auf die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Wildtyp-Zellen, die mit PDIA6* inkubiert waren, normalisiert. Dabei wurde diese Fluoreszenzintensität 100 % gesetzt, da die Wildtyp-Zelllinie die normale, zelltypspezifische Menge an KDELR1 exprimieren. Die Fluoreszenzintensitäten der *kdelr1 knock-down* Klone 3 und 7 wurden zu der Fluoreszenzintensität des Wildtyps in Bezug gesetzt.

Durch eine Abnahme der Expression des *kdelr1* Gens, in den *kdelr1 knock-down*-Zelllinien Klon 3 und Klon 7, konnte weniger PDIA6* im Vergleich zum Wildtyp an die Zelloberfläche binden. Im Verhältnis hierzu fiel die Bindung von PDIA6wo* nochmals geringer aus. Betrachtet man lediglich den Wildtyp so bindet etwa 30 % weniger PDIA6wo* als PDIA6* an die Zelloberfläche. Für die *kdelr1 knock-down*-Zelllinien Klon 3 und 7 konnte jeweils eine geringere Bindung von etwa 30 % für PDIA6* und PDIA6wo* im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass der KDELR1 an der Bindung von exogen zugegebener PDIA6* an die Zelloberfläche beteiligt war. Im Folgenden sollten die Auswirkungen des *kdelr1 knockdowns* auf den Transport von endogenen PDIs an die Zelloberfläche, sowie deren Zelloberflächenassoziation, untersucht werden.

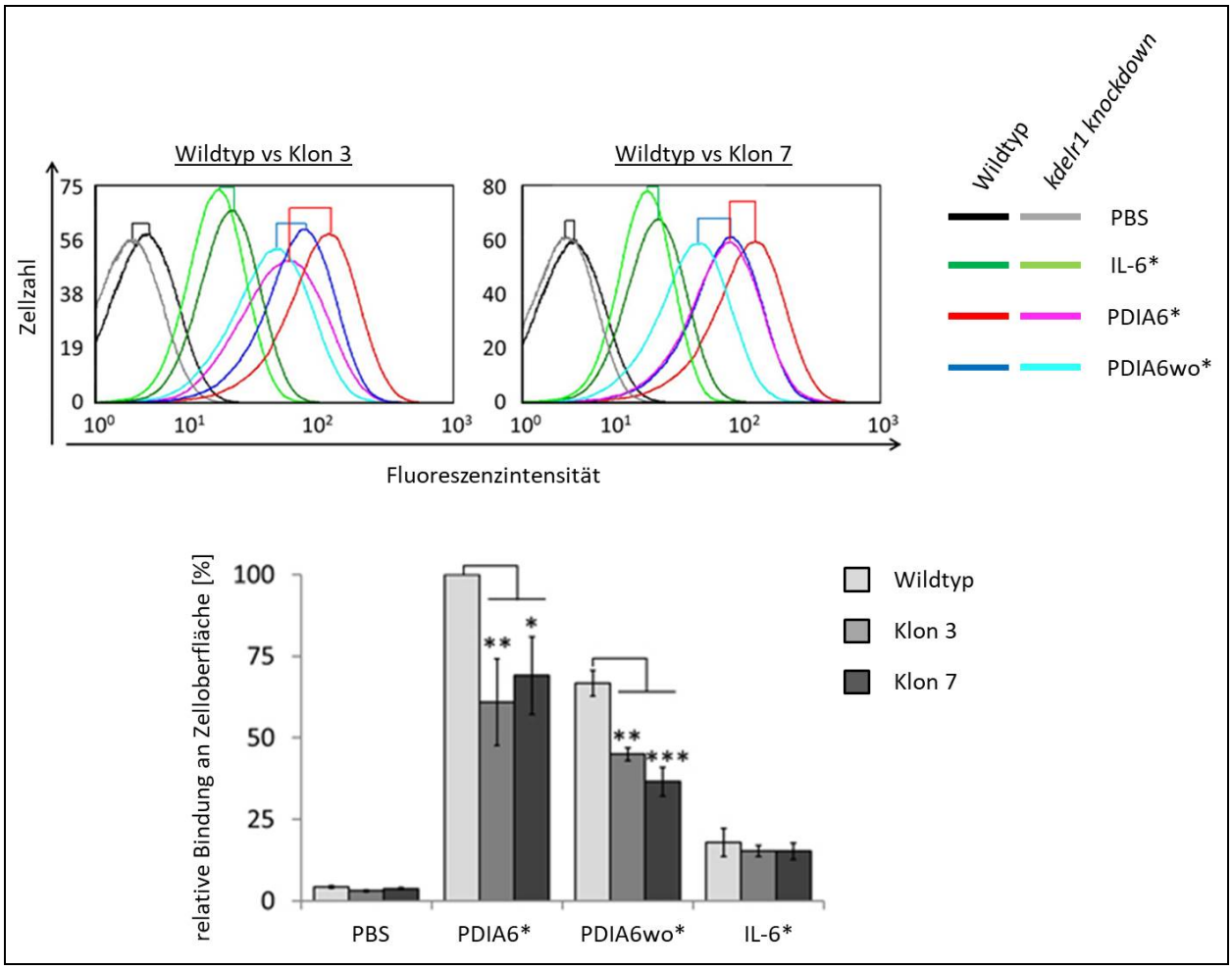


Abbildung 13: Assoziation von fluoreszenzmarkierter PDIA6* und PDIA6wo* an die Zelloberfläche von *kdelr1 knock-down*-Zellen.

0,5 µM fluoreszenzmarkierte PDIA6 und PDIA6wo wurden mit Wildtyp-HEK293T-Zellen und *kdelr1 knock-down*-Zellen inkubiert und die Bindung an die Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle diente markiertes IL-6* bzw. PBS. Die Bindung von PDIA6* an die Oberfläche der Wildtyp-Zellen wurde dabei auf 100 % gesetzt und weitere Messungen hierzu in Bezug gesetzt.

3.5 Expression von PDIs an der Zelloberfläche in *kdelr1 knock-down*-Zellen

Die Zelloberflächenexpression für endogene PDIA3 und PDIA6 in HEK293T-Zellen konnte durch Oberflächen-Biotinylierungsexperimente und anschließende *Western-Blot*-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 14). Dabei war ein schwaches Signal

für PDIA3 und PDIA6 auf der Zelloberfläche detektierbar. Die totale Proteinmenge der Zelllysate (Kontrollen) war deutlich höher. Als Kontrolle wurde das zytoplasmatische *housekeeping*-Gen β-Actin herangezogen, welches in den Zelllysaten, jedoch nicht auf der Oberfläche, nachgewiesen werden konnte. Die Proteinmengen von PDIA3 und PDIA6 auf der Zelloberfläche waren in den *Western-Blot* Analysen sehr niedrig und schwer detektierbar, weswegen die Analyse von endogenen PDIs in darauffolgenden Experimenten mittels Durchflusszytometrie stattgefunden hat.

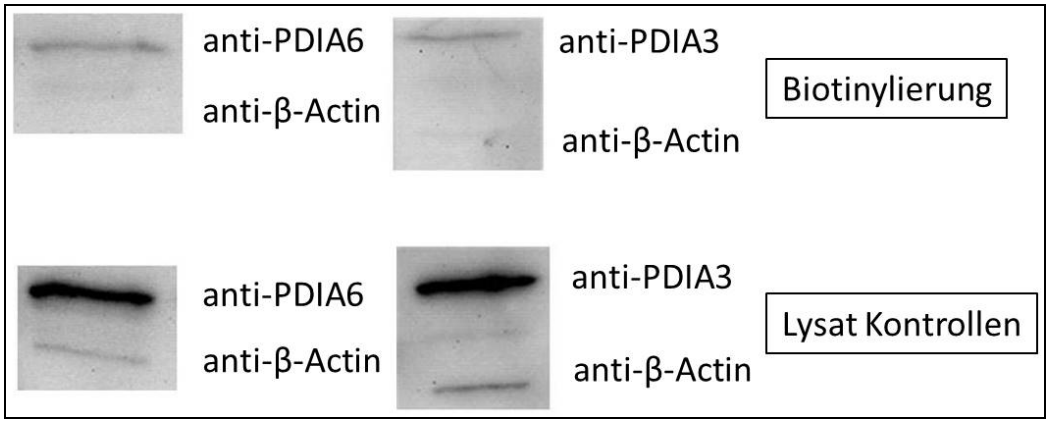


Abbildung 14: Endogene PDIA6 und PDIA3 sind auf der Zelloberfläche assoziiert.

Durch die Analyse der Oberflächen-Biotinylierung von HEK293T-Zellen mittels *Western-Blot* gegen PDIA3, PDIA6 und β-Actin konnte endogene PDIA3 und PDIA6 auf der Zelloberfläche detektiert werden. Als Kontrolle diente Zelllysat.

Mittels Durchflusszytometrie wurde untersucht, ob der KDELR1 an dem Transport von endogener PDIA1, PDIA3 und PDIA6 an die Zelloberfläche beteiligt ist. Hierfür wurden nicht-permeabilisierte HEK293T-Wildtyp-Zellen und *kdelr1 knock-down*-Zellen jeweils mit entsprechenden Antikörpern gegen die drei PDIs markiert (Abbildung 15). Zur Quantifizierung wurde die mittlere Fluoreszenz der entsprechenden PDIs im Wildtyp auf 100 % gesetzt und die mittlere Fluoreszenzintensität in den *kdelr1 knock-down*-Zellen jeweils in Relation dazu gesetzt. Als Kontrolle dienten Proben ohne primären Antikörper. Für alle drei PDIs konnte eine reduzierte Zelloberflächenassoziation in beiden Zelllinien der *kdelr1 knock-down* Zellen gezeigt werden. Bei gleichzeitiger Reduktion des *kdelr1*-Gens auf

40–60 % Expressionsstärke, kommt es zu 30-40 % weniger PDIA1, PDIA3 und PDIA6 auf der Zelloberfläche. Es konnte demnach eine Beteiligung des KDELR1 auf die Zelloberflächenassoziation von endogenen PDIs gezeigt werden.

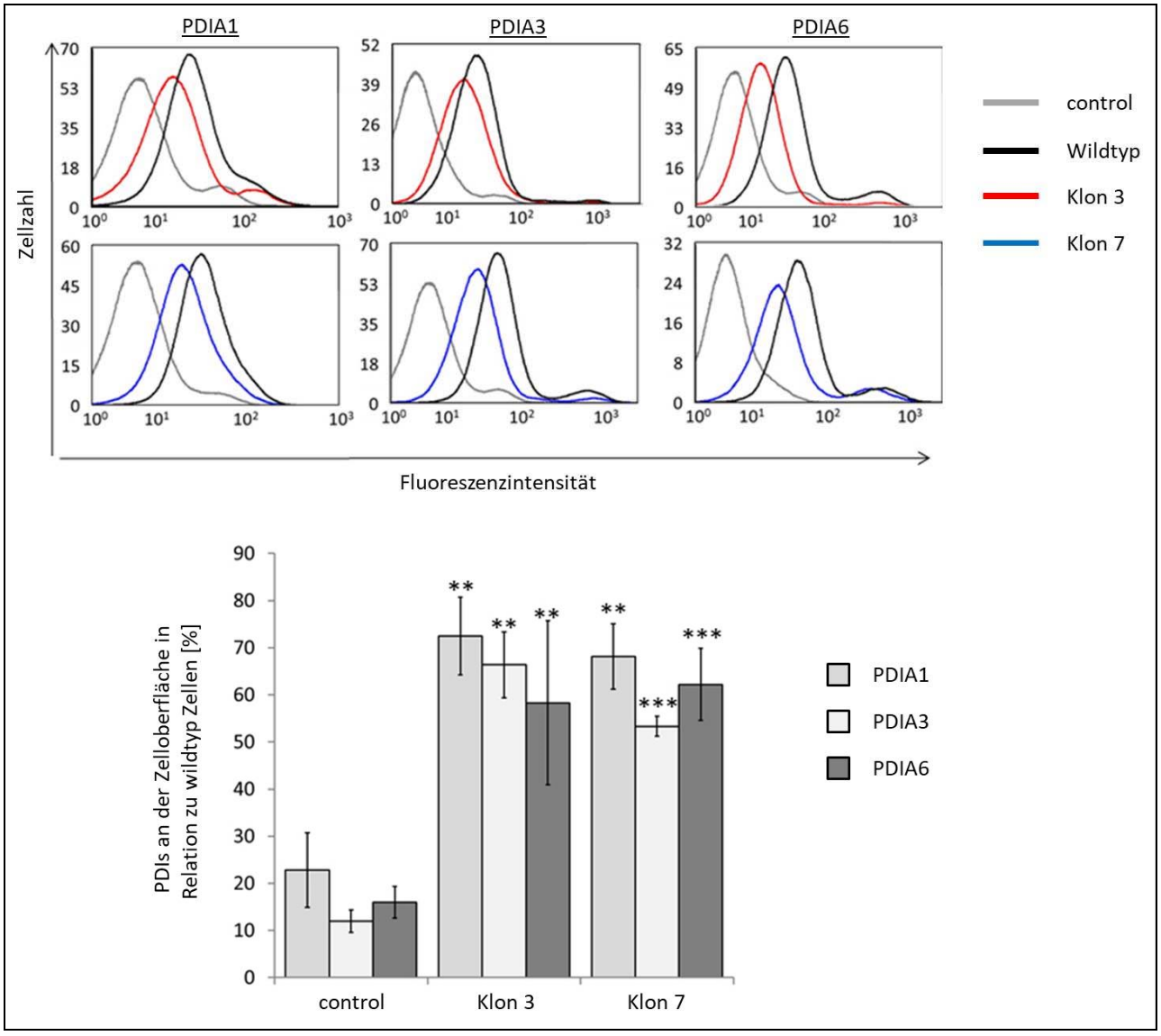


Abbildung 15: Auswirkungen des *kdelr1 knockdowns* auf den Transport endogener PDIs an die Zelloberfläche.

Nicht-permeabilisierte HEK293T-Zellen und *kdelr1 knock-down*-Zellen wurden mit Antikörpern gegen endogene PDIA1, PDIA3 und PDIA6 markiert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die mittlere Fluoreszenz der drei PDIs an der Zelloberfläche der *kdelr1 knock-down*-Zellen wurde in Relation zur Fluoreszenzintensität der jeweiligen PDI in Wildtyp-Zellen gesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne primären Antikörper behandelt.

3.6 Immunfluoreszenzanalyse zur Lokalisation markierter PDIA6

Um die Interaktion und Lokalisation von PDIA6* in der Zelle weiter zu untersuchen, wurden eine Immunfluoreszenzanalyse (IFA) durchgeführt. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit 3 µM fluoreszenzmarkierter PDIA6* inkubiert. Da in vorangegangenen Durchflusszytometrie-Analysen bereits gezeigt werden konnte, dass mögliche PDIA6 Bindestellen durch das KDEL-Peptid oder unmarkierte PDIA6 blockiert werden konnten, und sich dadurch das Bindepotential von PDIA6* verringerte, wurde diese Strategie auch für die IFA angewandt. Durch eine Ko-Inkubation mit 20 µM KDEL-Peptid oder 10 µM unmarkierter PDIA6 sollten mögliche PDIA6 Bindestellen blockiert werden. Die Zellmembran wurde mit dem Lektin *Wheat Germ Agglutinin* (WGA, rot) und der Nucleus mit DAPI (türkis) gefärbt (Abbildung 16). Die grün-fluoreszierende PDIA6* konnte dabei nah an der Zelloberfläche lokalisiert werden und zeigte teils eine Kolokalisation mit WGA. Sie ist somit, zumindest noch teilweise, an der Zelloberfläche assoziiert. Allerdings konnten einige grüne Signale und damit markierte PDIA6* intrazellulär detektiert werden. Die Spezifität der Bindung konnte wiederum durch die Ko-Inkubation der Zellen mit dem KDEL-Peptid bzw. unmarkierter PDIA6 gezeigt werden. Dabei konnte eine Abnahme der grün-fluoreszierenden PDIA6* detektiert werden. Diese Abnahme erschien auch hier stärker für die Ko-Inkubation mit PDIA6 als mit dem KDEL-Peptid. Dies bestätigte, dass neben dem KDEL-Motiv weitere Bindungsmotive innerhalb der PDIA6 vorhanden sind, und dass die Oberflächenassoziation spezifisch erfolgt.

