

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die Rolle von Anoctamin 6 für die Aktivierung der Metalloprotease ADAM17

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

vorgelegt von

Katharina Isabelle Koyro

aus Hamburg

Kiel, 2019

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Karina Reiß, Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Biochemisches
Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2020

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 15.09.2019

Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen.....	1
1.2 Struktur von ADAM17.....	2
1.3 Funktion von ADAM17.....	5
1.4 Regulation von ADAM17.....	8
1.5 Die Zellmembran	11
1.6 Flippasen, Floppasen und Scramblasen.....	11
1.7 Anoctamin-Familie	13
1.8 Anoctamin 6: Struktur und Funktion.....	14
2 Zielsetzung.....	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Geräte.....	17
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.3 Chemikalien	19
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	21
3.1.5 Stimulanzen	25
3.1.6 Inhibitoren	25
3.1.7 Primäre und sekundäre Antikörper	25
3.1.8 Zellkulturmedien	26
3.1.9 Zelllinien	26
3.1.10 Plasmide	26
3.1.11 Kits.....	27
3.1.12 Software	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Mikrobiologische Verfahren	27
3.2.1.1 Transformation	27
3.2.1.2 Anlage eines Plasmid-Glycerolstammes	28
3.2.1.3 Gewinnung von Plasmiden.....	28
3.2.2 Zellbiologische Methoden	28

3.2.2.1 Kultivierung von Zellen.....	28
3.2.2.2 Beschichtung von Wachstumsflächen.....	29
3.2.2.3 Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	30
3.2.2.4 Einfrieren von eukaryotischen Zellen.....	30
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden	30
3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten	30
3.2.3.2 Bestimmungen der Proteinkonzentration	31
3.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.2.3.4 <i>Western Blot</i>	32
3.2.3.5 Immunologische Detektion von Proteinen	32
3.2.4 Molekularbiologische Methoden	33
3.2.4.1 Isolierung von mRNA aus Zellen.....	33
3.2.4.2 Reverse Transkription	34
3.2.4.3 Gradienten Polymerase Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.4.4 Oligonukleotide.....	35
3.2.4.5 Quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR.....	36
3.2.5 <i>Shedding</i> -Experimente mittels alkalischer Phosphatase-Assays	37
3.2.5.1 Hintergrund.....	37
3.2.5.2 Transiente Transfektion	38
3.2.5.3 Stimulation und Inhibition	38
3.2.5.4 Auswertung.....	38
3.2.6 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	39
3.2.6.1 Hintergrund.....	39
3.2.6.2 siRNA-Transfektion	39
3.2.6.3 Stimulation von siRNA-transfizierten Zellen	40
3.2.6.4 Durchführung eines ELISAs	40
3.2.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	41
3.2.7.1 Fluoreszenzfärbung - <i>Annexin V</i> , <i>Alexa Fluor</i> [®] 568 nm.....	41
3.2.7.2 Mikroskopie	41
3.2.8 Statistische Auswertung	41
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Eine ANO6-Überexpression führt unter Ionomycin-Stimulation zu einer verstärkten PS-Externalisierung	43
4.2 Versuche zur Etablierung eines anti-ANO6-<i>Western Blots</i>	46
4.3 Auswirkungen einer ANO6-Überexpression auf die Freisetzung von ADAM-Substraten im AP-Assay	48

4.3.1 Eine ANO6-Überexpression führt unter Ionomycin-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg des AREG- und TGF- α - <i>Sheddings</i>	48
4.3.2 Eine ANO6-Überexpression führt unter Melittin-Stimulation zu einem signifikanten AREG- und TGF- α - <i>Shedding</i> -Anstieg	52
4.3.3 Eine ANO6-Überexpression führt unter PMA-Stimulation zu keiner Veränderung des AREG- <i>Sheddings</i>	55
4.4 Die Überexpression einer Ca²⁺-hypersensitiven ANO6-Mutante induziert eine massive Freisetzung von AREG und TGF-α im AP-Assay.....	56
4.5 Auswirkungen der ANO6-Herunterregulation mittels siRNA auf die ADAM-Substratfreisetzung in HUVECs	60
4.5.1 Die Herunterregulation von ANO6 durch ANO6-siRNA führt zu einer signifikanten Reduktion des Ionomycin-induzierten TNFR1- <i>Sheddings</i> im ELISA	61
4.5.2 Die Herunterregulation von ANO6 mit ANO6-siRNA zeigt keine Veränderung in der Freisetzung von CXCL16 im ELISA	63
4.6 Unter Ca²⁺-Ionophor-Stimulation wird weniger TNFR1 von AnO6^{-/-}-Osteoblasten als von AnO6^{+/-}-Osteoblasten freigesetzt	64
5 Diskussion	66
5.1 Eine ANO6-Überexpression führt unter Ionomycin-Stimulation zu einer gesteigerten PS-Externalisierung	67
5.2 Eine ANO6-Überexpression korreliert unter Ionomycin- und Melittin-Stimulation mit einem gesteigerten ADAM17-Substrat- <i>Shedding</i>	70
5.3 Eine ANO6 D408G-Überexpression induziert eine maximale Zunahme des konstitutiven ADAM17-Substrat- <i>Sheddings</i>	76
5.4 Eine Herunterregulation von endogenem ANO6 mittels ANO6-siRNA korreliert unter Ionomycin-Stimulation mit einem verminderten ADAM17-Substrat- <i>Shedding</i>	78
5.5 Ein ANO6-Mangel in embryonalen Maus-Osteoblasten geht mit einem verminderten TNFR1- <i>Shedding</i> einher	81
6 Zusammenfassung	85
7 Summary	87
8 Abbildungsverzeichnis.....	89
9 Literaturverzeichnis.....	90
10 Danksagung	104
11 Erklärung und Veröffentlichung.....	105
12 Lebenslauf.....	106

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADAM-TS	<i>ADAM with thrombospondin motif</i>
ANO6	Anoctamin 6
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AREG	<i>Amphiregulin</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ²⁺	Calciumion
CANDIS	<i>Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence</i>
CD62L	L-Selektin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cl ⁻	Chloridion
COS-7	SV40-transformierte Zelllinie der Niere der grünen Meerkatze
Ct	<i>Cycle threshold</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
CX3CL1	<i>C-X3-C motif ligand 1</i>
CXCL16	<i>C-X-C motif ligand 16</i>
CXCR6	<i>C-X-C chemokine receptor type 6</i>
DABCO	<i>1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octane</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>
dest.	destilliert
Dis	Disintegrin-Domäne
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal related kinases</i>
et al.	<i>et alii</i>

EZR	Extrazellulärraum
FCS	Fetales Kälberserum
g	einfache Gravitationsbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GI	GI254023X
GW	GW280264X
h	Stunde
HaCaT	<i>Human adult low calcium high temperature keratinocytes</i>
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
His	Polyhistidin-Markierung
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1</i>
HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
Io	Ionomycin
iRhom	<i>inactive rhomboid protein</i>
IZR	Intrazellulärraum
JAM-A	<i>Junctional adhesion molecule</i>
Kat	Katalytische Metalloprotease-Domäne
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
M	Molar
mA	Milliampere
Mel	Melittin
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MM	Marimastat
MMP	Matrix-Metalloprotease
µM	Mikromolar
MPD	Membran-proximale Domäne
mRNA	<i>messenger RNA</i>

NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
N-terminal	Amino-terminal
p	<i>probability</i>
PACS	<i>Phosphofurin acidic cluster sorting protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PLSCR1	<i>Phospholipid scramblase 1</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
POD	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
-R	-Rezeptor
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitativen <i>Real-Time</i> RT-PCR
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	<i>Transforming growth factor-α</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TMD	Transmembran-Domäne
TMEM16	<i>Transmembrane protein 16</i>
TNF- α	<i>Tumor nekrosis faktor-α</i>
TNFR	<i>Tumor nekrosis faktor receptor</i>
V	Volt
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Xkr8	<i>Xk-related protein 8</i>
Z	Zytoplasmatische-Domäne

1 Einleitung

1.1 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen

Die proteolytische Spaltung und Freisetzung der extrazellulären Domänen von Membran-assoziierten Vorläuferproteinen stellt einen essenziellen Mechanismus für die Regulation zellulärer Prozesse dar. Dies wird auch *Ectodomain-Shedding* genannt (Blobel 2005; Gooz 2011). Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen, die abgekürzt als ADAMs (*A Disintegrine and Metalloproteinases*) bezeichnet werden, sind eine bedeutende Enzymfamilie, von der einige Mitglieder als *Sheddases* fungieren. ADAMs sind Typ-I-Glykoproteine der Plasmamembran (Reiss & Saftig 2009; Schlöndorff & Blobel 1999). Die namensgebende Disintegrin-Domäne bezeichnet die funktionelle Beteiligung an Zell-Adhäsionsvorgängen (White 2003). Die ebenfalls namensgebende Metalloprotease-Domäne spaltet im Vorgang des *Sheddings* Zelloberflächenproteine ab. Das *Shedding* erfolgt im juxtamembranen Bereich und ist sowohl bei Typ-I- als auch bei Typ-II-Transmembranproteinen sowie bei GPI-verankerten Proteinen zu beobachten (Reiss & Saftig 2009).

ADAMs sind in einer Vielzahl von Organismen zu finden. In Pflanzen und Bakterien konnten diese Proteasen jedoch nicht nachgewiesen werden (Stone *et al.* 1999).

ADAMs gehören neben den *Snake venom metalloproteinases* und den *ADAMs with thrombospondin motifs* (ADAM-TSs) zu den Adamlysinen und sind als M12B Adamlysin-Subfamilie in der MEROPS-Klassifikation eingeordnet (Rawlings *et al.* 2018). Adamlysine bilden zusammen mit Astacinen, Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Serralysinen die vier Subfamilien der Metzinkine. Die Familie der Metzinkine ist charakterisiert durch eine hochkonservierte Zink-Bindungsregion im aktiven Zentrum. Diese enthält drei Histidin-Reste (HEXXHXXGXXH). Der Methionin-Rest in Nähe des katalytischen Zentrums, der auch als *Met-turn* bezeichnet wird, ist ein weiteres Charakteristikum der Metzinkin-Familie (Bode *et al.* 1993).

Im menschlichen Genom sind 21 ADAMs beschrieben, jedoch besitzen nur 13 ADAMs eine proteolytische Aktivität: ADAMDEC-1, ADAM8, -9, 10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 und -33 (Edwards *et al.* 2008). Als Ursache für die fehlende Proteolyse-Eigenschaft mancher ADAMs ist zum einen der Verlust der Metalloprotease-Domäne während der intrazellulären Reifung und zum anderen Veränderungen der Zink-Binderegion des aktiven Zentrums anzunehmen (Gooz 2010). Die proteolytisch inaktiven ADAMs (ADAM-2, -7, -11, -18, -22, -23, -29

und -32) könnten andere Funktionen wie eine Beteiligung bei Proteinfaltungsprozessen oder bei Protein-Protein-Interaktionen besitzen (Edwards *et al.* 2008).

ADAMs sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel der Fertilisation, Apoptose, Zellmigration, Wundheilung, Neurogenese und der Angiogenese. Dabei ist hervorzuheben, dass nicht nur die direkte extrazelluläre Freisetzung von Zellmembranproteinen Signalwege anstößt, sondern dass nachfolgend intrazellulär freigesetzte Domänen eine Signaltransduktion initiieren könnten (Reiss & Saftig 2009).

Neben physiologischen Prozessen sind ADAMs auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Hier sind insbesondere inflammatorische Erkrankungen, wie die rheumatoide Arthritis und entzündliche Darmerkrankungen, die kortikale Demenz vom Alzheimer-Typ, verschiedene Tumorerkrankungen und Herz-Kreislaufkrankungen zu nennen (Lisi *et al.* 2014; Pruessmeyer & Ludwig 2009).

Aufgrund der vielseitigen biologischen Relevanz von ADAM17 ist diese Protease in der Literatur am umfassendsten beschrieben und steht auch in dieser Arbeit im Mittelpunkt.

1.2 Struktur von ADAM17

ADAMs besitzen eine charakteristische Domänenstruktur. N-terminal befindet sich die Signal-Sequenz gefolgt von einer Pro-Domäne, einer Metalloprotease-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen-Region, einer *Epidermal growth factor*- (EGF) ähnlichen-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer C-terminalen Zytoplasmatischen-Domäne (Seals & Courtneidge 2003; Wolfsberg *et al.* 1995).

ADAM10 und -17 werden auch als atypische Mitglieder der ADAM-Familie bezeichnet, da anstelle der Cystein-reichen- und EGF-ähnlichen-Domäne, die Membran-proximale-Domäne (MPD) mit einer α/β -Faltung sowie die *Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence*-Region (CANDIS-Region) zu finden sind (Düsterhöft *et al.* 2014; Lorenzen *et al.* 2012; Takeda 2009). Abbildung 1 zeigt die Domänenstruktur von ADAM17.

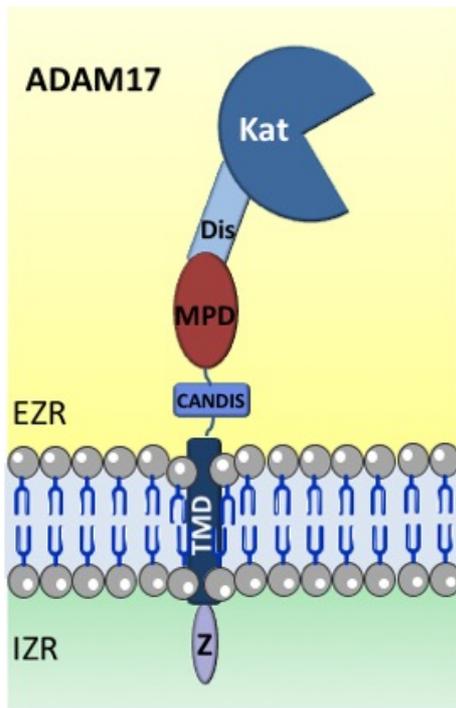


Abbildung 1: Die Domänenstruktur von ADAM17

ADAM17 besitzt eine Signal-Sequenz (nicht abgebildet), Pro-Domäne (nicht abgebildet), katalytische Metalloprotease-Domäne (Kat), Disintegrin-Domäne (Dis), Membranproximale-Domäne (MPD), Stalk/CANDIS-Region (CANDIS), Transmembran-Domäne (TMD) und eine Zytoplasmatische-Domäne (Z) (modifiziert nach Düsterhöft *et al.* 2014).

EZR (Extrazellulärraum)
IZR (Intrazellulärraum)

Die Synthese von ADAMs findet an Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums statt. Es folgt die unten näher beschriebene Reifung, bestehend aus einer komplexen Glykosylierung und Entfernung des Propeptids im Golgi-Apparat (Endres *et al.* 2003; Reiss & Saftig 2009; Schlöndorff *et al.* 2000). Die Signal-Sequenz dient dem Transport des Proteins und wird in späteren Schritten entfernt (Seals & Courtneidge, 2003).

Katalytisch aktive ADAMs werden als inaktive Proenzyme synthetisiert. Die Pro-Domäne enthält einen konservierten Cystein-Rest, der mit dem Zink-Ion des aktiven Zentrums der Protease interagiert, sodass die Protease-Domäne zunächst inaktiv ist (Van Wart & Birkedal-Hansen 1990). Außerdem wird für die Pro-Domäne eine Funktion beim Transport und die Eigenschaft als Chaperon vermutet (Leonard *et al.* 2005). Chaperone schützen Proteine vor Aggregationen und sichern die korrekte Proteinfaltung (Walter & Buchner 2002). Das Abspalten der N-terminalen Pro-Domäne erfolgt durch Furin-ähnliche Konvertasen (Lum *et al.* 1998; Roghani *et al.* 1999; Schlöndorff *et al.* 2000). Dieser Vorgang findet bei ADAM10 und -17 durch zwei proteolytische Prozesse im trans-Golgi-Netzwerk statt. Zunächst erfolgt ein erster Schnitt an der *Proprotein Convertase Cleavage Site*, sodass eine Konformationsänderung eine weitere Schnittstelle zugänglich macht (Wong *et al.* 2015). Final werden die ADAMs auf die Zelloberfläche transportiert.

Der Pro-Domäne folgt die Metalloprotease-Domäne. Die Entschlüsselung der Kristallstruktur der katalytisch aktiven Domäne von ADAM17 hat entscheidend zum Verständnis der Mechanismen der proteolytischen Aktivität beigetragen (Maskos *et al.* 1998). Katalytisch aktive

ADAMs sind durch das konservierte Zink-Bindemotiv mit drei Histidin-Resten und den Methionin-*turn* gekennzeichnet (Bode *et al.* 1993). Die extrazellulären Domänen von ADAM-Substraten werden hydrolytisch freigesetzt (Seals & Courtneidge 2003).

C-terminal der Metalloprotease-Domäne befindet sich die Disintegrin-ähnliche-Domäne. Bei einer Vielzahl von ADAMs kann die Disintegrin-ähnlichen-Domäne an Integrine binden (White 2003). Integrine sind Transmembranproteine, die Adhäsionsvorgänge vermitteln. Es handelt sich sowohl um Zell-Zell-Kontakte als auch um Zell-Matrix-Kontakte. ADAM17 kann an das Integrin $\alpha 5\beta 1$ binden (Bax *et al.* 2004). In Nierenzellen konnte beobachtet werden, dass die Bindung von ADAM17 an Integrin $\alpha 5\beta 1$ die Aktivität von ADAM17 moduliert (Gooz *et al.* 2012).

Die auf die Disintegrin-Domäne folgenden Domänen sind in der Nomenklatur nicht einheitlich beschrieben. Im Folgenden wird die Domänenstruktur von der in dieser Arbeit im Fokus stehenden Protease ADAM17 näher erläutert.

Der MPD wird eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Substraterkennung, Multimerisation und die Aktivitätsregulierung von ADAM17 zugeschrieben (Düsterhöft *et al.*, 2014, 2013, Lorenzen *et al.*, 2012, 2011; Sommer *et al.*, 2016). Von der isolierten MPD existieren zwei Isoformen *in vitro*. Es wird eine offene und gestreckte Isoform, die mit einem aktiven ADAM17 korreliert, von einer geschlossenen und kompakten Isoform, die für ein inaktives ADAM17 steht, unterschieden. Protein-Disulfid-Isomerasen wandeln die offene in die kompakte Isoform um. Bei diesem Vorgang werden zwei Disulfidbrücken umgelagert (Düsterhöft *et al.* 2013). Möglicherweise sind verschiedene Protein-Disulfid-Isomerasen *in vivo* an der Umlagerung der Disulfidbrücken beteiligt (Krossa *et al.* 2018). Zudem enthält die MPD ein kationisches Aminosäure-Motiv, welches vermutlich mit dem in der Gesamtladung negativ geladenen Phosphatidylserin (PS) der Plasmamembran interagiert. Diese Interaktion könnte ein Schlüsselmechanismus für die ADAM17-*Shedding*-Aktivierung sein (Sommer *et al.* 2016). Im Kapitel 1.4 findet eine nähere Erläuterung statt.

Juxtamembran besitzt ADAM17 eine konservierte α -helikale Region, die *Stalk*-Region. Diese wird auch als CANDIS-Region bezeichnet. Die CANDIS-Region bindet die Typ-I-Transmembranproteine Interleukin-6 Rezeptor und Interleukin-1 Rezeptor-II. Allerdings findet keine Interaktion zwischen der CANDIS-Region und dem Typ-II-Transmembranprotein *tumor nekrosis faktor- α* (TNF- α) statt. Die MPD moduliert die Bindungskapazität der CANDIS-Region an ihr Substrat (Düsterhöft *et al.* 2014). Eine weitere Studie von Düsterhöft und Kol-

legen beschrieb für die CANDIS-Region ebenfalls eine Interaktion mit der Plasmamembran (Düsterhöft *et al.* 2015). Dies könnte ein unterstützender Mechanismus zur ADAM17-*Shedding*-Aktivierung sein.

Bei der Transmembran-Domäne handelt es sich um eine α -Helix. Dieser Domäne wird neben der Verankerung von ADAM17 in der Plasmamembran auch eine Rolle für die Substratspezifität und die Regulation der Substratfreisetzung nachgesagt (Li *et al.* 2007).

Die Zytoplasmatische-Domäne von ADAM17 enthält potenzielle Phosphorylierungsstellen und SH3-Domänen, die möglicherweise regulatorische Rollen besitzen (Díaz-Rodríguez *et al.* 2002; Scheller *et al.* 2011; Schwarz *et al.* 2014; Xu & Derynck 2010). *Polo-like kinases 2* könnten direkt mit der Zytoplasmatischen-Domäne von ADAM17 interagieren und eine Phosphorylierung und Modulierung der *Shedding*-Aktivität der Protease veranlassen (Schwarz *et al.* 2014). Dennoch ist ADAM17 auch ohne seine Zytoplasmatische-Domäne proteolytisch aktiv (Le Gall *et al.* 2010; Reddy *et al.* 2000).

1.3 Funktion von ADAM17

ADAM17 reguliert eine Vielzahl an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen durch das *Ectodomain-Shedding*. Da ADAM17 TNF- α prozessiert, wird ADAM17 auch als *TNF- α converting enzyme* (TACE) bezeichnet (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997). TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei Entzündungen chemotaktisch auf andere Immunzellen wirkt. Fehlregulationen im TNF- α Signalweg sind zudem mit verschiedenen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, inflammatorischen Darmerkrankungen oder dem Endotoxinschock assoziiert (Horiuchi *et al.* 2007a; Leppkes *et al.* 2014; McInnes & Schett 2011). Inzwischen sind über 70 ADAM17-Substrate bekannt (Dreymueller *et al.* 2012; Scheller *et al.* 2011). Neben Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Rezeptoren zählen auch Adhäsionsmoleküle zu den Substraten von ADAM17. Einige Beispiele sind in Tabelle 1 genannt.

Tabelle 1: Auswahl von ADAM17-Substraten (modifiziert nach Scheller *et al.* 2011)

Wachstumsfaktoren/Zytokine	Bezeichnung	Referenz
AREG	<i>Amphiregulin</i>	Arribas & Esselens 2009; Murthy <i>et al.</i> 2010
CX3CL1/ Fractalkine	<i>C-X3-C motif ligand 1</i>	Arribas & Esselens 2009
CXCL16	<i>C-X-C motif ligand 16</i>	Ludwig <i>et al.</i> 2005
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>	Arribas & Esselens 2009; Murthy <i>et al.</i> 2010
TGF- α	<i>Transforming growth factor-α</i>	Arribas & Esselens 2009; Murthy <i>et al.</i> 2010
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>	Arribas & Esselens 2009; Bell <i>et al.</i> 2007
Rezeptoren		
p55 TNF- α -RI	<i>p55 tumor necrosis factor-α-receptor I</i>	Arribas & Esselens 2009; Bell <i>et al.</i> 2007
p75 TNF- α -RII	<i>p75 tumor necrosis factor-α-receptor II</i>	Arribas & Esselens 2009; Bell <i>et al.</i> 2007
IL-6R α	<i>Interleukin-6 receptor α</i>	Arribas & Esselens 2009
Adhäsionsmoleküle		
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i>	Arribas & Esselens 2009
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	Arribas & Esselens 2009
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>	Arribas & Esselens 2009
JAM-A	<i>Junctional adhesion molecule A</i>	Koenen <i>et al.</i> 2009
CD62L	L-Selektin	Li <i>et al.</i> 2006; Arribas & Esselens 2009

Bestimmte Substrate werden hauptsächlich von ADAM17; andere zusätzlich von ADAM10 prozessiert (Saftig & Reiss 2011). Es gibt jedoch Hinweise, dass auch ADAM17-spezifische Substrate unter bestimmten Bedingungen von einer anderen Protease abgespalten werden können. Zum Beispiel übernimmt ADAM10 das *transforming growth factor- α* (TGF- α) *Shedding* für ADAM17, wenn ADAM17 nicht exprimiert wird (Le Gall *et al.* 2009).

Die freigesetzten Substrate können parakrin, autokrin oder juxtakrin Signalkaskaden anregen. Beispielsweise reguliert ADAM17 Zellwachstumsprozesse durch die Freisetzung von *epidermal growth factor receptor*- (EGFR) Liganden. Die EGFR-Liganden werden als membrangebundene Vorläufermoleküle synthetisiert und durch das *Shedding* prozessiert und freigesetzt. Nachfolgend wird der ERK1/2-Signalweg initiiert (Blobel 2005; Sahin *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde die Freisetzung der EGFR-Liganden *amphiregulin* (AREG) und TGF- α zur Untersuchung der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 ausgewählt.

AREG wird unter physiologischen Bedingungen auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert und moduliert Zellwachstums- und Zellmigrationsprozesse. Zudem besitzt AREG eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Milchgängen bei weiblichen Mäusen. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Entzündungsprozessen und Tumorentstehungen ist AREG ebenfalls beteiligt (Berasain & Avila 2014).

Der zweite EGFR-Ligand TGF- α ist bei der Zellentwicklung, Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7039>, [Stand 07.04.2019, 12:30]).

Eine Studie von Peschon und Kollegen zeigte die Bedeutung von ADAM17 als Haupt-*Sheddase* von EGFR-Liganden anhand von ADAM17-defizienten Mäusen. Diese starben meist prä- oder direkt postnatal. Die phänotypischen Veränderungen betrafen den Darm, die Lunge, die Augen und das Fell (Peschon *et al.* 1998). Zudem konnten teilweise Herzfehlbildungen beobachtet werden (Jackson *et al.* 2003).

Es waren drei *ADAM17*^{-/-}-Patienten bekannt, die Mutationen im *ADAM17*-Gen besaßen. Von Blaydon und Kollegen wurden zwei Patienten mit entzündlichen Hauterkrankungen und Hautanhangsveränderungen beschrieben. Zudem litten die Patienten an einer chronischen Diarrhö und Veränderungen des Herzens. Trotz der Multimorbidität waren die Patienten zunächst lebensfähig, sodass das Fehlen von ADAM17 im Menschen im Gegensatz zum Mausmodell kompensierbar erscheint. Eine Patientin verstarb jedoch im Alter von zwölf Jahren an einer Myokarditis (Blaydon *et al.* 2011). Bandsma und Kollegen beschrieben einen dritten Patienten, der bereits im Alter von zehn Monaten an einer Hypoxie nach einem viralen Atemwegsinfekt verstarb. Auch dieser Patient wies neben dermatologischen Veränderungen auch Pathologien an verschiedenen Organen wie dem Darm, der Leber und dem Herzen auf (Bandsma *et al.* 2015). Am Beispiel dieser Patienten wird die umfassende Rolle von ADAM17 für den menschlichen Körper deutlich.

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes ADAM-Substrat ist das Chemokin *C-X-C motif ligand 16* (CXCL16). CXCL16 wird als Transmembranprotein insbesondere auf Makrophagen, Epithelzellen und Endothelzellen bei Entzündungsprozessen exprimiert und kann PS und oxidiertes Lipoprotein binden (Dreymueller *et al.* 2016). Das transmembrane CXCL16 fungiert zum einen als Scavenger-Rezeptor, zum anderen ist eine Bildung von Zell-Zell-Kontakten durch Bindung an den *C-X-C chemokine receptor type 6* (CXCR6) auf Leukozyten beschrieben. Nach der Freisetzung wirkt das lösliche CXCL16 als Chemokin für CXCR6-exprimierende Leukozyten (Abel *et al.* 2004; Dreymueller *et al.* 2016; Postea *et al.* 2008; Shimaoka *et al.* 2000). Eine klinische Relevanz hat CXCL16 bei der Entstehung von Arteriosklerose, Tumorprogression und -metastasierung (Deng *et al.* 2010; Sheikine & Sirsjö 2008; Wuttge *et al.* 2004). ADAM10 gilt als Haupt-*Sheddase* von CXCL16 (Gough *et al.* 2004). Nach Ludwig und Kollegen ist ADAM10 beim konstitutiven *Shedding* die Haupt-*Sheddase*, beim

PMA-stimulierten *Shedding* ist dies jedoch ADAM17 (Ludwig *et al.* 2005). Auch beim Zytokin-induzierten *Shedding* ist ADAM17 neben ADAM10 wesentlich am CXCL16-*Shedding* beteiligt (Schramme *et al.* 2008).

Neben Wachstumsfaktoren und Zytokinen stellen Zelloberflächenrezeptoren selbst Substrate von ADAM17 dar. Die Freisetzung von Rezeptoren kann Signalwege aktivieren. Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung des Interleukin-6 Rezeptors, der nachfolgend an seinen Liganden Interleukin-6 bindet und als Rezeptor-Ligand-Komplex andere Zellen aktiviert. Dieser Vorgang wird als *trans-signalling* bezeichnet (Garbers *et al.* 2011; Rose-John & Heinrich 1994). Ebenfalls kann das *Shedding* von Rezeptoren Signalkaskaden supprimieren. Hierfür ist das ADAM17-vermittelte *tumor necrosis factor receptor 1- (TNFR1) Shedding*, welches auch Gegenstand dieser Arbeit ist, ein Beispiel. Das *Shedding* des TNFR1 desensibilisiert die Zellen gegenüber TNF- α , sodass die eigentlich über den Rezeptor-Liganden-Komplex vermittelte entzündliche Antwort abgeschwächt wird (Peschon *et al.* 1998; Reddy *et al.* 2000; Van Zee *et al.* 1992).

Eine weitere wichtige Substratgruppe für ADAM17 sind Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin. Die Spaltung von Adhäsionsmolekülen modifiziert den Zell-Zell-Verbund (Hafezi-Moghadam *et al.* 2001).

1.4 Regulation von ADAM17

Die Aktivität von ADAM17 wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Dabei sind insbesondere die Expression, die Reifung, der Transport und die Aktivierung des *Shedding*-Prozesses zu nennen.

Mögliche Regulationsmechanismen auf Transkriptionsebene sind bisher wenig erforscht. ADAM17 wird auf Tumoren jedoch vermehrt exprimiert (Arribas *et al.* 2006).

Die posttranslationalen Modifikationen von ADAM17 wurden ausführlicher untersucht. Im trans-Golgi-Netzwerk wird die Pro-Domäne bei verschiedenen ADAMs durch Furin-ähnliche Konvertasen abgespalten (Lum *et al.* 1998; Peiretti *et al.* 2003; Roghani *et al.* 1999). Es besteht zudem eine weitere Schnittstelle in der Pro-Domäne, die für die Aktivität von ADAM9, -10 und -17 entscheidend sein könnte. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer verminderten katalytischen Aktivität (Wong *et al.* 2015). Die Furin-abhängige Reifung von ADAM17 findet in Cholesterin-reichen Membranteilen des Golgi-Apparates statt. Die reife

Protease könnte somit eventuell vermehrt in *Lipid Rafts*, Cholesterin-reichen Bereichen der Plasmamembran, proteolytisch aktiv sein (Tellier *et al.* 2006).