Da die Assoziation von PDIA6 zum Teil abhängig von dem KDEL-Motiv war, wäre es möglich, dass es sich bei den intrazellulären Signalen um PDIA6* handelte, die retrograd, z. B. von KDELR, in das ER transportiert wurde. Daher wurde zusätzlich eine Ko-Färbung mit PDIA3 als ER-Marker (rot) durchgeführt (Abbildung 17). Hierbei konnte keine Kolokalisation von markierter PDIA6* und ER detektiert werden.

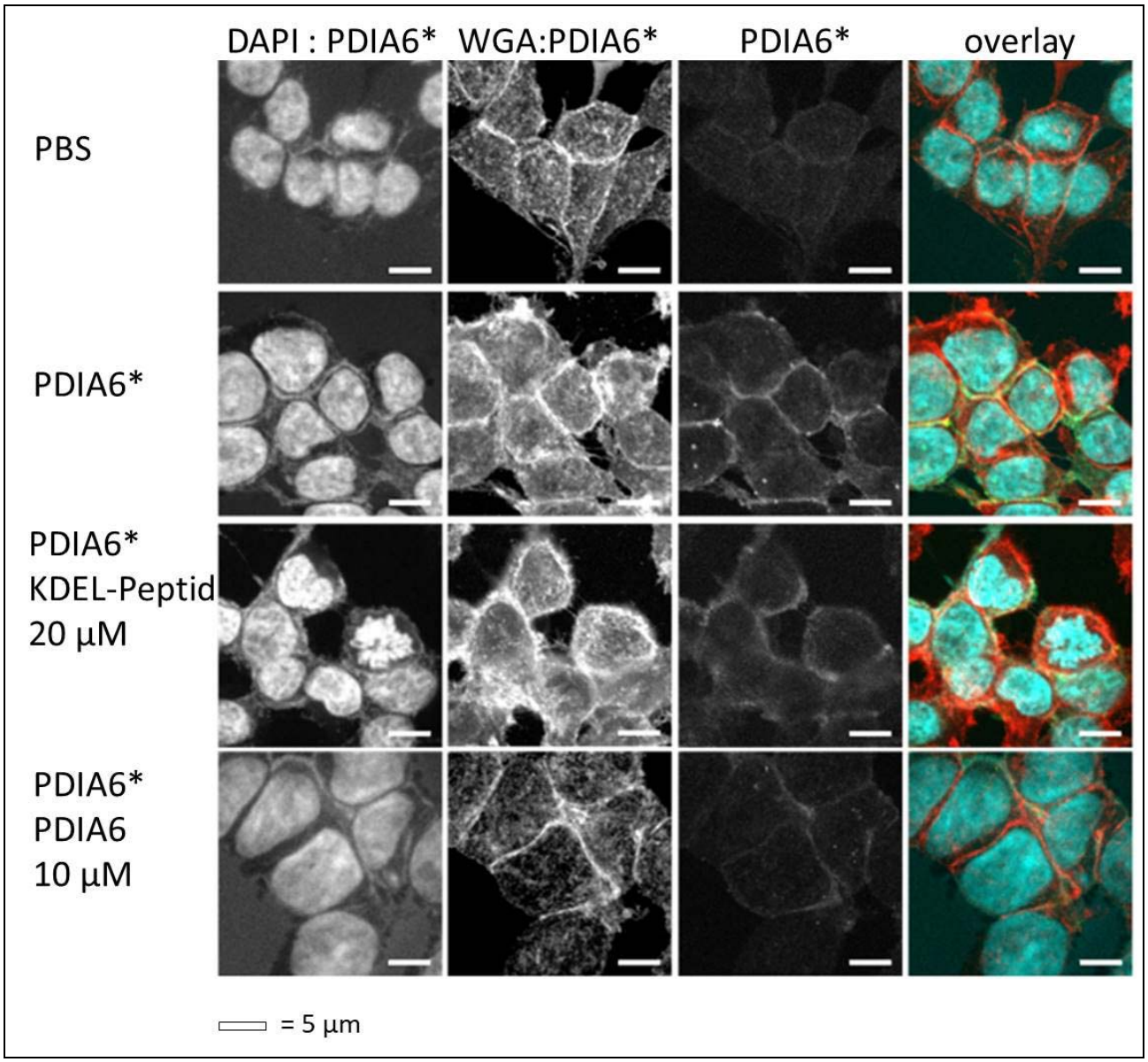


Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalyse zur Lokalisation fluoreszenzmarkierter PDIA6*.

HEK293T-Zellen wurden mit 3 µM fluoreszenzmarkierter PDIA6* (grün) inkubiert. Zusätzlich wurden mögliche PDIA6-Bindestellen durch Ko-Inkubation mit 20 µM KDEL-Peptid oder 10 µM unmarkierter PDIA6 blockiert. Als Zelloberflächenmarker wurde *Wheat Germ Agglutinin* (WGA, rot) benutzt und der Nucleus wurde mit DAPI (türkis) gefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PBS inkubiert. Die grün-fluoreszierende PDIA6* ließ sich an der Zelloberfläche detektieren, da sie mit dem WGA-Signal kolokalisiert. Die Signalstärke von PDIA6* wurde dabei schwächer, wenn mit KDEL-Peptid oder unmarkierter PDIA6 ko-inkubiert, und somit mögliche PDIA6-Bindestellen kompetitiv blockiert wurden.

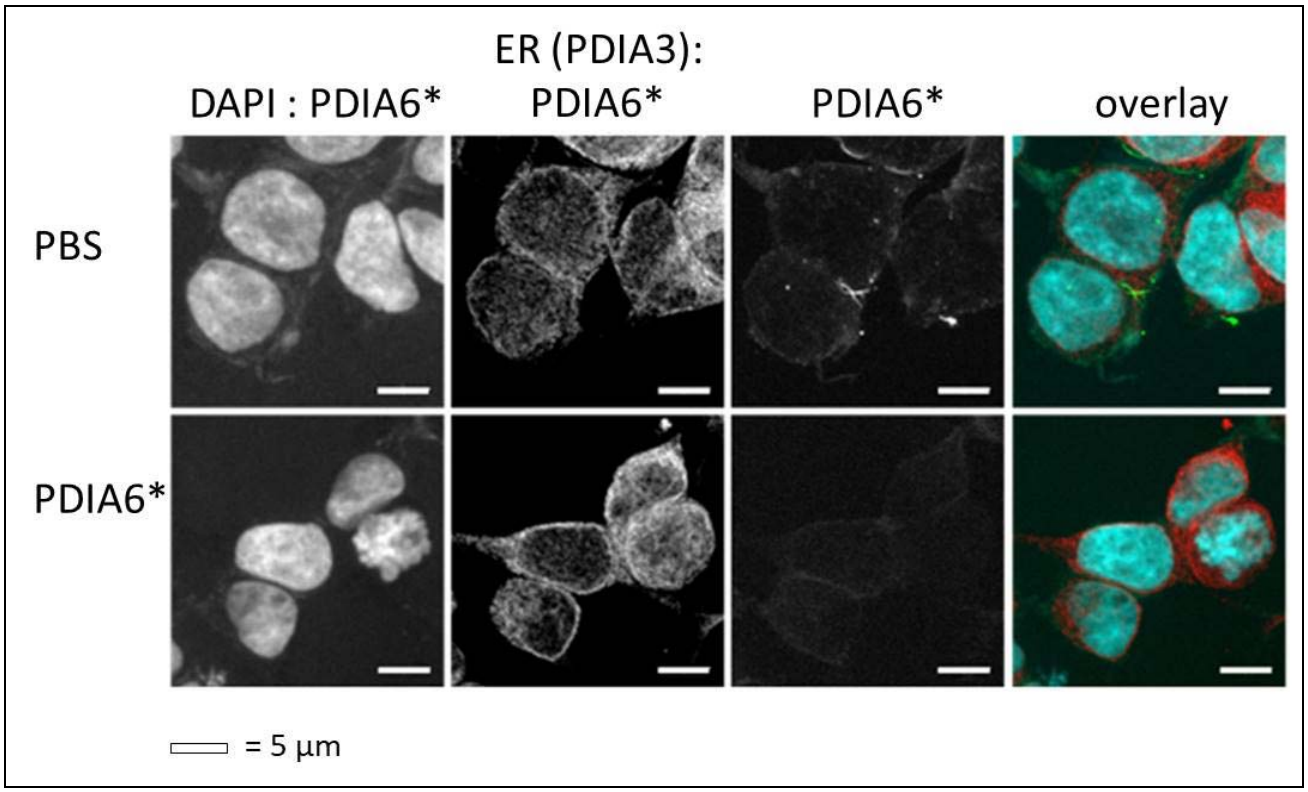


Abbildung 17: Immunfluoreszenzanalyse zur Analyse einer Kolokalisation exogener PDIA6* mit dem ER.

HEK293T-Zellen wurden mit markierter PDIA6* (grün) inkubiert. Als ER-Marker wurde PDIA3 (rot) benutzt. Der Nucleus wurde mit DAPI (türkis) gefärbt. Für die grün-fluoreszierende PDIA6* ließ sich keine Kolokalisation mit dem ER detektieren.

Um eine potentielle Kolokalisation genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Plot-Profil der Fluoreszenzintensitäten durchgeführt (Abbildung 18). Dabei wurde analysiert, ob sich die Fluoreszenzsignale von PDIA6* und WGA (Zelloberfläche) bzw. von PDIA6* und PDIA3 (ER) überlagern. Das Plot-Profil zeigte die Pixelintensität innerhalb eines festgelegten Bereichs (hier dargestellt als Linie 1 und 2) der zuvor aufgenommenen Immunfluoreszenzbilder. Die x-Achse zeigt die horizontale Distanz, und die y-Achse die durchschnittliche Pixel- bzw. Fluoreszenzintensität innerhalb des festgelegten Bereichs. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitätsprofile zeigte ein ähnliches Muster von PDIA6* (grün) und WGA (Zelloberflächenmarker, rot), was die Lokalisation von PDIA6* an der Zelloberfläche bestätigt. Für PDIA6* (grün) und PDIA3 (ER-Marker, rot) konnte kein ähnliches Profil detektiert werden. Daher ist auszuschließen, dass ein KDELR-

abhängiger retrograder Transport der zugefügten PDIA6* zurück ins ER stattfand.

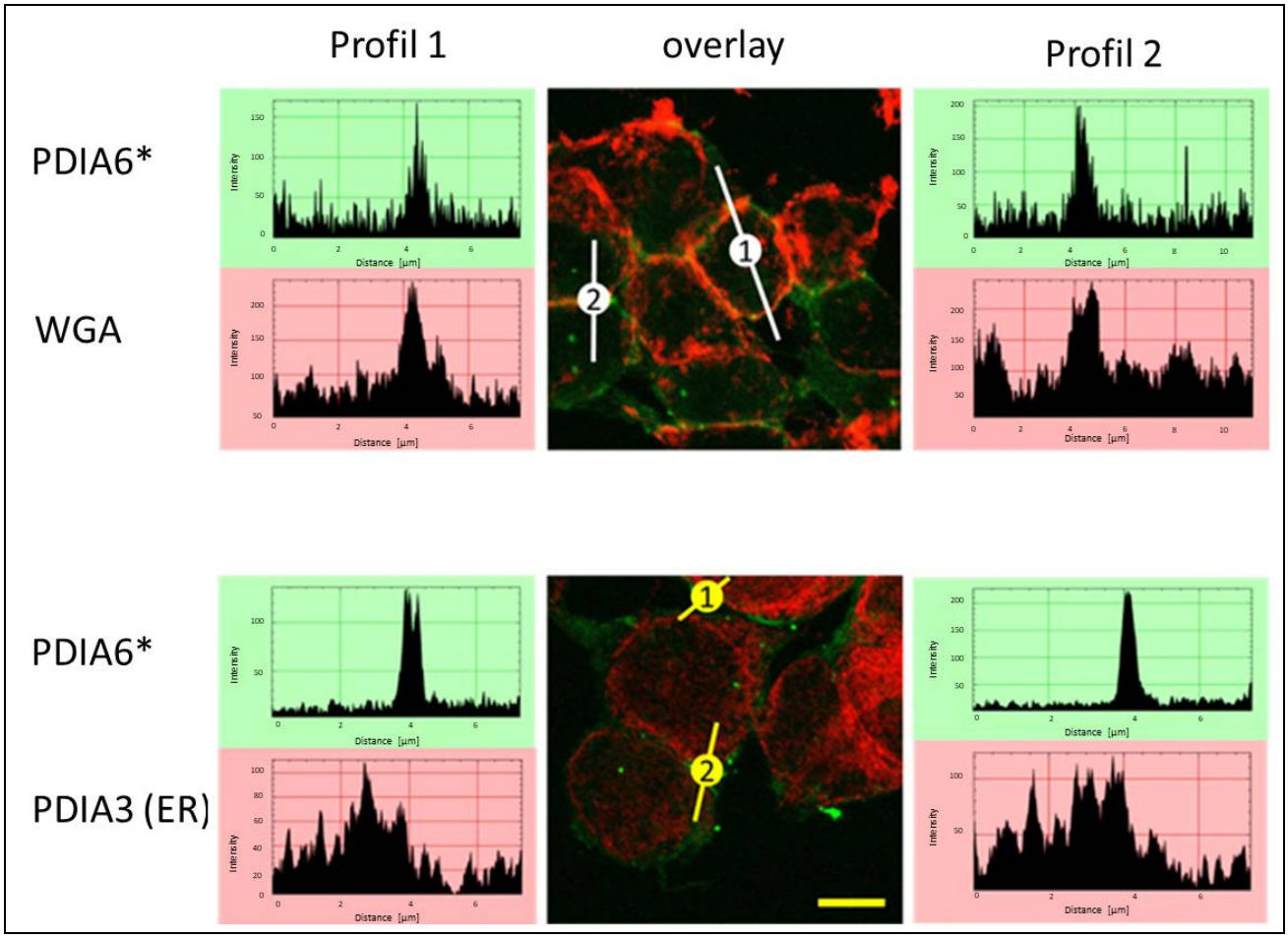


Abbildung 18: Plot-Profil zur Immunfluoreszenzanalyse.

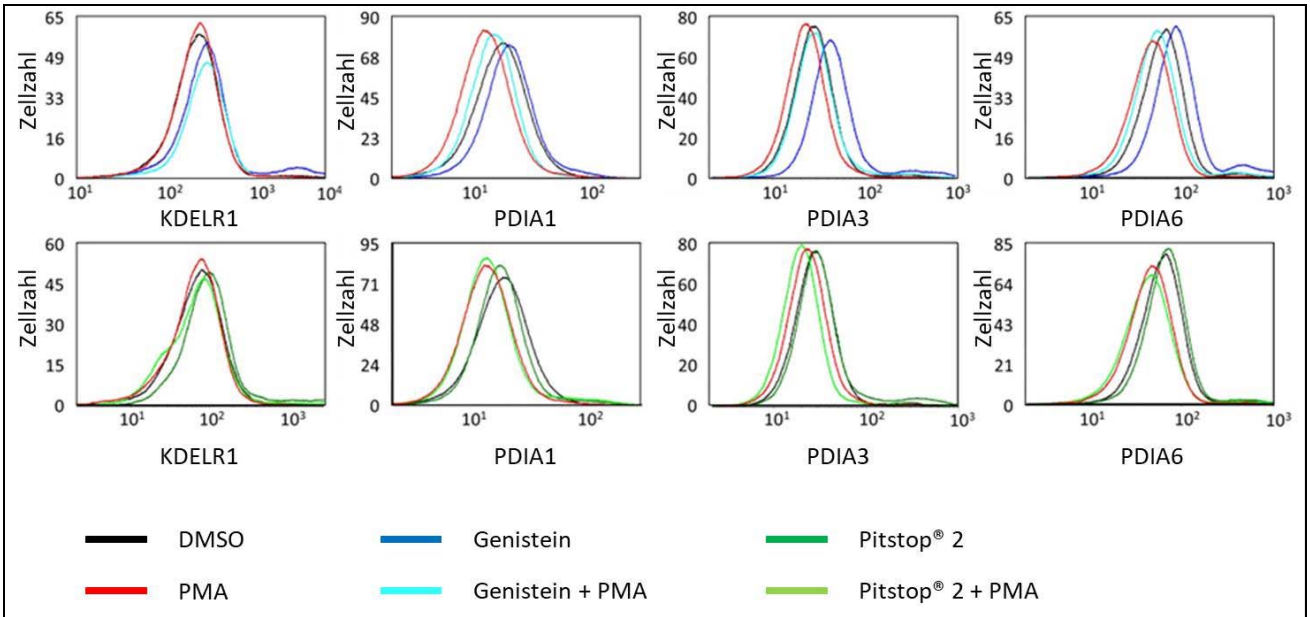
Im Plot-Profil wurden die Fluoreszenzintensitäten innerhalb eines festgelegten Bereichs (Linie 1 und 2) der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Dabei ist auf der x-Achse die horizontale Distanz in µm dargestellt. Die y-Achse beschreibt die durchschnittliche Pixelintensität innerhalb des festgelegten Bereichs. Es konnte ein ähnliches Fluoreszenzintensitätsprofil für die Kolokalisationsstudie von PDIA6* (grün) mit WGA (Zelloberflächenmarker, rot) (oben) detektiert werden. Für PDIA6* (grün) und PDIA3 (ER-Marker, rot) (unten) konnte kein ähnliches Plot-Profil ermittelt werden und eine Kolokalisation ist somit nicht gegeben.

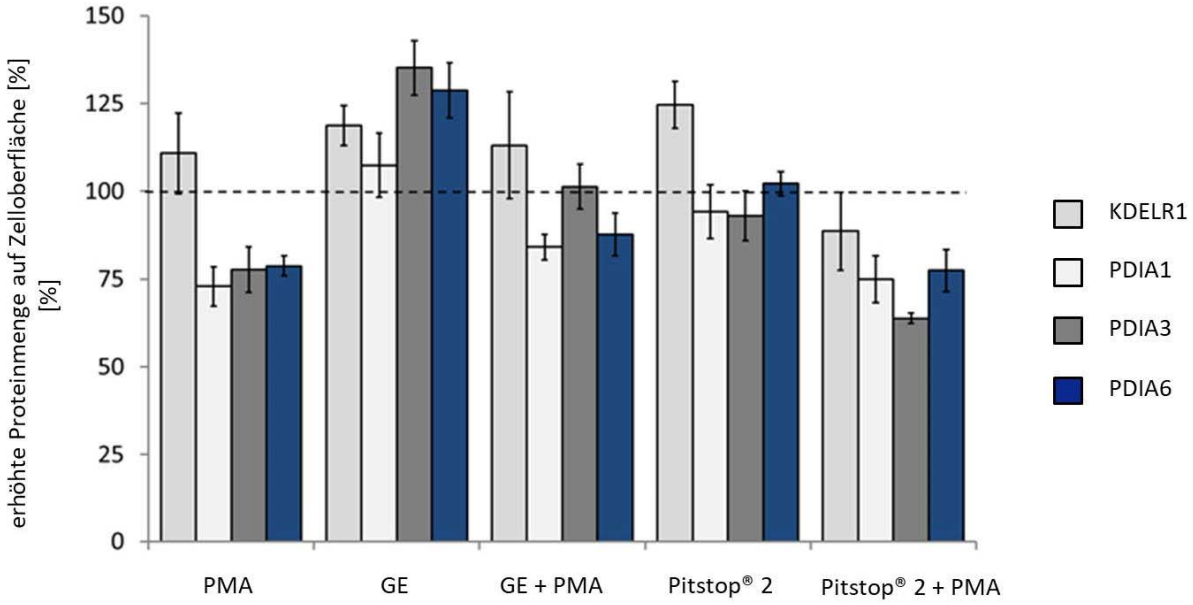
3.7 Transport vom KDELR1 und PDIs an die Zelloberfläche

Um zu untersuchen, auf welche Art und Weise der KDELR1 bzw. verschiedene PDIs an die Zelloberfläche gelangen, wurden HEK293T-Zellen mit verschiedenen Stimulanzien bzw. Inhibitoren inkubiert. Dabei wurde die Caveolin-abhängige Endozytose mit Genistein (GE) und die Clathrin-abhängige Endozytose mit Pitstop® 2 inhibiert. Zusätzlich wurden die Zellen simultan oder nur mit PMA behandelt. Bei einer PMA-Behandlung von HEK293T-Zellen konnte zuvor gezeigt werden, dass es eine Sekretion von PDIs in den extrazellulären Raum induziert (Jasuja *et al.*, 2010; Araujo, Zeidler*, et al.*, 2017). Nach Inkubation mit den Stimulanzien bzw. Inhibitoren wurden nicht-permeabilisierte Zellen mit Antikörpern gegen den KDELR1, PDIA1, PDIA3 oder PDIA6 markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 19). Für die Quantifizierung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von DMSO behandelten Kontrollzellen als 100 % gesetzt und die folgenden Messungen zu diesem Wert in Relation gesetzt.

Eine Behandlung der Zellen mit PMA führte in diesem Experiment zu keiner erhöhten Menge von KDELR1 auf der Zelloberfläche, jedoch nahm die Menge von PDIA1, PDIA3 und PDIA6 signifikant ab. Für den KDELR1 konnte eine erhöhte Menge auf der Zelloberfläche nach Genistein und Pitstop® 2 Behandlung detektiert werden, was darauf hindeutete, dass die Endozytose des KDELR1 sowohl Clathrin- als auch Caveolin-abhängig ist, und es sich hier um einen dynamischen Prozess handelte. Für PDIA1 konnte nicht detektiert werden, dass es über einen der beiden Endozytose-Wege internalisiert wurde, da die Proteinmenge an der Zelloberfläche sowohl nach Genistein, als auch nach Pitstop® 2 Behandlung nahezu unverändert blieb. PDIA3 und PDIA6 zeigten bei Behandlung mit Genistein eine deutlich höhere Proteinmenge auf der Zelloberfläche, was darauf hindeutete, dass diese beiden Isomerasen u. a. über den Caveolin-abhängigen Endozytose-Weg internalisiert wurden. Eine Behandlung mit Pitstop® 2 hingegen, hatte keinen Einfluss auf die Zelloberflächenmenge von PDIA3 und PDIA6. Eine Reduktion der Zelloberflächenpräsenz von allen drei PDIs konnte in diesem Experiment zum einen bei der Behandlung der Zellen mit PMA allein, zum anderen auch bei der simultanen Behandlung von Genistein oder Pitstop® 2 mit PMA gezeigt werden. PDIA1 zeigte eine höhere Oberflächenpräsenz in Zellen, welche simultan mit Genistein und PMA

behandelt wurden, im Vergleich zur Behandlung mit PMA allein. Im Gegensatz zu alleiniger Genistein Behandlung, führte der Zusatz von PMA zu einer Akkumulation von PDIA1, was zeigt, dass PMA die Endozytose fördert. Dieser Trend konnte auch für PDIA6 detektiert werden, wobei hier keine Signifikanz festgestellt werden konnte. Für PDIA3 konnte eine Reduktion auf der Zelloberfläche festgestellt werden, wenn die Zellen mit Pitstop® 2 und PMA simultan behandelt wurden und dies mit alleiniger PMA Behandlung verglichen wird. Da es hier zu keiner Blockierung der Caveolin-abhängigen Endozytose kam, ist zu vermuten, dass PDIA3 u. a. auf diesem Weg internalisiert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass jeder PDI ein individueller Transportweg zuzuordnen ist und es wohl keinen allgemein gültigen Weg für alle PDIs gibt.





	KDELR1	PDIA1	PDIA3	PDIA6
PMA vs. DMSO	n.s.	**	**	***
GE vs. DMSO	**	n.s.	**	**
GE vs. PMA	n.s.	**	***	***
GE + PMA vs. DMSO	n.s.	**	n.s.	*
GE + PMA vs. PMA	n.s.	*	*	n.s.
Pitstop 2 vs. DMSO	**	n.s.	n.s.	n.s.
Pitstop 2 vs. PMA	n.s.	*	n.s.[1]	***
Pitstop 2 + PMA vs. DMSO	n.s.	**	***	***
Pitstop 2 + PMA vs. PMA	n.s.	n.s.	*	n.s.

[1] p-Wert = 0,0509

Zunahme	Abnahme

Abbildung 19: Inhibition und Stimulation des KDELR1- und PDI-Transports an die Zelloberfläche.

HEK293T-Zellen wurden mit den Inhibitoren Genistein (GE) und Pitstop® 2 allein oder simultan mit PMA bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Dabei sollte die Clathrin-abhängige Endozytose (GE) oder die Caveolin-abhängie Endozytose (Pitstop® 2) inhibiert werden, um weitere Erkenntnisse über den Transport von KDELR1 und PDIs an die Zelloberfläche zu erlangen. Nach Inkubation mit den Inhibitoren bzw. Stimulanzien wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den KDELR1 und die drei PDIs (PDIA1, PDIA3, PDIA6) markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Quantifizierung wurde die mittlere Intensität der Fluoreszenz von Kontrollzellen, welche mit DMSO behandelt wurden, auf 100 % gesetzt und die anderen Messungen zu diesem Wert in Relation gesetzt.

3.8 Konstruktion und Expression von IL-6R Mutanten

Bisher wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die PDIs KDELR1-abhängig an die Zelloberfläche gelangen. Für PDIA6 wurde beschrieben, dass sie eine Affinität zur MPD17 aufweist und demnach mit ADAM17 interagieren könnte (Krossa *et al.*, 2018). Dabei katalysiert die PDIA6 die Isomerisierung von zwei Disulfidbrücken innerhalb der MPD17 und es kommt infolgedessen zu einer Konformationsänderung von ADAM17. In diesem Zustand ist die Protease nicht mehr in der Lage, seine membranständigen Substrate zu prozessieren.

Ein Substrat von ADAM17 ist der IL-6-Rezeptor. Um zu zeigen, dass die proteolytische Prozessierung des IL-6R durch ADAM17 unabhängig von der *shedding*-Aktivität stattfinden kann, wurden acht IL-6R Mutanten konstruiert. Diese wurden so gewählt, dass ein Motiv von 6 Aminosäuren (LPVQDS) in der *stalk*-Region, welche die ADAM17-Schnittstelle enthält (Prolin-Valin) (Riethmüller *et al.*, 2017), um jeweils 5 Aminosäuren pro Mutante Richtung in Richtung N-Terminus verschoben wurde. Dadurch erhöht sich die Distanz zwischen der Schnittstelle und der Membran (Abbildung 20). Da ADAM17 den IL-6R-Wildtyp nahe der Zellmembran prozessiert, soll untersucht werden, ob bei größerer Distanz der Schnittstelle zur Zellmembran ein löslicher IL-6R generiert wird, welcher nicht durch stimuliertes *shedding*, sondern nur durch die proteolytische Aktivität (konstitutives *shedding*) von ADAM17 erzeugt wird.

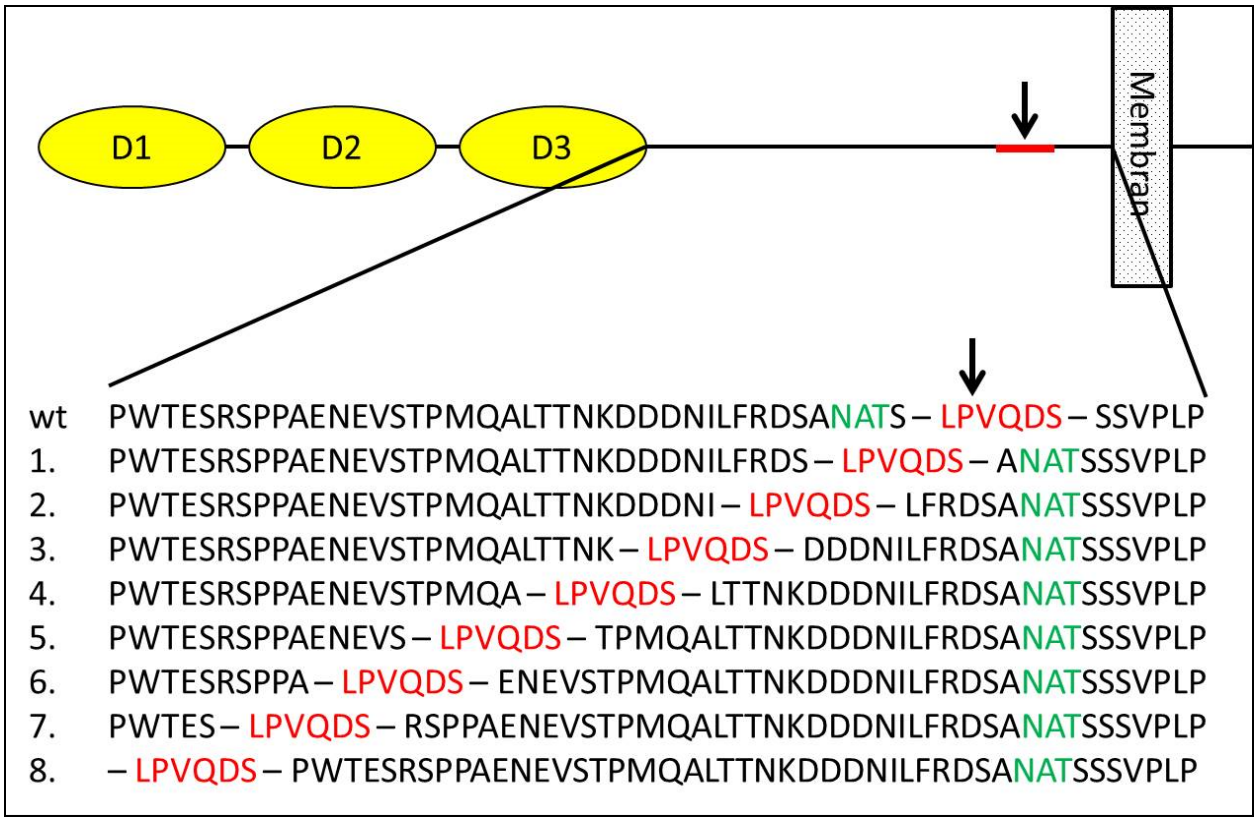


Abbildung 20: IL-6R Mutationen innerhalb der *stalk*-Region.

Ein Motiv von 6 Aminosäuren (LPVQDS, rot), welches die ADAM17-Schnittstelle zwischen Prolin und Valin (Pfeil) beinhaltet, wurde um jeweils 5 Aminosäuren pro Mutante in Richtung N-Terminus verschoben. Dadurch erhöhte sich die Distanz der Schnittstelle zur Zellmembran. Die Glykosylierungsstelle (NAT, grün) war nur beim Wildtyp-IL-6R Teil des löslichen Proteins.

Um die Expression der generierten IL-6R Konstrukte zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert. Dabei wurde die HEK293T-Zelllinie für Analysen herangezogen, da sie unter normalen Umständen keinen IL-6R exprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Proteine der Lysate mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend im *Western-Blot* mit einem anti-IL-6R (4-11) Antikörper detektiert (Abbildung 21). Als Ladekontrolle wurde das *housekeeping*-Gen Actin verwendet, welches in allen Proben gleich stark detektiert werden konnte.

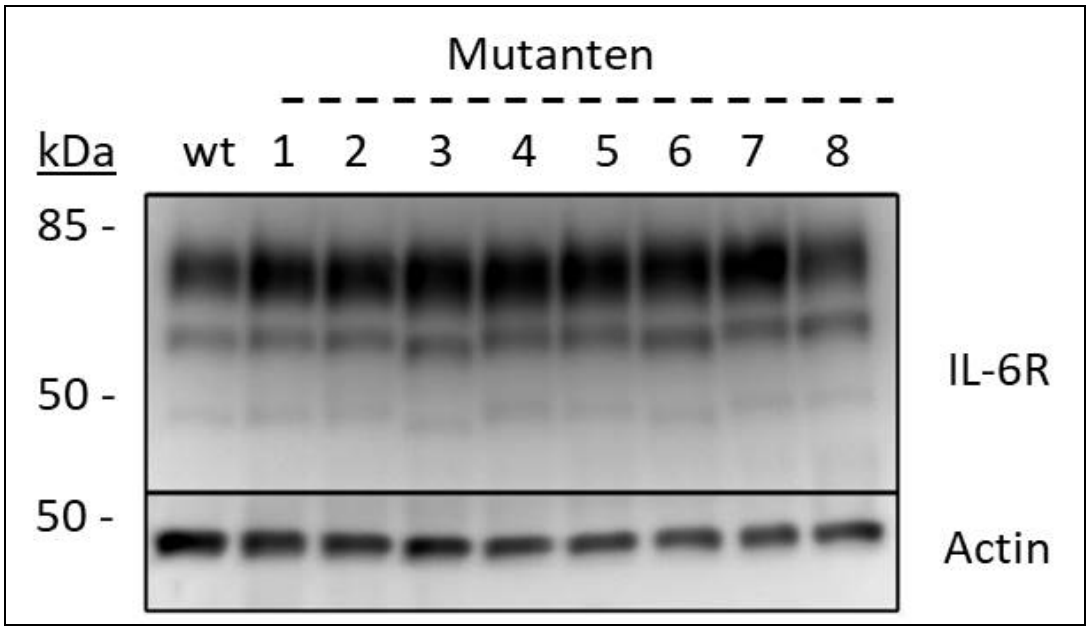


Abbildung 21: Expression der IL-6R-Mutanten.