Ein wichtiger Aspekt ist der Transport von ADAM17 zur Zelloberfläche. Hier sind katalytisch inaktive Familienmitglieder der *inactive rhomboid protein-* (iRhom) Familie von großer Relevanz. Die integralen Membranproteine iRhom1 und -2 vermitteln die Reifung und den Transport von ADAM17 (Adrain *et al.* 2012; Christova *et al.* 2013). Für iRhom2, das hauptsächlich auf Makrophagen exprimiert wird, ist im Mausmodell eine Bindung an ADAM17 und die Vermittlung des Transports von ADAM17 aus dem endoplasmatischen Retikulum beschrieben (Adrain *et al.* 2012). In andere Zellen als Makrophagen ist iRhom1 am gerichteten Transport von ADAM17 beteiligt. Ein *Knockout* beider iRhoms führt zu einer vollständigen, ein *Knockout* eines der genannten iRhoms zu einer reduzierten ADAM17-Enzymaktivität (Christova *et al.* 2013).

In einer Studie von Dombernowsky und Kollegen wurde zudem das *Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2* (PACS-2) als ein weiteres ADAM17-regulierendes Protein vorgestellt. PACS-2 könnte die Zelloberflächenverfügbarkeit von ADAM17 und das ADAM17-bedingte *Shedding* von ErbB-Liganden steuern (Dombernowsky *et al.* 2015).

Bei der schnellen Regulation des *Shedding*-Prozesses kann das konstitutive *Shedding* entweder verstärkt oder gehemmt werden. Es wird zwischen physiologischen und unphysiologischen Stimulanzen unterschieden.

Physiologische Stimulanzen sind Zytokine und Wachstumsfaktoren. Beispielsweise aktivieren Thrombin, *Lysophosphatidic Acid*, TNF- α , EGF, *Fibroblast Growth Factor 7* und Adenosintriphosphat (ATP) das ADAM17-Substrat-*Shedding* (Le Gall *et al.* 2010, 2009; Maretzky *et al.* 2011).

Unphysiologische Stimulanzen sind das Ca²⁺-Ionophor Ionomycin oder der Phorbolster *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA). Ionomycin veranlasst eine Porenbildung in der Zellmembran, durch die Ca²⁺ einströmen kann. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist mit einer Steigerung des *Sheddings* assoziiert. PMA wirkt hingegen über einen Signalweg der Proteinkinase C (Horiuchi *et al.* 2007b; Le Gall *et al.* 2010, 2009).

Des Weiteren ist Melittin, eine Hauptkomponente des Bienengifts, als potenter Stimulus von ADAM10 und -17 bekannt. Der Signalweg beinhaltet eine P2-Rezeptor-Aktivierung (Sommer *et al.* 2012). Die vollständigen Signalwege sind jedoch nicht abschließend untersucht.

Neben der genannten Stimulierung der ADAM17-*Shedding*-Aktivität ist auch dessen Inhibition von großer Bedeutung. Der *tissue inhibitor of metalloproteases 3* (TIMP3) ist ein physiologischer Inhibitor für Metalloproteasen (Amour *et al.* 1998). Unphysiologische Inhibitoren sind der Breitspektrum Metalloprotease Inhibitor Marimastat (MM), der präferenzielle ADAM10-Inhibitor GI 254023X (GI) und der präferenzielle ADAM10 und -17 Inhibitor GW 280264X (GW) (Ludwig *et al.* 2005).

Die Zytoplasmatische-Domäne ist, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ebenfalls an der Regulation beteiligt (Díaz-Rodríguez *et al.* 2002; Scheller *et al.* 2011).

Unabhängig von den genannten Regulationsmechanismen findet während der Apoptose ein *Shedding* verschiedener ADAM17-Substrate statt (Chalaris *et al.* 2007; Madge *et al.* 1999; Walcheck *et al.* 2006). Die Apoptose ist durch einen frühen Verlust der Membranasymmetrie und die Externalisierung des negativ geladenen PS auf der eukaryotischen Plasmamembran gekennzeichnet (Leventis & Grinstein 2010). Für die PS-Translokation sind Scramblasen (siehe Kapitel 1.6) wie Anoctamin 6 (ANO6) oder *Xk-related protein 8* (Xkr8) verantwortlich (Suzuki *et al.* 2013a, 2010).

Eine Studie von Sommer und Kollegen beschäftigte sich mit der Regulation der ADAM17-*Shedding*-Aktivität durch eine PS-Externalisierung. Es wurde gezeigt, dass ein Stimulanzien-induziertes ADAM17-Substrat-*Shedding* mit einer PS-Externalisierung einherging. Die Blutzellen von Patienten mit einem Scott-Syndrom haben eine Missense-Mutation in der Scramblase ANO6. Die B-Zellen dieser Patienten externalisierten unter Verwendung von ADAM17-Stimulanzien weniger PS und setzten weniger ADAM17-Substrat frei als Wildtyp-B-Zellen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass ein kationisches Aminosäure-Motiv der MPD von ADAM17 mit der negativ geladenen Kopfgruppe von PS interagiert. Das Motiv R625/K626/G627/K628 der MPD, welches drei basische Aminosäuren enthält, ist essenziell für die Interaktion mit PS. Beim Ersetzen dieser drei basischen durch neutrale Aminosäuren war das *Shedding* von Membran-assoziierten ADAM17-Substraten abgeschwächt. Die PS-Interaktion stellt vermutlich den gemeinsamen Schlüsselmechanismus zur finalen ADAM17-*Shedding*-Aktivierung dar und bildet die Grundlage für die hier vorliegende Arbeit (Sommer *et al.* 2016).

1.5 Die Zellmembran

Die Plasmamembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht und dient der Abgrenzung zwischen dem Intrazellulär- und Extrazellulärraum. Bei den Lipiden der Plasmamembran handelt es sich hauptsächlich um amphipathische Phospholipide. Die hydrophilen Kopfgruppen weisen zum Intra- und Extrazellulärraum, wohingegen die lipophilen Kohlenwasserstoffschwänze die innere hydrophobe Zone der Lipiddoppelschicht bilden. Die Lipide können innerhalb der Membran diffundieren, dies nennt man Fluidität der Biomembran. Mit der Plasmamembran assoziiert sind integrale Membranproteine, beispielsweise Transmembran- und Lipidankerproteine, und periphere Membranproteine, die der Plasmamembran angelagert sind. Diese Membranproteine sind ebenfalls innerhalb der Plasmamembran beweglich (Goñi 2014; Nicolson 2014; Singer & Nicolson 1972).

Die Verteilung der Lipide innerhalb der Membran ist asymmetrisch. Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) befinden sich hauptsächlich auf der extrazellulären Membranseite. Die zytoplasmatische Membranseite ist dagegen reich an Phosphatidylethanolamin (PE) und PS (Rothman & Lenard 1977).

Wie von Daleke zusammengefasst, stellt die Erhaltung der Lipidasymmetrie eine Schlüsselrolle für die Funktion der Plasmamembran dar. Veränderungen in der Lipidverteilung können die Aktivität von Zellen modulieren. Die Asymmetrie der Plasmamembran wird primär durch die selektive Lipidsynthese auf jeweils einer Seite der Membran generiert. In einem langsamen Vorgang der passiven Diffusion können Lipide innerhalb der Membran ihre Lokalisation verändern. Für eine schnellere Lipidtranslokation sind Flippasen, Floppasen und Scramblasen zuständig. Diese Phospholipidtranslokatoren können die Lipidasymmetrie sowohl erhalten als auch auflösen (Daleke 2003).

1.6 Flippasen, Floppasen und Scramblasen

Flippasen (siehe Abbildung 2) sind P₄-ATPasen, die bestimmte Phospholipide von der extrazellulären zur intrazellulären Seite der Plasmamembran transportieren und somit die Membranasymmetrie aufrechterhalten (Hankins et al., 2015). Flippasen benötigen neben ATP auch Mg²⁺ und können durch Ca²⁺ gehemmt werden (Daleke 2003). Charakteristisch für Flippasen ist der selektive Transport von PS (Daleke & Lyles 2000).

Zu den Floppasen werden Mitglieder der Familie der *ATP-binding cassette*-Transporter gezählt. Diese transportieren ATP-abhängige Lipide von intrazellulär nach extrazellulär, wie in

Abbildung 2 dargestellt. In der Regel sind Floppasen unspezifisch bezüglich ihrer Lipidselektivität. Es gibt jedoch auch einige Floppasen mit Substratselektivität (Daleke 2003).

Phospholipid-Scramblasen transportieren Lipide nicht selektiv bidirektional (siehe Abbildung 2). Der Transport erfolgt ohne direkten ATP-Verbrauch entlang eines transmembranen Gradienten (Williamson 2016). Die Aktivität von Scramblasen führt unter anderem zu einem Zusammenbruch der Membranasymmetrie durch eine PS-Externalisierung (Kodigepalli *et al.* 2015). Eine PS-Externalisierung kann bei verschiedenen biologischen Prozessen beobachtet werden, beispielsweise bei der Initiierung der Blutgerinnung und dem programmierten Zelltod (Lentz 2003; Martin *et al.* 1995). Als Phospholipid-Scramblasen gelten Xkr- und Anoctamin-Familienmitglieder (Gyobu *et al.* 2017, 2016; Suzuki, J. *et al.* 2014, 2013a, 2013b; 2010).

In früheren Studien wurde auch *Phospholipid scramblase 1* (PLSCR1) als potentielle Scramblase diskutiert (Bassé *et al.* 1996; Zhou *et al.* 1997). Andere Veröffentlichungen gehen davon aus, dass PLSCR1 keine Scramblase ist, jedoch möglicherweise die Transkription involvierter Gene regulieren könnte (Ben-Efraim *et al.* 2004; Rysavy *et al.* 2014; Wiedmer *et al.* 2003). Es gibt jedoch auch Hinweise aus multiplen anderen Studien, zusammengefasst in einem Review von Bevers und Williamson, dass die PLSCR-Familie keinen Einfluss auf das Phospholipid-*Scrambling* hat (Bevers & Williamson 2010).

Das Xkr-Familienmitglied Xkr8 externalisiert in apoptotischen Zellen PS (Suzuki *et al.* 2013a). Neben Xkr8 sind Xkr4 und Xkr9 am Caspase-aktivierten Lipid-*Scrambling* beteiligt (Suzuki, J. *et al.* 2014).

Einige Mitglieder der Anoctamin-Familie, die auch als *Transmembrane Protein 16-* (TMEM16) Familie in der Literatur bezeichnet wird, zeigen ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-*Scrambling* (Gyobu *et al.* 2017, 2016; Suzuki *et al.* 2013b, 2010). Eine detailliertere Vorstellung der Anoctamine findet in den Kapiteln 1.7 und 1.8 statt.

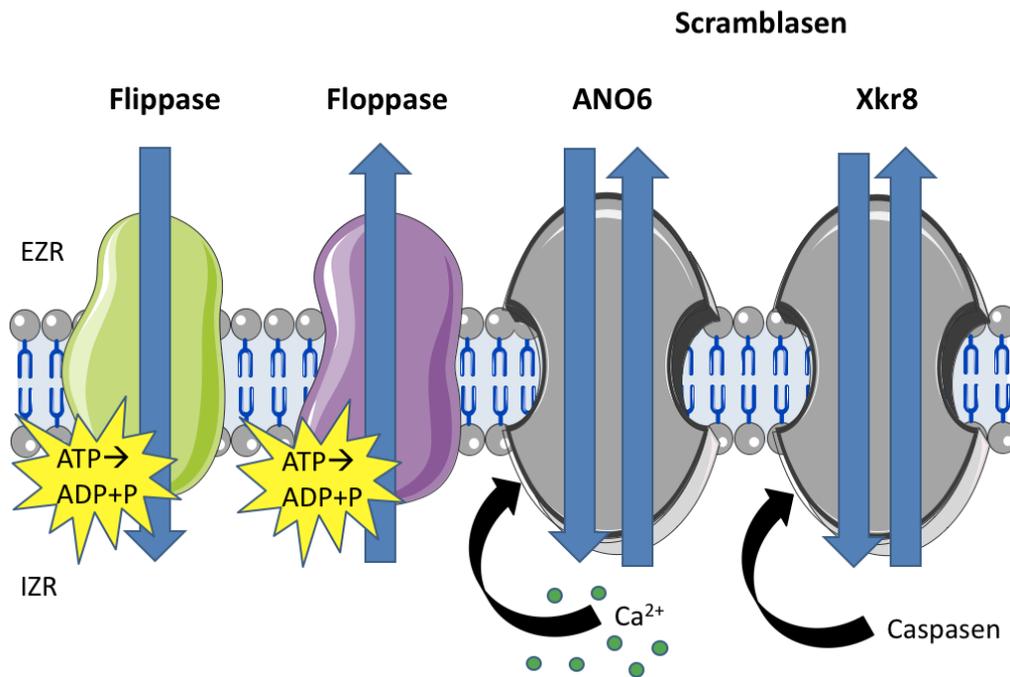


Abbildung 2: Phospholipidtranslokatoren der Plasmamembran

Flippasen transportieren aktiv Phospholipide von der extrazellulären auf die intrazelluläre Seite der Plasmamembran (Daleke & Lyles 2000). Floppasen transportieren aktiv Phospholipiden von der intrazellulären auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran (Daleke 2003). Scramblasen translozieren Phospholipide bidirektional. ANO6 ist eine Ca²⁺-abhängige Scramblase, währenddessen Xkr8 als eine Caspase-aktivierte Scramblase Phospholipide transloziert (Suzuki *et al.* 2013a, 2010). Die Pfeile stellen die Transportrichtung der Lipide dar. Die Abbildung wurde modifiziert und erweitert nach Daleke & Lyles (2000).

EZR (Extrazellulärraum), IZR (Intrazellulärraum)

1.7 Anoctamin-Familie

Die Anoctamin-Familie lässt sich anhand ihrer funktionellen Charakteristika vereinfacht in Ionenkanäle und Scramblasen unterteilen.

Bei ANO1 und -2 handelt es sich um Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle (Caputo *et al.* 2008; Schroeder *et al.* 2008; Yang *et al.* 2008). Diese sind an verschiedenen Prozessen, zusammengefasst von Pedemonte und Galiotta, involviert. Beispielsweise sind Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle an transepitheliale Transport, Muskelkontraktion, neuronaler Erregung und dem Geruchssinn beteiligt (Pedemonte & Galiotta 2014).

Die zweite charakteristische Eigenschaft der Anoctamin-Familie ist die Scramblase-Aktivität, diese besitzen ANO3, -4, -5, -6, -7, -10 und -11 (Gyobu *et al.* 2017, 2016; Suzuki *et al.* 2013b, 2010). Bezüglich der Scramblase-Aktivität ist derzeit ANO6 in der Literatur am umfassendsten beschrieben.

1.8 Anoctamin 6: Struktur und Funktion

Die Kristallstruktur von ANO-Familienmitgliedern wurde im Pilz *Nectria haematococca* von Brunner und Kollegen entschlüsselt. Beide Untereinheiten des homodimeren Proteins bestehen aus zehn Transmembran-Domänen und einer hydrophilen Membrandurchspannenden Furche, die die potentielle Katalysestelle darstellt. Diese enthält eine konservierte Ca^{2+} -Bindestelle (Brunner *et al.* 2014). Von dem humanen ANO6 existiert bisher keine Kristallstruktur. Laut dem TMHMM2 Programm, einem Programm zur Vorhersage von potenziellen Transmembran-Domänen, wurden für das humane ANO6 zunächst nur acht Transmembran-Domänen angenommen (Katoh & Katoh 2004).

Die zytoplasmatischen N- und C-Termini von ANO6 sind für die Lokalisation in der Plasmamembran und die Proteinstabilität von Bedeutung (Suzuki, T. *et al.* 2014). Anhand der Aminosäuresequenzen von ANO6-Paralogen in 24 Säugetierarten konnten Yu und Kollegen die mutmaßliche *Scrambling*-Domäne zwischen der vierten und fünften Transmembran-Domäne ausmachen. Dabei wurde von insgesamt zehn Transmembran-Domänen ausgegangen (Yu *et al.* 2015). Für die PS-Translokation erscheinen insbesondere hydrophile Residuen in der Transmembran-Domäne wichtig (Gyobu *et al.* 2017). Es wird auch von dem *Stepping-stone* Modell für das ANO6-assoziierte Phospholipid-*Scrambling* gesprochen. Bei diesem binden die Kopfgruppen der Phospholipide über elektrostatische Interaktionen an positiv geladene Residuen des transmembranen Segments von ANO6 und bewegen sich stufenweise durch die Plasmamembran (Bethel & Grabe 2016; Gyobu *et al.* 2017; Watanabe *et al.* 2018). Ein ANO6-Schema ist in Abbildung 3 dargestellt.

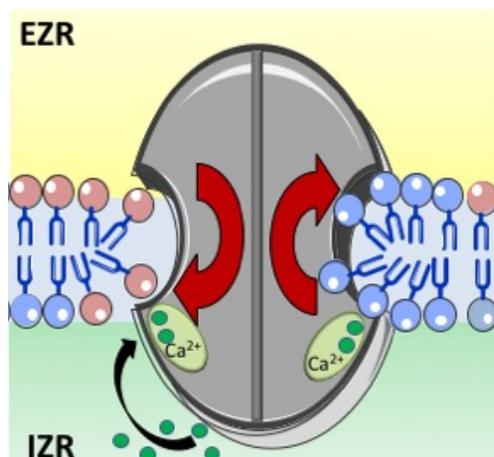


Abbildung 3: ANO6-Schema

Eine schematische Darstellung illustriert die Ca^{2+} -abhängige Scramblase-Funktion von ANO6. Die blauen Kopfgruppen stellen die negativ geladenen Phosphatidylserin- (PS) Kopfgruppen dar. Die Externalisierung von PS stellt eine wichtige Funktion von ANO6 dar (Suzuki *et al.* 2010).

EZR (Extrazellulärraum), IZR (Intrazellulärraum)

Für ANO6 sind in der Literatur unterschiedliche Funktionen beschrieben.

Zum einen werden verschiedene Ionenkanal-Funktionen von ANO6 diskutiert. Beispielsweise wurde eine Aktivität als Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanal, als Volumen-regulierter Cl^- -Kanal oder als Ca^{2+} -aktivierter Kationen-Kanal beschrieben (Almaça *et al.* 2009; Shimizu *et al.* 2013; Szteyn *et al.* 2012; Yang *et al.* 2012).

In dieser Arbeit wurde die Funktion als Ca^{2+} -abhängige Scramblase näher untersucht. Hierbei ist insbesondere die Externalisierung von PS relevant (Suzuki *et al.* 2010).

Eine Schlüsselrolle besitzt ANO6 in der Blutgerinnung. Bei Patienten mit einem Scott-Syndrom liegt ein mutationsbedingter Defekt in ANO6 vor. Folglich ist das Phospholipid-*Scrambling* gestört und PS wird weniger externalisiert. Phänotypisch manifestiert sich das Scott-Syndrom mit einer verstärkten Blutungsneigung (Castoldi *et al.* 2011; Suzuki *et al.* 2010; Weiss & Lages 1997; Zwaal *et al.* 2004).

Des Weiteren ist murines ANO6 an der Mineralisation der Knochenmatrix beteiligt. In murinen *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten zeigte sich ein vermindertes Ca^{2+} -abhängiges PS-*Scrambling*. Die *Ano6*^{-/-}-Mäuse präsentierten sich phänotypisch mit Skelettdeformitäten. Postnatal starben die meisten *Ano6*^{-/-}-Mäuse an einer Erstickung (Ehlen *et al.* 2013). In einer anderen Studie führte das Fehlen von ANO6 im Mausmodell zu verlängerten Blutungszeiten und ebenfalls zu einem reduzierten Überleben (Mattheij *et al.* 2016).

Außerdem könnte ANO6 eine Rolle bei viralen Infektionen spielen. Bei der HIV1-Infektion bindet HIV1 an die Wirtszelle und eine PS-Externalisierung wird induziert. Eine Interaktion von dem viralen *envelope glycoprotein* und PS erleichtert die Rezeptor-abhängige Fusion der Virus- und Zellmembran und somit auch der Infektion. Bei dieser PS-Externalisierung könnte ANO6 involviert sein (Zaitseva *et al.* 2017). Ebenfalls im Rahmen einer Ebola Virus-Infektion wurde eine Beteiligung von ANO6 beschrieben (Younan *et al.* 2018).

Ob ANO6 durch dessen Fähigkeit PS zu externalisieren einen Einfluss auf die ADAM17-*Shedding*-Aktivität hat, ist bisher unklar und wird in dieser Arbeit erstmalig untersucht.

2 Zielsetzung

In vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Körper sind ADAMs involviert. Besonders Tumorerkrankungen, Demenz und Entzündungsprozesse gehen mit einer veränderten ADAM-Aktivität einher. Deshalb ist in den letzten Jahren insbesondere die Forschung an der Regulation der ADAMs intensiviert worden. ADAM17 prozessiert über 70 verschiedene Substrate, zu denen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle zählen, und ist daher von besonders großem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse.

Es sind bisher verschiedene Regulationsmechanismen der *ADAM17-Shedding*-Aktivität beschrieben, beispielsweise posttranslationale Regulationen, Regulationen der Lokalisation und durch iRhoms. Aktuelle Untersuchungen der Arbeitsgruppe Reiß weisen dennoch auf einen gemeinsamen finalen Schlüsselmechanismus zur *ADAM17-Shedding*-Aktivierung hin. Demnach führt die PS-Externalisierung auf der Plasmamembran zu einer Interaktion von PS mit ADAM17, wodurch die *ADAM17-Shedding*-Aktivität reguliert werden könnte. PS, das hauptsächlich auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert ist, kann durch eine schnelle bidirektionale Phospholipidtranslokation durch Scramblasen, wie das Ca^{2+} -abhängige ANO6, externalisiert werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, diesen finalen Schlüsselmechanismus zur Aktivierung der *ADAM17-Shedding*-Aktivität näher zu untersuchen und die Hypothese zu prüfen, dass ANO6 die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 bestimmt.

Dafür wurde mittels ANO6-Überexpressionen und -Herunterregulationen überprüft, inwiefern ANO6 einen Einfluss auf die *Shedding*-Aktivität von ADAMs – im Besonderen von ADAM17 – hat. Im Speziellen wurde die Freisetzung verschiedener überexprimierter und endogener ADAM-Substrate in Zelllinien und primären Zellen unter Verwendung verschiedener ADAM-Stimulanzen und -Inhibitoren analysiert. Zusätzlich wurde durch Zuhilfenahme einer Ca^{2+} -hypersensitiven ANO6-Mutante deren Einfluss auf die *ADAM17-Shedding*-Aktivität ohne die Verwendung von ADAM-Stimulanzen untersucht. Um die Relevanz von ANO6 in Hinblick auf die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 ex vivo darzustellen, wurde abschließend das *Shedding* von endogen exprimiertem ADAM17-Substrat in Zellen von *Ano6^{-/-}* und *Ano6^{+/-}*-Mausembryonen untersucht. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen ein tieferes Verständnis der biologischen Grundlagen der Regulation von ADAMs und könnten wegbereitend für mögliche weitergehende therapeutische Interventionen sein.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Vertreiber
Absaugpumpe, <i>BVC professional</i>	VACUUBRAND GmbH cxc Co. KG, DE
Analysewaage	Sartorius AG, DE
Analysewaage, <i>XS205 DualRange</i>	Mettler-Toledo GmbH, CH
Brutschrank, <i>HERA cell 150</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Cellometer</i> [®] , <i>Auto 1000</i>	Nexcelom Bioscience LLC, US
<i>Dispenser, Multipette</i> [®] <i>plus</i>	Eppendorf AG, DE
Doppelgelsystem , <i>PerfectBlue</i> [™] <i>Twin M/ExW S</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Fotodokumentationsanlage , <i>BioDocII</i>	Biometra GmbH, DE
Gefrierschrank -20°C, <i>Comfort</i>	Liebherr-International AG, CH
Gefrierschrank -80°C, <i>Forma 9000 series</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Heizblock	Eppendorf AG, DE
Heizblock	HLC BioTech, DE jetzt DITABIS AG, DE
Inkubator , <i>MaxQ</i> [™] <i>6000</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Kippschüttler , <i>Roto-Shake Genie</i>	Scientific Industries Inc., US
Konfokales Fluoreszenzmikroskop , <i>FluoView FV1000</i>	Olympus K.K., JP
Kühlschrank , <i>Premium</i>	Liebherr-International AG, CH
Lichtmikroskop , <i>invers</i>	Helmut Hund GmbH, DE
Magnetrührer , <i>CB 162</i>	Stuart, UK
Microplate-Reader , <i>96-well, EL800</i> [™]	BioTek Instruments GmbH, DE
Microplate-Reader , <i>96-well, Sunrise</i> [™]	Tecan Group Ltd., CH
Multi-Imagingsystem , <i>Fusion FX7</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Multipipette , <i>Transferpette</i> [®] <i>S-12</i>	Brand GmbH & Co. KG, DE
Netzgerät , <i>EV222</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Netzgerät , <i>EV231</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
pH-Meter , <i>pH211</i>	HANNA Instruments Deutschland GmbH, DE
Probenröhrchenrotator , <i>MACSmix</i> [™] <i>Tube Rotator</i>	Miltenyl Biotec GmbH, DE
Real-Time PCR System , <i>StepOnePlus</i> [™]	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Rolltisch , <i>Stuart SRT6</i>	Bibby Scientific Ltd, UK
Schüttelinkubator , <i>Minitron</i>	Infors HT, CH
Spektralphotometer , <i>NanoDrop 1000</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Sterilwerkbank , <i>Cytosafe-N 2004</i>	Faster GmbH, IT

Sterilwerkbank	Köttermann GmbH & Co. KG, DE
Tank-Elektroblotter , <i>PerfectBlue™ Web S</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
Thermocycler , <i>peqSTAR 96 Universal Gradient</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
UV-Transilluminator , <i>Dual intensity Ultraviolet Transilluminator TM 20</i>	Ultraviolet-Products, US jetzt Analytic Jena AG, DE
Vacuum-Pumpe , <i>Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold</i>	Promega Corporation, US
Vortexer , <i>Heidolph Reax top test tube shaker</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE/ Merck KGaA, DE
Vortexer , <i>Lab dancer</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Vortexer , <i>Vortex genius 3</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Wasseraufbereitungsanlage , <i>TKA GenPure</i>	TKA part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Wasserbad , <i>GFL1004</i>	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, DE
Zählkammer , <i>Neubauer</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, DE
Zentrifuge , <i>C1301B</i>	Labnet International, Inc., US
Zentrifuge , <i>Centrator 5301</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge , <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge , <i>Centrifuge 5424</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge , <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge , <i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge , <i>Heraeus™ Fresco™21</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Zentrifuge , <i>Heraeus™ Multifuge™ X3R</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Vertreiber
96-Well-ELISA-Platten	Sarstedt AG & Co., DE
96-Well-Platten , Flachboden	Sarstedt AG & Co., DE
96-Well-Platten , <i>MicroAmp^R Fast 96-Well Reaction Plate</i>	Life Technologies Co., US jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Autoklavenbeutel	Sarstedt AG & Co., DE
Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH, DE
Einfrierbehälter , <i>Nalgene® Mr. Frosty</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Einkanalpipetten , Mehrkanalpipetten , <i>Discovery comfort</i>	PZ HTL S.A., PL
Einmalhandschuhe , <i>Mirco-Touch® Nitrile</i>	Ansell Healthcare GmbH, DE
Einmalinjectionsspritzen , <i>BD Discardit II - 2 ml; 10 ml; 20 ml; 30 ml</i>	Becton Dickson GmbH, DE
Einmalinjectionsspritzen , <i>Inject - 1 ml; 20 ml</i>	B. Braun Melsung AG, DE
Einmalkanülen , <i>BD Eclipse Needle - 20G</i>	Becton Dickson GmbH, DE
Einmalkanülen , <i>BD Microlance 3 - 26G</i>	Becton Dickson GmbH, DE
Entsorgungsbeutel	Brand GmbH + CO KG, DE
Frischhaltebox , luftdicht	EMSA GmbH, DE

Gestopfte Spitzen	Sarstedt AG & Co., DE
Glaskolben, 1000 ml; 300 ml	Schott AG, DE
Mikroschraubröhrchen, 2 ml; 1ml	Sarstedt AG & Co., DE
Objektträger	Menzel-Gläser GmbH, DE
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
PCR-Gefäß, 0,2 ml	Sarstedt AG & Co., DE
PVDF-Membran, Roti® 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Reaktionsgefäß, 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Serologische Pipetten, 5 ml; 10 ml; 25 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Spritzenfilter, 0,22 µm; 0,45 µm	Sarstedt AG & Co., DE
Stickstofftank	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, DE
Whatman-Papier, 1,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Zählkammer, Cellometer Counting Chamber	Nexcelom Bioscience LLC, US
Zellkulturflaschen, 75 cm²	Sarstedt AG & Co., DE
Zellkulturplatten, 12-Well-Platten	Sarstedt AG & Co., DE
Zellkulturschalen, Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zentrifugenröhrchen, 15 ml; 50 ml	Sarstedt AG & Co., DE

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Vertreiber
<i>1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO)</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>1,10-Phenanthrolin</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE / Merck KGaA, DE
<i>Amersham™ ECL Select™</i>	GE Healthcare GmbH, US
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Annexin V, Alexa Fluor® 568 conjugate</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
BM blue HRP Substrat	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Bovine Serum Albumin (BSA) Standard</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>COmplete™, Protease-Inhibitor-Mix</i>	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>DNA-Ladepuffer, 6x Loading Dye</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>DNA-Leiter, GeneRuler 100 bp DNA-ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare GmbH, US
Gelatine	SERVA Electrophoresis GmbH, DE
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>HiPerfect Transfection Reagent</i>	Qiagen GmbH, DE
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, DE
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Kollagen	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, DE
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Mowiol® 4-88</i>	Calbiochem, Merck KGaA, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Nonidet P40	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE / Merck KGaA, DE
Paraformaldehyd	Merck KGaA, DE
Para-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE / Merck KGaA, DE
Penicillin/Streptomycin, 100x	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent</i>	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Poly-L-Lysine (0,01%)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE / Merck KGaA, DE
Proteinmarker, <i>PageRuler™ Plus, Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Rotiphorese® Gel 30, Acrylamid</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Lo GC</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Stealth siRNAs (Set of 3) HSS153249, HSS153251, HSS176378</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Triton X-100</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Trypanblau (0,5%ig)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE / Merck KGaA, DE
Trypsin-EDTA, 10x	Life Technologies Co., US, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>TurboFect™, Transfektionsreagenz</i>	Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., DE
<i>Tween® 20</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Menge
<i>Annexin Binding-Puffer</i>	
HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM
<i>AP-Lysepuffer</i>	
EDTA	1 mM
<i>Triton X-100</i>	2,5% (v/v)
1,10-Phenanthrolin in AP-Puffer	10 mM
<i>AP-Puffer</i>	
NaCl	100 mM
TRIS	100 mM
MgCl ₂	20 mM
pH	9,5
<i>AP-Substratlösung</i>	
1x Tablette Para-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer	5 mg 2,5 ml
<i>Blockierlösung</i>	
Milchpulver in TBST	5 % (w/v)
<i>DMEM⁺</i>	
FCS in DMEM	10 % (v/v)
<i>DMEM-Vollmedium</i>	
FCS	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin in DMEM	100 µg/ml
<i>Einfriermedium</i>	
FCS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)
in DMEM oder <i>Endothelial Cell Basal Medium</i>	
<i>ELISA-Waschpuffer</i>	
<i>Tween[®] 20</i> in PBS	0,05 % (v/v)
pH	7,4
<i>Endothelzell-Vollmedium</i>	
<i>SupplementMix Endothelial Cell Growth Medium</i> in <i>Endothelial Cell Basal Medium</i>	1 x 500 ml