HEK293T-Zellen wurden entweder mit den jeweiligen IL-6R-Mutanten oder dem IL-6R wildtyp transfiziert. Um die Expression der IL-6R-Mutanten zu überprüfen, wurden die Zellen lysiert und die Proteine anschließend mittels SDS-PAGE getrennt. Der IL-6R wurde dann im *Western-Blot* mit dem 4-11 Antikörper gegen IL-6R detektiert. Als Ladekontrolle diente Actin. Da es hierbei um ein *houskeeping*-Gen handelt, war die Expressionsstärke in allen Proben gleich.

Um zu prüfen, dass sowohl der Wildtyp IL-6R als auch die mutierten IL-6R Varianten auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, wurden HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und nicht-permeabilisierte Zellen mittels Durchflusszytometrie, mit dem 4-11 IL-6R Antikörper, analysiert (Abbildung 22). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen sowie Zellen, welche nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden. Es konnte für alle IL-6R-Varianten eine etwa gleich starke Exposition auf der Zelloberfläche ermittelt werden.

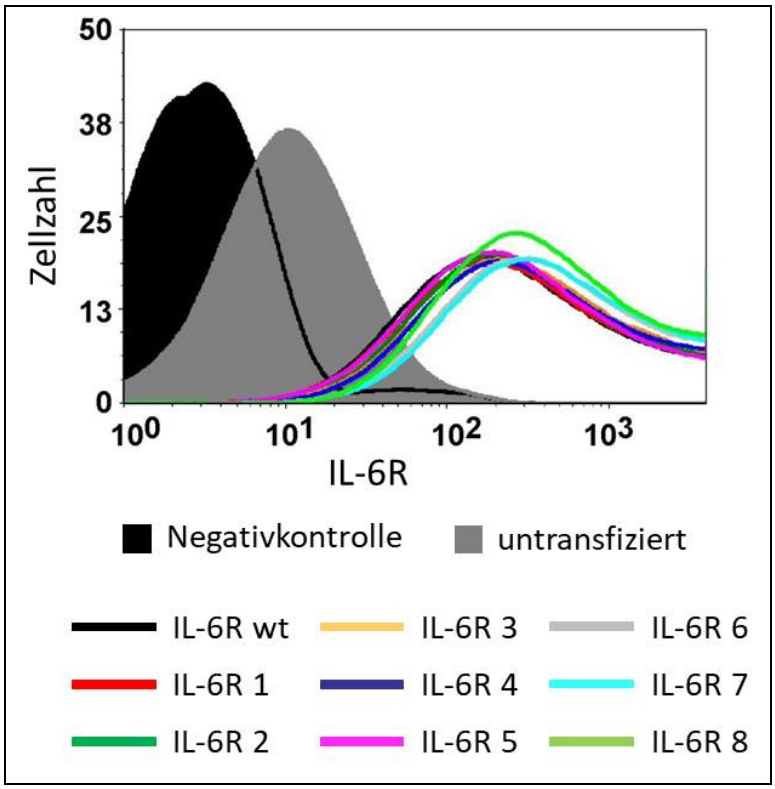


Abbildung 22: IL-6R Oberflächenexpressionsanalyse.

HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp IL-6R und mutierten IL-6R Varianten transfiziert und eine Oberflächenexpression des IL-6R mit einem entsprechenden Antikörper 4-11 gegen den IL-6R mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, sowie Zellen, welche ohne primären Antikörper behandelt wurden (Negativkontrolle).

3.9 Mutierten Varianten des sIL-6R weisen keine Glykosylierung auf

Da das Aminosäuremotiv, welches die ADAM17-Schnittstelle enthält, in den Mutanten in Richtung N-Terminus verschoben wurde, fehlt in den löslichen IL-6R Mutanten die Glykosylierung des NAT-Motivs. Dieses bleibt bei den mutierten Varianten nach Abspalten des sIL-6R Teil des membranständigen IL-6R Proteins. Dies führte in allen Mutanten zu einer Verminderung der Größe des sIL-6R um etwa 15 kDa. Um dies zu verifizieren wurden HEK293T-Zellen mit einem IL-6R-Konstrukt transfiziert, bei welchem die Glykosylierungsstelle mutiert war (T352A) (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christoph Garbers, Universitätsklinikum Magdeburg). Zusätzlich wurden Zellen mit dem IL-6R Wildtyp bzw. dem Konstrukt IL-6R Mutante 1 transfiziert. Die Zellen wurden mit PMA behandelt und der Überstand mittels TCA

gefällt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und der sIL-6R anschließend mit einem anti-IL-6R-Antikörper (4-11) im *Western-Blot* detektiert (Abbildung 23).

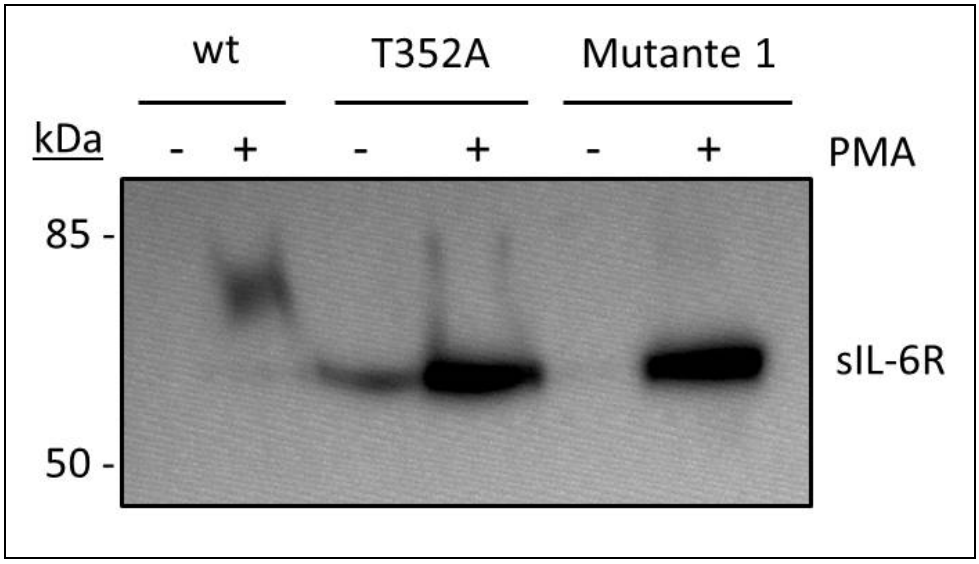


Abbildung 23: Mutation bzw. Fehlen der Glykosylierungsstelle im sIL-6R.

Um das Fehlen der Glykosylierung in den Mutanten zu verifizieren, wurden HEK293T-Zellen mit Wildtyp IL-6R, Mutante 1 oder einer T352A Mutante (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christoph Garbers) transfiziert, mit PMA behandelt und die Proteine des Überstandes mit TCA gefällt. Die Proteine wurden anschließend mit SDS-PAGE getrennt und im *Western-Blot* mit einem Antikörper gegen den IL-6R (4-11) detektiert. Durch Mutation der Glykosylierungstelle des IL-6R (T352A) oder Verlagerung der ADAM17-Schnittstelle (Mutante 1) Richtung N-Terminus enthält der lösliche IL-6R beider Varianten keine Glykosylierung mehr. Dies hat im Vergleich zum Wildtyp sIL-6R, welcher stets glykosyliert ist, eine Änderung der Proteingröße um etwa 15 kDa zur Folge.

3.10 Proteolytische Prozessierung der IL-6R-Mutanten durch ADAM17

Um zu prüfen, welche IL-6R Varianten konstitutiv bzw. nach PMA-Stimulation durch ADAM17 prozessiert werden, wurden zunächst HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten des IL-6R (wildtyp und 1 – 8) transfiziert. Das klassische *shedding* durch ADAM17 wurde mittels PMA induziert. Durch Behandlung

mit PMA sollte das aktive Zentrum von ADAM17 nah an die Zellmembran gebracht werden, und somit in die Nähe der IL-6R Schnittstelle, sodass der lösliche IL-6R generiert wird.

Zudem wurden transfizierte Zellen mit DMSO behandelt. Bei DMSO-Behandlung sollte es zu konstitutivem *shedding* des IL-6R kommen, da das aktive Zentrum von ADAM17 eine größere Distanz zur Zellmembran aufweist und somit nur die IL-6R-Schnittstellen erreicht werden, welche eine entsprechend größere Distanz zur Zellmembran aufweisen. Als Kontrolle wurden transfizierte Zellen mit Marimastat (MM) inkubiert. Da es sich hierbei um einen Metalloprotease-Inhibitor handelt, zeigte ADAM17 bei allen Proben keine Aktivität (Abbildung 25) und es konnte kein sIL-6R detektiert werden.

Nach Behandlung der Zellen mit DMSO, PMA oder Marimastat wurden die Überstände gesammelt und die Proteine mit TCA gefällt. Anschließend wurden diese mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach getrennt. Die Analyse erfolgte im *Western-Blot* mit dem 4-11 IL-6R Antikörper (Abbildung 24 & Abbildung 25).

Zunächst wurden alle IL-6R-Varianten lediglich nach PMA oder DMSO Behandlung miteinander verglichen (Abbildung 24). Die Analyse zeigte, dass ADAM17 nach PMA-Stimulation ein lösliches IL-6R Protein generiert, wenn die Zellen mit dem Wildtyp IL-6R oder den mutierten Varianten 1, 2 und 4 transfiziert wurden. Hierbei handelt es sich um klassische ADAM17 *shedding* Aktivität, wobei die Protease gleichzeitig auch in der Lage ist, konstitutives *shedding* durchzuführen. Die Behandlung mit DMSO führte zu einem sIL-6R der Mutanten 4 und 6. ADAM17 ist nach DMSO Behandlung lediglich konstitutiv proteolytisch aktiv und es findet kein klassisches, stimuliertes *shedding* statt.

Für die mutierten Varianten 3, 5, 7 und 8 des sIL-6R konnte, nur ein schwaches bzw. kein Signal detektiert werden.

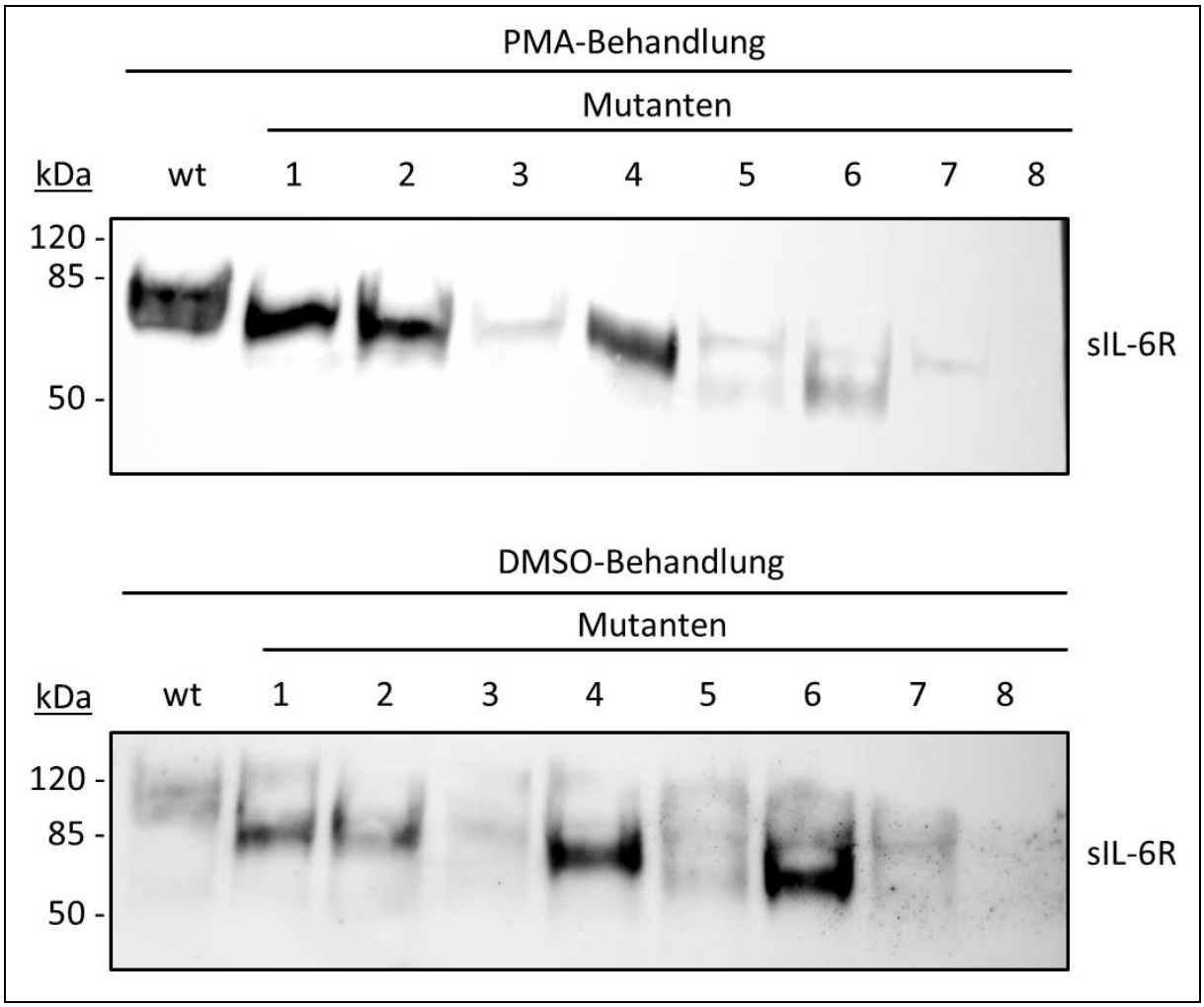


Abbildung 24: Nachweis des sIL-6R nach DMSO- bzw. PMA-Behandlung des Wildytps und der Mutanten.

HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp bzw. mutierten Varianten des IL-6R transfiziert und mit PMA oder DMSO behandelt. Die Proteine des Überstands wurden anschließend mit TCA gefällt und per SDS-PAGE getrennt. Die Analyse erfolgte im *Western-Blot* mit dem 4-11 IL-6R Antikörper. Nach PMA Behandlung wurde ein löslicher IL-6R für die den Wildtyp IL-6R, sowie die Mutanten 1, 2 und 4 detektiert. ADAM17 prozessiert den IL-6R durch klassisches, stimuliertes *shedding*, wobei die Protease gleichzeitig auch konstitutiv, proteolytisch aktiv ist. Nach DMSO-Behandlung wird, durch konstitutives *shedding* von ADAM17, ein löslicher IL-6R für die Mutanten 4 und 6 detektiert.

Um Unterschiede innerhalb der mutierten Varianten zu untersuchen, wurden zudem *Western-Blots* generiert und analysiert, in welchen die mit DMSO bzw. PMA behandelten Proben direkt miteinander verglichen wurden (Abbildung 25).

Die Ergebnisse zeigten, dass der Wildtyp IL-6R, sowie der IL-6R der Mutanten 1 und

2, nur nach PMA-Stimulation durch ADAM17 proteolytisch prozessiert wird, sodass ein löslicher IL-6R entsteht. Bei Mutante 4 und 6 findet nach DMSO-Behandlung, und demnach unabhängig von PMA-Stimulation, *shedding* durch ADAM17 statt. Dies zeigte, dass die Schnittstelle des IL-6R nah an der Zellmembran lokalisiert sein muss, damit nach Stimulation *shedding* stattfinden kann. Weist die Schnittstelle eine erhöhte Distanz zur Zellmembran auf (Mutante 3 - 8) konnte kein stimuliertes *shedding* mehr stattfinden. Bei bestimmter Distanz zur Membran (Mutante 4 und 6) rückte die IL-6R-Schnittstelle in die Nähe des katalytischen Zentrums von ADAM17 und es fand konstitutives *shedding* statt, sodass ein sIL-6R generiert wurde.

Für den IL-6R der mutierten Variante 3, 5, 7 und 8 findet weder konstitutiv noch nach PMA-Stimulation eine proteolytische Prozessierung durch ADAM17 statt.

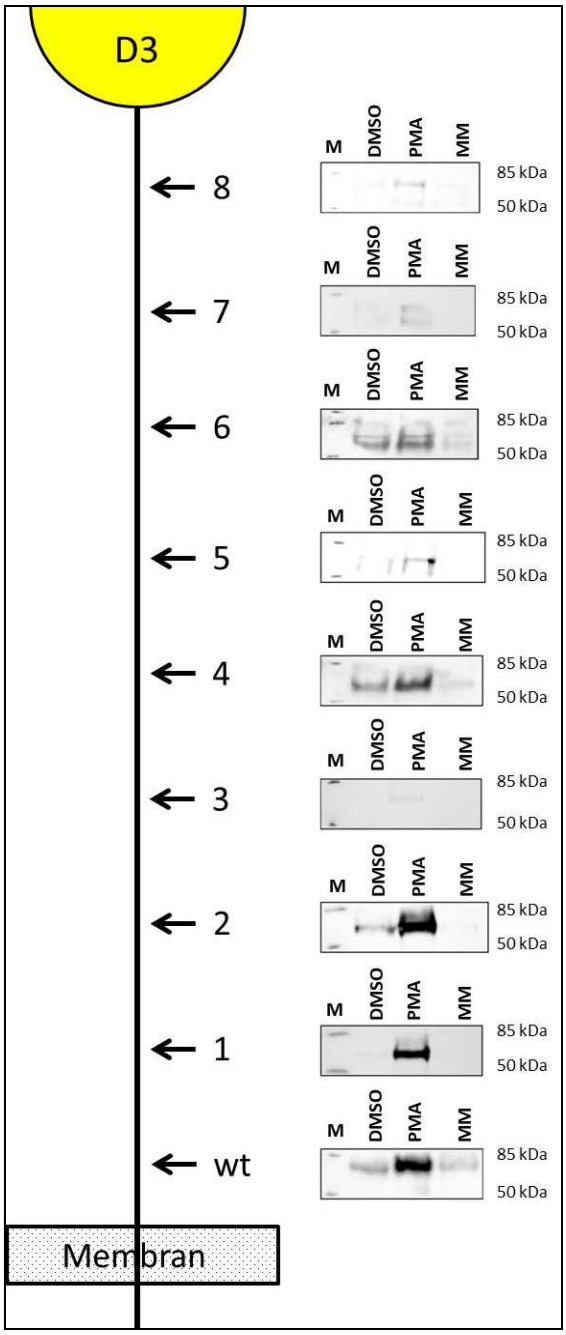


Abbildung 25: Proteolytische Prozessierung des wt IL-6R und den mutierten Varianten durch ADAM17.

HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp oder mutierten Varianten 1 - 8 des IL-6R transfiziert und die Proteine des Überstands nach DMSO-, PMA- oder Marimastat (MM)-Behandlung mit TCA gefällt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und im *Western-Blot* mit einem anti-IL-6R-Antikörper (4-11) analysiert. Der wildtyp IL-6R, sowie die Mutanten 1 und 2 werden nur nach PMA-Stimulation proteolytisch von ADAM17 prozessiert. Es findet stimuliertes *shedding* statt. IL-6R Mutante 4 und 6 werden nach DMSO Behandlung, und demnach unabhängig von PMA Stimulation, von ADAM17 gespalten. Mutante 4 und 6 werden demnach konstitutiv von ADAM17 prozessiert. M = Marker.

4 Diskussion

Für ER-residente Chaperone und Isomerasen ist bekannt, dass sie, neben ihrer Beteiligung an verschiedenen Prozessen innerhalb des ER, bei vielzähligen Funktionen an der Zelloberfläche eine Rolle spielen. Durch ein spezifisches ER Retentionssignal, einem C-terminalen KDEL-Motiv, werden die PDIs im ER zurückgehalten oder binden, nach Austritt aus dem ER, an den KDEL-Rezeptor des Golgi-Apparats. Der KDEL-Rezeptor bindet das KDEL-Motiv und der Protein-Rezeptor-Komplex wird in Vesikel verpackt und zurück zum ER transportiert. Wie die ER-residenten Proteine, trotz ihres KDEL-Motivs, dem retrograden Transport zwischen Golgi-Apparat und ER entkommen und an die Zelloberfläche gelangen, ist bislang noch weitestgehend ungeklärt und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

4.1 Einfluss des KDEL-Rezeptors auf das Umgehen des retrograden Transports von ER-residenten PDIs

Eine zunächst durchgeführte Biotinylierungsstudie, der in dieser Arbeit zu untersuchenden ER-residenten Proteindisulfidisomerasen, zeigte, dass überexprimierte PDIA6 auf der Zelloberfläche von HEK293T-Zellen lokalisiert war (Abbildung 9). Des Weiteren wurde endogen exprimierte PDIA3 und PDIA6 durch Biotinylierungsexperimente auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Abbildung 14). Eine Möglichkeit, um an die Zelloberfläche zu gelangen, wäre, dass die Proteine einer Interaktion mit dem KDELR und somit dem retrograden Transport entkommen. Demnach würden sie auf dem klassischen sekretorischen Weg an die Zelloberfläche gelangen. Dies könnte durch Beteiligung eines weiteren Proteins geschehen, welches das KDEL-Motiv maskiert und somit unzugänglich für den KDELR macht. Zudem könnte dieses zusätzliche Protein auch an dem Transport an die Zelloberfläche beteiligt sein. Ein entsprechender Mechanismus wurde für das ER-residente Chaperon GRP78 (BiP) beschrieben. GRP78 gelangt durch Interaktion mit den Proteinen MTJ-1 (Misra *et al.*, 2005) und Par-4 (Burikhanov *et al.*, 2009) an die Zelloberfläche. Ein weiteres Beispiel ist für PDIA1 beschrieben. Dabei interagiert das Lektin Galektin-9 mit den O-Glykanen der PDIA1 und unterstützt dadurch dessen

Transport an die Zelloberfläche (Bi *et al.*, 2011; Schäfer *et al.*, 2017). Ein weiterer Mechanismus, um den retrograden Transport zu umgehen, könnte eine Überlastung des sekretorischen Weges mit KDEL-Motiv tragenden ER-Proteinen sein. Dadurch würden alle KDELR gesättigt sein und ungebundene KDEL-Motiv tragende Proteine könnten auf dem sekretorischen Weg an die Zelloberfläche gelangen. Dieses Szenario könnte z. B. bei ER-Stress eintreten, in dem die Expression von ER-residenten Chaperonen und Isomerasen stark hochreguliert ist (Lee *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2003; S. Li *et al.*, 2013) und dadurch ungebundene Proteine an die Zelloberfläche transportiert und/oder in den extrazellulären Raum sekretiert werden (Delpino & Castelli, 2002; L. R. Peters & Raghavan, 2011). Der Transport und die Zelloberflächenassoziation von überexprimierten PDIA6-Varianten sind in dieser Arbeit nicht auf eine Sättigung des KDELR zurückzuführen. Eine starke Überexpression von unmarkierter oder myc-markierter PDIA6 mit und ohne KDEL-Motiv führte nicht zu einer Sekretion der KDEL-tragenden Varianten in den Überstand (Abbildung 8). Lediglich die PDIA6-Varianten ohne KDEL-Motiv werden sekretiert und konnten im Überstand detektiert werden. Eine erhöhte Sekretion von ER-residenten Proteinen ohne KDEL-Motiv wurde bereits gezeigt (Vuori *et al.*, 1992; Sönnichsen *et al.*, 1994; Ko & Kay, 2004; Zhang *et al.*, 2010). So wurde für das Chaperon Calreticulin gezeigt, dass eine Deletion des KDEL-Motivs zu einer Sekretion führte. Diese erfolgte jedoch im Vergleich zu klassisch sekretierten Proteinen mit geringerer Effizienz, was auf zusätzliche Interaktionen von Calreticulin im ER bzw. sekretorischen Weg hindeutet (Sönnichsen *et al.*, 1994).

Die reduzierte Zelloberflächenassoziation von PDIA6wo ist gegensätzlich zu Studien mit überexprimiertem GRP78 ohne KDEL-Motiv (GRP78wo). Hier ist die Zelloberflächenassoziation von GRP78wo nicht signifikant reduziert (Zhang *et al.*, 2010). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass die jeweiligen Proteine verschiedene Transportwege nutzen. Während das KDEL-Motiv beim Transport von PDIA6 eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, wird für GRP78 vermutet, dass es in einem Komplex mit MTJ-1 (Misra *et al.*, 2005) und Par-4 (Burikhanov *et al.*, 2009), welche das KDEL-Motiv maskieren, transportiert wird. Es ist anzunehmen, dass dieser Komplex auch bei fehlendem KDEL-Motiv gebildet werden kann, sodass es keinen oder nur einen geringen Unterschied in der

Zelloberflächenassoziation zwischen GRP78 und GRP78wo gibt. Ein weiterer Grund für die höhere Zelloberflächenassoziation von GRP78wo, im Vergleich zu PDIA6wo, kann darin bestehen, dass es eine höhere Anzahl an Interaktionspartnern nutzt und/oder mit höherer Affinität als PDIA6wo an mögliche Interaktionspartner bindet und somit schon vor der Sekretion von anderen Proteinen abgefangen wird.

4.2 Der KDEL-Rezeptor ist an der Bindung von PDIA6 an die Zelloberfläche beteiligt

Obwohl die *Western-Blot*-Analyse nahezu keine Zelloberflächenassoziation nach PDIA6wo-Überexpression zeigte, konnte in Analysen mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die exogene Zugabe von rekombinanter, fluoreszenzmarkierter PDIA6wo, in einer Bindung an die Zelloberfläche resultierte (Abbildung 10). Diese Diskrepanz der Ergebnisse kann eine Folge der sehr hohen Konzentration des markierten Proteins sein. So wurden die HEK293T-Zellen mit 0,5 µM fluoreszenzmarkierten PDIA6-Varianten inkubiert, was einer Konzentration von 24,2 mg/mL Protein entspricht. Eine derartige Proteinmenge durch Überexpression zu erreichen ist sehr unwahrscheinlich (Jäger *et al.*, 2013; Subedi *et al.*, 2015). Die Zellen wurden zudem mit gleichen Konzentrationen von rekombinanter, fluoreszenzmarkierter PDIA6, und IL-6 als Kontrolle, inkubiert. Für PDIA6wo konnte dabei eine etwa 30% verringerte Bindekapazität im Vergleich zu PDIA6 detektiert werden. Dennoch zeigte PDIA6wo ein deutlich stärkeres Bindungspotential als die Negativkontrolle IL-6. Dies könnte darin begründet sein, dass PDIA6 nicht nur über das KDEL-Motiv mit möglichen Interaktionspartnern auf der Zelloberfläche interagiert, sondern auch über andere Bereiche an Substrate bindet. So bindet PDIA6 in HEK293T-Zellen (Thul *et al.*, 2017) KDEL-Motiv-unabhängig an die extrazellulären Domänen von MICA (Kaiser *et al.*, 2007) und kann, genauso wie PDIA1 und PDIA3, mit ADAM17 interagieren (Willems *et al.*, 2010; Düsterhöft *et al.*, 2013, Krossa *et al.*, 2018). Trotzdem zeigte die PDIA6 mit dem KDEL-Motiv eine höhere Bindung als PDIA6wo. Um dies weiter zu überprüfen, könnte in Zukunft eine PDIA6wo-Deletionsmutante hergestellt werden, bei welcher die inaktive Bindedomäne b so generiert wird, dass sie nicht mehr an Liganden binden kann.

Die Zelloberflächenassoziation von exogen zugegebener PDIA6 konnte in den durchgeführten Studien durch Zugabe des KDEL-Peptides vermindert werden (Abbildung 11). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Bindungsstellen für das KDEL-Motiv durch das Peptid blockiert wurden und lieferten somit einen Hinweis, dass die Zelloberflächenassoziation abhängig vom KDELR ist und es sich somit um einen Golgi-abhängigen Transportweg handelt. So wurde die Beteiligung des KDELR1 an dem Transport von PDIA1 bei einer Infektion mit dem Dengue-Virus gezeigt. Dabei ist der KDELR1 am Anstieg von PDIA1 an der Zelloberfläche, hervorgerufen durch das Dengue-Virus, involviert (Wan *et al.*, 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass der Transport an die Oberfläche Brefeldin A sensitiv ist. Bei Brefeldin A handelt es sich um einen Inhibitor, der die Translokation von Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat hemmt (Chege & Pfeffer, 1990). Durch den hervorgerufenen ER-Stress kommt es nicht nur zu einer erhöhten Zelloberflächenassoziation des überexprimierten KDELR, sondern auch von diversen Chaperonen (Zhang *et al.*, 2010; L. R. Peters & Raghavan, 2011; Henderson *et al.*, 2013; Numata *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2016).

Da die ersten durchgeführten Experimente dieser Arbeit einen Einfluss des KDELR auf die Zelloberflächenassoziation von PDIs bestätigten, wurde in weiteren Studien untersucht welche Auswirkungen eine verminderte Expressionsstärke des KDELR1 auf die Oberflächenassoziation von PDIs hat.

4.3 Ein *knockdown* des *kdelr1*- Gens führt zu verminderter Oberflächenassoziation der PDIs

In dieser Arbeit wurden Zelllinien mittels CRISPR/Cas konstruiert, die einen *knockdown* im *kdelr1* aufwiesen. Ein kompletter *knockout* des Gens konnte nicht erreicht werden. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die HEK293T-Zellen einen multiplen Chromosomensatz aufweisen und zum anderen, dass der KDELR1 essentiell für die Zellen ist und sie ohne ihn nicht lebensfähig wären. Der *knockdown* des *kdelr1* Gens führte zu einer Reduktion der Zelloberflächenassoziation von endogener PDIA1, PDIA3 und PDIA6 (Abbildung 15). Dementsprechend scheint der Transport der Isomerasen zur Zelloberfläche vom

KDELR1 abhängig zu sein. Im Einklang konnte endogen exprimierter KDELR1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dementsprechend ist die Zelloberflächenpräsenz des KDELR1, die zuvor in zwei Studien mittels Überexpression der KDELR gezeigt wurde (Henderson *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2016), kein Artefakt der experimentellen Bedingungen. Hat der KDELR1 seine Liganden an die Zelloberfläche transportiert, so ist es wahrscheinlich, dass diese Bindung durch den Anstieg des pH-Werts an der Zellmembran gelöst wird (Paroutis *et al.*, 2004). Diese Freisetzung geschieht möglicherweise gezielt in spezifischen Mikrodomänen der Zellmembran, wodurch die Bindung von PDIA6 an mögliche Interaktionspartner der Zelloberfläche begünstigt werden könnte.

Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass exogen zugegebene PDIA6 mit der Zelloberfläche assoziierte und internalisiert wurde (Abbildung 16). Eine Kolokalisation mit dem ER konnte jedoch ausgeschlossen werden. Da der pH-Wert an der Zelloberfläche im Vergleich zum Zellinneren höher ist und damit die Affinität des KDEL-Motivs zum KDELR geringer ausfällt, sollte die Freisetzung des Liganden begünstigt sein (Paroutis *et al.*, 2004). Damit kann eine kurzfristige Interaktion des KDELR mit dem Liganden erfolgen, jedoch ist eine Internalisierung und somit retrograder Transport zurück zum Golgi/ER unwahrscheinlich. Ob der KDELR seinen Liganden dennoch bindet und zu anderen Zellkompartimenten transportiert, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass PDIA6 mit anderen extrazellulären Proteinen und Substraten interagiert, mit ihnen internalisiert und ggf. im Lysosom degradiert werden könnte.