Gelatine	
Gelatine in H ₂ O	0,25 % (w/v)
Kollagenlösung	
Kollagen aus Rattenschwanz in Essigsäure (0,2 %)	20 µg/ml
LB (<i>Lysogeny broth</i>)-Ampicillin-Platten	
LB-Medium	
Agar-Agar	1,5 % (w/v)
Ampicillin	0,1 mg/ml
LB-Medium	
NaCl	10 g
Trypton/Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O dest.	900 ml
pH	7,4
ad 1l H ₂ O dest.	
Mowiol	
Glycerin	6 g
<i>Mowiol</i> [®] 4-88	2,4 g
H ₂ O dest.	6 ml
TRIS-Cl, 0,2M	12 ml
pH	8,5
Mowiol^{+/+}	
Mowiol	1 ml
DABCO	100 µl
DAPI	1 µl
Phosphatpuffer (PBS)	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH	7,4
Reagent Diluent	
BSA in PBS	1 %
pH	7,4
gefiltert (Ø 0,2 µm)	
RIPA-Lysepuffer	
TRIS	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P40	1 %
DTT	1 mg/ml
Na-Desoxychlorat	0,25 %
pH	7,4

Sammelgel 4,5 %	
H ₂ O dest.	2,9 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Acrylamid	0,835 ml
APS	30 µl
TEMED	15 µl
Sammelgelpuffer	
TRIS	500 mM
SDS	0,4 %
pH	6,8
SDS-Laufpuffer	
TRIS	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	3,5 mM
pH	8,8
SDS-Probenpuffer 6 x (reduzierend)	
TRIS	750 mM
SDS	416 mM
EDTA	6 mM
DTT	120 mM
Glycerin	47,5 %
Bromphenolblau	0,25 %
pH	6,8
Stripping-Puffer	
TRIS	62,5 mM
SDS	70 mM
2-Mercaptoethanol	0,7 %
pH	6,7
Transfektionsansatz pro Well eines 12-Wells (Lipofektion)	
DMEM	100 µl
Plasmid	
- <i>pAptag-5 TGF-AP</i>	0,5 µg
- <i>pAptag-5 AREG-AP</i>	
- <i>pcDNA3.1 ANO6 D408G His</i>	1 µg
- <i>pcDNA3.1 ANO6 eGFP</i>	
- <i>pcDNA3.1 eGFP</i>	
- <i>pcDNA3.1</i>	
<i>TurboFect™ Transfection Reagent</i>	2 µl/µg Plasmid
ad 500 µl DMEM ⁺ -Medium	
Transfektionsansatz pro Well eines 12-Wells (siRNA-Transfektion)	
<i>Endothelial Cell Basal Medium</i>	100 µl
<i>Stealth siRNA HSS153249, HSS153251, HSS176378</i>	20 nM
oder <i>Stealth RNAi™ Negative Control Lo GC</i>	
<i>HiPerfect Transfection Reagent</i>	3 µl/Well
ad 1100 µl Endothelzell-Vollmedium	

Transferpuffer für ANO6	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
SDS	0,05 %
pH	8,2- 8,4
Transferpuffer	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10 %
pH	8,2-8,4
Trenngel 7,5 %	
H ₂ O dest.	5,03 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml
Acrylamid	2,33 ml
APS	60 µl
TEMED	30 µl
Trenngelpuffer	
TRIS	1500 mM
SDS	0,4 %
pH	8,8
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	
Tris	40 mM
Acetat	20 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0
Tris-Bufferd Saline (TBS)	
TRIS	20 mM
EDTA	50 mM
NaCl	150 mM
pH	7,4
Tris-Buffered Saline and Tween® 20 (TBST)	
Tween® 20 in TBS	0,1 %
Western Blot ADAM10-Lysepuffer	
TRIS	5 mM
EGTA	1 mM
Saccharose	250 mM
Triton X-100	1 %
Western Blot RIPA-Lysepuffer	
RIPA-Lysepuffer CComplete™ Protease Inhibitor Mix	1x

3.1.5 Stimulanzen

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Stimulanzen

Stimulans	Konzentration	Bezug
Ionomycin (Io)	0,5-1 μ M	Calbiochem, Merck KGaA, DE
Melittin (Mel)	1 μ M	Prof. Dr. Jörg Andrä, Hamburg
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	300 ng/ml	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE / Merck KGaA, DE

3.1.6 Inhibitoren

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration	Bezug
Marimastat (MM)	10 μ M	R&D Systems, Inc., US
GI254023X (GI)	3 μ M	Tocris Bioscience, UK jetzt R&D Systems, Inc., US
GW280264X (GW)	3 μ M	Aobious, Inc., US

3.1.7 Primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten primären Antikörper

Primäre Antikörper	Herkunft	Bezug	Konzentration
Anti-ANO6-Antikörper	Kaninchen	Acris Antibodies GmbH, DE	1:500 in Milchpulver (1 %)
Anti-ANO6-Antikörper	Kaninchen	Prof. Dr. Kunzelmann, Regensburg	1:500 in Milchpulver (1 %)
Anti-eGFP-Antikörper	Maus	Roche Deutschland Holding GmbH, DE	1:2000 in Milchpulver (5 %)
Anti-His-Antikörper	Maus	Cell Signaling Technology, NL	1:1000 in Milchpulver (5 %)

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper

Sekundäre Antikörper	Herkunft	Bezug	Konzentration
<i>Mouse-POD</i>	Schaf	Dianova GmbH, DE	1:10.000 in TBST
<i>Rabbit-POD</i>	Ziege	Dianova GmbH, DE	1:10.000 in TBST

3.1.8 Zellkulturmedien

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien

Bezeichnung	Vertreiber
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Life Technologies Co., US
<i>Endothelial Cell Basal Medium</i>	Promocell GmbH, DE

3.1.9 Zelllinien

HEK-293-T-Zellen

Bei *human embryonic kidney-293T-cells*, nachfolgend HEK-293-Zellen genannt, handelt es sich um menschliche embryonale Nierenzellen mit adhärenenten Wachstumseigenschaften. Die Zusatzbezeichnung T steht für die Expression des großen T Antigens des Simian-40 Virus. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Vollmedium in gelatinisierten Ø10 cm Zellkulturschalen. 12-Well-Platten und Deckgläser wurden mit Poly-L-Lysine beschichtet.

HUVECs

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) wurden von der Firma PromoCell als Zusammenschluss von mehreren Spendern bezogen. HUVECs sind primäre humane Endothelzellen von Nabelschnurvenen. Zur Kultivierung der adhärenenten Zellen in kollagenisierten 75 cm² Zellkulturflaschen wurde Endothelzell-Vollmedium benutzt.

Osteoblasten

Undifferenzierte primäre Osteoblasten wurden von Prof. Dr. Vortkamp der Universität Duisburg-Essen bezogen. Die Osteoblasten stammten entweder von *Ano6*-heterozygoten (*Ano6^{+/-}*) oder *Ano6-Knockout-* (*Ano6^{-/-}*) Mausembryonen des Embryonaltages 18,5. Die adhärenenten Zellen wurden in gelatinisierten Ø10 cm Zellkulturschalen kultiviert.

3.1.10 Plasmide

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Bezug
ANO6 D408G His K8	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Regensburg
ANO6 eGFP K9	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Regensburg
AREG-AP	pAP-Tag5	Prof. Dr. med. Carl Blobel, New York
eGFP Leervektor K1	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Regensburg
pcDNA3.1. Leervektor	pcDNA3.1	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Regensburg
TGF-α-AP	pAP-Tag5	Prof. Dr. med. Carl Blobel, New York

3.1.11 Kits

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Kits

Kit	Vertreiber
<i>Human TNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA</i>	R&D Systems, Inc., US
<i>Human CXCL16 DuoSet ELISA</i>	R&D Systems, Inc., US
<i>Mouse TNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA</i>	R&D Systems, Inc., US
<i>PureYield™, Plasmid Midiprep System</i>	Promega Corporation, US
<i>SV Total RNA Isolation System</i>	Promega Corporation, US

3.1.12 Software

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Software

Programm	Vertreiber
<i>Adobe® Photoshop® CS4 Extended</i>	Adobe Systems GmbH, US
<i>Bio 1D v15.03b</i>	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
<i>Fusion v15.17</i>	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
<i>FV10-ASW 2.1 Viewer</i>	Olympus K.K., JP
<i>Gen5 1.11</i>	BioTek Instruments GmbH, DE
<i>GraphPad Prism 5</i>	GraphPad Software Inc., US
<i>Mendeley Desktop v1.11</i>	Mendeley Ltd., UK
<i>Microsoft Office Word, Excel, PowerPoint 2010</i>	Microsoft Corp., US
<i>peqStar Protocol Editor v1.02</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE
<i>StepOne™ Software</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., DE

Für die Erstellung der Abbildungen **1**, **2**, **3** und **20** wurden PowerPoint-Vorlagen von Servier Medical Art zur Hilfe verwendet (<https://smart.servier.com>).

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Verfahren

3.2.1.1 Transformation

Unter einer Transformation von Bakterien wird die nicht-virale Übertragung von freier DNA in kompetente Bakterienzellen verstanden. 1 µl einer Plasmidlösung wurden zu 50 µl chemisch kompetenter *E.coli XL1 blue*-Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Unter 45-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Plasmid in die *E.coli XL1 blue*-Zellen aufgenommen. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Nachfolgend wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß für 5 min auf Eis platziert. 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium wurde zum

Transformationsansatz hinzugefügt. Der Ansatz inkubierte bei 37 °C und 600 rpm für 30 min in einem Heizblock. Es wurden 30 µl des Transformationsansatzes entnommen und auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen. Diese verweilten über Nacht in einem Standardinkubator bei 37 °C. Am folgenden Tag wurde eine Kolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einen Kolben mit 200 ml LB-Medium und dem Selektionsantibiotikum Ampicillin überführt. Nach 18 h erfolgte die Plasmidgewinnung (siehe Kapitel 3.2.1.3)

3.2.1.2 Anlage eines Plasmid-Glycerolstammes

Um die Verwendung desselben Klons eines Plasmids zu gewährleisten, wurde bei jeder Plasmidpräparation ein Glycerolstamm angelegt. Dafür wurden 850 µl einer Flüssigkultur mit 150 µl Glycerol versehen und in einem 2 ml Mikroschraubröhrchen bei -80°C verwahrt. Für eine erneute Plasmidpräparation wurde eine abgeflamnte Impföse in den Glycerolstamm getaucht und in einen Kolben mit 200 ml LB-Medium überführt. Schließlich konnten *E.coli* dasselbe Plasmid exprimieren, welches mittels des *PureYield™ Plasmid Midiprep Systems* extrahiert und bei -20 °C gelagert wurde.

3.2.1.3 Gewinnung von Plasmiden

Für die Präparation von Plasmiden wurde das *PureYield™ Plasmid Midiprep System* verwendet. Die Handhabung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller verwendeten Zellarten erfolgte in einem Standardinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 70-80 % Luftfeuchtigkeit.

Die HEK-293-Zellen und die Osteoblasten wurden bei einer Konfluenz von 80-100 % *gesplittet*. Das Vollmedium wurde dafür abgesaugt und die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen. Danach wurde die Zellkulturschale mit 1-2 ml Trypsin/EDTA versetzt und für 2-5 min im Standardinkubator gelagert. Das Ablösen der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Die Zellen wurden in 6 ml Vollmedium resuspendiert, sodass die Trypsinisierungsreaktion beendet wurde.

Zum Erhalt der HEK-293-Zellen oder der Osteoblasten wurden je nach gewünschter Zelldichte 0,5-4 ml der Resuspensionslösung in eine neue gelatinisierte Zellkulturschale pipettiert

und auf 10 ml Vollmedium aufgefüllt. Eine vollständige Beschreibung der einzelnen Beschichtungsvorgänge ist im Kapitel 3.2.2.2 zu finden.

Die Handhabung der HUVECs erfolgte analog. Aufgrund der größeren Wachstumsfläche in 75 cm² Zellkulturflaschen wurde das Trypsin/EDTA-Volumen auf 5 ml erhöht. Die Trypsinisierungsreaktion wurde ebenfalls durch DMEM-Vollmedium beendet. Im Anschluss wurde die Resuspensionslösung bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Das DMEM-Vollmedium wurde abgenommen und das Zellpellet in 10 ml Endothelzell-Vollmedium resuspendiert. Von dieser Resuspensionslösung wurden 1-2 ml in eine kollagenisierte Zellkulturflasche pipettiert und 13 ml Endothelzell-Vollmedium zugesetzt.

Für Experimente wurden die Zellen ausgezählt. 20 µl der Resuspensionslösung wurden mit 20 µl Trypanblau versetzt. Davon wurden 20 µl in einer Zählkammer im *Cellometer*[®] *Auto 1000* ausgezählt. Versuchsabhängig wurden zwischen 50.000 und 220.000 Zellen pro *Well* eines *12-Well*s verwendet. In jedes *Well* wurde zusätzlich 1 ml Vollmedium pipettiert. Bei den HEK-293-Zellen wurden die einzelnen *Wells* vor dem Aussäen der Zellen mit Poly-L-Lysine beschichtet. HUVECs erhielten zur besseren Adhäsion eine Kollagenisierung der *Wells*. Für die Osteoblasten wurden die *Wells* gelatinisiert.

Bei Experimenten mit HEK-293-Zellen auf Deckgläsern wurde je ein Deckglas nach Abflammen mit Hilfe eines Bunsenbrenners in jeweils einem *Well* einer *12-Well*-Platte platziert. Die Beschichtung der Deckgläser erfolgte erneut mit Poly-L-Lysine.

3.2.2.2 Beschichtung von Wachstumsflächen

Gelatinisierung

Zur Verbesserung der Adhäsionsfähigkeit von HEK-293-Zellen und Osteoblasten wurden die Wachstumsflächen der verwendeten Zellkulturschalen und der *12-Well*-Platten mit Gelatine benetzt. Nach 5 min wurde die Gelatine abgenommen und die Wachstumsflächen bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Kollagenisierung

Da HUVECs auf kollagenisierten Wachstumsflächen besser adhäreren, wurde der Boden der Zellkulturflaschen mit einer Kollagenlösung beschichtet. Die Einwirkungszeit betrug 15 min. Nach anschließendem Lufttrocknen folgten zwei Waschschrte mit PBS.

Poly-L-Lysine Beschichtung

Bei Stimulationsversuchen mit HEK-293-Zellen wurden die *Wells* der *12-Well*-Platten bzw. die Deckgläser mit Poly-L-Lysine beschichtet und nach einer 15-minütigen Einwirkzeit luftge-

trocknet. Nachfolgend wurde überschüssiges Poly-L-Lysine mit PBS durch zweimaliges Waschen entfernt.

3.2.2.3 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Ein Mikroschraubröhrchen der gewünschten Zelllinie wurde aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Nach Auftauen der Zellsuspension wurden 9 ml vorgewärmtes Vollmedium mit 1 ml der Zellsuspension in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Zur Entfernung des Einfriermediums erfolgte eine Zentrifugation bei 250 x g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert. Die Resuspensionslösung wurde auf zwei Zellkulturflaschen bzw. -schalen aufgeteilt und in dem Standardinkubator bei 37 °C platziert. 24 h später erfolgte der erste Medienwechsel.

3.2.2.4 Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Zelllinien können sich mit zunehmender Passagenanzahl verändern. Um dies zu vermeiden, wurden die Zellen mit möglichst früher Passagenanzahl eingefroren. Selbiges Vorgehen wurde bei längerer Nichtbenutzung einer Zelllinie angewandt.

Zellen in einer zu mindestens 90 % konfluenten Zellkulturschale oder -flasche wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit 2-5 ml Trypsin/EDTA abgelöst und in 6-12 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 250 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Resuspensionslösung in ein 2 ml Mikroschraubröhrchen überführt. Das Mikroschraubröhrchen wurde in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter über Nacht auf -80 °C gekühlt. Durch das Isopropanol wurde die Abkühlgeschwindigkeit auf etwa 1 °C/min limitiert. Am folgenden Tag wurde das Mikroschraubröhrchen in den Stickstofftank überführt.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Da ANO6 ein Plasmamembranprotein mit mehreren Transmembran-Domänen ist, musste für die Herstellung von Zelllysaten ein neues Protokoll etabliert werden.

Der Zellkulturüberstand von in 12-Well-Platten ausgesäten Zellen wurden zunächst abgenommen. Um unspezifische Banden bei der späteren Proteindetektion durch das Albumin des FCS im Vollmedium zu vermeiden, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend

wurden die Zellen in 500 µl PBS mit einem Zellschaber abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Eine Zentrifugation bei 12.000 rpm für 5 min pelletierte die Zellen, sodass der Überstand mit einer Pipette abgenommen werden konnte. Das Zellpellet wurde in 100-150 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Der RIPA-Lysepuffer wurde direkt vor der Benutzung mit dem Protease-Inhibitor-Mix *Complete™* versetzt. Der Lysevorgang wurde durch zehnmaliges Aufziehen der Resuspensionslösung mit einer 1 ml Einmalinjektionsspritze und den Einmalkanülen *BD Eclipse Needle - 20G* optimiert. Nachfolgend wurden die Proben für eine Stunde auf Eis platziert. Der Überstand der Proben wurde nach Zentrifugation bei 12.000 rpm für 5 min abgenommen und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Nun konnte die Proteinkonzentrationsbestimmung im *Pierce™ 660nm* Protein Assay erfolgen. Bei keiner direkten Weiterverwendung wurden die Proben bei -20 °C verwahrt.

3.2.3.2 Bestimmungen der Proteinkonzentration

Der *Pierce™ 660nm* Protein Assay wurde mit folgenden Abweichungen zur Proteinbestimmung benutzt: Zu 6 µl der Probe wurden 100 µl des *Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent* in die *Wells* einer 96-Well-Flachboden Platte pipettiert. Die Messung erfolgte bei 630 nm im *Microplate-Reader, 96-well, EL800™*. Es wurden Proteinmengen zwischen 20 und 50 µg weiterverwendet. Die Proteinmenge wurde durch die Zuhilfenahme einer BSA- (*Bovine Serum Albumin*) Standardkurve berechnet.

3.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld wurde anhand der Methode des diskontinuierlichen elektrophoretischen Systems durchgeführt. Es wurden die vertikalen Gelsysteme vom Typ *PerfectBlue* Doppelgelsystem *Twin M* und *ExW S* verwendet. Sowohl die Glasscheiben als auch der Kamm und die *Spacer* des Gelsystems wurden mit Isopropanol vor der Verwendung gereinigt. Anschließend wurde das Gelsystem zusammengebaut und mit 7,5%-igem Trenngel bis zu der vorgesehenen Markierung befüllt. Das 4,5%-ige Sammelgel wurde nach der Auspolymerisierung des Trenngels aufgefüllt und mit dem Kamm, welcher Taschen für die Proben formt, versehen. Der SDS-Laufpuffer wurde bis zu den Markierungen bzw. bis zum oberen Rand der Glasplatten der Kammern zugegeben. Sowohl die Anode als auch die Kathode wurden mit SDS-Laufpuffer bedeckt. Der Kamm wurde entfernt und die Geltaschen mit einer Einmalinjektionsspritze, *Inject 20 ml* und einer Einmalkanüle von Gelresten gesäubert. Vor Befüllung der Geltaschen wurden die Proteinproben mit 6x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 versehen. Der verwendete SDS-

Probenpuffer enthielt DTT zu Spaltung von möglichen Disulfidbrücken. Nachfolgend wurden die Proben in einem Heizblock für 5 min erhitzt. In der Regel wurden die Proteine bei 95 °C und 650 rpm denaturiert und nach einer kurzen Zentrifugation in die Geltaschen gegeben. Zur Detektion von ANO6 wurde die Temperatur auf 56 °C herabgesetzt. Bei höheren Temperaturen zeigte sich ein schlechtes Wanderungsverhalten der ANO6-Probe (siehe Kapitel 4.2). Neben den Proben wurde in eine Tasche 6 µl des Proteinmarkers *PageRuler™ Plus, Prestained Protein Ladder* pipettiert. Sobald die Spannung angelegt wurde, wanderten die negativ geladenen Proteine vom Sammelgel in das Trenngel zum positiv geladenen Pol, der Anode. Die verwendete Spannung betrug für die erste halbe Stunde 75 V. Für die weitere vollständige Proteinauftrennung betrug die Spannung 90 V bis zur Beendigung der Gelelektrophorese.

3.2.3.4 Western Blot

Die immunologische Detektion der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine erfolgte anhand der Bedienungshinweise für den *PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S* mittels *Tank-Blotting*. Hierbei wurden die Proteine von dem Elektrophoresegel auf eine PVDF-Membran mit 0,45 µm Porendichte übertragen.

Zunächst wurde die PVDF-Membran auf dieselbe Größe wie das Acrylamidgel zugeschnitten und mit einem Kugelschreiber beschriftet. Nach der Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol wurde diese in Transferpuffer äquilibriert.

Die *Blotting*-Kassette des *Tankblots* enthielt an beiden Seiten je eine Fasermatte und zwei mit Transferpuffer befeuchtete *Whatman*-Papiere. Zur Anode gerichtet befand sich innerhalb der *Whatman*-Papiere die PVDF-Membran und zur Kathode gerichtet das Gel. Bevor der *Tankblot* vollständig mit Transferpuffer gefüllt wurde, wurde die Kassette in den *Tankblot* eingelegt.

Zur Detektion von ANO6 wurde eine Stromstärke von 125 mA über 1,5 h zum Transfer verwendet. Anstelle des regulären Transferpuffers wurde der ANO6-Transferpuffer verwendet. Alle anderen zu detektierenden Proteine wurden bei 150 mA über 2 h transferiert.

3.2.3.5 Immunologische Detektion von Proteinen

Nach Abschluss des vollständigen Proteintransfers wurde zur Entfernung von Transferpufferresten die PVDF-Membran mit TBST gespült. Mit der Blockierlösung wurden die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht blockiert. Die Primärantikörperfärbung, die sich gegen Teile des Zielproteins richtet, erfolgte in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen. Der Primärantikörper wurde in 1%-igem oder 5%-igem

Milchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Rolltisch oder im Probenröhrchenrotator durchgeführt. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min mit TBST entfernt. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Nach der Verdünnung des Sekundärantikörpers in TBST wurde dieser in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und die PVDF-Membran zugegeben. Ungebundener Sekundärantikörper wurde nach 1 h Einwirkdauer auf dem Rolltisch bei Raumtemperatur durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Der Sekundärantikörper war mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt. Folglich konnte die Chemolumineszenzreaktion des *AmershamTM ECL SelectTM Luminols* durch die Peroxidase katalysiert werden und durch die Benutzung des *Multi-Imagingsystems, Fusion FX7*, detektiert werden. Die Belichtungszeit richtete sich in der Regel nach der von der Software vorgeschlagenen *Auto-Exposure-Zeit*.

Zur Detektion weiterer Proteine auf derselben PVDF-Membran wurde der vorherige Antikörper durch den Vorgang des *Probe-Strippings* entfernt. Hierbei wurde die PVDF-Membran nach einer Reaktivierung in Methanol in einer Box mit 50 ml *Stripping-Puffer* für 50 min bei 60 °C erwärmt. Der *Stripping-Puffer* enthielt Mercaptoethanol, welches für mindestens 15 min unter einem Abzug abdampfen konnte. Im Anschluss erfolgte ein mehrmaliges Waschen mit TBST. Bevor die PVDF-Membran erneut gefärbt wurde, wurden die freien Bindestellen blockiert.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Isolierung von mRNA aus Zellen

Zur Isolierung von mRNA aus Zellen wurde diese unter Verwendung des *SV Total RNA Isolation Systems* den Herstellerangaben folgend gewonnen. Die Lyse der Zellen wurde durch einen zusätzlichen Einfrierschritt für mindestens 15 min bei -80 °C direkt nach Zugabe des Lysepuffers verbessert. Bei sämtlichen Arbeitsschritten des Kapitels 3.2.4 wurden Nukleasefreie Reaktionsgefäße und Filterpipettenspitzen verwendet. Das Spektralphotometer *Nano-Drop1000* diente der Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm wurde zur Überprüfung der Reinheit der Probe angewandt, da aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Anschließend wurde das Verhältnis von den Messungen bei 260 nm zu 280 nm gebildet, wobei der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte, um eine

Verunreinigung auszuschließen. Die Umschreibung in cDNA erfolgte möglichst innerhalb von 24 h. Bis zur Umschreibung erfolgte eine Lagerung der Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.2 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der gewonnenen mRNA in cDNA wurde das *PrimeScript™ RT Master Mix* Kit verwendet. Zusätzlich zu $0,5\text{ }\mu\text{g}$ RNA wurden $2\text{ }\mu\text{l}$ des *5x PrimeScript™ RT Master Mixes* in ein $0,2\text{ ml}$ PCR-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde dies mit DEPC- H_2O auf $10\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt. Die reverse Transkription erfolgte im *Thermocycler, peqSTAR 96 Universal Gradient*, mit folgenden Einstellungen (Tabelle 14):

Tabelle 14: Programm für die reverse Transkription

Funktion	Zeit	Temperatur
Umschreibung der mRNA in cDNA	15 min	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Inaktivierung der reversen Transkriptase	15 s	$85\text{ }^{\circ}\text{C}$

Anschließend wurde die Konzentration der cDNA auf $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ mit DEPC- H_2O eingestellt.

3.2.4.3 Gradienten Polymerase Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. In diesem Fall wurde eine Gradienten-PCR angewandt, um die optimale *Annealing*-Temperatur für die verwendeten Primerpaare zu testen. Ein $25\text{ }\mu\text{l}$ -Ansatz enthielt die in Tabelle 15 genannten Komponenten.

Tabelle 15: Ansatz für die Gradienten-PCR

Menge	Substanz
$2,5\text{ }\mu\text{l}$	10x <i>Dream Taq</i> -Puffer
$2,5\text{ }\mu\text{l}$	Desoxynukleotide (dNTPs) (2 mM)
$0,125\text{ }\mu\text{l}$	<i>Forward</i> Primer (100 μM)
$0,125\text{ }\mu\text{l}$	<i>Reverse</i> Primer (100 μM)
$0,125\text{ }\mu\text{l}$	<i>Dream Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μl)
$1\text{ }\mu\text{l}$	DNA (10 ng/ μl)
ad $25\text{ }\mu\text{l}$	DEPC- H_2O

Eine Negativkontrolle mit DEPC- H_2O anstelle von DNA wurde zur Testung auf Verunreinigung wie beispielsweise durch DNA verwendet. Die PCR erfolgte im *Thermocycler, peqSTAR 96 Universal Gradient*. Die folgende Tabelle 16 zeigt die Einstellungen des PCR-Programmes:

Tabelle 16: Programm für die Gradienten-PCR

Funktion	Zeit	Temperatur [°C]	
Deckel erhitzen		120	
Initiale Denaturierung	3 min	95	
Denaturierung	30 s	95	25 Zyklen
Annealing	30 s	51,4- 58,5	
Elongation	1 min	72	
Finale Elongation	10 min	72	
Kühlung	∞	4	

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt eine Methode zur Nukleinsäuren Größenbestimmung dar. In diesem Fall dient diese der Quantifizierung der optimalen *Annealing*-Temperatur. Es wurde ein 2%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 µl/ml), einem DNA-bindenden Farbstoff, verwendet. Das Agarosegel basiert auf Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer. Bevor das Agarosegel mit Proben versehen wurde, wurden diese mit 6x Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurden 15 µl der DNA-Leiter *GeneRuler 100 bp DNA-ladder* verwendet. Bei Anlage des elektrischen Feldes wurde eine elektrische Stromstärke von 90 mA gewählt. Über etwa 75 min erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren. Die anschließende UV-Beleuchtung des Gels erfolgte mit dem *Dual intensity Ultraviolet Transilluminator TM 20* und der *BioDocII*-Fotodokumentationsanlage.

3.2.4.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen der Oligonukleotide für humanes *ANO6* wurden der Veröffentlichung von Ousingawat und Kollegen entnommen und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen (Ousingawat *et al.* 2015). Die *HPRT1*-Oligonukleotide wurden von Dr. N. Speck (Dermatologie, UKSH Kiel) entworfen. Die Sequenzen sind in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 17: verwendete Oligonukleotide

Gen	Name	Sequenz
<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1)</i> , human	hHPRT_for_eigener	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
	hHPRT_rev_eigener	CCCTGTTGACTGGTCATTAC
<i>ANO6</i> , human	humANO6for	GGAGTTTTGGAAGCGACGC
	humANO6rev	GTATTTCTGGATTGGGTCTG

3.2.4.5 Quantitative *Real-Time* RT-PCR

Hintergrund

Bei der quantitativen *Real-Time* RT-PCR (RT-qPCR) handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, welches mittels *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* durchgeführt wurde. Durch Untersuchungen der gewonnenen cDNA können Rückschlüsse auf die relative mRNA-Expression der *Target*-DNA in Zellen gezogen werden. Die Expression der *Target*-DNA wurde mit einem *Housekeeping*-Gen verglichen. Bei *Housekeeping*-Genen handelt es sich um Gene, die in jeder Zelle möglichst gleich stark exprimiert sind und somit als Kontrolle dienen. In diesen Experimenten wurde das *Housekeeping*-Gen *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1)* verwendet.

Anwendung

Die Durchführung einer *Touchdown*-PCR diente zur Verbesserung der Spezifität. Dabei wurde zunächst eine höhere Temperatur als die optimale *Annealing*-Temperatur gewählt und diese in jedem Zyklus um 1 °C gesenkt bis die optimale *Annealing*-Temperatur erreicht wurde. Bei diesem Vorgehen entstehen weniger unspezifische Primer-Anlagerungen an die cDNA, weshalb spezifischere DNA-Fragmente entstehen. Diese wurden in den folgenden Zyklen vervielfältigt.

Die quantitative DNA-Bestimmung erfolgte durch Benutzung des *SYBR premix Ex Taq II-Mix* von Takara. Bei *Sybr Green* handelt es sich um einen in die doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff. Die Zunahme der gefärbten *Target*-DNA korreliert mit dem Fluoreszenz-Anstieg bei zunehmenden Zykluszahlen. Im Anschluss an jede Elongationsphase fand eine Messung der Fluoreszenz statt. Der Zusatz *Rox* des *Sybr Greens* ändert seine Fluoreszenz innerhalb der qPCR nicht, sodass dieses als Korrektur für Pipettierungenauigkeiten einbezogen wurde. Ein Standardansatz für ein *Well* einer *MicroAmp^R Fast 96-Well Reaction Plate* ist in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18: RT-qPCR Standardansatz

Menge	Substanz
5,2 µl	<i>SYBR premix Ex Taq II-Mixes</i> (5x Master Mix + <i>Rox</i>)
2,8 µl	DEPC-H ₂ O
1 µl	einer 1:40 Vorverdünnung des <i>forward</i> Primers (100 µM) und des <i>reverse</i> Primers (100 µM)
1 µl	cDNA (10 ng/µl)

Als Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA 1 µl DEPC-H₂O verwendet. Jede Messung erfolgte in Doppelwerten. Das ausgewählte RT-qPCR-Programm zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: RT-qPCR Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	5	6 Zyklen
Annealing	64 (-1 °C/Zyklus)	30	
Elongation	72	30	
Denaturierung	95	5	40 Zyklen
Annealing	58/55	30	
Elongation	72	30	
Denaturierung	95	15	Schmelzkurve
Elongation	60	60	
Aufschmelzen	60 + (0,3)	15 (bis 95°C)	
Finale Denaturierung	95	15	

Auswertung

Die Auswertung wurde mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ - (*Cycle threshold*) Methode durchgeführt (Tabelle 20).