4.4 Mögliche Endozytosewege der PDIs und des KDELR1

Mittels der Durchflusszytometrie konnte die Zelloberflächenassoziation von PDIA1, PDIA3 und PDIA6 in Abhängigkeit vom KDELR1 gezeigt (Abbildung 15). Um einen ersten Einblick in mögliche Transportwege der PDIs und des KDELR1 zu erhalten wurde eine Internalisierungsstudie durchgeführt (Abbildung 19). In diesen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit PMA stimuliert, da PMA als Stimulanz beschrieben wurde, welches die Sekretion von Isomerasen erhöht (Jasuja *et al.*,

2010; Araujo, Zeidler*, et al.*, 2017). Durch die PMA induzierte Sekretion wird der klassische, sekretorische Transportweg umgangen (Araujo, Zeidler*, et al.*, 2017). Dies konnte auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen festgestellt werden, da eine Behandlung mit PMA zu einer reduzierten Zelloberflächenassoziation der PDIs führte, wobei die Oberflächenpräsenz des KDELR1 unverändert blieb (Abbildung 19). Ohne Zugabe von PMA wurde der KDELR1 über den Clathrin- und/oder den Caveolin-abhängigen Endozytoseweg internalisiert. Es handelte sich bei der Oberflächenpräsenz des KDELR1 dementsprechend um einen dynamischen Prozess. Demgegenüber konnte für PDIA3 und PDIA6 eine Caveolin-abhängige Endozytose gezeigt werden. PDIA1 zeigte in unstimulierten Zellen weder eine Tendenz zu Caveolin- noch zur Clathrin-abhängigen Endozytose. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit PMA und den Endozytose Inhibitoren Pitstop® 2 (Clathrin-abhängiger Endozytoseweg) und Genistein (Caveolin-abhängiger Endozytoseweg) zeigten, dass sowohl PDIA1 als auch PDIA3 nicht nur sekretiert wurden, sondern auch über die *lipid raft*-Region internalisiert wurden.

Diese Ergebnisse liefern erste Einblicke in mögliche Endozytosewege der untersuchten PDIs und des KDELR1. Dabei gibt es deutliche Unterschiede im Transport des KDELR1 und der PDIs, was die Hypothese unterstützt, dass die Bindung des KDELR1 und seinen Liganden an der Zellmembran oder dessen Nähe aufgehoben wird. Für die PDIs wurden bisher mindestens zwei verschiedene Transportwege beschrieben (Araujo, Fernandes*, et al.*, 2017; Araujo, Zeidler*, et al.*, 2017). Dabei gibt es vermutlich einen Unterschied im Transport von sekretierten PDIs und PDIs, welche an der Zelloberfläche assoziieren. Bei der Zelloberflächenassoziation handelt es sich um ein lokales Ereignis, bei welchem die PDIs gezielt an ihre Substrate binden. Die Sekretion von PDIs hingegen, z. B. bei der Koagulation, ist dabei als ein globales Ereignis anzusehen. Bei Bedarf werden die PDIs, z. B. von Thrombozyten und Endothelialzellen, ausgeschüttet und es kommt zur Gerinnungsreaktion (Holbrook *et al.*, 2010; Jasuja *et al.*, 2010; Holbrook *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Passam *et al.*, 2015). Da hier eine schnelle Sekretion nötig ist, werden die PDIs in Granula gespeichert und können nach ihrer Ausschüttung an einer großen Anzahl an Zellen und Zelltypen wirken (Jordan *et al.*,

2005; Jasuja *et al.*, 2010; Thon *et al.*, 2012; Sharda *et al.*, 2015). Die Sekretion von PDIs wird dabei z. B. durch Thrombin oder LPS induziert und umgeht den klassischen sekretorischen Transportweg (Araujo, Zeidler*, et al.*, 2017).

Um den KDELR1 auf der Zelloberfläche zu detektieren, genügte in anderen Studien eine Überexpression des entsprechenden *kdelr1* Gens (Henderson *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2016). Die anderen drei KDEL-Rezeptoren (KDELR2, KDELR3a und KDELR3b) konnten hingegen nur nach Induktion von ER-Stress auf der Zelloberfläche detektiert werden (Henderson *et al.*, 2013). Ein Grund hierfür könnte die Selektivität sein. Der KDELR1 bevorzugt das KDEL-Motiv und ist somit möglicherweise hauptsächlich an dem konstitutiven und induzierten Transport von Proteinen mit KDEL-Motiv involviert. Die anderen drei KDEL-Rezeptoren favorisieren hingegen das HDEL-Motiv. Dadurch ergibt sich, dass Proteine mit dem KDEL-Motiv eher an der Zelloberfläche assoziiert sind, als Proteine mit dem HDEL-Motiv. Für diesen Transport an die Zelloberfläche lässt sich in dieser Arbeit feststellen, dass es verschiedene mögliche Transportwege für PDIs gibt und zumindest einer von diesen KDELR1-abhängig ist. Detaillierte Mechanismen für diesen Transportweg müssen in Zukunft weiter untersucht werden.

4.5 Mutierte IL-6R-Varianten werden konstitutiv von ADAM17 prozessiert

Es wurde bisher gezeigt, dass die PDIs KDELR1-abhängig vom Zellinneren an die Zelloberfläche transportiert werden. Für PDIA6 konnte bestätigt werden, dass es eine Affinität zu ADAM17 aufweist und somit in der Lage ist, mit der Protease zu interagieren (Krossa *et al.*, 2018). Dabei katalysiert PDIA6 die Isomerisierung von zwei Disulfidbrücken innerhalb der MPD17 und es kommt zur Konformationsänderung von ADAM17. Dies überführt die MPD17 von einer flexiblen, offenen Form in eine rigide, geschlossene Form. Durch die Konformationsänderung der MPD kann sie nicht mehr an negativ geladene Phosphatidylserine der Zellmembran binden um das aktive Zentrum der Protease ADAM17 in die Nähe der Zellmembran zu bringen (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). Da die Schnittstellen der ADAM17-Substrate aber alle nahe der Zellmembran lokalisiert

sind, kann demzufolge keine Proteolyse mehr stattfinden. Dieses Phänomen wurde in Experimenten dieser Arbeit mittels DMSO- bzw. PMA-Stimulation der Zellen induziert. Nach PMA-Behandlung findet klassische proteolytische Prozessierung statt, d. h. stimuliertes *shedding* der Substrate nahe der Zellmembran. Nach DMSO-Behandlung ist die Protease ADAM17 lediglich proteolytisch aktiv und es findet kein stimuliertes *shedding* statt. Das heißt das aktive Zentrum von ADAM17 weist eine Distanz zur Zellmembran auf, welches den Zugang zur Schnittstelle von Substraten nahe der Zellmembran nicht ermöglicht. Somit ist lediglich konstitutives *shedding* möglich. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es zur proteolytischen Prozessierung mittels konstitutivem *shedding* des ADAM17-Substrats IL-6R kommt, wenn die Schnittstelle durch Einfügen von Mutationen in größerer Distanz zur Zellmembran lokalisiert ist.

Die Mutanten 4 und 6 werden nach DMSO-Behandlung, und somit unabhängig von PMA Stimulation, von ADAM17 prozessiert, sodass ein löslicher IL-6R generiert wird. Der Wildtyp-IL-6R, sowie Mutante 1 und 2 werden lediglich nach PMA-Stimulation von ADAM17 prozessiert (Abbildung 25). Dies zeigt, dass die Protease ADAM17 stets ein gewisses Maß an Elastizität aufweist, wenn das aktive Zentrum nahe an der Zellmembran ist. So kann durch stimuliertes *shedding* ein sIL-6R aus der IL-6R Mutante 1 generiert werden, bei welchem die Schnittstelle um 5 Aminosäuren in Richtung N-Terminus verschoben wurde. Gleiches konnte für IL-6R Mutante 2 gezeigt werden, wobei die Schnittstelle bei dieser Mutante bereits um 10 Aminosäuren in Richtung N-Terminus verschoben wurde. Durch weitere Erhöhung der Distanz der Schnittstelle zur Zellmembran (Mutante 3-8) konnte kein löslicher IL-6R mehr durch stimuliertes *shedding* generiert werden.

In vorangegangenen Studien wurde beschrieben, dass ADAM17 unabhängig von einer Stimulation ein lösliches, fluorogenes Substrat konstitutiv prozessieren kann, obwohl das aktive Zentrum nicht nahe der Zellmembran lokalisiert ist (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). In dieser Arbeit war die Schnittstelle der Mutante 4 und 6 weit genug von der Zellmembran entfernt und gleichermaßen nahe genug am aktiven Zentrum von ADAM17, sodass es unter unstimulierten Bedingungen proteolytisch prozessiert werden konnte. Für Mutante 5 konnte kein konstitutives *shedding* des IL-6R detektiert werden. Das Bild der proteolytische Aktivität von

ADAM17 unter unstimulierten Bedingungen konnte somit in dieser Arbeit erweitert werden (Abbildung 26). Am Beispiel des IL-6R konnte gezeigt werden, dass lediglich die große Distanz zwischen ADAM17-Schnittstelle und katalytischer Domäne eine proteolytische Prozessierung des membranständigen Substrats verhindert. ADAM17 liegt demnach unabhängig von seiner Stimulation immer proteolytisch aktiv vor. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Studie konnte ein entscheidender Beitrag zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus von ADAM17 geleistet werden.

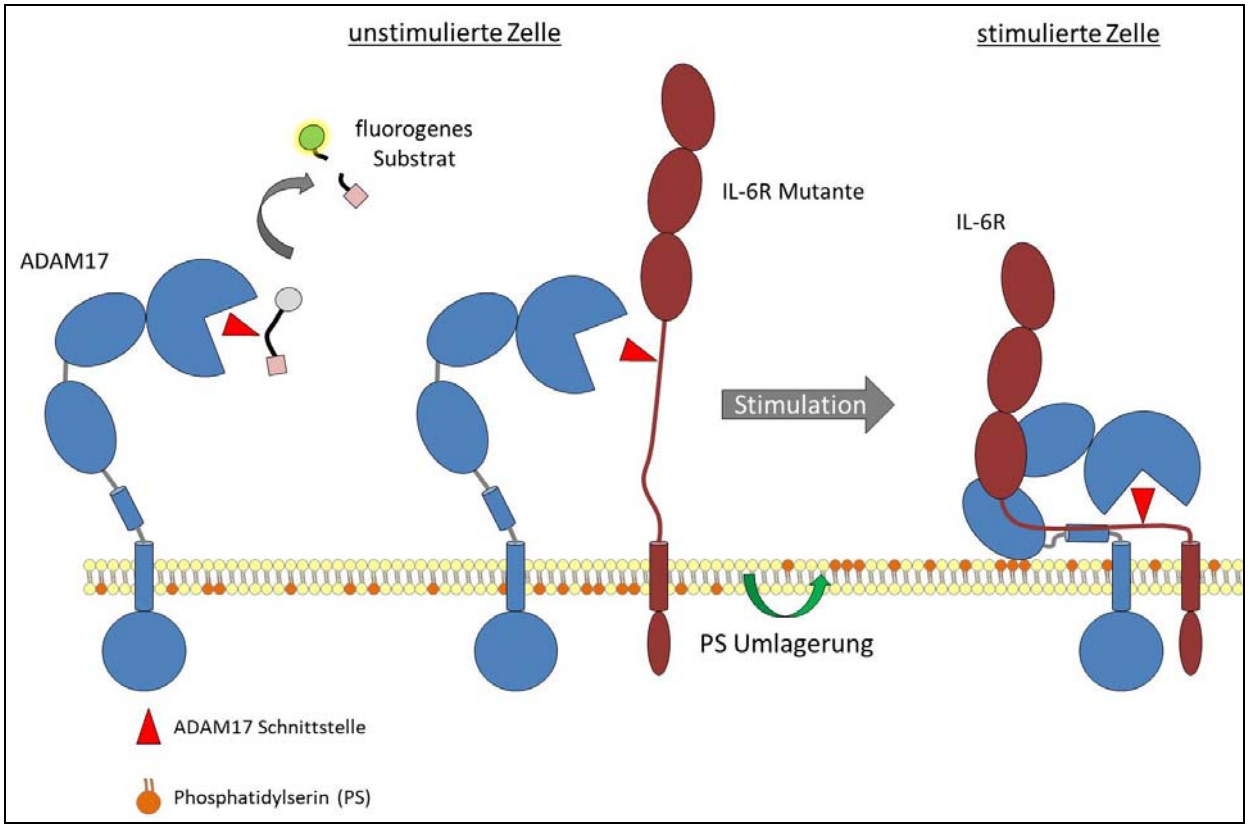


Abbildung 26: Erweiterte schematische Darstellung der proteolytischen Aktivität von ADAM17 in stimulierten und unstimulierten Zellen.

Unter unstimulierten Bedingungen ist ADAM17 proteolytisch aktiv und kann lösliche fluorogene Substrate konstitutiv spalten (Sommer *et al.*, 2016; Reiss & Bhakdi, 2017). Unter diesen Bedingungen können die membranständigen Substrate von ADAM17 nicht prozessiert werden, da die ADAM17-Schnittstelle bei allen Substraten nah an der Zellmembran lokalisiert ist. Aufgrund der großen Distanz zueinander kann die katalytische Domäne von ADAM17 die Schnittstelle seiner Substrate nicht erreichen und somit nicht prozessieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IL-6R als Substrat von ADAM17 konstitutiv prozessiert wird, wenn die ADAM17-Schnittstelle durch Mutation weiter von der Zellmembran weg und somit näher an das katalytische Zentrum verschoben wird.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ADAM17 in der Lage ist, den membranständigen IL-6R ohne Stimulation der Zelle proteolytisch zu prozessieren, wenn die Schnittstelle eine größere Distanz zur Zellmembran aufweist und somit näher am katalytischen Zentrum von ADAM17 lokalisiert ist. Dies zeigt, dass ADAM17 unter unstimulierten Bedingungen lediglich durch die zu große Distanz zur Substrat-Schnittstelle daran gehindert wird, den IL-6R zu prozessieren. Es müssten jedoch weitere ADAM17-Substrate auf gleiche Weise untersucht werden. Ein prominentes Substrat für weitere Studien stellt TNF-α dar. Während es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten IL-6R um ein Typ-1-Transmembranprotein handelt, bei welchem der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist, handelt es sich bei TNF-α um ein Typ-2-Transmembranprotein mit extrazellulärem C-Terminus. Weitere Studien mit verschiedenen Substraten würden entscheidend zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus von ADAM17 beitragen. Außerdem könnten Studien mit ADAM10 durchgeführt werden, da es sich dabei um die nächste verwandte Protease zu ADAM17 handelt.

Die proteolytische Aktivität von ADAM17 kann durch Interaktion mit der PDIA6 inaktiviert werden. Es handelt sich dabei um eine Inaktivierung aufgrund von Strukturänderungen innerhalb der MPD17, infolgedessen die katalytische Domäne die Schnittstellen seiner Substrate nicht mehr erreichen kann. Die ER-residente PDIA6 muss für die Interaktion mit ADAM17 auf der Zelloberfläche assoziiert sein. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der KDELR1 sowohl beim Transport der PDIs an die Zelloberfläche, als auch an deren Zelloberflächenassoziation beteiligt ist.

Diese Erkenntnisse liefern einen ersten Einblick in mögliche Transportwege der PDIs an die Zelloberfläche. Zudem sollte in Zukunft ein direkter Einfluss des *kdelr1 knockdowns* auf die proteolytische Prozessierungsrate von ADAM17-Substraten untersucht werden.

5 Zusammenfassung

ADAM17 (A Disintegrin And Metalloprotease 17) ist eine membranständige, ubiquitär exprimierte Metalloprotease, die in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle spielt. Inzwischen sind über 80 Substrate bekannt, welche von ADAM17 proteolytisch prozessiert werden können. Dadurch werden eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie z. B. die Immunantwort, Entzündungsreaktionen, sowie entwicklungsbiologische und regenerative Zellantworten, beeinflusst. Darüber hinaus spielt ADAM17 bei der Tumorentwicklung, Autoimmunerkrankung und chronischen Entzündungen eine entscheidende Rolle (Horiuchi *et al.*, 2007; Scheller *et al.*, 2011). Durch die Vielzahl an Prozessen, an denen ADAM17 beteiligt ist, wird die bedeutsame Rolle der Protease im Organismus deutlich und erfordert eine strikte Regulation ihrer Aktivität. Die membranständigen Substrate von ADAM17, wie der IL-6R, werden nach Zellstimulation nahe der Zellmembran prozessiert, wodurch es zur Freisetzung ihrer Ektodomäne kommt. In der vorliegenden Arbeit sollten die strukturellen Voraussetzungen untersucht werden, die zur Freisetzung des sIL-6R erforderlich sind. Dabei stand der Abstand der ADAM17-Schnittstelle im IL-6R zur Zellmembran im Vordergrund. Mit diesem Beitrag sollte das Verständnis der proteolytischen Aktivität und des Aktivierungs-mechanismus von ADAM17 vertieft werden. Neues Wissen über Grundlagen der Aktivierung bzw. Inaktivierung von ADAM17 ist essentiell um zukünftig die Aktivität der Protease in pathologischen Situationen gezielt zu modifizieren. So wird ADAM17 durch die ER-residente PDIA6 inaktiviert. Dabei interagiert die PDIA6 auf der Zelloberfläche mit der MPD von ADAM17. Die resultierende Isomerisierung zweier Disulfidbrücken führt zu einer Konformationsänderung innerhalb der MPD. Dieser Vorgang resultiert in einer Strukturänderung, die es ADAM17 nicht mehr erlaubt die Schnittstellen der membranständige Substrate zu erreichen (Düsterhöft *et al.*, 2013). Um diese Isomerisierung zu katalysieren ist es essentiell, dass PDIA6 auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Somit sollte in dem zweiten Abschnitt der Arbeit untersucht werden, wie die ER-residenten PDIs an die Zelloberfläche gelangen und auf der Zelloberfläche verbleiben. Damit sollte ein Beitrag zum Verständnis des Inaktivierungsmechanismus von ADAM17 geleistet werden.

6 Summary

ADAM17 (A Disintegrin And Metalloprotease 17) is a membrane-bound metalloprotease that is ubiquitously expressed in all tissues. So far, more than 80 substrates were identified that are proteolytically processed by ADAM17. It is involved in various physiological and pathophysiological processes such as immune response and inflammation as well as developmental and regenerative processes. Furthermore, ADAM17 plays a role in cancer progression, autoimmune diseases and chronic inflammation (Horiuchi et al., 2007; Scheller et al., 2011). Therefore, ADAM17 plays a central role in the organism and needs to be strictly regulated. To process membrane-bound substrates, e. g. the interleukin-6 receptor, by ADAM17 respective, cells need to be stimulated. This results in the generation of a soluble extracellular part of the substrate by cleavage close to the cell membrane. In this thesis, the structural requirements that lead to the release of the sIL-6R were examined. This work focused on the distance between the ADAM17 cleavage site of the IL-6R and the cell membrane. The aim was to contribute to a better understanding of the proteolytic action and the activation mechanism of ADAM17. The understanding of the activation and inactivation of ADAM17 in molecular detail is essential for future modification of its activity in pathological situations.

The ER-resident protein disulfide isomerase A6 (PDIA6) inactivates ADAM17 on the cell surface. PDIA6 interacts with the membrane-proximale domain (MPD) of ADAM17 and leads to an isomerization of disulfide bonds within this domain. The resulting irreversible conformational change makes an interaction between the catalytic domain of ADAM17 and its substrates cleavage sites close to the cell membrane impossible (Düsterhöft et al., 2013). To catalyze the inactivation PDIs have to be at the cell surface.

The second objective of this thesis was the examination how ER-resident PDIs escape the retrograde transport from the Golgi to the ER and travel to the cell surface. Since they play a crucial role at the cell surface it should be further adressed how PDIs remain at the cell membrane. These results should contribute to a better understanding of the inactivation mechanisms of ADAM17.

I Literaturverzeichnis

Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S., & Müllberg, J. (2000). Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem, **267*(9)**, 2624-2631.

Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, P.,& Hsu, V. (1997). The KDEL receptor, ERD2, regulates intercellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO J* **16**, 7305-7316.

Araujo, T. L. S., Fernandes, C. G., & Laurindo, F. R. M. (2017). Golgi-independent routes support protein disulfide isomerase externalization in vascular smooth muscle cells. *Redox Biol, **12***, 1004-1010.

Araujo, T. L. S., Zeidler, J. D., Oliveira, P. V. S., Dias, M. H., Armelin, H. A., & Laurindo, F. R. M. (2017). Protein disulfide isomerase externalization in endothelial cells follows classical and unconventional routes. *Free Radic Biol Med, **103***, 199-208.

Arora, P., Cuevas, B. D., Russo, A., Johnson, G. L. & Trejo, J. (2008). Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by proteaseactivated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene* **27**, 4434-4445.

Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta, **1404*(1-2)**, 67-76.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., & Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell, **77*(6)**, 895-907.

Bartels, A. K., Göttert, S., Desel, C., Schäfer, M., Krossa, S., Scheidig, A. J., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2019). KDEL Receptor 1 Contributes to Cell Surface Association of Protein Disulfide Isomerases. *Cell Physiol Biochem* **46**, 1-19.

Bax, D. V., Messent, A. J., Tart, J., van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R. A., & Humphries, M. J. (2004). Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem,* ***279*****(21)**, 22377-22386.

Becker, B., Shaebani, M. R., Rammo, D., Bubel, T., Santen, L., & Schmitt, M. J. (2016). Cargo binding promotes KDEL receptor clustering at the mammalian cell surface. *Sci Rep,* ***6***, 28940.

Bennett, T. A., Edwards, B. S., Sklar, L. A., & Rogelj, S. (2000). Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *J Immunol,* ***164*****(8)**, 4120-4129.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol,* ***62*****(3)**, 293-300.

Bi, S., Hong, P. W., Lee, B., & Baum, L. G. (2011). Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A,* ***108*****(26)**, 10650-10655.

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature,* ***385*****(6618)**, 729-733.

Black, R. A., & White, J. M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol,* ***10*****(5)**, 654-659.

Blaydon, D. C., Biancheri, P., Di, W. L., Plagnol, V., Cabral, R. M., Brooke, M. A., van Heel, D. A., Ruschendorf, F., Toynbee, M., Walne, A., O'Toole, E. A., Martin, J. E., Lindley, K., Vulliamy, T., Abrams, D. J., MacDonald, T. T., Harper, J. I., & Kelsell, D. P. (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med,* ***365*****(16)**, 1502-1508.

Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., & Stöckler, W. (1993). Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett,* ***331*****(1-2)**, 134-140.

Burikhanov, R., Zhao, Y., Goswami, A., Qiu, S., Schwarze, S. R., & Rangnekar, V. M. (2009). The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell,* ***138*****(2)**, 377-388.

Cancino, J., Capalbo, A., Di Campli, A., Giannotta, M., Rizzo, R., Jung, J. E., Di

Martino, R., Persico, M., Heinklein, P., Sallese, M., & Luini, A. (2014). Control systems of membrane transport at the interface between the endoplasmic reticulum and the golgi. *Developmental Cell*, **30(3)**, 280–294.

Chege, N. W., & Pfeffer, S. R. (1990). Compartmentation of the Golgi complex: brefeldin-A distinguishes trans-Golgi cisternae from the trans-Golgi network. *J Cell Biol,* ***111*****(3)**, 893-899.

Cho, J., Furie, B. C., Coughlin, S. R., & Furie, B. (2008). A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest,* ***118*****(3)**, 1123-1231.

Cho, J., Kennedy, D. R., Lin, L., Huang, M., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. C., & Furie, B. (2012). Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation in vivo depends on the presence of beta3 integrins. *Blood,* ***120*****(3)**, 647-655.

Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M.,& Cassel, D: (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* **270**, 1999-2002.

Delpino, A., & Castelli, M. (2002). The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep,* ***22*****(3-4)**, 407-420.

Doedens, J. R., & Black, R. A. (2000). Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem,* ***275*****(19)**, 14598-14607.

Düsterhöft, S., Höbel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G. H., Chalaris, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Lorenzen, I., & Grötzinger, J. (2014). A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J Biol Chem,* ***289*****(23)**, 16336-16348.

Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C. W., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc,* ***135*****(15)**, 5776-5781.

Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med,* ***29*****(5)**, 258-289.

Ellgaard, L., & Frickel, E. M. (2003). Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* **39**, 223-247.

Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., & Postina, R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem,* ***270*****(11)**, 2386-2393.

Garbers C., Aparicio-Siegmund S., & Rose-John S. (2018). The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol* **34**, 75-82.

Garbers, C., Hermanns, H., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grötzinger, J., Rose-John, S., & Scheller, J. (**2012).** Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, **23(3)**, 85-97.

Garbers C, & Scheller J. (2013). Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. *Biol Chem* **394 (9)**, 1145-1161.

Gechtman, Z., Alonso, J. L., Raab, G., Ingber, D. E., & Klagsbrun, M. (1999). The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem, **274*(40)**, 28828-28835.

Giannotta, M., Ruggiero, C., Grossi, M., Cancino, J., Capitani, M., Pulvirenti, T., Consoli, G. M., Geraci, C., Fanelli, F., Luini, A. & Sallese, M. (2012). The KDEL receptor couples to Gαq/11 to activate Src kinases and regulate transport through the Golgi. *EMBO Journal*, **31(13)**, 2869–2881.

Gonzales, P. E., Galli, J. D., & Milla, M. E. (2008). Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry, **47*(37)**, 9911-9919.

Gonzales, P. E., Solomon, A., Miller, A. B., Leesnitzer, M. A., Sagi, I., & Milla, M. E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem, **279*(30)**, 31638-31645.

Gooz, M. (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol, **45*(2)**, 146-169.

Grötzinger, J., Lorenzen, I., & Düsterhöft, S. (2017). Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, **1864*(11 Pt B)**, 2088-2095.

Hamada, H., Suzuki, M., Yuasa, S., Mimura, N., Shinozuka, N., Takada, Y., Suzuki, M., Nishino, T., Nakaya, H., Koseki, H., & Aoe, T. (2004). Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol, **24*(18)**, 8007-8017.

Henderson, M. J., Richie, C. T., Airavaara, M., Wang, Y., & Harvey, B. K. (2013). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *J Biol Chem, **288*(6)**, 4209-4225.

Holbrook, L. M., Sasikumar, P., Stanley, R. G., Simmonds, A. D., Bicknell, A. B., & Gibbins, J. M. (2012). The platelet-surface thiol isomerase enzyme ERp57 modulates platelet function. *J Thromb Haemost, **10*(2)**, 278-288.

Holbrook, L. M., Watkins, N. A., Simmonds, A. D., Jones, C. I., Ouwehand, W. H., & Gibbins, J. M. (2010). Platelets release novel thiol isomerase enzymes which are recruited to the cell surface following activation. *Br J Haematol, **148*(4)**, 627-637.

Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett, **354*(1)**, 1-6.

Hooper, N. M., Karran, E. H., & Turner, A. J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem J, **321 (Pt 2)***, 265-279.

Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y., & Blobel, C. P. (2007). Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol, **179*(5)**, 2686-2689.

Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Contesti, J., Gonzalez, E., Lopez-Soto, A., Fernandez-Guizan, A., Acebes-Huerta, A., de Los Toyos, J. R., Lopez-Larrea, C., Groh, V., Spies, T., & Gonzalez, S. (2012). Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother, **61*(8)**, 1201-1210.

Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., & Takeda, S. (2007). Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett, **581*(13)**, 2416-2422.

Irannejad, R., Tomshine, J. C., Tomshine, J. R., Chevalier, M., Mahoney, J. P., Steyaert, J., Rasmussen, S. G., Sunahara, R. K., El-Samad, H., Huang, B., & von Zastrow, M. (2013). Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* **495**, 534-538.

Itai, T., Tanaka, M., & Nagata, S. (2001). Processing of tumor necrosis factor by the membrane bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur J Biochem* **268**, 2074-2082.

Jäger, V., Bussow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A., & Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol,* ***13***, 52.

Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M., & Nikolov, D. B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell,* ***123*****(2)**, 291-304.

Jasuja, R., Furie, B., & Furie, B. C. (2010). Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood,* ***116*****(22)**, 4665-4674.

Jordan, P. A., & Gibbins, J. M. (2006). Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal,* ***8*****(3-4)**, 312-324.

Jordan, P. A., Stevens, J. M., Hubbard, G. P., Barrett, N. E., Sage, T., Authi, K. S., & Gibbins, J. M. (2005). A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function. *Blood,* ***105*****(4)**, 1500-1507.

Kaiser, B. K., Yim, D., Chow, I. T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H. H., Strong, R. K., Groh, V., & Spies, T. (2007). Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature,* ***447*****(7143)**, 482-486.

Kim, K., Hahm, E., Li, J., Holbrook, L. M., Sasikumar, P., Stanley, R. G., Ushio-Fukai, M., Gibbins, J. M., & Cho, J. (2013). Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood,* ***122*****(6)**, 1052-1061.

Ko, M. K., & Kay, E. P. (2004). PDI-mediated ER retention and proteasomal degradation of procollagen I in corneal endothelial cells. *Exp Cell Res,* ***295*****(1)**, 25-35.

Kozlov, G., Määttänen, P., Thomas, D. Y., & Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS Lett,* ***277*****(19)**, 3924-3936.

Krossa, S., Scheidig, A. J., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2018). Redundancy of protein disulfide isomerases in the catalysis of the inactivating disulfide switch in A Disintegrin and Metalloprotease 17. *Sci Rep,* ***8*****(1)**, 1103.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* ***227*****(5259)**, 680-685.

Lahav, J., Gofer-Dadosh, N., Luboshitz, J., Hess, O., & Shaklai, M. (2000). Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett,* ***475*****(2)**, 89-92.

Laurindo, F. R., Pescatore, L. A., & Fernandes Dde, C. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med,* ***52*****(9)**, 1954-1969.

Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D., Niu, X. D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., & Blobel, C. P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci,* ***123*****(Pt 22)**, 3913-3922.

Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol,* ***23*****(21)**, 7448-7459.

Lewis, M. J., & Pelham, H. R. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature,* ***348*****(6297)**, 162-163.

Lewis, M. J., & Pelham, H. R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell,* ***68*****(2)**, 353-364.

Lewis, M. J., Sweet, D. J., & Pelham, H. R. (1990). The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell,* ***61*****(7)**, 1359-1363.

Li, S., Zhao, F., Cheng, S., Wang, X., & Hao, Y. (2013). Uric acid-induced endoplasmic reticulum stress triggers phenotypic change in rat glomerular mesangial cells. *Nephrology (Carlton),* ***18*****(10)**, 682-689.

Li, X., Pérez, L., Pan, Z., & Fan, H. (2007). The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res,* ***17*****(12)**, 985-998.

Liu, H., Shim, A. H., & He, X. (2009). Structural characterization of the ectodomain of a disintegrin and metalloproteinase-22 (ADAM22), a neural adhesion receptor instead of metalloproteinase: insights on ADAM function. *J Biol Chem,* ***284*****(42)**, 29077-29086.

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

Lorenzen, I., Lokau, J., Korpys, Y., Oldefest, M., Flynn, C. M., Künzel, U., Garbers, C., Freeman, M., Grötzinger, J., & Düsterhöft, S. (2016). Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci Rep* **6**, 35067.

Lorenzen, I., Trad, A., & Grötzinger, J. (2011). Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem Biophys Res Commun,* ***415*****(2)**, 330-336.

Mancia, F., & Shapiro, L. (2005). ADAM and Eph: how Ephrin-signaling cells become detached. *Cell,* ***123*****(2)**, 185-187.

Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., & Pizzo, S. V. (2005). The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling. *J Immunol,* ***174*****(4)**, 2092-2097.

Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J. W., Palmisano, R., & Zhou, P. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem,* ***282*****(49)**, 35712-35721.

Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., & Willard, D. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol,* ***72*****(2)**, 127-129.

Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D., & et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature,* ***385*****(6618)**, 733-736.

Murphy, G. (2009). Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'. *Semin Cell Dev Biol,* ***20*****(2)**, 138-145.

Numata, Y., Morimura, T., Nakamura, S., Hirano, E., Kure, S., Goto, Y. I., & Inoue, K. (2013). Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Biol Chem,* ***288*****(11)**, 7451-7466.

Okada, K., Chen, W. T., Iwasa, S., Jin, X., Yamane, T., Ooi, A., & Mitsumata, M. (2003). Seprase, a membrane-type serine protease, has different expression patterns in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Oncology,* ***65*****(4)**, 363-370.

Paroutis, P., Touret, N., & Grinstein, S. (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda),* ***19***, 207-215.

Passam, F. H., Lin, L., Gopal, S., Stopa, J. D., Bellido-Martin, L., Huang, M., Furie, B. C., & Furie, B. (2015). Both platelet- and endothelial cell-derived ERp5 support thrombus formation in a laser-induced mouse model of thrombosis. *Blood,* ***125*****(14)**, 2276-2285.

Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., & Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science,* ***282*****(5392)**, 1281-1284.

Peters, L. R., & Raghavan, M. (2011). Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *J Immunol,* ***187*****(2)**, 919-931.

Peters, M., Müller, A. M., & Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood,* ***92*****(10)**, 3495-3504.

Pulvirenti, T., Giannotta, M., Capestrano, M., Capitani, M., Pisanu, A., Polishchuk, R. S., San Pietro, E., Beznoussenko, G. V., Mironov, A. A., Turacchio, G., Hsu, V. W., Sallese, M., & Luini, A. (2008). A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nature Cell Biology*, **10(8)**, 912–922.