Tabelle 20: $\Delta\Delta\text{Ct}$ - (*Cycle threshold*) Methode

Wert	Berechnung
ΔCt	= Ct (Ziel-Gen) - Ct (<i>Housekeeping</i> -Gen)
$\Delta\Delta\text{Ct}$	= ΔCt (stimulierte Probe) - ΔCt (unbehandelte Kontrolle)
x-Fache Veränderung (<i>fold change</i>)	= $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

3.2.5 *Shedding*-Experimente mittels alkalischer Phosphatase-Assays

Um den Einfluss von ANO6 auf die *Shedding*-Aktivität von ADAMs näher zu untersuchen, wurden alkalische Phosphatase- (AP) gekoppelte, ADAM-spezifische Substrate verwendet. HEK-293-Zellen wurden mit ANO6 und einem AP-Substrat wie TGF- α -AP bzw. AREG-AP ko-transfiziert.

3.2.5.1 Hintergrund

Spalteten ADAMs ihre AP-Substrate während eines Experimentes von der Zelloberfläche ab, gelangten die freigesetzten Substrate in den Zellkulturüberstand. Bei ausgebliebenen *Shedding* verblieben die AP-Substrate auf der Zelloberfläche. Bei Hinzugabe des chromogenen Substrates p-Nitrophenylphosphat wurde dieses durch die Substrat-fusionierte alkalische Phosphatase in p-Nitrophenyl umgesetzt. Dies führte zu einem gelben Farbumschlag. Folg-

lich konnte die AP-Aktivität des Zellkulturüberstandes mit der AP-Aktivität des Zelllysates in Relation gesetzt und die prozentuale AP-Substratfreisetzung von den Zellen bestimmt werden.

3.2.5.2 Transiente Transfektion

Das Einbringen der Plasmide in HEK-293-Zellen erfolgte 24 h nach deren Aussaat auf 12-Well-Platten. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Zellen eine Konfluenz zwischen 60-80 % erreicht haben. Die Transfektion mittels Lipofektion, dem Einbringen von DNA in Zellen durch Liposomen, erfolgte mit dem in Kapitel 3.1.4 genannten Transfektionsansatz. Der Transfektionsansatz inkubierte bei Raumtemperatur für 20 min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Währenddessen wurde das DMEM-Vollmedium durch DMEM⁺-Medium ersetzt. Anschließend wurden 100 µl des Transfektionsansatzes in jedes Well einer 12-Well-Platte pipettiert. Die 12-Well-Platten wurden für 6 h im Standardinkubator platziert. Nach Ablauf der 6 h wurde das Medium entnommen und durch 1 ml DMEM-Vollmedium pro Well ersetzt.

3.2.5.3 Stimulation und Inhibition

Nach weiteren 24 bis 48 h erfolgte die Stimulation und Inhibition der transfizierten Zellen. Von jedem Well der 12-Well-Platte wurde das Vollmedium abgesaugt und durch 400 µl DMEM-Medium ersetzt. Die Stimulation und Inhibition erfolgte wie in Tabelle 21 beschrieben.

Tabelle 21: Stimulations- und Inhibitions-Schema

Inhibitor	Anwendung	Konzentration
Marimastat (MM)	15 min vor Hinzugabe eines Stimulus	10 µM
GI 254023X (GI)	15 min vor Hinzugabe eines Stimulus	3 µM
GW 280264X (GW)	15 min vor Hinzugabe eines Stimulus	3 µM
Stimulus		
Ionomycin (Io)	30 min	1 µM
Melittin	30 min	1 µM
PMA	2 h	300 ng/ml

3.2.5.4 Auswertung

Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellkulturüberstände mit einer Pipette entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, welche bei 10.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurden. Auf jedes Well einer 12-Well-Platte wurden 300 µl AP-Lysepuffer pipettiert.

Die 12-Well-Platten wurden auf Eis platziert. Damit sich die Zellen von den Wachstumsflächen lösten, wurden die 12-Well-Platten alle 5 min geschwenkt. Nach einer Gesamtdauer von 30 min wurde das vollständige Ablösen der Zellen im Lichtmikroskop überprüft. Die Zelllysatlösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 10.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Während die Zelllysate auf Eis inkubierten, wurden jeweils 100 µl der Zellkulturüberstände in Dreifachwerten auf eine 96-Well Platte pipettiert. Von den Zelllysateüberständen wurden 10 µl mit 90 µl AP-Puffer pro Well der 96-Well Platte in Dreifachwerten pipettiert. Zum Schluss wurde mit einer Mehrkanalpipette pro Well der 96-Well Platte 100 µl des AP-Substrates p-Nitrophenylphosphat zugefügt. Die Extinktionsmessungen erfolgten bei 405 nm im *Microplate-Reader, 96-well, Sunrise™* zu mehreren Zeitpunkten. Zur Auswertung der Extinktionsmessungen wurden mittels *Microsoft Office Excel* die Dreifachwerte sowohl der Zellkulturüberstände als auch der Zelllysateüberstände gemittelt und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Die dazugehörigen Kontrollwerte wurden ebenfalls gemittelt und dienten als Korrekturwerte. Final wurde der Anteil des in den Zellkulturüberstand gelangten AP-Substrates prozentual zu dem Gesamt-AP-Substrat ermittelt. Diese Daten wurden in *GraphPad Prism 5* überführt und per *One-Way-Anova* ($p \leq 0,05$) mit dem *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet.

3.2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay

3.2.6.1 Hintergrund

Als *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wird ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren verstanden. In dieser Arbeit wurden ELISAs zur Bestimmung von ADAM-Substratkonzentrationen als Maß der ADAM17-*Shedding*-Aktivität in Zellkulturüberständen herangezogen. Verwendet wurden der *Human sTNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA* sowie der *Human CXCL16 DuoSet ELISA* von R&D Systems nach Herstellerangaben. Der *Mouse TNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA* von R&D Systems wurde mit 50 % des vom Hersteller empfohlenen Volumens benutzt.

3.2.6.2 siRNA-Transfektion

Um die Expression von ANO6 herunter zu regulieren, wurde ANO6-siRNA genutzt. Es wurden die *Stealth siRNAs HSS153249, HSS153251, HSS176378* von Thermo Fisher Scientific gegen humanes ANO6 verwendet. Als Kontrolle fungierte die *Stealth RNAi™ Negative Control Lo GC Duplex*. Diese besitzt eine willkürliche Basensequenz, die keinerlei Homologien zu bekannten

Wirbeltiergenen aufweist. In jedes *Well* einer 12-*Well*-Platte wurden 55.000 HUVECs oder 100.000 HEK-293-Zellen in Vollmedium ausgesät. Die Wachstumsflächen wurden zuvor zur besseren Zelladhäsion kollagenisiert oder mit Poly-L-Lysine beschichtet. Nach 24 h erfolgte die siRNA-Transfektion, dieser Zeitpunkt wurde als $t = 0$ h definiert. Das Medium der *Wells* wurde entnommen und durch 1100 μ l Vollmedium pro *Well* ersetzt. Der Transfektionsansatz (siehe Kapitel 3.1.4) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und inkubiert für 15 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde in jedes *Well* der 12-*Well*-Platte 100 μ l des Transfektionsansatzes zugeführt und die 12-*Well*-Platte im Standardinkubator platziert. Zum Zeitpunkt $t = 48$ h erfolgte ein Medienwechsel mit Vollmedium. Für die Stimulation und Inhibition wurde der Zeitpunkt $t = 72$ h gewählt. Der Erfolg des *ANO6-Knockdowns* wurde mittels RT-qPCR überprüft (siehe Kapitel 3.2.4.5).

3.2.6.3 Stimulation von siRNA-transfizierten Zellen

ANO6-siRNA-transfizierte HUVECs wurden zum Zeitpunkt $t = 72$ h in 300 μ l *Endothelial Cell Basal Medium* stimuliert. Die Stimulanzen wurden wie in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben eingesetzt.

3.2.6.4 Durchführung eines ELISAs

Die ELISAs wurden nach der Methode des *Sandwich*-ELISAs durchgeführt. Eine 96-*Well*-ELISA-Platte wurde zunächst mit dem monoklonalen *Capture Antibody* beschichtet. Der *Capture Antibody* bindet das gesuchte Protein, welches sich in den aufgetragenen Zellkulturüberständen befand. Zur späteren Quantifizierung der Proteinmenge wurde neben den Zellkulturüberständen eine Verdünnungsreihe bekannter Antigenkonzentrationen für die Anfertigung einer Standardkurve aufgetragen. Im Folgenden wurde ein Biotin-gekoppelter polyklonaler *Detection Antibody* zugeführt. Dieser erkennt ein anderes Epitop des gesuchten Proteins als der *Capture Antibody*. Es bildete sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch die Zugabe von *Streptavidin-HRP* band dieses an das Biotin des *Detection Antibodies*. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde das chromogene Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidine zugeführt. Durch dessen Umsetzung entstand ein Farbumschlag. Final wurde die Absorptionsmessung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm im *Microplate-Reader, 96-well, SunriseTM* durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit *GraphPad Prism 5*.

3.2.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

3.2.7.1 Fluoreszenzfärbung - *Annexin V, Alexa Fluor® 568 nm*

Das *Annexin V, Alexa Fluor® 568* Konjugat markiert extrazellulär lokalisiertes PS. 200.000 HEK-293-Zellen wurden auf Poly-L-Lysine beschichteten Deckgläsern in 12-Well-Platten ausgesät und nach 24 h transfiziert (siehe Kapitel 3.2.5.2). Die Stimulation erfolgte nach weiteren 24 h. Das Vollmedium wurde durch 400 µl DMEM-Medium pro Well einer 12-Well-Platte ersetzt. Ionomycin wurde in einer Konzentration von 0,5 µM für 5-30 min appliziert. Alle nachfolgend beschriebenen Schritte erfolgten unter Lichtschutz. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Deckgläser aus den Wells der 12-Well-Platten entnommen und auf einer Papierserviette abgetupft. Die Deckgläser wurden auf 10 µl einer 1:20 *Annexin V, Alexa Fluor® 568* Vorverdünnung (in *Annexin Binding*-Puffer) platziert. Die Färbung wurde nach exakt 10 min durch zweimaliges Waschen mit *Annexin Binding*-Puffer beendet. Zur Fixierung wurden die Deckgläser für mindestens 15 min mit 3%-igem Paraformaldehyd beschichtet. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und ein Waschschrte mit destilliertem Wasser zur Entfernung von Salzresten. Die Deckgläser wurden mit 10 µl Mowiol^{+/+} versehen und auf einem Objektträger platziert. Nach einer Stunde Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger bis zur weiteren Benutzung abgedunkelt bei 4 °C gelagert.

3.2.7.2 Mikroskopie

Die Aufnahmen der *Annexin V, Alexa Fluor® 568nm* gefärbten Zellen wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop *FluoView FV1000* von Olympus erhoben. Mit dem Ziel Abbildungsfehler wie sphärische und chromatische Aberrationen zu reduzieren, wurde das *UPLSAPO 60XO Super Apochromat* Objektiv (NA= 1,35) verwendet. Die Extinktionsmessungen erfolgten wie in Tabelle 22 beschrieben.

Tabelle 22: Extinktionsmessungen für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Wellenlänge	Detektion von
488 nm	ANO6 eGFP
405 nm	DNA-Markierung - DAPI
559 nm	PS - <i>Annexin V, Alexa Fluor® 568 nm</i> Konjugat

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *Graph Pad Prism 5*. Es wurden die Mittelwerte plus den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Ausgewertet wurden

grundsätzlich mindestens drei voneinander unabhängige Versuche mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*. Im *Post-hoc-Test* wurden alle Gruppen gegeneinander getestet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $\leq 0,05$ bezeichnet. Die Symbole für den Grad der statistischen Signifikanz wurden wie in Tabelle 23 dargestellt gewählt.

Tabelle 23: Statistische Auswertung

Symbol	Bedeutung
n.s. (nicht signifikant)	$p > 0,05$
*/#	$p \leq 0,05$
**/##	$p \leq 0,01$
***/###	$p \leq 0,001$
****/####	$p \leq 0,0001$

4 Ergebnisse

Untersuchungen zur Rolle von ANO6 bezüglich der *Shedding*-Aktivität der Metalloprotease ADAM17

Um den Einfluss von ANO6 auf die ADAM17-*Shedding*-Aktivität zu bestimmen, wurden verschiedene Aspekte betrachtet. Der erste Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Scramblase-Aktivität von ANO6 durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Da ANO6 eine Externalisierung von PS induzierte, folgten Untersuchungen des Einflusses der ANO6-induzierten PS-Externalisierung auf die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung. Dafür wurden im zweiten Teil dieser Arbeit ANO6-Überexpressionsexperimente in HEK-293-Zellen durchgeführt. Die Freisetzung der ADAM17-zugeschriebenen Substrate AREG und TGF- α wurde hierbei unter Benutzung verschiedener Stimuli und Inhibitoren mittels AP-Assays analysiert. Als Drittes wurden die Einflüsse einer Ca²⁺-hypersensitiven ANO6-Mutante auf das ADAM17-Substrat-*Shedding* im AP-Assay ermittelt. Um endogene Substrate von ADAM17 und endogenes ANO6 zu untersuchen, wurden die Auswirkungen des ANO6-Knockdowns mittels ANO6-siRNA auf das Substrat-*Shedding* des TNFR1 und des Wachstumsfaktors CXCL16 mittels ELISAs im vierten Teil analysiert. Im fünften Abschnitt wurden primäre murine *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten im Vergleich zu *Ano6*^{+/-}-Osteoblasten hinsichtlich ihres TNFR1-*Sheddings* im ELISA untersucht.

4.1 Eine ANO6-Überexpression führt unter Ionomycin-Stimulation zu einer verstärkten PS-Externalisierung

Die ersten Experimente dieser Arbeit befassen sich mit der Ca²⁺-abhängigen Lipid-Scramblase-Aktivität von ANO6. Wie in der Einleitung bereits erläutert, ist für ANO6 eine Schlüsselrolle für die PS-Externalisierung beschrieben (Suzuki *et al.* 2010). Auch in dieser Arbeit konnte der ANO6-induzierte PS-Flip mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

HEK-293-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am folgenden Tag mit den Plasmiden *pcDNA3.1 eGFP* oder *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* transfiziert und nach weiteren 24 h stimuliert. Als Stimulus wurde das Ca²⁺-Ionophor Ionomycin über eine Zeitreihe von 5, 10, 15 und 30 min appliziert. Im Anschluss erfolgte die *Annexin V*-Färbung (siehe Kapitel 3.2.7.1). *Annexin V*, Alexa Fluor® 568nm ist ein rot fluoreszierender Farbstoff zur Detektion von

extrazellulärem PS. Die Zellkerne erscheinen durch die 4',6-Diamidino-2-phenylindole- (DAPI) DNA-Markierung blau.

Abbildung **4, A** zeigt die Expression von ANO6 in HEK-293-Zellen, die ohne Stimulation für 30 min in DMEM-Medium inkubiert wurden. Die grüne Fluoreszenz des *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* Plasmids visualisierte die erfolgreiche Transfektion. Die HEK-293-Zellen zeigten sich *Annexin V*-negativ. PS wurde folglich nicht vermehrt externalisiert.

In den Abbildungen **4, B-E** sind *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierte HEK-293-Zellen gezeigt. Hier erfolgte über vier verschiedene Zeiträume eine Stimulation mit Ionomycin. Zu allen abgebildeten Stimulationszeiträumen zeigten sich die ANO6-überexprimierenden HEK-293-Zellen *Annexin V*-positiv. Demnach externalisierten diese Zellen vermehrt PS. Die untransfizierten Zellen zeigten sich hingegen unter den gewählten Einstellungen *Annexin V*-negativ, da keine vermehrte PS-Externalisierung zu beobachten war. Das *Overlay* veranschaulicht zudem eine partielle Kollokalisierung von ANO6 und PS.

Die Abbildung **4, F** zeigt als Negativkontrolle Zellen, die *pcDNA3.1 eGFP* exprimierten. Die grüne Fluoreszenz bestätigte die erfolgreiche Transfektion. Diese Zellen waren analog zu den untransfizierten Zellen *Annexin V*-negativ. Somit wurde nicht vermehrt PS externalisiert.

Es ist hervorzuheben, dass die untransfizierten Zellen auch PS externalisierten. In diesen Abbildungen wurde die Sensitivität jedoch herabgesetzt, damit die PS-Externalisierung der ANO6-überexprimierenden Zellen dargestellt werden konnte. Demzufolge war die Sensitivität zu niedrig, um die vergleichsweise geringe PS-Externalisierung der untransfizierten Zellen zu illustrieren.

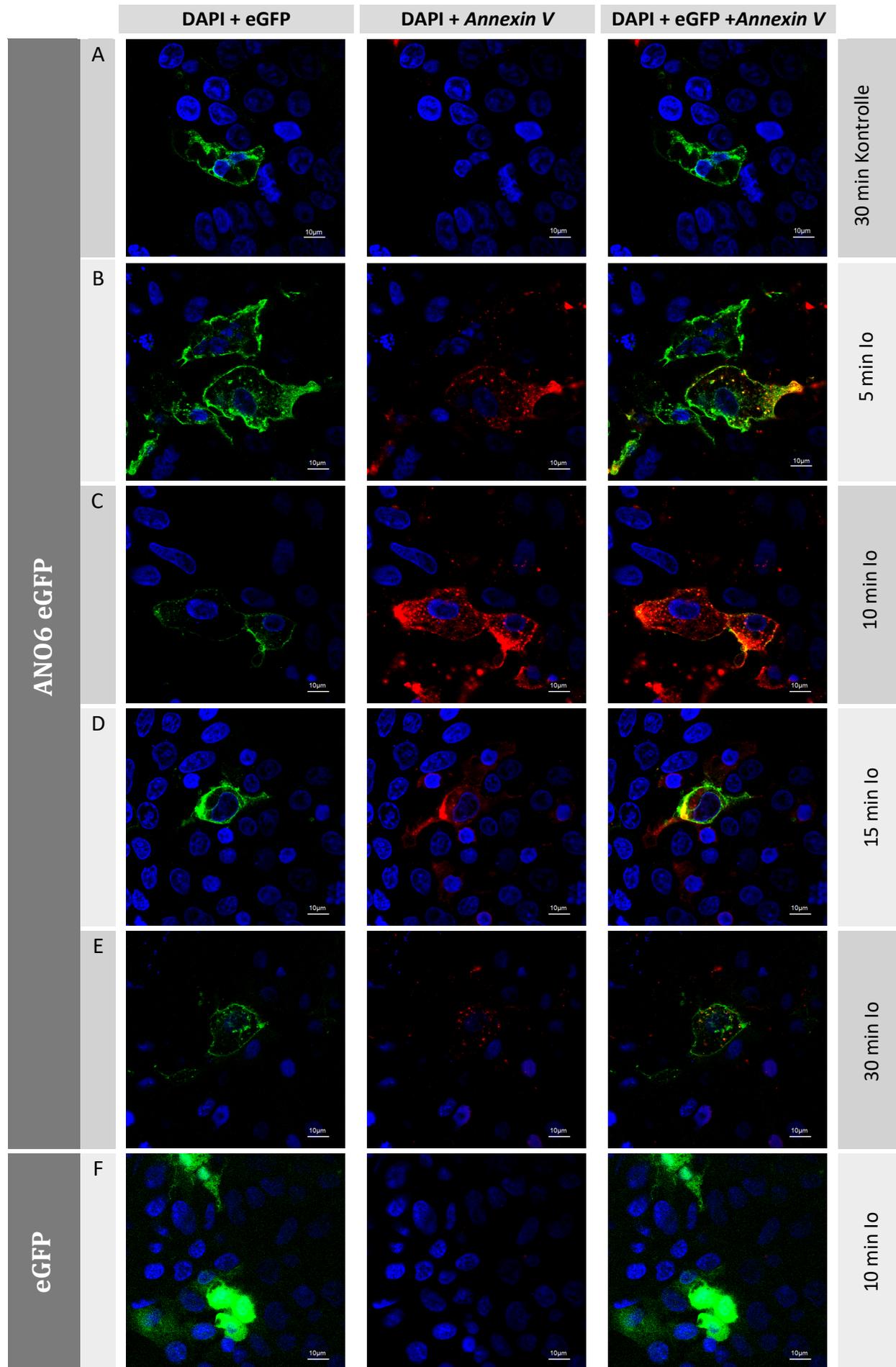


Abbildung 4: Eine ANO6-Überexpression führt zu einer verstärkten Ionomycin-induzierten PS-Externalisierung

HEK-293-Zellen wurden auf Deckgläsern in 12-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit den Plasmiden *pcDNA3.1 eGFP* oder *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* transfiziert. Die Stimulation mit 0,5 μ M Ionomycin (Io) erfolgte nach weiteren 24 h für eine Dauer von 5, 10, 15 oder 30 min. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Deckgläser für 10 min mit einer 1:20 Verdünnung des *Annexin V, Alexa Fluor[®] 568* gefärbt und in 3%-igem Paraformaldehyd fixiert. Durch DAPI wurde die Markierung der DNA ermöglicht. **A:** ANO6-überexprimierende HEK-293-Zellen wurden nicht stimuliert. **B-E:** ANO6-überexprimierende HEK-293-Zellen wurden mit Ionomycin stimuliert. **F:** *PcDNA3.1 eGFP*-exprimierende HEK-293-Zellen wurden mit Ionomycin stimuliert. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

4.2 Versuche zur Etablierung eines anti-ANO6-Western Blots

Die Etablierung eines Protokolls zum Nachweis von endogenem ANO6 erwies sich als kompliziert. Es wurden zwei verschiedene anti-ANO6-Antikörper, ein anti-His-Antikörper zur Detektion eines His-Tags an einem ANO6 His-Plasmid sowie ein anti-eGFP-Antikörper zur Detektion eines eGFP-Tags an einem ANO6 eGFP-Plasmid erprobt. Zunächst wurde ein *Western Blot*-Protokoll an *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten HEK-293-Zellen etabliert. ANO6 sollte eine Molekülmasse von 106 kDa und der eGFP-Tag von etwa 27 kDa besitzen. Es ergibt sich eine Gesamtmolekülmasse von 133 kDa. Abbildung 5, **A** zeigt einen repräsentativen *Western Blot* mit dem nicht modifizierten herkömmlichen *Western Blot*-Protokoll. Es war keine ANO6-Bande bei 133 kDa zu erkennen. Zu beobachten war jedoch eine schwache Bande über der 250 kDa Markierung in der *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-Spur. Dies konnte auf ein schlechtes Wanderungsverhalten von ANO6 hindeuten. Daraufhin wurde das *Western Blot*-Protokoll durch die Anwendung verschiedener Lysevorgänge und -puffer sowie durch unterschiedliche Proben-Erhitzungsmethoden modifiziert (siehe Kapitel 3.2.3). Final konnte ANO6 eGFP im *Western Blot* detektiert werden (Abbildung 5, **B**).

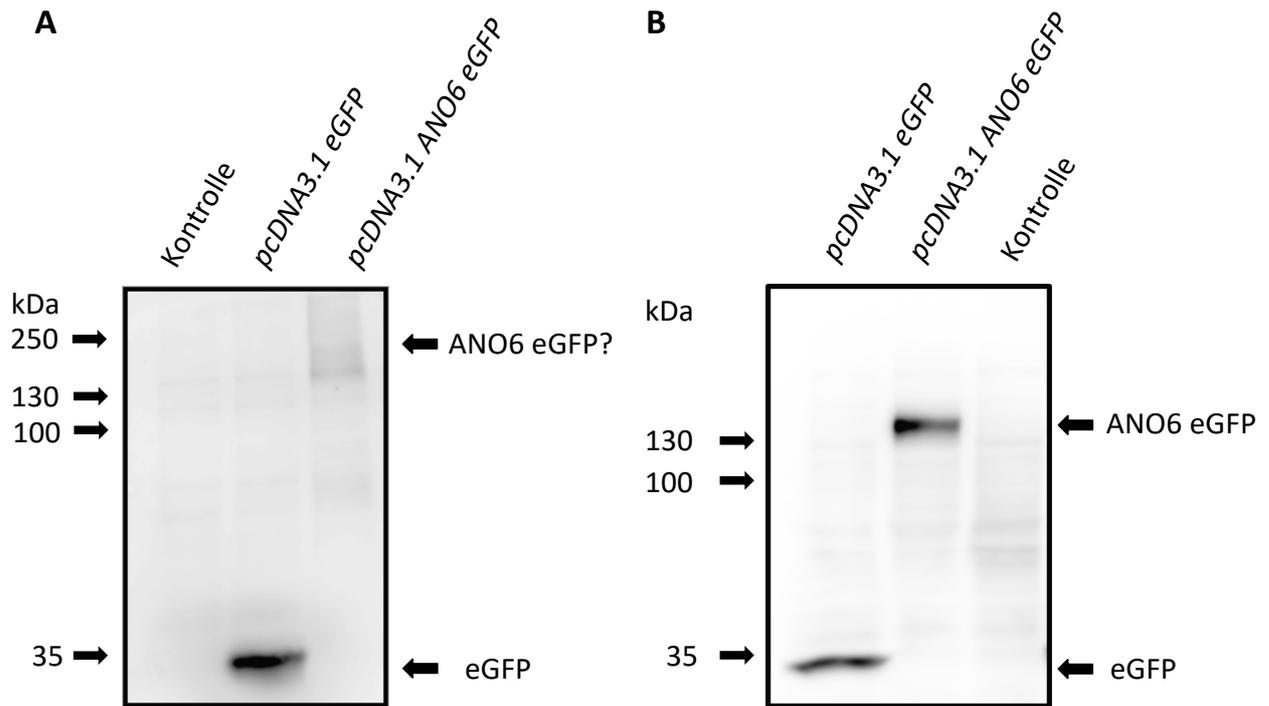


Abbildung 5: Etablierung eines anti-ANO6-Western Blots

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* transfiziert und deren Lysate nach 24 h mit einem *Western Blot* untersucht. **A:** Dargestellt ist ein *Western Blot* unter Verwendung des ADAM10-Lysepuffers und einer Denaturierung bei 95 °C. Hier wurde die Helligkeit und der Kontrast mit *Adobe Photoshop CS4 Extended* modifiziert. **B:** Durch eine Modifizierung des *Western Blot* Lyse-Protokolls mit RIPA-Lysepuffer und einer Proben-Aufkochung bei 56 °C konnte ANO6 eGFP bei etwa 133 kDa detektiert werden. Der eGFP-Leervektor weist eine Molekülmasse von etwa 27 kDa auf.

Nachfolgend sollte anhand des neu etablierten *Western Blot*-Protokolls die Spezifität von zwei anti-ANO6-Antikörpern überprüft werden. Der anti-ANO6-Antikörper von *Acris Antibodies* richtet sich gegen die C-terminale Region von humanem ANO6. Mit diesem Antikörper konnte ANO6 nicht erfolgreich detektiert werden (nicht dargestellt). Auch mit einem zweiten anti-ANO6-Antikörper von Prof. Dr. Kunzelmann der Universität Regensburg ließen sich keine spezifischen Banden detektieren (Abbildung 6). HEK-293-Zellen wurden mit den Plasmiden *pcDNA3.1 eGFP* und *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* transfiziert. Die proteinbiochemischen Methoden wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Primärantikörperfärbung erfolgte für 14 h bei 4 °C und die Sekundärantikörperfärbung mit einem anti-*Rabbit-POD*-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Es ließen sich keine spezifischen Banden auf Höhe von 133 kDa in den ANO6-überexprimierenden Zellen ausmachen (Abbildung 6, A). Im Anschluss wurde der Antikörper wie in Kapitel 3.2.3.5 beschrieben entfernt. Es erfolgte eine zweite Färbung derselben PVDF-Membran mit einem anti-eGFP-Primärantikörper und einer Sekundärantikörperfärbung mit einem anti-*mouse-POD*-Antikörper. Beide Färbungen erfolgten für 1 h bei Raumtemperatur. In der anti-eGFP-Antikörperfärbung konnte ANO6 auf einer

Höhe von 133 kDa detektiert werden (Abbildung 6, B). Somit konnte gezeigt werden, dass der anti-ANO6-Antikörper nicht spezifisch ANO6 markierte. Daher wurde in den folgenden Versuchen nur der anti-eGFP-Antikörper zum Nachweis von ANO6 eGFP verwendet.

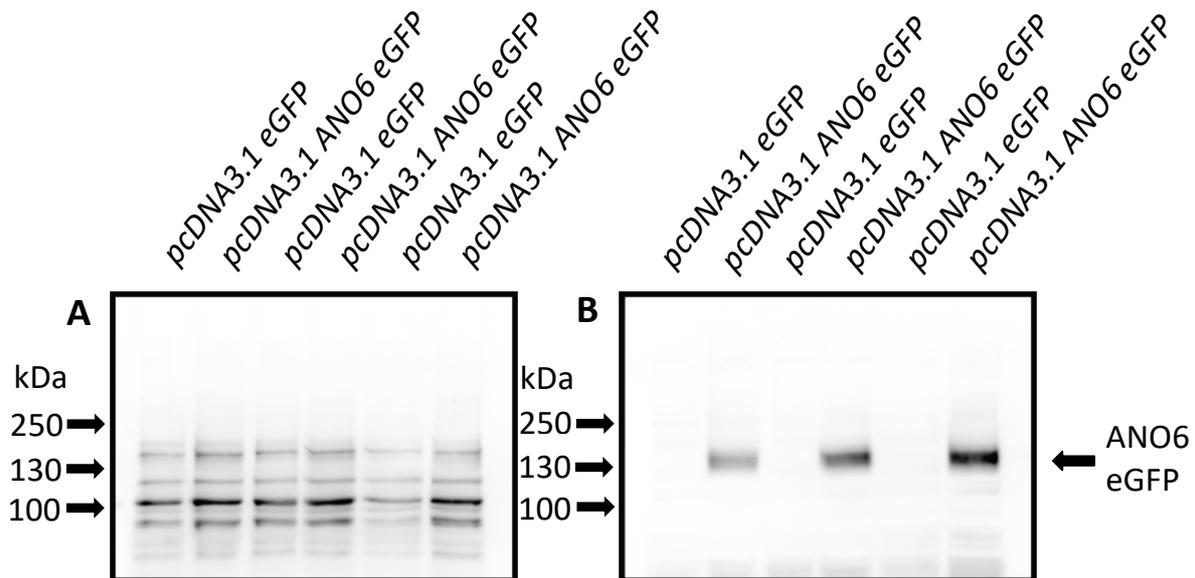


Abbildung 6: Vergleich des anti-ANO6-Antikörpers mit einem anti-eGFP-Antikörper

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und TGF- α -AP kotransfiziert. Es sind identischen Proben auf derselben PVDF-Membran dargestellt (6 A, B). Der anti-ANO6-Antikörper (Bezug: Prof. Dr. Kunzelmann, Regensburg) erwies sich als unspezifisch (A). Nach Entfernung des anti-ANO6-Antikörpers erfolgte eine zweite Färbung mit einem anti-eGFP-Antikörper (B). ANO6 eGFP besitzt eine Molekülmasse von etwa 133 kDa.