Ramachandran, N., Root, P., Jiang, X. M., Hogg, P. J., & Mutus, B. (2001). Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A,* ***98*****(17)**, 9539-9544.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc,* ***8*****(11)**, 2281-2308.

Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Nguyen, V. D., Latva-Ranta, M., & Ruddock, L. (2007). A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol,* ***179*****(6)**, 1193-1204.

Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., & Black, R. A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem,* ***275*****(19)**, 14608-14614.

Reiss, K., & Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,* ***1864*****(11 Pt B)**, 2082-2087.

Riethmüller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C. W., Flynn, C. M., Lokau, J., Agthe, M., Düsterhöft, S., Zhu, Y., Grötzinger, J., Lorenzen, I., Koudelka, T., Yamamoto, K., Pickhinke, U., Wichert, R., Becker-Pauly, C., Rädisch, M., Albrecht, A., Hessefort, M., Stahnke, D., Unverzagt, C., Rose-John, S., Tholey, A., & Garbers, C. (2017). Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol, **15**(1)*, e2000080.

Robbins, P. D., Rio, D. C., & Botchan, M. R. (1986). trans Activation of the simian virus 40 enhancer. *Mol Cell Biol, **6**(4)*, 1283-1295.

Rose-John, S., & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J, **300 (Pt 2)***, 281-290.

Schäfer, K., Webb, N. E., Pang, M., Hernandez-Davies, J. E., Lee, K. P., Gonzalez, P., Douglass, M. V., Lee, B., & Baum, L. G. (2017). Galectin-9 binds to O-glycans on protein disulfide isomerase. *Glycobiology, **27**(9)*, 878-887.

Scheel, A. A., & Pelham, H. R. (1998). Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J Biol Chem, **273**(4)*, 2467-2472.

Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., & Rose-John, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol, **32**(8)*, 380-387.

Schlöndorff, J., Becherer, J. D., & Blobel, C. P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J, **347 Pt 1***, 131-138.

Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev, **17**(1)*, 7-30.

Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N., & Pelham, H. R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell, **61**(7)*, 1349-1357.

Sharda, A., Kim, S. H., Jasuja, R., Gopal, S., Flaumenhaft, R., Furie, B. C., & Furie, B. (2015). Defective PDI release from platelets and endothelial cells impairs thrombus formation in Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood,* ***125*****(10)**, 1633-1642.

Shein, H. M., & Enders, J. F. (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A,* ***48***, 1164-1172.

Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., Maretzky, T., Evers, A., Andrä, J., Düsterhöft, S., Michalek, M., Lorenzen, I., Somasundaram, P., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Kunzelmann, K., Heinbockel, L., Nehls, C., Gutsmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2016). Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun,* ***7***, 11523.

Sönnichsen, B., Fullekrug, J., Nguyen Van, P., Diekmann, W., Robinson, D. G., & Mieskes, G. (1994). Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci,* ***107 (Pt 10)***, 2705-2717.

Solis, G. P., Bilousov, O., Koval, A., Lüchtenborg, A. M., Lin, C., & Katanaev, V. L. (2017). Golgi-resident Gαo promotes protrusive membrane dynamics. *Cell*, **170(5)**, 939–955.

Subedi, G. P., Johnson, R. W., Moniz, H. A., Moremen, K. W., & Barb, A. (2015). High Yield Expression of Recombinant Human Proteins with the Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension. *J Vis Exp***(106)**, e53568.

Swiatkowska, M., Szymanski, J., Padula, G., & Cierniewski, C. S. (2008). Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with alphaVbeta3 integrin on endothelial cells. *FEBS Lett,* ***275*****(8)**, 1813-1823.

Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol,* ***20*****(2)**, 146-152.

Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., & Araki, S. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *Embo j,* ***25*****(11)**, 2388-2396.

Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J.,& Rothman, J. (1993). Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **123**, 1365-1371.

Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H. O., Stockert, R. J., & Schilsky, M. L. (1995). Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem, **270**(**35**)*, 20410-20416.

Thon, J. N., Peters, C. G., Machlus, K. R., Aslam, R., Rowley, J., Macleod, H., Devine, M. T., Fuchs, T. A., Weyrich, A. S., Semple, J. W., Flaumenhaft, R., & Italiano, J. E., Jr. (2012). T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol, **198**(**4**)*, 561-574.

Thul, P. J., Akesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Bjork, L., Breckels, L. M., Bäckström, A., Danielsson, F., Fagerberg, L., Fall, J., Gatto, L., Gnann, C., Hober, S., Hjelmare, M., Johansson, F., Lee, S., Lindskog, C., Mulder, J., Mulvey, C. M., Nilsson, P., Oksvold, P., Rockberg, J., Schutten, R., Schwenk, J. M., Sivertsson, A., Sjöstedt, E., Skogs, M., Stadler, C., Sullivan, D. P., Tegel, H., Winsnes, C., Zhang, C., Zwahlen, M., Mardinoglu, A., Pontén, F., von Feilitzen, K., Lilley, K. S., Uhlén, M., & Lundberg, E. (2017). A subcellular map of the human proteome. *Science, **356**(**6340**)*.

Townsley, F. M., Wilson, D. W., & Pelham, H. R. (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *Embo j, **12**(**7**)*, 2821-2829.

Trad, A., Riese, M., Shomali, M., Hedeman, N., Effenberger, T., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2013). The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblastcarcinoma cell interactions. *Int J Oncol, **42**(**5**)*, 1793-1800.

Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Myllyla, R., & Kivirikko, K. I. (1992). Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in Spodoptera frugiperda insect cells. *Embo j, **11**(**11**)*, 4213-4217.

Wan, S. W., Lin, C. F., Lu, Y. T., Lei, H. Y., Anderson, R., & Lin, Y. S. (2012). Endothelial cell surface expression of protein disulfide isomerase activates beta1 and beta3 integrins and facilitates dengue-virus infection. *J Cell Biochem,* ***113*****(5)**, 1681-1691.

Wang, L., Wu, Y., Zhou, J., Ahmad, S. S., Mutus, B., Garbi, N., Hammerling, G., Liu, J., & Essex, D. W. (2013). Platelet-derived ERp57 mediates platelet incorporation into a growing thrombus by regulation of the alphaIIbbeta3 integrin. *Blood,* ***122*****(22)**, 3642-3650.

Willems, S. H., Tape, C. J., Stanley, P. L., Taylor, N. A., Mills, I. G., Neal, D. E., McCafferty, J., & Murphy, G. (2010). Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J,* ***428*****(3)**, 439-450.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res,* ***17*****(9)**, 3469-3478.

Xiao, G., Chung, T. F., Pyun, H. Y., Fine, R. E., & Johnson, R. J. (1999). KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Brain Res Mol Brain Res,* ***72*****(2)**, 121-128.

Xu, S., Sankar, S., & Neamati, N. (2014). Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today,* ***19*****(3)**, 222-240.

Yoshihisa, T., Barlowe, C., & Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* **259**, 1466.

Yoshimori, T., Semba, T., Takemoto, H., Akagi, S., Yamamoto, A., & Tashiro, Y. (1990). Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J Biol Chem,* ***265*****(26)**, 15984-15990.

Zai, A., Rudd, M. A., Scribner, A. W., & Loscalzo, J. (1999). Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest,* ***103*****(3)**, 393-399.

Zhang, Y., Liu, R., Ni, M., Gill, P., & Lee, A. S. (2010). Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem,* ***285*****(20)**, 15065-15075.

Zur Hausen, H. (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol,* ***1*****(6)**, 1174-1185.

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Familie der Metzinkine mit ADAM17. 6

Abbildung 2: Schematische Darstellung von ADAM17. 9

Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteolytischen Aktivität von ADAM17 in stimulierten und unstimulierten Zellen. 12

Abbildung 4: Isomerisierung der MPD17 durch PDIA6. 14

Abbildung 5: Reaktionsverhalten der Proteindisulfidisomerasen. 15

Abbildung 6: Schematischer Aufbau der PDIs. 16

Abbildung 7: Schematische Darstellung des KDELR. 19

Abbildung 8: PDIA6wo wird in den Überstand sekretiert. 49

Abbildung 9: Überexprimierte PDIA6 ist mit der Zelloberfläche assoziiert. 50

Abbildung 10: Analyse der Bindungskapazitäten von HEK293T-Zellen für PDIA6 in Abhängigkeit des KDEL-Motivs. 51

Abbildung 11: Die PDIA6*-Bindung auf der Zelloberfläche kann durch KDEL-Peptid und PDIA6 blockiert werden. 53

Abbildung 12: Analyse der *kdelr1 knock-down*-Zellen mittels Durchflusszytometrie. 55

Abbildung 13: Assoziation von fluoreszenzmarkierter PDIA6* und PDIA6wo* an die Zelloberfläche von *kdelr1 knock-down*-Zellen. 57

Abbildung 14: Endogene PDIA6 und PDIA3 sind auf der Zelloberfläche assoziiert.. 58

Abbildung 15: Auswirkungen des *kdelr1 knockdowns* auf den Transport endogener PDIs an die Zelloberfläche. 59

Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalyse zur Lokalisation fluoreszenzmarkierter PDIA6*..... 61

Abbildung 17: Immunfluoreszenzanalyse zur Analyse einer Kolokalisation exogener PDIA6* mit dem ER. 62

Abbildung 18: Plot-Profil zur Immunfluoreszenzanalyse. 63

Abbildung 19: Inhibition und Stimulation des KDELR1- und PDI-Transports an die Zelloberfläche. 67

Abbildung 20: IL-6R Mutationen innerhalb der *stalk*-Region 68

Abbildung 21: Expression der IL-6R-Mutanten. 69

Abbildung 22: IL-6R Oberflächenexpressionsanalyse. 70

Abbildung 23: Mutation bzw. Fehlen der Glykosylierungsstelle im sIL-6R. 71

Abbildung 24: sIL-6R nach DMSO bzw. PMA Behandlung des Wildytps und der Mutanten. 73

Abbildung 25: Proteolytische Prozessierung des wt IL-6R und den mutierten Varianten durch ADAM17. 75

Abbildung 26: Erweiterte schematische Darstellung der proteolytischen Aktivität von ADAM17 in stimulierten und unstimulierten Zellen. 84

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte. 21

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien. 22

Tabelle 3: Verwendete Software. 22

Tabelle 4: Gesonderte Bezugsquellen der Chemikalien. 23

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika. 24

Tabelle 6: Verwendete Antikörper. 25

Tabelle 7: Verwendete Kits. 26

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide. 26

Tabelle 9: Verwendete Plasmide. 27

Tabelle 10: Hybridisieren der Oligonukleotide für CRISPR/Cas9. 38

Tabelle 11: Ligationsansatz für CRISPR/Cas9. 38

Tabelle 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE. 42

IV Abkürzungsverzeichnis

%	……	Prozent
°C	……	Grad Celsius
A	……	Ampere
ad.	……	auffüllen auf
ADAM	……	A Disintegrin And Metalloprotease
APS	……	Ammonium-Persulfat
BCA	……	Bicinchoninsäure
bp	……	Basenpaare
BSA	……	Rinderserum-Albumin
bzw.	……	beziehungsweise
ca.	……	circa
CANDIS	……	conserved ADAM17 dynamic interaction sequence
d. h	……	das heißt
DAPCO	……	Diazabicyclooctan
DAPI	……	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH_2O	……	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	……	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	……	Dimethylsulfoxid
DNA	……	Desoxyribonukleinsäure
DTT	……	Dithiothreitol
E. coli	……	*Escherichia coli*
e. g.	……	exempli gratia (*for example*)
ECL	……	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	……	Ethylendiamintetraacetat
ER	……	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	……	*et alii* (und andere)
FCS	……	fötales Kälberserum
g	……	Gramm
GFP	……	grün-fluoreszierendes Protein
gp130	……	Glykoprotein 130
h	……	Stunde
HEK	……	Human Embryonic Kidney

HRP	……	Meerrettichperoxidase
IFA	……	immunfluoreszenzmikroskopische Analyse
IL-6	……	Interleukin-6
IL-6R	……	Interleukin-6 Rezeptor
k	……	Kilo
kDa	……	Kilodalton
L	……	Liter
LB	……	Luria-Bertani
µ	……	Mikro (10^{-6})
M	……	Molar
m	……	milli (10^{-3})
min	……	Minute
mm	……	Millimeter
MPD	……	membranproximale Domäne
OD	……	optische Dichte
p	……	piko (10^{-12})
PAGE	……	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	……	Phosphat Buffered Saline
PCR	……	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	……	Proteindisulfidisomerase
PEI	……	Polyethylenimin
PMA	……	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PS	……	Phosphatidylserin
RNA	……	Ribonukleinsäure
rpm	……	*rounds per minute*
RT	……	Raumtemperatur
SDS	……	Natriumdodecylsulfat
TBS	……	Tris Buffered Saline
TEMED	……	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF-α	……	Tumornekrosefaktor α
Tris	……	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	……	unter anderem
U	……	Unit (Einheit von Enzymen)
ü. N.	……	über Nacht
UV	……	Ultraviolett
v/v	……	Volumen pro Volumen

V	……	Volt
w/v	……	Gewicht pro Volumen
WGA	……	Wheat germ agglutinin
wt	……	wildtyp
x g	……	Fallbeschleunigung (9,81 m/s²)
z. B.	……	zum Beispiel

Aminosäuren

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

V Lebenslauf

Name: Anne-Kathrin Bartels

Geburtstag: 15.07.1986

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

2015 - 2019	Promotion am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Rahmen des SFB 877 ‚*Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology*'. Titel: Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen der proteolytischen Aktivität von ADAM17
2010 - 2013	Master Studium der Biologie mit dem Schwerpunkt Molekulare Biologie und Biotechnologie an der Universität Hamburg
2007 - 2010	Bachelor Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
2007	Allgemeine Hochschulreife (Scharnhorst Gymnasium Hildesheim)

VI Publikationen

Bartels, A. K., Göttert, S., Desel, C., Schäfer, M., Krossa, S., Scheidig, A. J., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2019). KDEL Receptor 1 Contributes to Cell Surface Association of Protein Disulfide Isomerases. *Cell Physiol Biochem* **46**, 1-19.

Schäfer, M. , Granato, D. C., Krossa, S., Bartels, A. K., Yokoo, S., Düsterhöft, S., Koudelka, T., Scheidig, A. J., Tholey, A., Paes Leme, A. F., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2017). GRP78 protects a disintegrin and metalloprotease 17 against protein-disulfide isomerase A6 catalyzed inactivation. *FEBS Lett* **591(21)**, 3567-3587.

Matthiesen, J., Bär, A. K., Bartels, A. K., Marien, D., Ofori, S., Biller, L., Tannich, E., Lotter, H., & Bruchhaus, I. (2013). Overexpression of specific cysteine peptidases confers pathogenicity to a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* clone. *MBio* **4(2)**, 1-11.

VII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel herangezogen habe. Diese Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die Arbeit wurde von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht und ich erkläre an keinem anderen Promotionsverfahren teilgenommen zu haben und, dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Kiel, 11.04.2019

(Anne-Kathrin Bartels)

VIII Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Laborgruppe am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel anfertigen zu können. Die Unterstützung und Hilfestellung haben dazu beigetragen, diese Arbeit bestmöglich zu verfassen.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan Rose-John, welcher mich am Institut für Biochemie aufgenommen hat und stets mit fachlichem Rat und einem offenen Ohr für etwaige Anliegen zur Verfügung stand.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Inken Lorenzen für die engagierte Betreuung, die Begutachtung, Beantwortung von Fragen jeder Art, sowie die Hilfe bei diversen Arbeitstechniken im Labor bedanken. Mit Ihr hatte ich außerdem viele nette Gespräche und unterhaltsame Momente im Laboralltag.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Matthias Leippe für die Begutachung meiner Arbeit und bei Prof. Dr. Axel Scheidig als Teil meiner Prüfungskomission.

Ich möchte mich bei allen Mitglieder der AG Grö bedanken, welche im Laufe der Zeit ein- und ausgegangen sind und den Laboralltag mit vielen schönen Momenten und fachlichem Austausch gefüllt haben.

Letztendlich war es jedoch das gesamte Institut der Biochemie mit sämtlichen Mitarbeitern und Assoziierten, welche dafür verantwortlich sind, dass ich die Zeit sehr genossen habe und mich privat wie auch beruflich weiterentwickeln konnte.

Abschließend gilt mein Dank meinen Freunden und ganz besonders meiner Familie, für die Unterstützung in jeder Lebenslage.