4.3 Auswirkungen einer ANO6-Überexpression auf die Freisetzung von ADAM-Substraten im AP-Assay

4.3.1 Eine ANO6-Überexpression führt unter Ionomycin-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg des AREG- und TGF- α -Sheddings

Wie in der Einleitung beschrieben, wird die PS-Externalisierung als Schlüsselmechanismus für die Aktivierung von ADAM17 angenommen (Sommer *et al.* 2016). Da ANO6 PS von der intrazellulären Seite auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran überführen kann (Suzuki *et al.* 2010), stellte sich die Frage, ob die durch ANO6-induzierte PS-Externalisierung Einfluss auf die ADAM17-*Shedding*-Aktivität hat.

HEK-293-Zellen wurden mit dem Plasmid *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder mit *pcDNA3.1 eGFP* und den ADAM17-Substraten AREG-AP oder TGF- α -AP kotransfiziert. Die Umsetzung des AP-Substrates durch die Substrat-fusionierte alkalische Phosphatase diente als *Readout* der ADAM17-*Shedding*-Aktivität. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Stimulation der HEK-

293-Zellen. Zunächst erfolgte eine Vorinkubation mit den Inhibitoren Marimastat (MM), GI 254023X (GI) und GW 280264X (GW). MM ist ein Breitspektrum Matrix-Metalloprotease Inhibitor. Für GI ist eine präferenzielle Inhibition der Protease ADAM10 beschrieben. GW inhibiert hauptsächlich ADAM10 und -17 (Ludwig *et al.* 2005). 15 min nach Beginn der Vorinkubation wurde das Ca²⁺-Ionophor Ionomycin appliziert. Der AP-Assay wurde wie in Kapitel 3.2.5 erläutert durchgeführt.

Als erstes Substrat wurde AREG untersucht (Abbildung 7, A). Bei den *pcDNA3.1 eGFP*-transfizierten Zellen konnte eine *Shedding*-Zunahme auf das 2,7-Fache im Ionomycin-stimulierten AREG-*Shedding* beobachtet werden. Der *Shedding*-Anstieg war jedoch nicht signifikant erhöht. Tendenziell wurde das Ionomycin-stimulierte *Shedding* durch GW und MM, aber nicht durch GI, inhibiert. Demnach kann ADAM17 als Haupt-*Sheddase* angenommen werden. Das *Shedding* der *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten Zellen stieg unter Ionomycin-Stimulation auf das 11-Fache des unstimulierten *Sheddings*. Dieses Ionomycin-induzierte *Shedding* war im Vergleich zu dessen *eGFP*-Leervektor-Kontrolle signifikant erhöht. Ohne Applikation von Ionomycin konnte keine veränderte *Shedding*-Aktivität zwischen den ANO6-überexprimierenden Zellen und der Kontrolle beobachtet werden. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Resultaten aus Kapitel 4.1. Dort wurde gezeigt, dass die ANO6-induzierte PS-Externalisierung nur unter einer Ca²⁺-Ionophor-Stimulation zunahm. Das Ionomycin-stimulierte *Shedding* der *ANO6 eGFP*-transfizierten HEK-293-Zellen wurde durch GI auf etwa die Hälfte reduziert. GW und MM hemmten das Ionomycin-stimulierte *Shedding* vollständig. Folglich waren ADAM10 und -17 zu ungefähr gleich großem Anteil am AREG-*Shedding* beteiligt. Als Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Überexpression wurde ein *Western Blot* angefertigt (Abbildung 7, B).

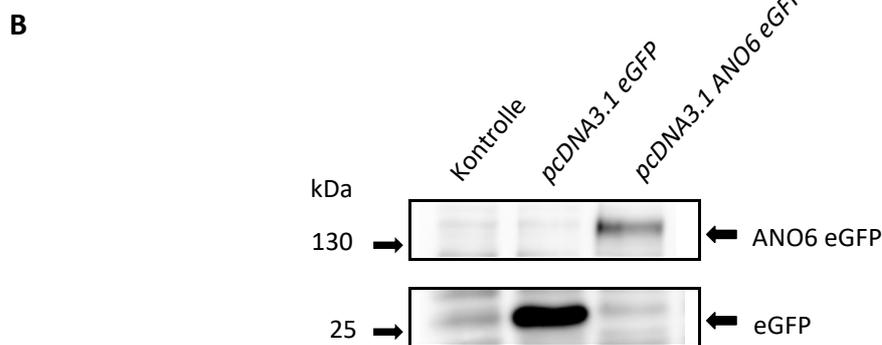
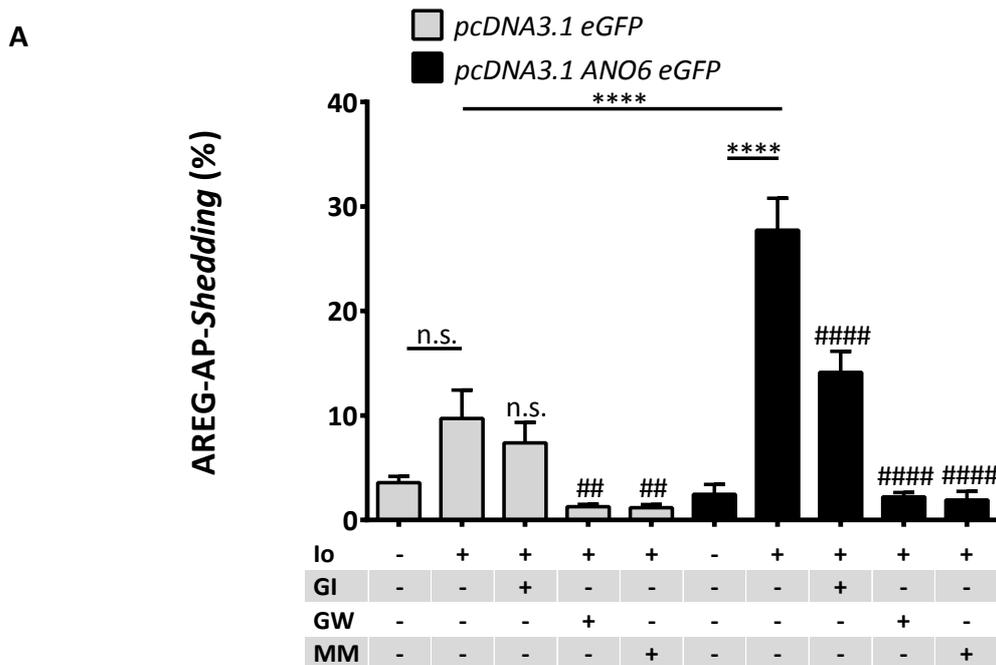


Abbildung 7: Eine ANO6-Überexpression steigert das Ionomycin-stimulierte AREG-AP-Shedding

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und AREG-AP kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M Marimastat (MM), 3 μ M GI 254023X (GI) oder 3 μ M GW 280264X (GW) und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M Ionomycin (Io) für 30 min. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von AREG-AP aus drei unabhängigen Versuchen sind in **A** dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-Sheddings, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Zunahme des Sheddings oder eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$). Ein repräsentativer *Western Blot* zur Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Proteinüberexpression mittels anti-eGFP-Antikörper ist in **B** dargestellt.

Um den beobachteten Effekt auch für weitere ADAM17-Substrate zu überprüfen, wurde das Substrat TGF- α untersucht (Abbildung 8, A). Die *pcDNA3.1 eGFP*-transfizierten Hek-293-Zellen zeigten unter Ionomycin-Stimulation eine Zunahme des TGF- α -Sheddings auf das Doppelte des unstimulierten Ausgangswertes. GI hemmte das Ionomycin-induzierte *Shedding* nicht, wohingegen GW und MM das Ionomycin-stimulierte *Shedding* vollständig hemmten. ADAM17 fungierte hier als Haupt-*Sheddase* von TGF- α . Die *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten Zellen zeigten unter Ionomycin-Stimulation einen TGF- α -*Shedding*-Anstieg auf das 3,8-Fache. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen des AREG-

Sheddings konnte für das TGF- α -*Shedding* eine Ionomycin-induzierte *Shedding*-Zunahme in ANO6-überexprimierenden HEK-293-Zellen im Vergleich zu der eGFP-Leervektor-Kontrolle bestätigt werden. Das Ionomycin-induzierte TGF- α -*Shedding* der *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten Zellen wurde durch GI und GW um etwa ein Drittel reduziert. MM inhibierte die Substratfreisetzung etwa auf den unstimulierten Ausgangswert. Entsprechend waren unter diesen Bedingungen neben ADAM10 weitere Metalloproteasen am TGF- α -*Shedding* beteiligt. Als Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Überexpression wurde ein *Western Blot* angefertigt (Abbildung 8, B).

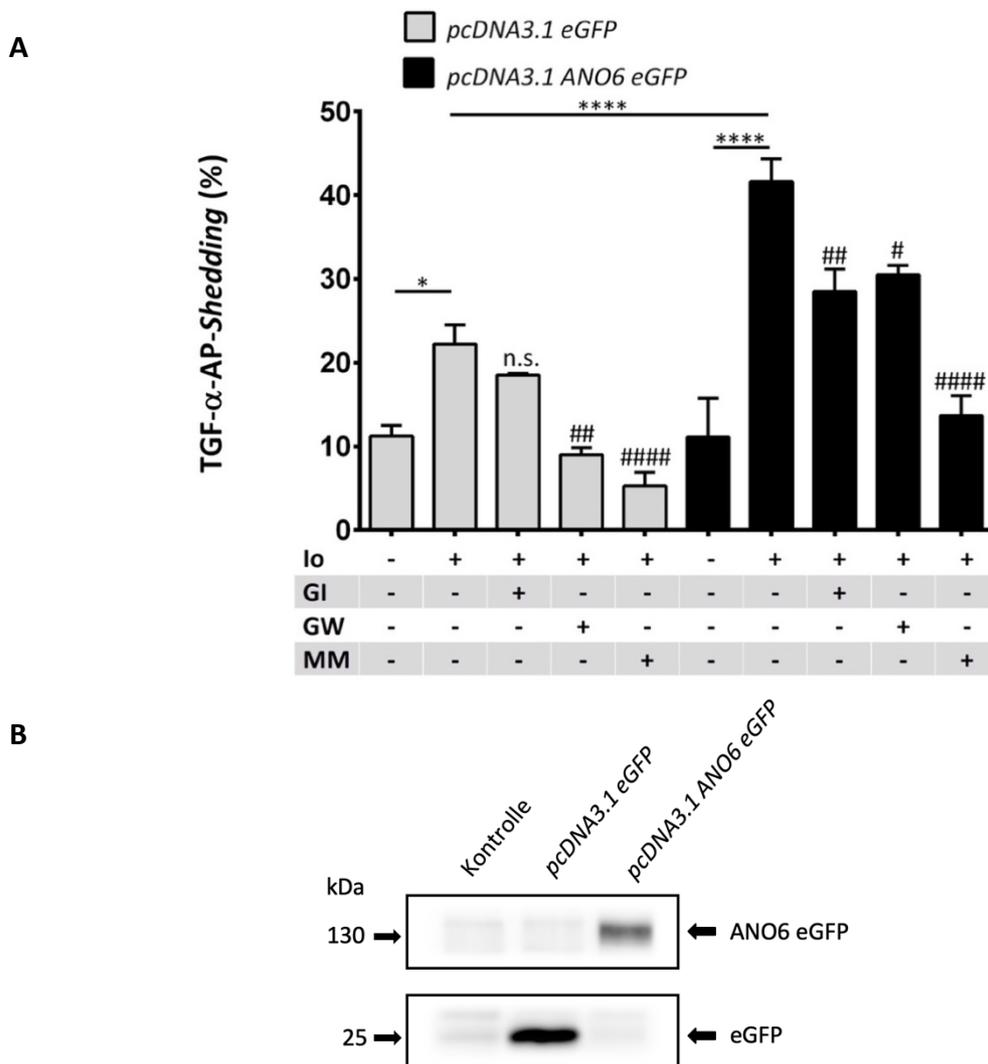


Abbildung 8: Eine ANO6-Überexpression steigert das Ionomycin-stimulierte TGF- α -AP-*Shedding*
HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und TGF- α -AP kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M Ionomycin (Io) für 30 min. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von TGF- α -AP aus drei unabhängigen Versuchen sind in **A** dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des TGF- α -AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/#### $p \leq 0,001$, ****/##### $p \leq 0,0001$). Ein repräsentativer *Western Blot* zur Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Proteinüberexpression mittels anti-eGFP-Antikörper ist in **B** dargestellt.

4.3.2 Eine ANO6-Überexpression führt unter Melittin-Stimulation zu einem signifikanten AREG- und TGF- α -Shedding-Anstieg

Um die aufgestellte Hypothese, dass ANO6 die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 bestimmt, weiter zu prüfen, wurde der Ca^{2+} -abhängige Stimulus Melittin verwendet. Melittin stellt eine Hauptkomponente des Bienengiftes dar. Anti-karzinogene, anti-mikrobielle und anti-inflammatorische Eigenschaften werden Melittin zugeschrieben (Gajski & Garaj-Vrhovac 2013; Moreno & Giralto 2015). Die Wirkmechanismen von diesem Stimulus sind noch nicht abschließend geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Melittin-Stimulation unter anderem einen Ca^{2+} -Einstrom induziert (Liu *et al.* 2008; Sommer *et al.* 2012).

Die Fragestellung, ob das Melittin-induzierte *Shedding* von ADAM17-Substraten in ANO6-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu einer Kontrolle ohne ANO6-Überexpression zunimmt, wurde analog zu den Experimenten in Kapitel 4.3.1 in HEK-293-Zellen im AP-Assay untersucht. Die Experimente erfolgten erneut unter Verwendung der Plasmide *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und den ADAM17-Substraten AREG-AP oder TGF- α -AP. Die Stimulation wurde 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Nach 15 min Vorinkubation mit den Inhibitoren MM, GI und GW wurde Melittin für 30 min appliziert.

Als Erstes wurde das Melittin-stimulierte AREG-*Shedding* untersucht (Abbildung 9, A). Die *pcDNA3.1 eGFP*-transfizierten Zellen zeigten unter Melittin-Stimulation eine Zunahme des AREG-*Sheddings* auf das 4,8-Fache des unstimulierten Ausgangswertes. GI hemmte das Melittin-induzierte *Shedding* um etwa ein Drittel. GW und MM reduzierten das *Shedding* auf den Ausgangswert. Folglich war neben ADAM17 auch ADAM10 zu geringerem Ausmaß am AREG-*Shedding* beteiligt. In den *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten Zellen stieg unter Melittin-Stimulation das AREG-*Shedding* auf das 12,4-Fache. Dieser Anstieg war im Vergleich zu dem *Shedding*-Anstieg der Kontroll-transfizierten Zellen signifikant erhöht. Das Melittin-induzierte AREG-*Shedding* der *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten Zellen wurde durch GI auf 64 % supprimiert. Dies lässt auf eine Teilbeteiligung von ADAM10 am AREG-*Shedding* schließen. GW und MM hemmten das Melittin-induzierte AREG-*Shedding* vollständig. Daher ist anzunehmen, dass ein Großteil von AREG durch ADAM17 freigesetzt wurde. Zur Überprüfung der erfolgreichen ANO6-Überexpression wurde ein *Western Blot* angefertigt (Abbildung 9, B).

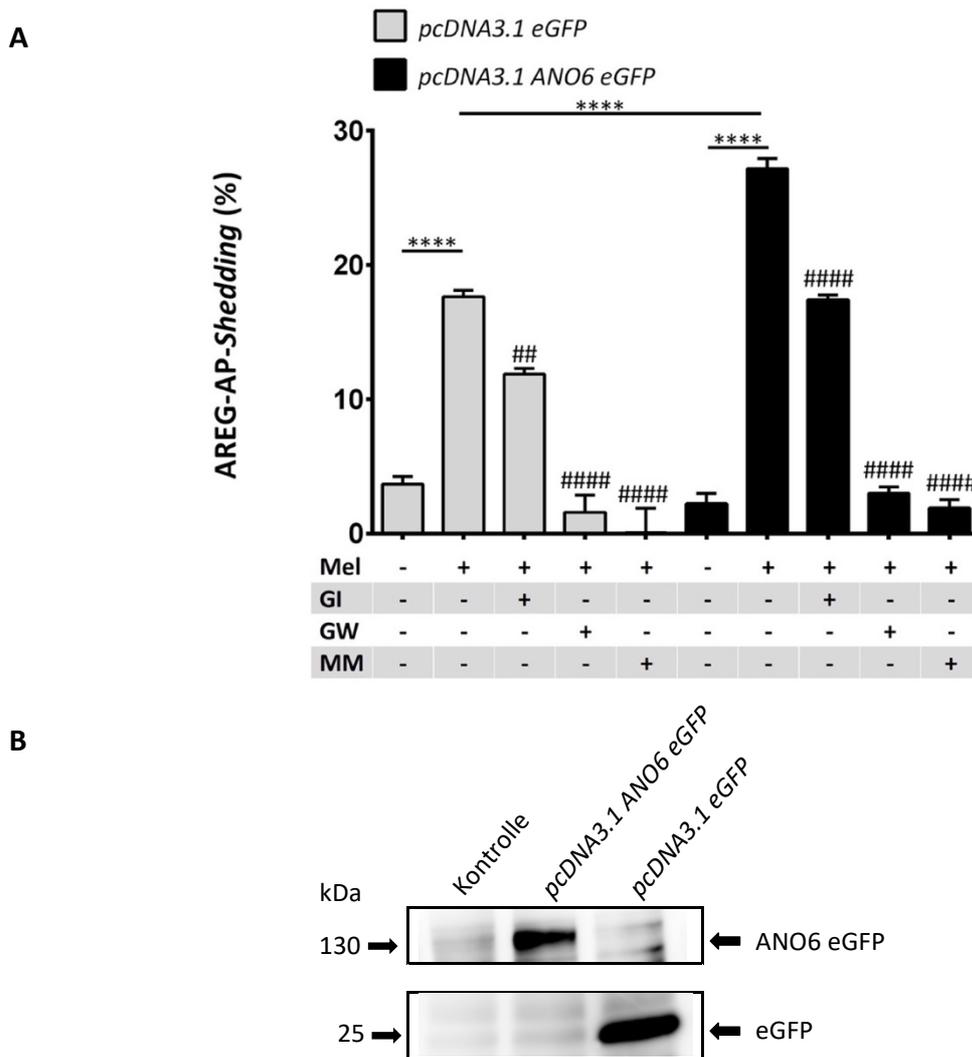


Abbildung 9: Eine ANO6-Überexpression steigert das Melittin-stimulierte AREG-AP-Shedding

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und AREG-AP kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M Melittin (Mel) für 30 min. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von AREG-AP aus drei unabhängigen Versuchen sind in **A** dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-Sheddings, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$, ****/#### $p \leq 0,0001$). Ein repräsentativer *Western Blot* zur Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Proteinüberexpression mittels anti-eGFP-Antikörper ist in **B** dargestellt.

Auch für das Substrat TGF- α wurde das Melittin-induzierte *Shedding* untersucht (Abbildung **10, A**). Das Melittin-stimulierte TGF- α -*Shedding* der *pcDNA3.1 eGFP*-transfizierten HEK-293-Zellen stieg auf etwa das Doppelte an. Dieser *Shedding*-Anstieg ließ sich mit GI nicht signifikant hemmen. GW und MM inhibierten das Melittin-stimulierte *Shedding* vollständig, sodass ADAM17 als Haupt-*Sheddase* angenommen werden kann. Das *Shedding* der *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten HEK-293-Zellen stieg unter Melittin-Stimulation auf das 3,3-Fache an. Dieser *Shedding*-Anstieg war signifikant höher als der Melittin-induzierte *Shedding*-Anstieg in der eGFP-Leervektor-Kontrolle. GI konnte das Melittin-induzierte *Shedding* in den ANO6-

überexprimierenden Zellen nicht hemmen. GW inhibierte das Melittin-stimulierte *Shedding* auf etwa 70 % und MM vollständig. Vermutlich waren unter diesen Bedingungen neben ADAM10 und -17 noch weitere unbekannte Metalloproteasen am Melittin-induzierten TGF- α -*Shedding* in ANO6-überexprimierenden HEK-293-Zellen beteiligt. Als Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Überexpression wurde ein *Western Blot* angefertigt (Abbildung 10, B).

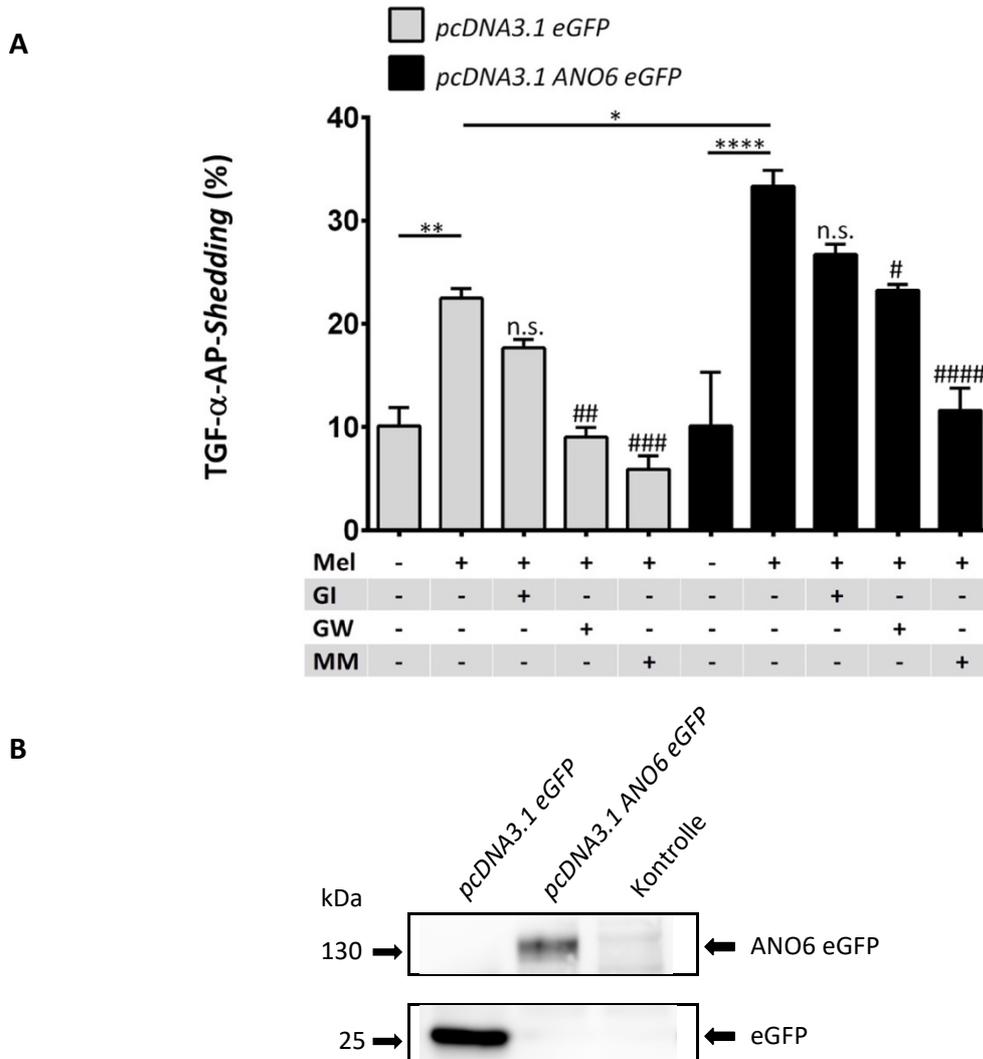


Abbildung 10: Eine ANO6-Überexpression steigert das Melittin-stimulierte TGF- α -AP-*Shedding*

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und TGF- α -AP kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M Melittin (Mel) für 30 min. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von TGF- α -AP aus drei unabhängigen Versuchen sind in A dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des TGF- α -AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$, ****/#### $p \leq 0,0001$). Ein repräsentativer *Western Blot* zur Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Proteinüberexpression mittels anti-eGFP-Antikörper ist in B dargestellt.

4.3.3 Eine ANO6-Überexpression führt unter PMA-Stimulation zu keiner Veränderung des AREG-*Sheddings*

Der Phorbolester PMA ist ein weiterer Stimulus, der für die Aktivierung von ADAM17 beschrieben ist. PMA wirkt im Gegensatz zu den Ca^{2+} -abhängigen Stimulanzen Ionomycin und Melittin über eine Aktivierung der Proteinkinase C (Horiuchi *et al.* 2007b; Le Gall *et al.* 2010, 2009).

In Bezug auf die Hypothese, dass ANO6 Ca^{2+} -abhängig die ADAM17-*Shedding*-Aktivität bestimmt, wurde erwartet, dass PMA in ANO6-transfizierten Zellen keinen weiteren *Shedding*-Anstieg induziert.

Die mit *pcDNA3.1 eGFP*- oder *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*- und AREG-AP-transfizierten Zellen wurden mit MM, GI und GW vorinkubiert und im Anschluss für 2 h mit PMA stimuliert.

Wie in Abbildung **11, A** gezeigt ist, steigerte die PMA-Stimulation in den *pcDNA3.1 eGFP*-transfizierten HEK-293-Zellen das AREG-*Shedding* massiv. Dieser PMA-induzierte *Shedding*-Anstieg ließ sich nicht signifikant durch GI reduzieren. GW und MM inhibierten das PMA-stimulierte *Shedding* auf den unstimulierten Ausgangswert. Folglich fungierte ADAM17 unter PMA-Stimulation als Haupt-*Sheddase* von AREG. Bei den *pcDNA3.1 ANO6 eGFP*-transfizierten HEK-293-Zellen stieg das *Shedding* unter PMA-Stimulation ebenfalls massiv an. Der *Shedding*-Anstieg ließ sich nicht mit GI, aber mit GW und MM, hemmen. Das PMA-induzierte AREG-*Shedding* der ANO6-überexprimierenden HEK-293-Zellen unterschied sich nicht wesentlich von dessen eGFP-Leervektor-Kontrolle. Zur Überprüfung der erfolgreichen ANO6-Überexpression wurde ein *Western Blot* angefertigt (Abbildung **11, B**).

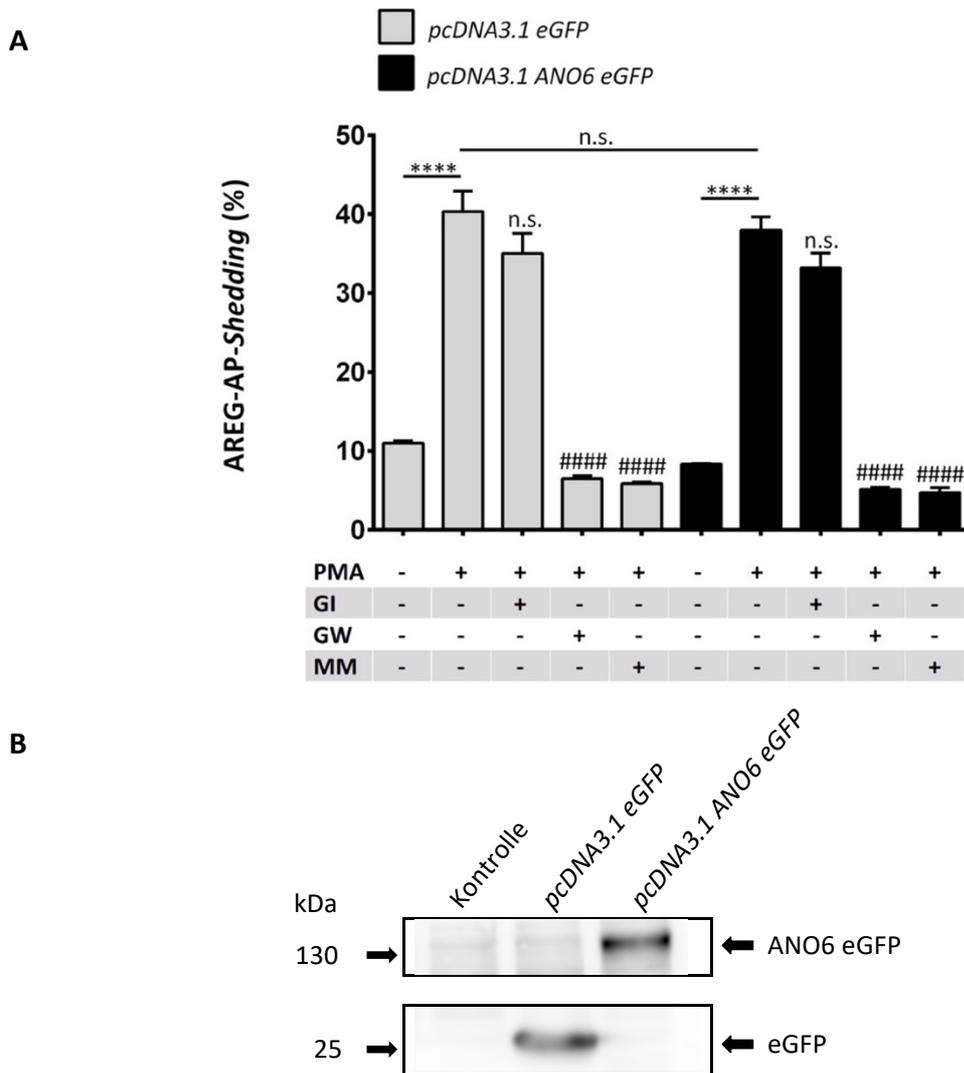


Abbildung 11: Eine ANO6-Überexpression beeinflusst nicht das PMA-stimulierte AREG-AP-Shedding

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1 ANO6 eGFP* oder *pcDNA3.1 eGFP* und AREG-AP kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW und anschließend eine zwei-stündige Stimulation mit 300 ng/ml PMA. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von AREG-AP aus drei unabhängigen Versuchen sind in **A** dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-Sheddings, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Veränderung des Sheddings oder eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$, ****/#### $p \leq 0,0001$). Ein repräsentativer *Western Blot* zur Kontrolle der erfolgreichen ANO6-Proteinüberexpression mittels anti-eGFP-Antikörper ist in **B** dargestellt.

4.4 Die Überexpression einer Ca^{2+} -hypersensitiven ANO6-Mutante induziert eine massive Freisetzung von AREG und TGF- α im AP-Assay

Der dritte Teil der Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen der Ca^{2+} -hypersensitiven ANO6-Mutante auf die *Shedding*-Aktivität von ADAM17. Die Ca^{2+} -hypersensitive Mutante ANO6 wurde erstmalig von Suzuki und Kollegen als murine D409G-Mutante beschrieben. Diese besitzt eine Adenin-zu-Guanin Mutation des Nukleotids 1226, sodass eine Asparaginsäure durch ein Glycin ersetzt wurde. Diese D409G-Mutante besitzt die Eigenschaft, PS bei norma-

len intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu externalisieren (Suzuki *et al.* 2010). Die humane Mutante hat den Austausch der kritischen Aminosäure an Position 408, weshalb es sich in dieser Arbeit um eine ANO6 D408G-Mutante handelt. Diese wurde von Prof. Dr. Kunzelmann der Universität Regensburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Mittels transients Transfektion wurde das Plasmid der Ca^{2+} -hypersensitiven ANO6-Mutante, *pcDNA3.1 ANO6 His D408G*, zusammen mit einem ADAM17-AP-Substrat in HEK-293-Zellen eingebracht. Als Kontrollen wurden das Plasmid *pcDNA3.1* und das Wildtyp ANO6-Plasmid, *pcDNA3.1 ANO6 His*, verwendet (siehe Kapitel 3.2.5.2). Nach 48 h wurden die Zellen für 30, 60 und 90 min in DMEM-Medium inkubiert. Im Anschluss erfolgte der AP-Assay.

Zuerst wurden die Einflüsse der D408G-Mutante auf das AREG-AP-*Shedding* überprüft (Abbildung 12). Es konnte kein *Shedding*-Aktivitätsunterschied zwischen den *pcDNA3.1*- und den *pcDNA3.1 ANO6 His*-transfizierten HEK-293-Zellen beobachtet werden. Die Überexpression der D408G-Mutante induzierte dagegen eine massive konstitutive Freisetzung von AREG-AP im Vergleich zu den *pcDNA3.1*- oder *pcDNA3.1 ANO6 His*-transfizierten Zellen. Das AREG-*Shedding* der D408G-transfizierten Zellen war um den Faktor 15-21 im Vergleich zu den *pcDNA3.1*-transfizierten Zellen erhöht. Das AREG-AP-*Shedding* der D408G-transfizierten Zellen stieg über die drei gemessenen Zeitpunkte weiter an.

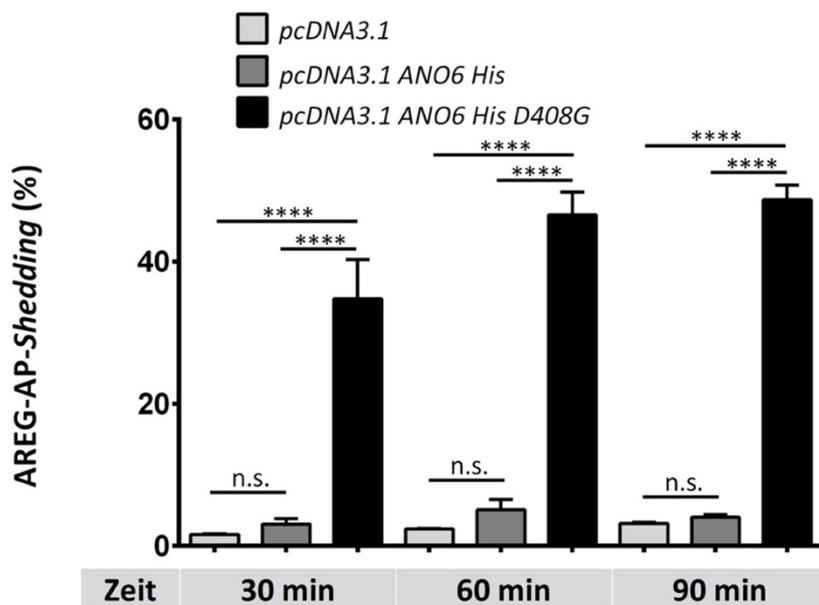


Abbildung 12: Die Ca^{2+} -hypersensitive Mutante *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* induziert konstitutiv eine massive Freisetzung von AREG-AP

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1*, *pcDNA3.1 ANO6 His* oder *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* und AREG-AP kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurde für 30, 60 und 90 min die Freisetzung von AREG-AP bestimmt. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von AREG-AP aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*. **** $p \leq 0,0001$).

In Abbildung 13 zeigt sich ebenfalls für das zweite Substrat, TGF- α -AP, kein signifikanter *Shedding*-Aktivitätsunterschied zwischen den *pcDNA3.1*- und den *pcDNA3.1 ANO6 His*-transfizierten Zellen. Auch für TGF- α konnte dessen exzessive Freisetzung unter Einbringung der D408G-Mutante verglichen mit den *pcDNA3.1*- und den *pcDNA3.1 ANO6 His*-transfizierten HEK-293-Zellen beobachtet werden. Das TGF- α -*Shedding* der D408G-transfizierten HEK-293-Zellen war um den Faktor 13-19 größer als bei den *pcDNA3.1*-transfizierten Zellen.

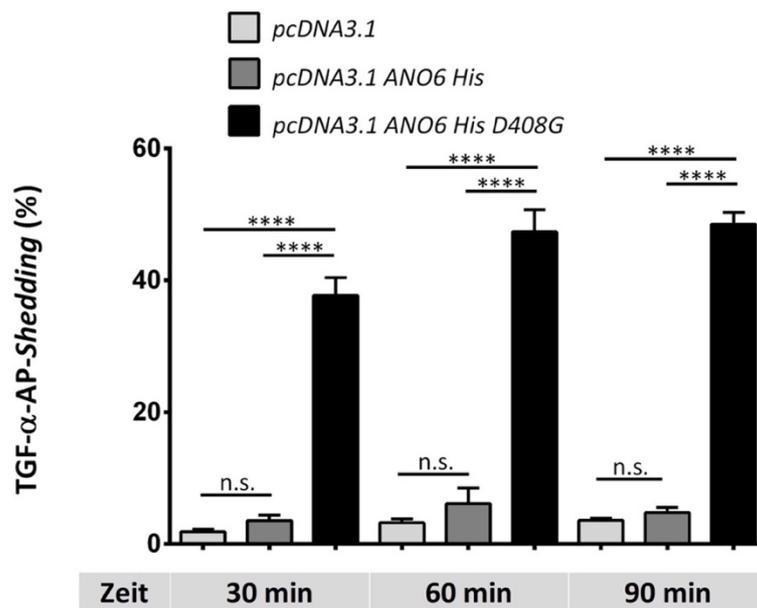


Abbildung 13: Die Ca²⁺-hypersensitive Mutante *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* induziert konstitutiv eine massive Freisetzung von TGF- α -AP

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1*, *pcDNA3.1 ANO6 His* oder *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* und TGF- α -AP kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurde für 30, 60 und 90 min die Freisetzung von TGF- α -AP bestimmt. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von TGF- α -AP aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Zunahme des TGF- α -AP-*Sheddings*. **** $p \leq 0,0001$).

Da die Ca²⁺-hypersensitive Mutante D408G sowohl das AREG- als auch das TGF- α -*Shedding* hochgradig induzierte, wurde die Beteiligung von ADAM10 und -17 in diesem Prozess untersucht.

HEK-293-Zellen wurden mit den Plasmiden *pcDNA3.1* oder *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* und AREG-AP oder TGF- α -AP transfiziert. Nach 48 h erfolgte eine Vorinkubation mit den Inhibitoren GI und GW für 15 min. Anschließend wurden für weitere 30 min GI und GW appliziert.

In Abbildung 14 ist das AREG-AP-*Shedding* der D408G-transfizierten HEK-293-Zellen 11,7-fach so hoch wie das *Shedding* der *pcDNA3.1*-transfizierten Zellen. Das AREG-*Shedding* der D408G-transfizierten HEK-293-Zellen konnte mit GI nicht signifikant inhibiert werden. GW

hemmte das *Shedding* der D408G-transfizierten Zellen. Als Konsequenz kann größtenteils auf ein ADAM17-vermitteltes AREG-*Shedding* geschlossen werden.

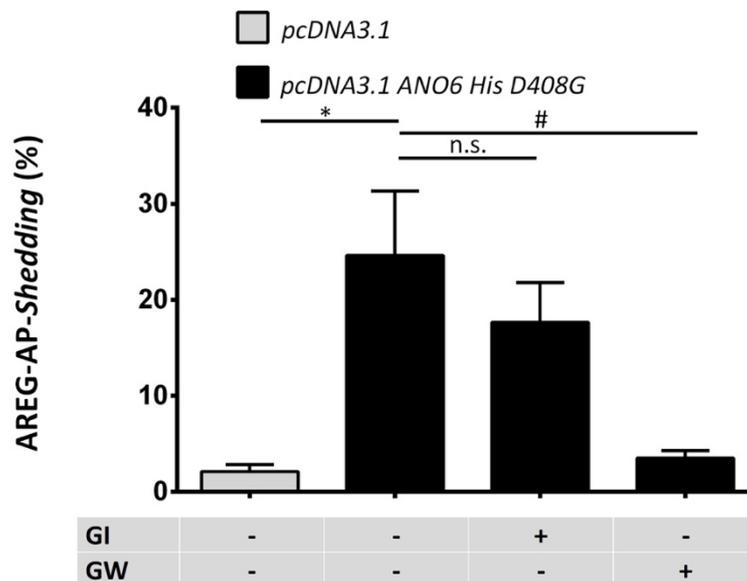


Abbildung 14: Die Inhibition der Ca^{2+} -hypersensitiven Mutante *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* mittels präferenziellen ADAM-Inhibitoren zeigt eine maßgebliche Beteiligung von ADAM17 im AREG-AP-*Shedding*

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1* oder *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* und AREG-AP kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte eine Vorinkubation mit 3 μ M GI und 3 μ M GW für 15 min. Anschließend wurden nach einem Medienwechsel erneut 3 μ M GI und 3 μ M GW für weitere 30 min appliziert. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von AREG-AP aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-*Sheddings*. Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$).

In Abbildung 15 zeigt sich ein ebenfalls massiver TGF- α -AP-*Shedding*-Anstieg der D408G-transfizierten HEK-293-Zellen im Vergleich zu den *pcDNA3.1*-transfizierten Zellen. GI hemmte tendenziell das *Shedding* der D408G-transfizierten Zellen. GW inhibierte das *Shedding* signifikant. ADAM17 war somit am *Shedding* beteiligt.

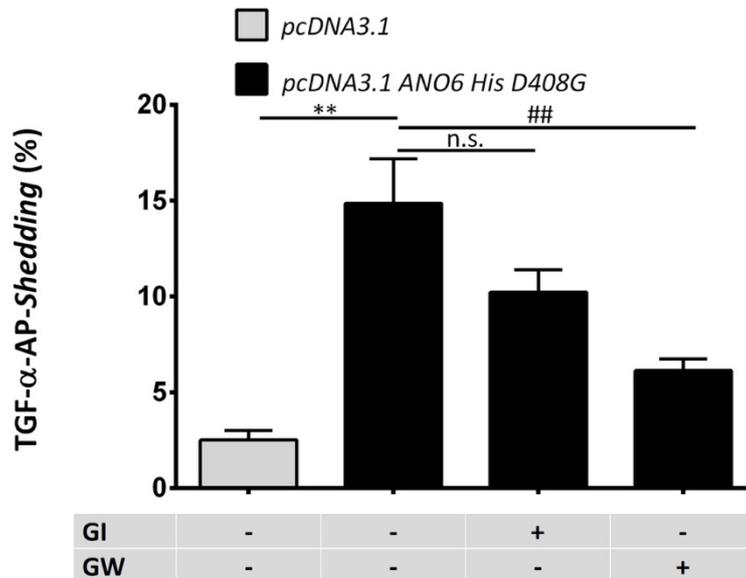


Abbildung 15: Die Inhibition der Ca^{2+} -hypersensitiven Mutante *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* mittels präferenziellen ADAM-Inhibitoren zeigt eine maßgebliche Beteiligung von ADAM17 im TGF- α -AP-Shedding

HEK-293-Zellen wurden mit *pcDNA3.1* oder *pcDNA3.1 ANO6 His D408G* und TGF- α -AP kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte eine Vorinkubation mit 3 μM GI und 3 μM GW für 15 min. Anschließend wurde nach einem Medienwechsel erneut 3 μM GI und 3 μM GW für weitere 30 min appliziert. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung von TGF- α -AP aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt (ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-Sheddings. Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. **/## $p \leq 0,01$).

4.5 Auswirkungen der *ANO6*-Herunterregulation mittels siRNA auf die ADAM-Substratfreisetzung in HUVECs

Um den Einfluss von endogenem ANO6 auf die Aktivität von ADAM17 umfassender zu bestimmen, wurde *ANO6* durch die Anwendung von *ANO6*-siRNA herunterreguliert. Die Einflüsse des *ANO6*-Knockdowns wurden anschließend hinsichtlich des Substrat-Sheddings analysiert.

Wie bereits in Kapitel 4.2 gezeigt wurde, war kein Nachweis der endogenen ANO6-Expression mit einem anti-ANO6-Antikörper möglich. Damit der erfolgreiche *ANO6*-Knockdown mittels *ANO6*-siRNA dennoch überprüft werden konnte, wurden drei verschiedene *ANO6*-siRNAs verwendet und deren Wirkung mittels einer RT-qPCR untersucht. Die Verwendung von drei unterschiedlichen *ANO6*-siRNAs diente dem Ausschluss von *Off-Target*-Effekten einer einzelnen siRNA. HEK-293-Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben mit 20 nM *ANO6*-siRNA oder der Kontrolle *Lo GC* transfiziert. Nach Ablauf von 72 h wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Schließlich erfolgte die RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.4.5). In Abbildung 16 ist die relative Veränderung der *ANO6*-mRNA-Expression

unter der Verwendung der drei siRNAs (*HSS153249* = Nr. 1, *HSS153251* = Nr. 2, *HSS176378* = Nr. 3) bzw. der Kombination aller drei siRNAs dargestellt. Den größten *ANO6*-Knockdown induzierte die siRNA Nr. 3. Dies konnte auch für andere Zelllinien bestätigt werden (nicht abgebildet), weshalb diese für weitere Experimente ausgewählt wurde.

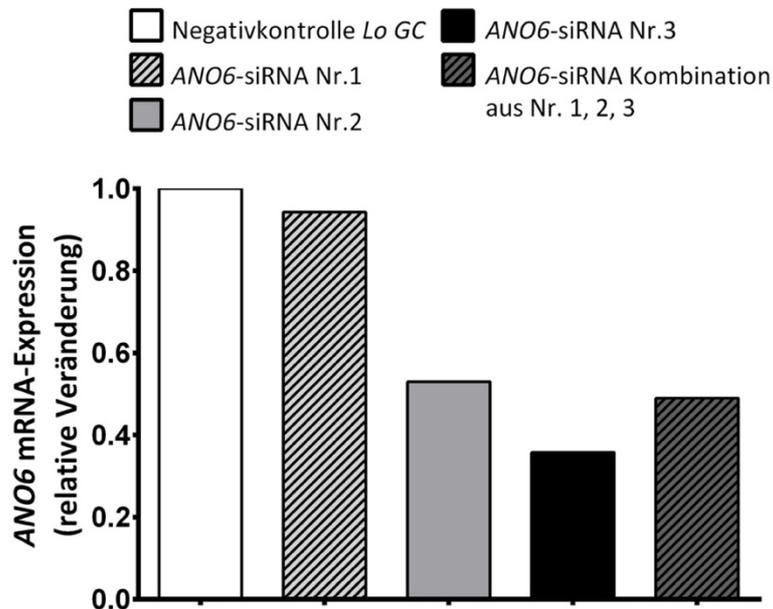


Abbildung 16: Ein Vergleich verschiedener siRNAs bezüglich des *ANO6*-Knockdowns in HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit 20 nM *ANO6*-siRNA oder der siRNA-Negativkontrolle *Lo GC* behandelt. Die Überprüfung des Knockdowns der *ANO6*-mRNA-Expression erfolgte nach 72 h durch eine RT-qPCR. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet, dabei wurde das *Housekeeping*-Gen *HPRT1* als interne Kontrolle verwendet. Es ist eine repräsentative RT-qPCR dargestellt (*Stealth siRNAs*: *HSS153249* = Nr. 1, *HSS153251* = Nr. 2, *HSS176378* = Nr. 3).

4.5.1 Die Herunterregulation von *ANO6* durch *ANO6*-siRNA führt zu einer signifikanten Reduktion des Ionomycin-induzierten TNFR1-Sheddings im ELISA

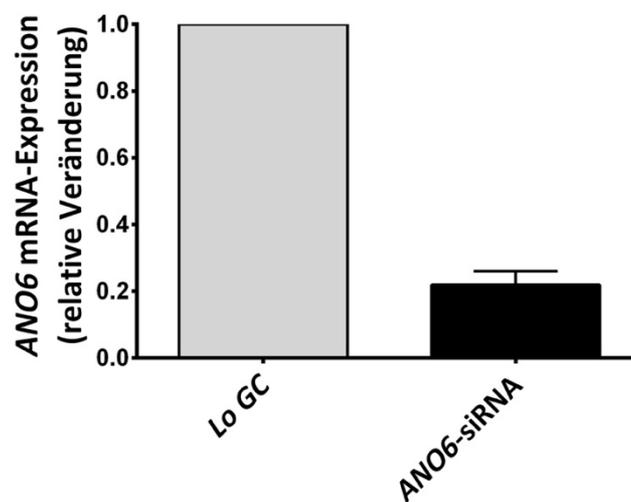
Die folgenden Experimente mit *ANO6*-siRNA wurden in HUVECs durchgeführt. HUVECs besitzen mehrere Vorteile. Zum einen stellen HUVECs ein physiologischeres System als immortalisierte Zelllinien dar, da es sich um primäre Endothelzellen von Nabelschnurvenen handelt. Zum anderen verfügen HUVECs im Gegensatz zu HEK-293-Zellen über eine starke Oberflächenexpression des ADAM17-Substrates TNFR1 und des ADAM10- und ADAM17-Substrates CXCL16.

HUVECs wurden unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagenzes *HiPerFect* mit 20 nM *ANO6*-siRNA oder der siRNA-Negativkontrolle *Lo GC* transfiziert. Nach 72 h erfolgte eine Vorinkubation mit den Inhibitoren MM, GI und GW und nachfolgend eine Stimulation mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (siehe Kapitel 3.2.6.3). Die Zellkulturüberstände wurden nach

30 min Ionomycin-Stimulation abgenommen und für den *Human TNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA* verwendet (siehe Kapitel 3.2.6.4). Aus den Zellysaten wurde die mRNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und diese für den Nachweis des erfolgreichen *ANO6-Knockdowns* in der RT-qPCR weiterverwendet (siehe Kapitel 3.2.4).

Die Herunterregulation von *ANO6* mittels *ANO6-siRNA* ist in Abbildung **17, A** dargestellt. Die Verwendung der *ANO6-siRNA* erzielte einen *Knockdown* der *ANO6*-mRNA-Expression auf etwa 22 %.

Zunächst wurde das *TNFR1-Shedding* im ELISA untersucht (Abbildung **17, B**). HUVECs, die mit der siRNA-Negativkontrolle *Lo GC* behandelt wurden, setzten unter Ionomycin-Stimulation das 4,5-Fache an *TNFR1* im Vergleich zu den unstimulierten Zellen frei. Der Ionomycin-stimulierte *Shedding*-Anstieg wurde mit GI nicht inhibiert. *ADAM10* war demnach nicht wesentlich am *Shedding* beteiligt. *GW* und *MM* hemmten das Ionomycin-induzierte *Shedding*. Folglich war *ADAM17* im Ionomycin-induzierten *TNFR1-Shedding* involviert. Die *ANO6-siRNA*-behandelten HUVECs zeigten ebenfalls unter Ionomycin-Stimulation einen Anstieg des *TNFR1-Sheddings*, dieser *Shedding*-Anstieg stieg jedoch nur auf das 2,8-Fache im Vergleich zu den unstimulierten Zellen an. Im Vergleich zu dem Ionomycin-induzierten *TNFR1-Sheddings* der *Lo GC*-behandelten HUVECs war dieser signifikant reduziert. Das Ionomycin-stimulierte *Shedding* der *ANO6-siRNA*-transfizierten HUVECs wurde mit GI nicht gehemmt. *GW* und *MM* inhibierten dieses hingegen. Dies lässt auf ein *ADAM17*-vermitteltes *TNFR1-Shedding* schließen.

A

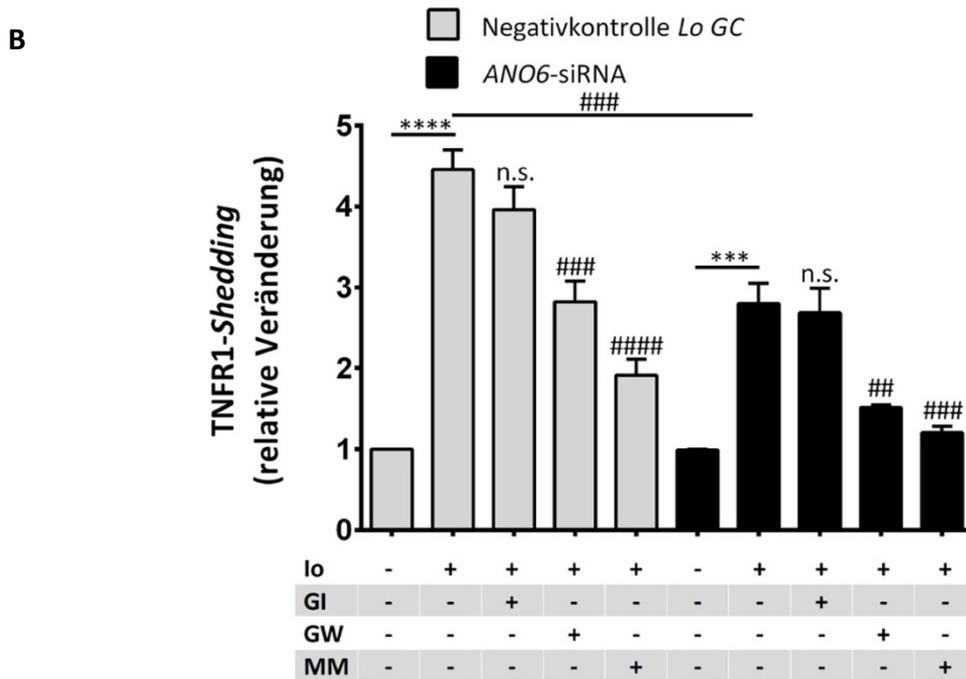


Abbildung 17: Ein ANO6-Knockdown führt zu einer signifikanten Reduktion des Ionomycin-induzierten TNFR1-Sheddings

HUVECs wurden mit 20 nM ANO6-siRNA oder der siRNA-Negativkontrolle *Lo GC* behandelt. Nach 72 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M lo. Die Überprüfung des erfolgreichen ANO6-Knockdowns mittels ANO6-siRNA erfolgte durch eine RT-qPCR. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet, dabei wurde das *Housekeeping-Gen HPRT1* als interne Kontrolle verwendet. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen sind in **A** dargestellt. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung des endogen exprimierten TNFR1 aus drei unabhängigen Versuchen sind in **B** dargestellt. Die Ergebnisse wurden auf das unstimulierte TNFR1-Shedding normalisiert (ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test: Rauten kennzeichnen eine signifikante Abnahme des TNFR1-Sheddings oder kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$, #### $p \leq 0,0001$).

4.5.2 Die Herunterregulation von ANO6 mit ANO6-siRNA zeigt keine Veränderung in der Freisetzung von CXCL16 im ELISA

Zur Überprüfung des Einflusses von ANO6 auf das CXCL16-Shedding wurden dieselben Zellkulturüberstände, die für den *Human TNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA* verwendet wurden, ebenfalls für einen *Human CXCL16 DuoSet ELISA* eingesetzt. Der *Human CXCL16 DuoSet ELISA* wurde wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben durchgeführt.

Wie in Abbildung 18 illustriert ist, stieg das CXCL16-Shedding der *Lo GC*-behandelten HUVECs tendenziell, aber nicht signifikant, unter Ionomycin-Stimulation. GI und MM hemmten dieses stimulierte Shedding signifikant, wohingegen GW dieses nicht signifikant inhibierte. Als potenzielle Sheddase könnte ADAM10 fungieren. Das Shedding der Ionomycin-stimulierten ANO6-siRNA-behandelten HUVECs stieg tendenziell an. Das Ionomycin-induzierte TNFR1-Shedding der *Lo GC*-behandelten HUVECs und der ANO6-siRNA-behandelten HUVECs unter-

schied sich statistisch nicht. Das Ionomycin-stimulierte *Shedding* der *ANO6*-siRNA-transfizierten HUVECs wurde mit GI, GW und MM etwa zu gleichem Ausmaß inhibiert. ADAM10 war hier die mutmaßliche CXCL16-*Sheddase*.

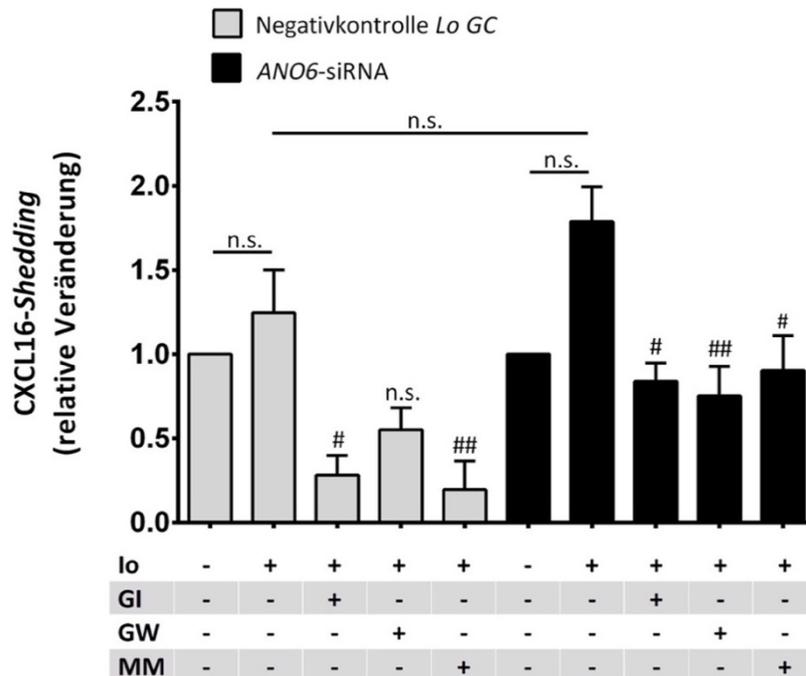


Abbildung 18: Ein *ANO6*-Knockdown führt zu keiner signifikanten Veränderung des Ionomycin-induzierten CXCL16-*Sheddings*

HUVECs wurden mit 20 nM *ANO6*-siRNA oder der siRNA-Negativkontrolle *Lo GC* behandelt. Nach 72 h erfolgte für 15 min eine Vorinkubation mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M Io. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet, dabei wurde das *Housekeeping*-Gen *HPRT1* als interne Kontrolle verwendet. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Freisetzung des endogen exprimierten CXCL16 aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. Die Ergebnisse wurden auf das unstimulierte CXCL16-*Shedding* normalisiert (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Veränderung des *Sheddings* oder eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$; #### $p \leq 0,0001$). Die Überprüfung des erfolgreichen *Knockdowns* der *ANO6*-mRNA-Expression mittels *ANO6*-siRNA ist in Abbildung 17, A zu sehen.

4.6 Unter Ca^{2+} -Ionophor-Stimulation wird weniger TNFR1 von *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten als von *Ano6*^{+/-}-Osteoblasten freigesetzt

Der letzte Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit dem ADAM17-vermittelten TNFR1-*Sheddings* auf Osteoblasten von *Ano6*^{+/-}- und *Ano6*^{-/-}-Mausembryonen. Die Osteoblasten wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vortkamp der Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Biologie, zur Verfügung gestellt. Die Mausembryonen wurden am Embryonaltag 18,5 präpariert und genotypisiert. Die isolierten Osteoblasten wurden nach Kiel gesendet und hier weiter untersucht.

Die *Ano6*^{+/-}- und *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten von drei Geschwistertier-Paaren wurden in 12-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit den Inhibitoren MM, GI und GW vorinkubiert und an-

schließlich mit Ionomycin stimuliert (siehe Kapitel 3.2.5.3). Danach wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und für den *Mouse TNF RI/TNFRSF1A DuoSet ELISA* verwendet (siehe Kapitel 3.2.6.4).

Abbildung 19 zeigt das TNFR1-*Shedding* von *Ano6^{+/-}*- und *Ano6^{-/-}*-Osteoblasten. Die Ionomycin-Stimulation der *Ano6^{+/-}*-Osteoblasten steigerte das TNFR1-*Shedding* auf etwa das Doppelte des unstimulierten *Sheddings*. Das Ionomycin-stimulierte *Shedding* wurde nicht wesentlich durch GI inhibiert. Demnach beteiligte sich ADAM10 nicht maßgeblich am TNFR1-*Shedding*. GW und MM inhibierten die Ionomycin-Stimulation vollständig, weshalb ADAM17 hier als präferenzielle TNFR1-*Sheddase* anzusehen ist. Bei den Osteoblasten der *Ano6^{-/-}*-Mausembryonen ließ sich ein tendenzieller, aber statistisch nicht signifikanter, TNFR1-*Shedding*-Anstieg unter Ionomycin-Stimulation beobachten. Dieser *Shedding*-Anstieg war signifikant geringer als der *Shedding*-Anstieg der Ionomycin-stimulierten *Ano6^{+/-}*-Osteoblasten. Der tendenzielle *Shedding*-Anstieg der *Ano6^{-/-}*-Osteoblasten wurde mit GI nicht maßgeblich inhibiert. GW und MM inhibierten diesen vollständig.

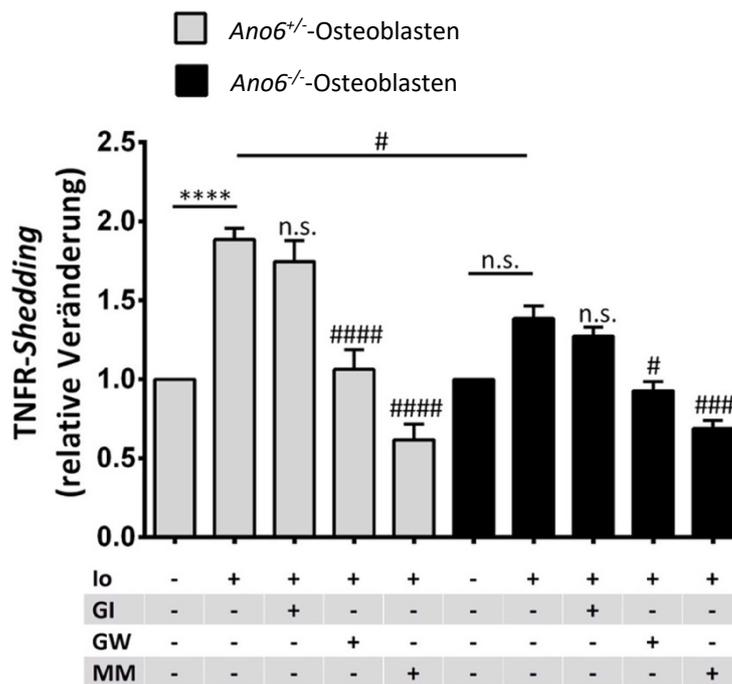


Abbildung 19: *Ano6^{-/-}*-Osteoblasten setzten unter Ionomycin-Stimulation weniger TNFR1 frei als *Ano6^{+/-}*-Osteoblasten

Ano6^{+/-}- und *Ano6^{-/-}*-Osteoblasten wurden mit 10 μ M MM, 3 μ M GI oder 3 μ M GW vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Ionomycin (Io) stimuliert. Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des TNFR1-*Sheddings* aus drei unabhängigen Versuchen und drei Geschwistertier-Paaren sind in der Abbildung dargestellt. Die Ergebnisse wurden auf das unstimulierte TNFR1-*Shedding* normalisiert (ANOVA, *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test*: Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des TNFR1-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Abnahme des TNFR1-*Sheddings* oder eine Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus, n.s. kennzeichnet eine nicht signifikante Zunahme des TNFR1-*Sheddings* oder eine nicht signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; ***/#### $p \leq 0,001$, ****/##### $p \leq 0,0001$).

5 Diskussion

In den beiden Monoschichten der Plasmamembran liegen die Phospholipide asymmetrisch verteilt vor. Diese Plasmamembranasymmetrie ist wichtig für die Regulation zellulärer Signalwege in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Die Aktivität von Phospholipid-Scramblasen führt zu einer Externalisierung von PS und damit zu einem Zusammenbruch der Asymmetrie der Plasmamembran. ANO6 ist eine der am umfassendsten erforschten Ca^{2+} -abhängigen Scramblasen. Für die Regulation der *Shedding*-Aktivität der Protease ADAM17 ist unter anderem die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Zusammensetzung der Plasmamembran von Relevanz. Hierbei ist insbesondere die PS-Externalisierung als finaler Schlüsselmechanismus für die ADAM17-*Shedding*-Aktivität beschrieben.

In dieser Arbeit wurde deshalb die Hypothese untersucht, dass ANO6 die ADAM17-*Shedding*-Aktivität bestimmt.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden verschiedene Ansätze gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass eine ANO6-Überexpression Ca^{2+} -Ionophor-abhängig eine PS-Externalisierung induzierte und mit einer gesteigerten Freisetzung von AREG und TGF- α einherging. Bei einer ANO6-Herunterregulation wurde der TNFR1 unter Ca^{2+} -Ionophor-Stimulation abgeschwächt prozessiert. Durch die Einbringung einer Ca^{2+} -hypersensitiven ANO6-Mutante wurden AREG und TGF- α ohne Stimulation stark erhöht freigesetzt. Final konnte nachgewiesen werden, dass von Osteoblasten von *Ano6*^{-/-}-Mausembryonen unter Ca^{2+} -Ionophor-Stimulation weniger endogen exprimierter TNFR1 als von Osteoblasten von *Ano6*^{+/-}-Mausembryonen abgespalten wurde. Durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren konnte die Beteiligung von verschiedenen ADAMs bestimmt werden.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit eine neue entscheidende Funktion von ANO6 zur Regulation des ADAM-*Shedding*-Prozesses dargelegt werden.

5.1 Eine ANO6-Überexpression führt unter Ionomycin-Stimulation zu einer gesteigerten PS-Externalisierung

PS findet sich hauptsächlich auf der intrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran. Unter bestimmten Bedingungen wird PS auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran transloziert (Leventis & Grinstein 2010). Der zugrunde liegende Mechanismus könnte eine verminderte Aktivität von Flippasen, welche den Erhalt der Membranasymmetrie sichern, oder die erhöhte Aktivität von Phospholipid-Scramblasen, wie ANO6, sein (Daleke 2003; Suzuki *et al.* 2010).

Das bekannteste Beispiel für die PS-Externalisierung ist das Signal zur Phagozytose im Rahmen der Apoptose (Martin *et al.* 1995). Aber auch für die Regulation der Blutgerinnung ist die PS-Externalisierung auf Thrombozyten wichtig (Lentz 2003). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass eine transiente PS-Externalisierung ein zentraler Schlüsselmechanismus zur ADAM17-*Shedding*-Aktivierung sein könnte (Sommer *et al.* 2016). Die *Shedding*-Aktivität wird durch verschiedene ADAM17-Stimulanzen, deren exakte Wirkungsmechanismen bisher nicht abschließend geklärt sind, moduliert. Einige Stimulanzen, wie Ionomycin oder Melittin, bewirken einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Liu & Hermann 1978; Liu *et al.* 2008).

Da sowohl eine PS-Externalisierung als auch die Ca^{2+} -Konzentration für die ADAM17-*Shedding*-Aktivität relevant sind, stellte sich die Frage, ob die Ca^{2+} -abhängige Scramblase ANO6 die ADAM17-*Shedding*-Aktivität bestimmt.

In der Literatur wurde bisher kontrovers über die vermutete Scramblase-Eigenschaft von ANO6 diskutiert. Daher sollte als Erstes durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden, ob ANO6 mit einer vermehrten PS-Externalisierung assoziiert ist.

In einer Studie von Yang und Kollegen konnte bei einer Überexpression von ANO6-Wildtyp oder der ANO6 D409G-Mutante in HEK293-Zellen keine Ca^{2+} -induzierte PS-Externalisierung gezeigt werden (Yang *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu beobachteten Yu und Kollegen in ANO6-Überexpressionsexperimenten ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-*Scrambling* (Yu *et al.* 2015). Dies wurde auch in dieser Arbeit durch *Annexin V*, *Alexa Fluor*[®] 568-Färbungen unter Stimulation mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin in ANO6-transfizierten Zellen bestätigt. Die Diskrepanzen zwischen den Beobachtungen von Yang und Kollegen und denen von Yu und Kollegen und dieser Arbeit lassen sich nicht durch Zelllinien spezifische Unterschiede erklären, da stets HEK-293-Zellen verwendet wurden. Es könnte allerdings der unterschiedliche Einsatz von Ca^{2+} -Ionophoren relevant sein. Yang und Kollegen verwendeten das Ca^{2+} -

Ionophor A23187 in einer Konzentration von 5 μM , wohingegen Yu und Kollegen eine A23187-Konzentration von 10 μM wählten. In dieser Arbeit genügten Konzentrationen von 0,5 μM Ionomycin. Zudem wurden unterschiedliche *Annexin V*-Markierungen verwendet. Yang und Kollegen verwendeten *FITC-conjugated Annexin V*, währenddessen von Yu und Kollegen und in dieser Arbeit *Annexin V, Alexa Fluor® 568* verwendet wurde. Diese Unterschiede in der Methodik liefern jedoch keine eindeutigen Hinweise, die die verschiedenen Beobachtungen erklären könnten.

Interessanterweise zeigten die Experimente von Yu und Kollegen, dass ein geringer Teil der ANO6-transfizierten Zellen unter Stimulation *Annexin V*-negativ waren und somit kein PS externalisierten. Dieses Phänomen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Hinsichtlich dessen ist zu bedenken, dass Zellen wahrscheinlich nicht synchronisiert PS externalisieren. Es lässt sich mutmaßen, dass die PS-Externalisierung oszillatorisch erfolgt, sodass manche Zellen zu einer Momentaufnahme wie in diesem Versuchsaufbau noch nicht *Annexin V*-positiv waren. Um diese Theorie zu verifizieren, wäre eine Beobachtung der ANO6-transfizierten Zellen über einen kontinuierlichen Zeitraum während der Ionomycin-Stimulation nötig. Als geeignete Methode könnte die *Live Cell Imaging*-Technologie unter Zuhilfenahme des PS-bindenden Farbstoffes *pSIVA™* genutzt werden. Da nur grün fluoreszierendes *pSIVA™* käuflich zu erwerben ist und ebenfalls die ANO6 eGFP-Plasmide grün fluoreszieren, wurden diese Experimente vorerst nicht durchgeführt. In einer Fortführung dieser Arbeit könnte das ANO6 eGFP-Plasmid mit einer anders farbigen fluoreszierenden Markierung versehen werden, sodass die Verwendung des grün fluoreszierenden *pSIVA™* möglich wäre.

Ein weiterer interessanter Aspekt in Hinblick auf die Fluoreszenzmikroskopie-Bilder ist, dass sowohl in der Arbeit von Yu und Kollegen als auch in dieser Arbeit innerhalb einzelner Zellen häufig, aber nicht immer, eine Kollokalisierung von ANO6 eGFP und *Annexin V*-positivem PS zu verzeichnen ist. Hier könnte gemutmaßt werden, dass ein Stimulations-Schwellenwert vorliegt. Beim Erreichen dieses Schwellenwertes könnte eine generalisierte PS-Externalisierung erfolgen.

Ergänzend zu der *Annexin V, Alexa Fluor® 568*-Markierung für Ionomycin-stimuliertes PS-*Scrambling* wäre für diese Arbeit ein selbiges Vorgehen für Melittin-stimulierte HEK-293-Zellen von Interesse. Eine PS-Externalisierung durch eine Melittin-Stimulation wurde in HaCaT-Zellen mit einer PS-Anfärbung durch *pSIVA™* im *Live Cell Imaging* bereits gezeigt

(Sommer *et al.* 2016). Gemäß dem gesteigerten Melittin-induzierten ADAM17-Substrat-*Shedding* in ANO6-transfizierten Zellen (siehe Kapitel 4.3.2) wäre eine verstärkte PS-Anfärbung durch *Annexin V, Alexa Fluor® 568* unter Melittin-Stimulation zu erwarten.

Da in dem Kapitel 4.3.3 ebenfalls der PKC-Aktivatoren PMA als ADAM17-Stimulus verwendet wurde, wäre auch für PMA-stimulierte ANO6-transfizierte Zellen eine *Annexin V, Alexa Fluor® 568*-Färbung interessant. Ein starker intrazellulärer Ca^{2+} -Einfluss ist für die Aktivierung von ANO6 nötig (Suzuki *et al.* 2010). Folglich wäre unter PMA-Stimulation keine vermehrte PS-Externalisierung zu erwarten. Im Gegensatz zu dieser Überlegung haben Sommer und Kollegen beobachtet, dass HaCaT-Zellen unter PMA-Stimulation PS externalisierten. Im Verhältnis zu der Ionomycin- und Melittin-Stimulation wurde jedoch in der Summe weniger und punktförmiger PS externalisiert (Sommer *et al.* 2016). Daher kann vermutet werden, dass für die ADAM17-*Shedding*-Aktivierung ein Ca^{2+} -abhängiger Signalweg mit einer Aktivierung von ANO6 und einer PS-Externalisierung existiert. Aufgrund der geringeren und anders ausgeprägten PS-Externalisierung durch PMA könnte ein zweiter Ca^{2+} - und ANO6-unabhängiger Signalweg zur Regulation der ADAM17-*Shedding*-Aktivität existieren. Dies wird im Kapitel 5.2 umfassender diskutiert.

Hinsichtlich der Interpretation der Beobachtungen aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist zu beachten, dass letztlich nicht gesagt werden kann, dass ANO6 selbst PS externalisiert. Es kann lediglich festgehalten werden, dass ANO6 mit einer PS-Externalisierung assoziiert ist. In der Literatur wurde beschrieben, dass ANO6 selbst eventuell keine Scramblase ist, aber sekundär eine Scramblase regulieren könnte. Yang und Kollegen mutmaßten, dass ANO6 als Ca^{2+} -Kanal fungiert. Der Ca^{2+} -Einstrom könnte sekundär eine bisher unbekannte Scramblase aktivieren (Yang *et al.* 2012). Allerdings würde dies bedeuten, dass auch ein ANO6-unabhängiger Ca^{2+} -Einstrom die unbekannte Scramblase induzieren könnte. Dies steht im Widerspruch zu den *Annexin V*-Färbungen dieser Arbeit. Würde die Vermutung von Yang und Kollegen zutreffen, hätte der Ca^{2+} -Einstrom durch Ionomycin auch in den Kontroll-transfizierten Zellen zu einer verstärkten PS-Externalisierung führen müssen. Viele weitere Studien zeigten, dass ANO6 selbst eine Phospholipid-Scramblase ist (Gyobu *et al.* 2017; Suzuki *et al.* 2010; Yu *et al.* 2015). Dafür spricht unter anderem, dass Patienten mit einem Scott-Syndrom, bei dem eine Mutation in ANO6 vorliegt, eine Beeinträchtigung bei der PS-Externalisierung auf Thrombozyten aufweisen. Das Scott-Syndrom ist durch eine erhöhte Blutungsneigung gekennzeichnet (Castoldi *et al.* 2011;

Suzuki *et al.* 2010; Weiss & Lages 1997; Zwaal *et al.* 2004). Auch die Identifikation der potenziellen *Scrambling*-Domäne von ANO6 stützt die Annahme, dass ANO6 selbst eine Scramblase ist (Yu *et al.* 2015).

Für die Fragestellung dieser Arbeit ist die Klärung, ob ANO6 selbst oder sekundär PS externalisiert, jedoch nicht zwingend relevant. Der Nachweis, dass ANO6 mit einer PS-Externalisierung assoziiert ist, ist vorerst ausreichend für die weiteren Untersuchungen.

5.2 Eine ANO6-Überexpression korreliert unter Ionomycin- und Melittin-Stimulation mit einem gesteigerten ADAM17-Substrat-*Shedding*

Die Untersuchungen von Sommer und Kollegen wiesen auf eine PS-abhängige ADAM17-*Shedding*-Aktivierung hin (Sommer *et al.* 2016). Da in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eine ANO6-Überexpression mit einer verstärkten PS-Externalisierung korrelierte, ließ sich die Vermutung aufstellen, dass ebenfalls die *Shedding*-Aktivität zunehmen würde. Dies wurde in dieser Arbeit durch Untersuchungen mittels AP-Assays unter Verwendung der ADAM17-Substrate AREG-AP und TGF- α -AP in ANO6- bzw. Kontroll-transfizierten HEK-293-Zellen untersucht.

Hierbei wurde durch die Verwendung von den präferenziellen ADAM-Inhibitoren GI (ADAM10) und GW (ADAM10 und -17) gezeigt, dass in den Kontroll-transfizierten Zellen das Ionomycin- und Melittin-induzierte *Shedding* von AREG und TGF- α hauptsächlich auf ADAM17 zurückzuführen war. Auch in der Literatur wurde ADAM17 als präferenzielle AREG- und TGF- α -*Sheddase* beschrieben (Peschon *et al.* 1998; Sahin *et al.* 2004; Sunnarborg *et al.* 2002).

Bei den ANO6-transfizierten Zellen ließen sich hingegen zwei bemerkenswerte Beobachtungen machen. Erstens resultierte eine ANO6-Überexpression unter Ionomycin-Stimulation im Vergleich zu dessen Kontrolle in der Tat in einem immensen Anstieg des *Sheddings* der ADAM17-zugeschriebenen Substrate AREG und TGF- α . Dies konnte bei der Stimulation mit Melittin anstelle von Ionomycin analog beobachtet werden. Diese Beobachtungen sprechen für die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass ANO6 die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 bestimmt. Zweitens erfolgte das Ionomycin-stimulierte AREG-*Shedding* in den ANO6-überexprimierenden HEK-293-Zellen nicht nur durch ADAM17, sondern zu etwa gleichen Anteilen durch ADAM10 und -17. Beim Ionomycin-stimulierten TGF- α -*Shedding* in den ANO6-überexprimierenden HEK-293-Zellen konnte ein Teil des *Sheddings* auf ADAM10 zu-

rückgeführt werden. Da GW hier das Ionomycin-stimulierte *Shedding* nicht weiter inhibierte, war ADAM17 an diesem *Shedding* überraschenderweise nicht beteiligt. MM inhibierte das Ionomycin-stimulierte TGF- α -*Shedding* vollständig, sodass hier vermutlich bisher nicht näher identifizierte Metalloproteasen beteiligt waren. Auch beim Melittin-induzierten AREG und TGF- α -*Shedding* konnte bei den ANO6-überexprimierenden Zellen neben ADAM17 auch ADAM10 und erneut bisher nicht näher identifizierte Metalloproteasen als beteiligte *Sheddases* ausgemacht werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei einer zusätzlichen PS-Externalisierung durch eine ANO6-Überexpression und folglich verstärktem *Shedding* weitere Metalloproteasen involviert waren. In weiterführenden Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Karina Reiß wurde neben den Inhibitoren GI und GW auch der ADAM17-spezifische Inhibitor D1 verwendet. Durch diesen konnte bestätigt werden, dass sowohl ADAM17 als auch andere Proteasen am *Shedding* in ANO6-überexprimierenden Zellen involviert waren (Veit *et al.* 2018).

In der Literatur werden die meisten Substrate einer definierten Protease zugeordnet (Reiss & Saftig 2009). Es gibt aber auch einige Beispiele, bei denen das für eine Protease spezifische Substrat unter bestimmten Bedingungen von anderen Proteasen abgespalten werden kann. Beispielsweise schneidet ADAM10 verschiedene ADAM17-Substrate, wie unter anderem TGF- α , in *Adam17*^{-/-}-Zellen (Le Gall *et al.* 2009). Zudem beteiligt sich ADAM10 im Chemokin-stimulierten AREG-*Shedding* in Prostataepithel-Zellen, wohingegen beim PMA-stimulierten AREG-*Shedding* in Fibroblasten von Mausembryonen ADAM17 hauptbeteiligt ist (Kasina *et al.* 2009; Sahin *et al.* 2004). Allgemein konnte auch für andere ADAM17-Substrate beobachtet werden, dass unter bestimmten Bedingungen andere ADAMs, beispielsweise ADAM9, -10 und -12, an deren *Shedding* beteiligt sind (Asakura *et al.* 2002; Izumi *et al.* 1998; Lemjabbar & Basbaum 2002). Die Beobachtungen dieser Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass die Substrate nicht streng einer Protease zugeordnet werden können.

Es ergibt sich aus den Experimenten dieser Arbeit die essenzielle Frage, warum im Gegensatz zu den Kontroll-transfizierten Zellen bei einer ANO6-Überexpression verschiedene zusätzliche Metalloproteasen neben ADAM17 beteiligt waren.

Es kann gemutmaßt werden, dass die Lokalisationen von ANO6, der Protease und dem Substrat in der Plasmamembran eine wichtige Rolle spielen könnten. Findet sich ADAM10 oder eine andere Metalloprotease, aber nicht ADAM17, in räumlicher Nähe zu ANO6 und einem potenziellen ADAM17-Substrat, könnte ADAM10 oder eine andere Metalloprotease das

Shedding des ADAM17-Substrates analog wie in den *Adam17*^{-/-}-Zellen in der Studie von Le Gall und Kollegen übernehmen (Le Gall *et al.* 2009). Um diese Theorie zu untersuchen, könnten Oberflächenmolekülmarker für PS, ADAM10 und -17 und deren Substrate und ANO6 eingesetzt werden. In Hinblick auf dieses Modell wäre denkbar, dass das *Shedding* durch ADAM10 und die anderen beteiligten Proteasen ebenfalls durch eine PS-Externalisierung initiiert würde. Eine Studie von Bleibaum und Kollegen zeigte ein PS-induziertes gesteigertes ADAM10-Substrat-*Shedding* und unterstützt daher die Hypothese, dass eine PS-Externalisierung durch ANO6 auch die ADAM10-*Shedding*-Aktivität steigern könnte (Bleibaum *et al.* 2019). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die PS-Externalisierung ein ubiquitäres Signal zur *Shedding*-Aktivierung von Metalloproteasen sein könnte. Bei dieser Überlegung bleibt jedoch die Frage ungeklärt, warum sich unter ANO6-Überexpressionsbedingungen andere Proteasen räumlich näher zum ADAM17-Substrat als bei den Kontrollbindungen befinden könnten.

Als erste Antwort auf diese Frage könnte vermutet werden, dass bei einer ANO6-Überexpression immens viel ANO6 exprimiert wird und ANO6 sich daher auch an anderen Lokalisationen wie unter physiologischen Bedingungen befindet. Daher könnte ANO6 auch dichter an anderen Proteasen als ADAM17 exprimiert werden und könnte diese eventuell über eine PS-Externalisierung aktivieren.

Reiß und Bhakdi lieferten eine weitere mögliche Erklärung. Es wird vermutet, dass ADAMs an zuvor festgelegten Positionen in Nanodomänen der Plasmamembran, welche reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind, lokalisiert sind und von dort bei Bedarf ihre zugehörigen Substrate freisetzen könnten. Demnach würde die primäre Substratspezifität beim konstitutiven *Shedding* von der ursprünglichen Kolokalisation der Protease und ihrem Substrat abhängen (Reiß & Bhakdi 2017). Bei der Stimulation von Zellen verändert sich auch die Struktur der Plasmamembran. Bei der schnellen ADAM17-*Shedding* Aktivierung wird PS externalisiert (Sommer *et al.* 2016), sodass ein Zusammenbruch der Asymmetrie der Plasmamembran resultiert. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit lassen auf eine entscheidende Rolle der Scramblase ANO6 für die PS-Externalisierung und nachfolgende Steigerung des *Sheddings* schließen. Scramblasen externalisieren jedoch nicht nur PS, sondern translozieren unspezifisch und ATP-unabhängig Phospholipide bidirektional (Daleke & Lyles 2000). Zellen mit der konstitutiv aktiven ANO6-Mutante D409G externalisieren zum einen PS und PE und internalisieren zum anderen PC und SM (Suzuki *et al.* 2013b, 2010). Reiß und Bhakdi vermu-

teten, dass das internalisierte SM durch neutrale Sphingomyelinasen (SMasen) prozessiert werden könnte (Reiss & Bhakdi 2017). Dabei entstünden Ceramide und Phosphatidylcholin (Chatterjee 1999). Es wurde beschrieben, dass eine erhöhte Aktivität der neutralen SMase und eine Ceramid-Bildung mit einem erhöhten *Shedding* des ADAM17-Substrates L-Selektin assoziiert sind (Walev *et al.* 2000). Es ist daher denkbar, dass auch andere ADAM-Substrate bei einer erhöhten SMase-Aktivität vermehrt freigesetzt werden könnten. Dies sollte für die in dieser Arbeit verwendeten Substrate überprüft werden. Ursächlich für ein erhöhtes *Shedding* durch Ceramide könnte eine Veränderung der Struktur der Nanodomänen sein (Reiss & Bhakdi 2017). Ein erhöhter Ceramid-Anteil ist mit einem geringeren Cholesterin-Anteil in der Plasmamembran assoziiert (Yu *et al.* 2005). Bei einer Reduzierung des Cholesterin-Anteils in der Plasmamembran wurde ein gesteigertes ADAM-Substrat-*Shedding* beobachtet (Tellier *et al.* 2006). Somit könnten die neuen Ceramid-reichen Nanodomänen die Grundlage für eine verstärkte Interaktion von Protease und Substrat bilden. Zudem wäre es denkbar, dass die Protease bei Notwendigkeit auch in den Nanodomänen anderer ADAMs Substrate freisetzen könnte (Reiss & Bhakdi 2017). In Hinblick auf diese Arbeit könnte dies eine Ursache sein, weshalb bei den ANO6-überexprimierenden Zellen verschiedene Metalloproteasen neben ADAM17 am *Shedding* beteiligt waren. Zudem wurde beschrieben, dass eine Aktivierung der SMase und die folgende Ceramid-Bildung selbst ein Lipid-*Scrambling* mit PS-Externalisierung initiieren könnte (Lang *et al.* 2008). Dadurch könnten weitere PS-induzierte Proteasen involviert werden und vermehrt Substrat freigesetzt werden. Ceramide könnten folglich über verschiedene Signalwege das *Shedding* modulieren (Reiss & Bhakdi 2017). Zusammenfassend vermuten Reiß und Bhakdi, dass eine horizontale und vertikale Dynamik in der Plasmamembran, bei der Scramblasen, Cholesterin und Ceramide involviert sind, wichtig für die Regulation des *Sheddings* sind. Insbesondere die Bildung von neuen Nanodomänen mit erhöhter Membranfluidität könnte die Interaktion von Protease und Substrat fördern (Reiss & Bhakdi 2017).

Gegen dieses Modell von Reiß und Bhakdi ließe sich einwenden, dass beispielsweise während der Entwicklung von Mäusen, insbesondere im Hinblick auf die EGFR-Aktivierung, der Verlust von ADAM17 nicht durch andere Proteasen kompensiert werden kann (Jackson *et al.* 2003; Peschon *et al.* 1998; Sternlicht *et al.* 2006). Mäuse mit einer homozygoten Mutation in *Adam17*, welche die Metalloprotease-Aktivität inaktiviert, sterben prä- oder postnatal (Peschon *et al.* 1998). Die Situation im Menschen ließe sich hingegen mit den Überlegungen

von Reiß und Bhakdi in Einklang bringen. Menschen mit einer homozygoten Mutation in *ADAM17*, die unter anderem zu einem Verlust der katalytischen Domäne führt, waren zunächst lebensfähig. Eine der beiden von Blaydon und Kollegen beschriebenen Patienten verstarb jedoch mit zwölf Jahren an einer Myokarditis. Beide Patienten litten unter entzündlichen Hauterkrankungen und Diarrhö (Blaydon *et al.* 2011). Eine weitere Patientin mit einem Verlust von *ADAM17* durch eine *Frameshift*-Mutation hatte ebenfalls Hautveränderungen und Diarrhö und starb mit zehn Monaten an einer Hypoxie nach einer *Respiratory Syncytial Virus*-Infektion (Bandsma *et al.* 2015). Da alle Patienten zunächst lebten, kann vermutet werden, dass ein *ADAM17*-Verlust im Menschen im Gegensatz zur Maus teilkompensiert wird. Hierbei könnten andere Metalloproteasen beteiligt sein. Das spricht dafür, dass im Menschen die Substrate, die normalerweise von *ADAM17* freigesetzt werden, eventuell auch von anderen Proteasen prozessiert werden könnten.

Es bleibt allerdings weiterhin unbeantwortet, welche Proteasen in dieser Arbeit neben *ADAM10* und *-17* am *Shedding*, insbesondere beim *TGF- α -Shedding*, in den *ANO6*-überexprimierenden Zellen beteiligt gewesen sein könnten. Da MM das Ionomycin bzw. Melittin-induzierte *TGF- α -Shedding* vollständig inhibierte, müssen die involvierten Proteasen Matrix-Metalloproteasen gewesen sein. Andere Mitglieder der *ADAM*-Familie besitzen ebenfalls eine proteolytische Aktivität und könnten demnach als *TGF- α -Sheddases* in Betracht gezogen werden. Demnach könnten *ADAMDEC-1*, *ADAM8*, *-9*, *-10*, *-12*, *-15*, *-17*, *-19*, *-20*, *-21*, *-28*, *-30* und *-33*, involviert sein (Edwards *et al.* 2009). Um diese Frage genauer zu untersuchen, könnten spezifische Inhibitoren oder die Verwendung von *Knockout*-Zelllinien für bestimmte Proteasen hilfreich sein.

Als weiterer klassischer *ADAM17*-Stimulus wurde in dieser Arbeit PMA verwendet. PMA wirkt als Aktivator der Proteinkinase C (Horiuchi *et al.* 2007b; Le Gall *et al.* 2010, 2009). Das *AREG-Shedding* stieg unter PMA-Stimulation sowohl in den Kontroll-transfizierten Zellen als auch in den *ANO6*-transfizierten Zellen auf etwa das Vierfache des unstimulierten Ausgangswertes. Somit führte die *ANO6*-Überexpression zu keiner stärkeren Erhöhung des PMA-stimulierten *Sheddings* als in der Kontrolle. Folglich war das PMA-induzierte *Shedding* *ANO6*-unabhängig. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass hier eher eine Proteinkinase C-Aktivierung als eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Ursache für das gesteigerte PMA-stimulierte *Shedding* war. Da jedoch auch bei einer PMA-

Stimulation dezent PS externalisiert wird (Sommer *et al.* 2016), kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise andere Ca^{2+} -unabhängige Scramblasen bei diesem *Shedding* beteiligt gewesen sein könnten. Da bisher erst wenige Scramblasen identifiziert wurden, können keine Vermutungen für die hier möglicherweise beteiligten Scramblasen aufgestellt werden. Die Verwendung von Ca^{2+} -Chelatoren wie EGTA könnte zur Überprüfung des Ca^{2+} -abhängigen Signalweges in fortführenden Experimenten zur Anwendung kommen.

Um die hier untersuchten Auswirkungen von ANO6 auf das *Shedding* genauer zu ergründen, wäre die Verwendung von physiologischen Stimulanzen ebenfalls von großem Interesse. In Fortführung von dieser Arbeit wurde deshalb ATP als ADAM-Stimulus verwendet. Die Beobachtung dieser Arbeit, dass ANO6-überexprimierende Zellen unter Stimulation massiv ADAM17-Substrate freisetzen, konnte auch mit ATP als Stimulus bestätigt werden (Veit *et al.* 2018).

In dieser Arbeit wurde bisher nur die vermehrte Substratfreisetzung durch eine erhöhte *Shedding*-Aktivität diskutiert. Von der *Shedding*-Aktivität sollte die katalytische Aktivität der Protease abgegrenzt werden (Grötzinger *et al.* 2017). Die *Shedding*-Aktivität beschreibt die Freisetzung von Membran-gebundenen Substraten durch ADAMs. Die katalytische Aktivität einer Protease ist hingegen ein Maß für die Wirksamkeit eines Enzyms, die dadurch definiert ist, wie viel Substrat in einer bestimmten Zeit umgesetzt wird. Einige Wissenschaftler beschrieben, dass bei einer PMA-Stimulation durch eine erhöhte katalytische Aktivität die Substratumsetzung gesteigert wird (Wu *et al.* 2015). Da in dieser Arbeit nur die *Shedding*-Aktivität untersucht wurde, müsste ein Nachweis erbracht werden, dass die vorgenommenen Modifikationen, wie Transfektionen, die katalytische Aktivität der Protease nicht beeinflussen. Die Methode der Wahl wäre ein Peptid-Substrat-Assay. Beim Peptid-Substrat-Assay wird ein lösliches Substrat mit einer assoziierten Fluoreszenz zur Protease gegeben. Spaltet die Protease das Substrat, kann der Fluoreszenz-Farbstoff angeregt werden und die Fluoreszenz gemessen werden. Wenn die vorgenommenen Modifikationen keine Veränderungen der detektierten Emissionen im Peptid-Substrat-Assay aufzeigen würden, könnte eine veränderte katalytische Aktivität ausgeschlossen werden.

5.3 Eine ANO6 D408G-Überexpression induziert eine maximale Zunahme des konstitutiven ADAM17-Substrat-*Sheddings*

Die ANO6-Mutante wurde als murine D409G-Mutante erstmalig von Suzuki und Kollegen beschrieben und wurde für diese Arbeit von Prof. Dr. Kunzelmann der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Die ANO6 D409G-Mutante externalisiert bei normalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen PS (Suzuki *et al.* 2010). Die humane Mutante hat den Austausch der kritischen Aminosäure an Position 408, weshalb es sich in dieser Arbeit um eine ANO6 D408G-Mutante handelt. Der Vorteil dieser Mutante bestand darin, dass keine Stimulanzen benötigt wurden.

Das Einbringen der ANO6 D408G-Mutante in HEK-293-Zellen induzierte ein massiv erhöhtes konstitutives *Shedding* der transfizierten Substrate AREG und TGF- α . Das konstitutive *Shedding* in den ANO6 D408G-transfizierten Zellen erreichte bereits nach 30 min ein Ausmaß, wie es bei der Stimulation mit den klassischen ADAM17-Stimulanzen, beispielsweise Ionomycin oder PMA, festzustellen ist. Anhand der Inhibitorexperimente konnte eine große Beteiligung von ADAM17 am *Shedding* ausgemacht werden. Interessanterweise beteiligte sich erneut ADAM10 tendenziell, wenn auch nicht signifikant, am TGF- α -*Shedding*. Die möglichen Ursachen dafür werden in Kapitel 5.2 diskutiert.

Eine dauerhafte PS-Externalisierung wird häufig als Phagozytose-Signal während der Apoptose gesehen (Martin *et al.* 1995). Obwohl die D409G-Mutante konstitutiv PS externalisiert, waren die von Suzuki und Kollegen verwendeten Ba/F3-Zellen lebensfähig (Suzuki *et al.* 2010). Auch die hier verwendeten D408G-transfizierten HEK-293-Zellen wiesen keinen lichtmikroskopisch beurteilbaren Unterschied im Vergleich zu deren Kontrollen auf. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass während der Apoptose vornehmlich die Caspase-abhängige Scramblase Xkr8 und nicht ANO6 den PS-Flip vermittelt (Suzuki *et al.* 2013a)

In der Literatur wurde die vermehrte PS-Externalisierung in den ANO6 D409G-transfizierten Zellen mittels *Annexin V*-Färbung bereits gezeigt (Scudieri *et al.* 2015). Der Nachweis einer konstitutiven PS-Externalisierung der D408G-transfizierten Zellen erwies sich in dieser Arbeit als schwierig. Eine immunzytochemische Färbung mit *Annexin V*, *Alexa Fluor*[®] 568 zur Anfärbung von PS und einer Anti-His-Färbung zur Markierung von ANO6 in ANO6 D408G-transfizierten Zellen wäre dafür von Nöten gewesen. Bedauerlicherweise erwies sich der verwendete His-Antikörper als unspezifisch, sodass vorerst keine Färbung erfolgen konnte.

Da kein Anti-His-Antikörper verfügbar war, konnte zudem derzeit keine Expressionskontrolle der ANO6 D408G-Mutante im *Western Blot* erfolgen.

In den Experimenten von Scudieri und Kollegen konnten bei Einbringung der D409G-Mutante in Zellen neben einem gesteigerten PS-*Scrambling* auch Ionenströme festgestellt werden (Scudieri *et al.* 2015). Daher wäre es prinzipiell denkbar, dass neben der PS-Externalisierung auch Ionenströme durch ANO6 an der Regulation des *Sheddings* beteiligt sein könnten. Für ANO6 wurden verschiedene Ionenkanalfunktionen diskutiert: beispielsweise als Ca²⁺-abhängiger Cl⁻-Kanal, als Volumen-regulierter Cl⁻-Kanal oder als Kationen-Kanal (Almaça *et al.* 2009; Shimizu *et al.* 2013; Szteyn *et al.* 2012; Yang *et al.* 2012). In anderen Studien konnten im Vergleich zu ANO1 und -2 für ANO6 jedoch nur sehr geringe oder keine Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanal-Aktivitäten festgestellt werden (Duran *et al.* 2012; Schreiber *et al.* 2010; Suzuki *et al.* 2013b; Suzuki, T. *et al.* 2014). Möglicherweise könnten die Ionenströme auch nur unspezifisch an der Phospholipid-Scramblase-Seite erfolgen (Yu *et al.* 2015). Folglich sind Einflüsse der Ionenströme auf die ADAM17-*Shedding*-Aktivität nicht ausgeschlossen, aber dennoch sehr unwahrscheinlich. Ein finaler Beweis, dass die Ionenströme keinen Einfluss auf die *Shedding*-Aktivierung haben, könnte allenfalls durch einen Ionenkanal-Inhibitor erbracht werden. Würde die Hypothese, dass die Ionen entlang der Phospholipid-Scramblase-Seite strömen (Yu *et al.* 2015), angenommen, wäre die Verwendung von einem Ionenkanal-Inhibitor jedoch nutzlos. In einer Weiterführung dieser Arbeit untersuchte daher die Arbeitsgruppe von Prof. Reiß detaillierter, ob tatsächlich das durch ANO6 externalisierte PS das *Shedding* von ADAM-Substraten maßgeblich beeinflusste. Unter der Annahme, dass die löslichen PS-Kopfgruppe oder Lactadherin, ein PS-bindendes Protein, die Interaktion der Protease mit dem membranständigen PS und somit auch des *Sheddings* beeinträchtigt, wurde der Einfluss dieser beiden Substanzen auf das stimulierte *Shedding* bestimmt. Unter Applikation beider Substanzen zeigte sich eine Reduktion des stimulierten *Sheddings* (Veit *et al.* 2018). Somit konnte die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass ANO6 PS-abhängig die *Shedding*-Aktivität bestimmt, weiter gefestigt werden.

5.4 Eine Herunterregulation von endogenem ANO6 mittels ANO6-siRNA korreliert unter Ionomycin-Stimulation mit einem verminderten ADAM17-Substrat-*Shedding*

Die bisher erhobenen Daten deuten auf eine große funktionelle Relevanz von ANO6 bezüglich der Regulation der ADAM-*Shedding*-Aktivität hin. Bei der Analyse dieser Daten muss hervorgehoben werden, dass Überexpressionsexperimente ein sehr artifizielles Modell darstellen, weshalb die Herunterregulation von endogenem Protein detailliertere Hinweise auf die physiologischen Funktionen liefern. Daher wurden Experimente mit ANO6-siRNA durchgeführt. Ein zweiter zu bedenkender Aspekt der Überexpressionsexperimente stellte das verwendete Zellsystem dar. HEK-293-Zellen verfügen über eine hohe Transfektionseffizienz, weshalb diese auch für die Überexpressionsexperimente ausgewählt wurden. Allerdings können immortalisierte Zelllinien Veränderungen erwerben, sodass diese Zelllinien ein weniger physiologisches System als Primärkulturen darstellen. Vor diesem Hintergrund wurden für die siRNA-Experimente als primäre Zellen HUVECs verwendet. HUVECs exprimieren den TNFR1, ein ADAM17-Substrat. Durch diesen Versuchsaufbau konnte endogenes ANO6 und endogenes ADAM17-Substrat untersucht werden.

Der mRNA-*Knockdown* mittels ANO6-siRNA betrug 78 %. Folglich betrug die verbleibende ANO6-Restexpression etwa 22 %.

Zur funktionellen Untersuchung der ADAM17-*Shedding*-Aktivität wurde als ADAM17-Substrat der TNFR1 gewählt. Dieser wird auf fast allen Zellen des menschlichen Körpers mit Ausnahme von Erythrozyten exprimiert (Tracey *et al.* 2008). Der TNFR1 ist ein Rezeptor des Signalproteins TNF- α , welches in vielzähligen Prozessen des Körpers, wie Entzündungsprozessen, Zellproliferation und -differenzierung und der Apoptose, involviert ist (Baud & Karin 2001). Wird die Ektodomäne des TNFR1 durch Proteasen abgespalten, werden die Zellen gegenüber seinem Liganden TNF- α desensibilisiert, sodass die entzündliche Antwort gemindert wird (Peschon *et al.* 1998; Reddy *et al.* 2000).

Die ANO6-siRNA-transfizierten HUVECs ließen in Relation zu der Kontrolle *Lo GC* ein reduziertes Ionomycin-induziertes TNFR1-*Shedding* erkennen. Durch die Verwendung der präferenziellen ADAM-Inhibitoren GI und GW konnte auf ein maßgeblich ADAM17-vermitteltes *Shedding* geschlossen werden. Diese Beobachtungen bestätigten die funktionelle Relevanz von ANO6 für die Regulation der ADAM17-*Shedding*-Aktivität.

Hervorzuheben ist, dass obwohl die *ANO6*-siRNA-transfizierten HUVECs im Vergleich zu der Kontrolle *Lo GC* unter Ionomycin-Stimulation weniger TNFR1 freisetzten, auch das *Shedding* der *ANO6*-siRNA-transfizierten Zellen unter Ionomycin-Stimulation tendenziell anstieg. Bei einem vollständigen *ANO6-Knockdown* wäre kein Anstieg des *Sheddings* unter Ionomycin-Stimulation in den *ANO6*-siRNA-transfizierten Zellen zu erwarten gewesen. Da der mRNA-*Knockdown* jedoch nur 78 % betrug, ist davon auszugehen, dass durch den unvollständigen *Knockdown* weiterhin ein geringer Anteil an *ANO6* exprimiert werden konnte. Folglich könnte die *ANO6*-Herunterregulation teilkompensiert worden sein. *ANO6* wird ubiquitär exprimiert und hat eine bedeutende physiologische Relevanz, beispielsweise in der Blutgerinnung oder bei der Knochenmineralisation (Castoldi *et al.* 2011; Ehlen *et al.* 2013; Suzuki *et al.* 2010; Weiss & Lages 1997; Zwaal *et al.* 2004). Daher kann gemutmaßt werden, dass zudem andere Phospholipid-Scramblasen die Auswirkungen eines *ANO6-Knockdowns* teilkompensieren könnten. Die Teilkompensation könnte durch andere Anoctamin-Familienmitglieder, für die ein Phospholipid-*Scrambling* beschrieben wurde, erfolgen. Studien an *ANO6*^{-/-}-Zellen weisen auf eine Scramblase-Funktion mit unterschiedlicher Lipid-Präferenz von *ANO3*, *ANO4*, *ANO7* und *ANO9* hin (Suzuki *et al.* 2013b). Auch *ANO5* und *ANO10*, die intrazellulär lokalisiert sind, sind vermutlich Scramblasen (Gyobu *et al.* 2017, 2016). Aufgrund der Lokalisation ist eine Teilkompensation durch diese aber nicht anzunehmen.

Zusätzlich zu den funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit mittels ELISAs würde eine Mikroskopie der Zellen mit einer PS-Markierung durch *Annexin V* und einer *ANO6*-Anfärbung interessant sein. Es wäre eine verminderte PS-Externalisierung der *ANO6*-siRNA-transfizierten Zellen zu erwarten. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen *ANO6*-Antikörpers (siehe Kapitel 4.2) konnte diese Mikroskopie nicht durchgeführt werden. Bisher zeigten Scudieri und Kollegen eine PS-Markierung durch eine *Annexin V*-Färbung ohne eine gleichzeitige *ANO6*-Anfärbung von *ANO6*-siRNA- und Kontroll-transfizierten HEK-293-Zellen. Die *ANO6*-siRNA-transfizierten Zellen waren weniger *Annexin V*-positiv als deren Kontrolle (Scudieri *et al.* 2015). Ein weiterer Ansatzpunkt, um ein vermindertes PS-*Scrambling* in *ANO6*-siRNA-transfizierten Zellen zu illustrieren, könnte die Verwendung von fluoreszierender siRNA kombiniert mit einer *Annexin V*-Färbung sein.

Neben dem TNFR1 wurde als zweites Substrat CXCL16 untersucht. Dafür wurden dieselben *ANO6*-siRNA- bzw. Kontroll-transfizierten Zellkulturüberstände verwendet.

Hierbei zeigte sich überraschenderweise kein reduziertes CXCL16-*Shedding* in den Ionomycin-stimulierten ANO6-siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu deren Kontrolle. Als *Sheddase* wurde sowohl in den ANO6-siRNA-transfizierten Zellen als auch in den Kontroll-transfizierten Zellen ADAM10 ausgemacht. In der Literatur wurde ADAM10 für das konstitutive *Shedding* ebenfalls als Haupt-*Sheddase* beschrieben (Gough *et al.* 2004; Ludwig *et al.* 2005). Beim PMA-stimulierte CXCL16-*Shedding* ist auch ADAM17 maßgeblich involviert (Ludwig *et al.* 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass ADAM17 beim Ionomycin-stimulierten *Shedding* nicht beteiligt war.

Es können unterschiedliche Ursachen dafür zugrunde liegen, dass in den Ionomycin-stimulierten ANO6-siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu deren Kontrolle kein reduziertes CXCL16-*Shedding* vorlag.

Primär muss erwähnt werden, dass das CXCL16-*Shedding* in absoluten Messwerten sehr gering war (nicht abgebildet). Die gemessenen Konzentrationen erreichten unter Stimulation Maximalwerte von 40 pg/ml. Der höchste Standard betrug 1000 pg/ml. Zudem ist hervorzuheben, dass sowohl in der Kontrolle als auch in den ANO6-siRNA-transfizierten HUVECs das *Shedding* unter Ionomycin-Stimulation nur sehr gering anstieg, was im Vergleich zu den anderen Experimenten mit Ionomycin-Stimulation in dieser Arbeit untypisch ist. Folglich sind die Ergebnisse bezüglich der *Shedding*-Aktivität nur bedingt aussagekräftig.

Zudem muss bedacht werden, dass in diesem Fall nur ADAM10 und nicht ADAM17 am *Shedding* beteiligt war. Obwohl in dieser Arbeit einige Beobachtungen auf ein ANO6-induziertes ADAM10-*Shedding* deuten und eine weitere Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reiß von einer PS-induzierten ADAM10-*Shedding*-Aktivierung ausgeht (Bleibaum *et al.* 2019), könnten diese Ergebnisse auch zeigen, dass weitere unbekannte Faktoren das *Shedding* regulieren könnten.

Zusammengefasst konnte in diesem Abschnitt der Arbeit eine deutliche Involvierung von endogenem ANO6 am ADAM17-vermittelten endogenen TNFR1-*Shedding* in HUVECs gezeigt werden. Da die Experimente mit CXCL16 als Substrat nur bedingt aussagekräftig waren, könnten diese Versuche in einem anderen Zellsystem mit stärkerer CXCL16-Expression wiederholt werden.

5.5 Ein ANO6-Mangel in embryonalen Maus-Osteoblasten geht mit einem verminderten TNFR1-*Shedding* einher

Da in den vorherigen Untersuchungen keine vollständige Herunterregulation mit ANO6-siRNA erreicht werden konnte, wurde das *Shedding* in Zellen von *Ano6*^{-/-}-Mausembryonen und *Ano6*^{+/-}-Mausembryonen untersucht.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vortkamp stellte fest, dass *Ano6*-mRNA in differenzierenden und reifen Osteoblasten während der Skelettentwicklung exprimiert wurde. *Ano6*^{-/-}-Mäuse präsentierten sich mit einer verminderten Skelettgröße und Knochenbaudeformitäten, die unter anderem die Extremitäten und Rippen betrafen. Die Differenzierung der Chondrozyten und Osteoblasten war nicht beeinträchtigt. Allerdings besaßen die *Ano6*^{-/-}-Mäuse während der embryonalen Entwicklung mehr nicht mineralisierte Bereiche im Periost. Postnatal konnte vermehrt unkalzifiziertes Osteoid nachgewiesen werden. Zudem externalisierten die *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten vermindert PS. Die Autoren schlussfolgerten, dass ANO6 für das PS-*Scrambling* in Osteoblasten wichtig ist. Die PS-Externalisierung könnte für die Ablagerung von Hydroxylapatit notwendig sein (Ehlen *et al.* 2013).

Interessanterweise konnten in unveröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reiß auch für *Adam17*^{-/-}-Mausembryonen Veränderungen im Knochenbau festgestellt werden. Die *Adam17*^{-/-}-Mausembryonen hatten verkürzte Unterarmknochen, einen verkürzten Unterkiefer und die Knochen der Pfoten waren geringer verknöchert als bei *Adam17*-Wildtyp-Tieren. In der Literatur wurden ebenfalls Veränderungen im Knochenbau bei einem Fehlen von ADAM17 beschrieben. Diese Mäuse hatten verkürzte Röhrenknochen und einen Osteoporose-ähnlichen Phänotyp (Horiuchi *et al.* 2009). Ferner wurde ADAM17 eine entscheidende Rolle während der enchondralen Ossifikation im Knochen zugeschrieben (Hall *et al.* 2013).

Bei dem Phänotyp der *Ano6*^{-/-}-Mäuse können einige Ähnlichkeiten zu dem Skelett-Phänotyp der *Adam17*^{-/-}-Mäuse ausgemacht werden. Daher stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung in einem Zusammenhang stehen könnte.

Um zu überprüfen, ob die *Ano6*^{-/-}-Mäuse eine verminderte ADAM17-*Shedding*-Aktivität besitzen, wurden Osteoblasten von *Ano6*^{-/-}- und *Ano6*^{+/-}-Mausembryonen auf deren TNFR1-*Shedding*-Aktivität untersucht. Die gewonnenen Daten zeigten, dass *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten unter Ca²⁺-Ionophor-Stimulation weniger endogen exprimierten TNFR1 als *Ano6*^{+/-}-Osteoblasten freisetzen. Mithilfe der verwendeten Inhibitoren konnte ADAM17 als Haupt-

Sheddase ausgemacht werden. Diese Beobachtung unterstreicht die Schlüsselrolle von ANO6 für die Regulation der ADAM17-*Shedding*-Aktivität.

Es ist festzustellen, dass das TNFR1-*Shedding* in den *Ano6*^{-/-}-Osteoblasten unter Ionomycin-Stimulation nicht signifikant, aber tendenziell gering, anstieg. Eine Erklärung für diesen tendenziellen *Shedding*-Anstieg könnte eine Teilkompensation durch andere ANO-Familienmitglieder mit Scramblase-Funktion gewesen sein. Für *Ano3* wurde beispielsweise eine hohe Expression auf Osteoblasten nachgewiesen (Gritli-Linde *et al.* 2009). Neben ANO3 könnten auch ANO4, -7 und -9, wie bereits in Kapitel 5.4 diskutiert, in Betracht gezogen werden (Suzuki *et al.* 2013b). Es wurden außerdem alternative mRNA-Varianten von *ANO6* nachgewiesen. Allerdings ist eine Teilkompensation des *ANO6-Knockdowns* durch diese unwahrscheinlich, da in *ANO6*^{-/-}-Zellen keine ANO6-Proteinexpression nachgewiesen wurde (Scudieri *et al.* 2015).

Die Beobachtungen von Ehlen und Kollegen zeigten, dass ANO6 essenziell während der Differenzierung und Reifung der Osteoblasten ist (Ehlen *et al.* 2013). Aufgrund der Vielzahl von Substraten von ADAM17, insbesondere den EGFR-Liganden, sind für ADAM17 ebenfalls wichtige Rollen während Entwicklungs- und Reifungsprozessen bekannt (Blobel 2005). In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, dass eine ANO6-induzierte ADAM17-*Shedding*-Aktivierung die Reifung der Osteoblasten beeinflussen könnte. Für zukünftige Experimente wäre eine Analyse der *Shedding*-Aktivität nach Ausdifferenzierung der *Ano6*^{-/-}- bzw. *Ano6*^{+/-}-Osteoblasten ebenfalls von Interesse.

Unter der Annahme, dass ANO6 Ca²⁺-abhängig unabdingbar für die ADAM17-*Shedding*-Aktivität ist, wäre anzunehmen, dass der *Ano6-Knockout*-Phänotyp dem *Adam17-Knockout*-Phänotyp ähnelt. Dies ist bis auf den Knochen-Phänotyp auf den ersten Blick nicht der Fall. *Adam17*^{-/-}-Mäuse haben weitere Defekte, die die Haut, Haare, Augen und verschiedene andere Organsysteme betreffen (Peschon *et al.* 1998). Eine weitere Gemeinsamkeit der *Ano6*^{-/-}- und *Adam17*^{-/-}-Mäuse ist jedoch, dass beide innerhalb von kurzer Zeit postnatal versterben (Ehlen *et al.* 2013; Peschon *et al.* 1998). Eine Studie von Mattheij und Kollegen bestätigte ebenfalls, dass ANO6 eine essenzielle Rolle für das Überleben von Mäusen hat, da auch hier das Fehlen von ANO6 zu einem geringeren Überleben der Mäuse führte (Mattheij *et al.* 2016). Als postnatale Todesursache der *Ano6*^{-/-}-Mäuse konnte unter anderem ein Tod durch Erstickung ausgemacht werden (Ehlen *et al.* 2013; Mattheij *et al.* 2016). Dies könnte eventuell auf eine Reifungsstörung der Lunge hinweisen. Auch die *Adam17*^{-/-}-Mäuse haben

Veränderungen des Lungengewebes, die zur Letalität beitragen könnten (Peschon *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu wurden in einer anderen Studie *Ano6*^{-/-}-Mäuse als überlebensfähig und fertil beschrieben (Yang *et al.* 2012). Warum der Phänotyp der *Ano6*^{-/-}- und *Adam17*^{-/-}-Mäuse nicht weiter übereinstimmt, kann derzeit nicht eindeutig beantwortet werden. Zum einen lag der Forschungsschwerpunkt in der Veröffentlichung von Ehlen und Kollegen hauptsächlich auf den Veränderungen des Skeletts (Ehlen *et al.* 2013). Es können daher keine eindeutigen Aussagen über mögliche weitere Veränderungen in anderen Geweben der *Ano6*^{-/-}-Mäusen getroffen werden. Zum anderen könnte möglicherweise der mildere *Ano6*^{-/-}-Phänotyp durch Kompensationsmechanismen anderer Scramblasen entstehen.

Funktionell lassen sich ebenfalls einige Gemeinsamkeiten zwischen ANO6 und ADAM17 finden. ADAM17 ist in vielen Tumoren wie dem Kolonkarzinom, Mammakarzinom oder Nicht-kleinzelligem-Bronchialkarzinom überexprimiert (Blanchot-Jossic *et al.* 2005; Lendeckel *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2006). Auch das *Shedding* selbst trägt zur Karzinogenese bei (Gooz 2010; Pruessmeyer & Ludwig 2009). Beispielsweise sind ADAMs durch das *Shedding* wesentlich an der Regulation von EGFR-Signalwegen involviert (Blobel 2005). Die durch das *Shedding* aktivierten Wachstumsfaktoren tragen zur Proliferation von Tumoren bei (Pruessmeyer & Ludwig 2009). Insbesondere ist eine Assoziation von ADAM17 und der Tumormprogression, Metastasierung und dem Überleben bei Mammakarzinomen bekannt (McGowan *et al.* 2008, 2007). Für ANO6 konnte eine Spleiß-Variante identifiziert werden, die mit einer schlechten Brustkrebs-Prognose einhergeht (Dutertre *et al.* 2010). Auch andere ANO-Familienmitglieder sind mit Tumorerkrankungen assoziiert (Kunzelmann *et al.* 2019; Wanitchakool *et al.* 2014).

ADAM17 ist zudem in der Pathogenese von verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie dem Morbus Crohn involviert (Lisi *et al.* 2014). Bei Morbus Bechterew Patienten wurden Polymorphismen in ANO6 identifiziert, die ebenfalls mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind (Wei *et al.* 2013).

Diese Beobachtungen könnten möglicherweise auf einen gemeinsamen Signalweg von ANO6 und ADAM17 in der Karzinogenese und bei entzündlichen Erkrankungen hinweisen. Hierbei bleiben noch viele Aspekte ungeklärt, sodass dieser Bereich ein spannendes Feld für die zukünftige Forschung eröffnet.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass ANO6 die ADAM17-*Shedding*-Aktivität bestimmt. Zudem liefert diese Arbeit erste Hinweise, dass ANO6 möglicherweise auch die *Shedding*-Aktivität anderer Proteasen regulieren könnte. Auf Grundlage der Beobachtungen aus dieser Arbeit und denen von Sommer und Kollegen (Sommer *et al.* 2016) lässt sich folgendes Modell zur finalen ADAM17-*Shedding*-Aktivierung erstellen (siehe Abbildung 20). Demnach ermöglicht ANO6 durch eine PS-Externalisierung die Interaktion der MPD von ADAM17 mit PS. Dadurch wird die Protease in räumliche Nähe zu seinem Substrat geführt und kann dieses freisetzen.

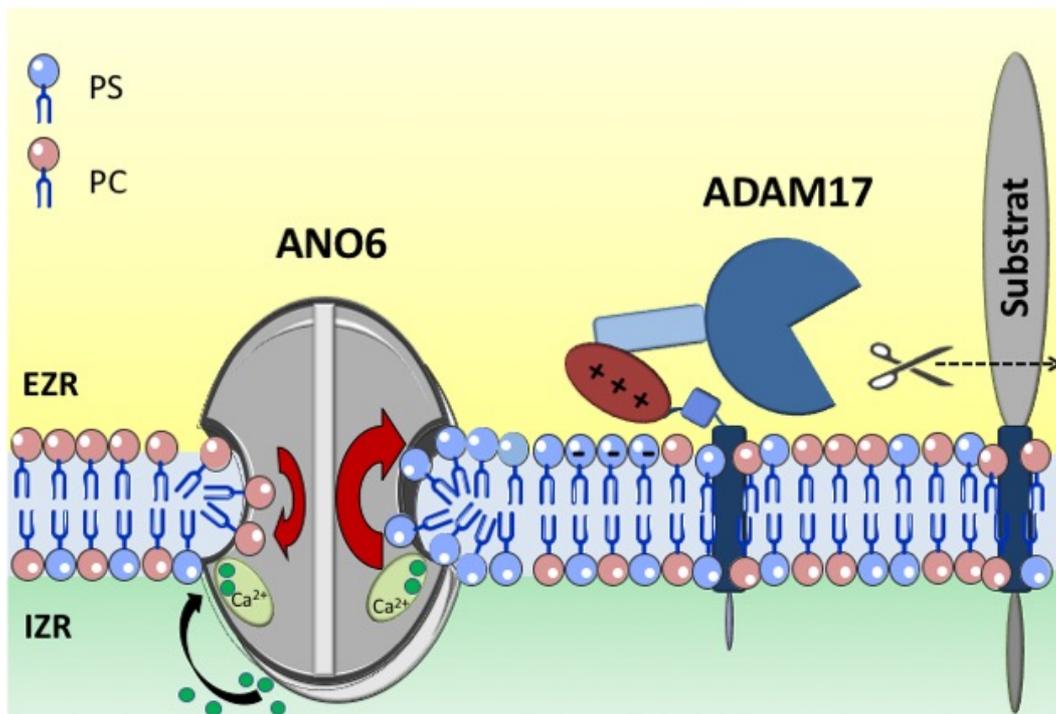


Abbildung 20: Modell zur ADAM17-*Shedding*-Aktivierung

Durch eine Ca^{2+} -Stimulation externalisiert ANO6 das in der Gesamtladung negativ geladene PS. Ein kationisches Aminosäure-Motiv der MPD von ADAM17 interagiert mit den negativ geladenen PS-Kopfgruppen. Diese Interaktion ist essenziell für die Initiierung der ADAM17-*Shedding*-Aktivität (Sommer *et al.* 2016).

EZR (Extrazellulärraum), IZR (Intrazellulärraum), PS (Phosphatidylserin), PC (Phosphatidylcholin)

6 Zusammenfassung

ADAM17 ist eine der bedeutendsten Metalloproteasen der ADAM-Familie. Viele Substrate werden von ADAM17 prozessiert und freigesetzt. Zu diesen Substraten gehören unter anderem Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie AREG oder TGF- α , aber auch Rezeptoren, wie der TNFR1. Diese Vielzahl an bedeutenden Substraten verdeutlicht die essenzielle Rolle, die ADAM17 in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielt. Trotzdem ist die Regulation der *Shedding*-Aktivität unzureichend geklärt. Erste Erkenntnisse in vorausgegangenen Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, aber auch die Aktivität verschiedener Kinasen und die Zusammensetzungen der Plasmamembran, eine wichtige Rolle bei der Regulation des *Sheddings* spielen. Von besonderer Bedeutung für die ADAM17-*Shedding*-Aktivität ist die Externalisierung von Phosphatidylserin, die auch ein wesentliches Merkmal der Apoptose ist. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine transiente Phosphatidylserin-Externalisierung ein zentraler Schlüsselmechanismus für die finale *Shedding*-Aktivierung sein könnte.

Die Plasmamembran ist eine Lipiddoppelschicht mit asymmetrischer Lipidverteilung. Phospholipid-Scramblasen transportieren verschiedene Phospholipide bidirektional. Mehrere Mitglieder der Anoctamin-Familie sind Phospholipid-Scramblasen, wobei ANO6 am umfassendsten für die Externalisierung von Phosphatidylserin untersucht ist.

Da ANO6 als eine Ca^{2+} -abhängige Phospholipid-Scramblase Phosphatidylserin externalisiert, sollte in dieser Arbeit die Hypothese überprüft werden, dass ANO6 die ADAM17-*Shedding*-Aktivität bestimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ANO6-Überexpression in HEK-293-Zellen zu einer verstärkten Ca^{2+} -abhängigen Phosphatidylserin-Externalisierung führte und zudem mit einer erhöhten Freisetzung von AREG und TGF- α einherging. Durch die Verwendung von teilspezifischen ADAM-Inhibitoren konnte dieses *Shedding* ADAM17, ADAM10 und weiteren nicht identifizierten Metalloproteasen zugeschrieben werden. Eine Stimulation von ADAM17 durch den Proteinkinase C-Aktivator PMA führte nicht zu einer vermehrten Freisetzung von AREG bei einer ANO6-Überexpression. Im Gegenzug führte eine alleinige Überexpression

einer Ca^{2+} -hypersensitiven ANO6-Mutante bereits ohne Stimulation zu einer immensen Freisetzung von AREG und TGF- α . Dabei wurden ADAM10 und -17 durch Inhibitorexperimente erneut als Haupt-*Sheddases* bestimmt. Zusätzlich konnte der beobachtete Zusammenhang zwischen ANO6, der Phosphatidylserin-Externalisierung und dem *Shedding* von ADAM17-Substraten durch ANO6-Herunterregulationsversuche bestätigt werden. Hierbei führte eine ANO6-Herunterregulation durch siRNA in HUVECs zu einer verminderten Ca^{2+} -Ionophor-stimulierten Freisetzung des TNFR1. Die funktionale Relevanz dieses Schlüsselmechanismus konnte zusätzlich in ex vivo Versuchen mit Osteoblasten von *Ano6*^{-/-}-Mausembryonen und *Ano6*^{+/-}-Mausembryonen belegt werden. Von Osteoblasten der *Ano6*^{-/-}-Mausembryonen wurde unter Ca^{2+} -Ionophor-Stimulation weniger TNFR1 freigesetzt als von Osteoblasten der *Ano6*^{+/-}-Mausembryonen.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass ANO6 die ADAM17-*Shedding*-Aktivität bestimmt. Zudem könnte möglicherweise auch die *Shedding*-Aktivität weiterer Metalloproteasen von ANO6 reguliert werden. Dieser Zusammenhang konnte erstmalig mittels in vitro- und auch in ex vivo-Versuchen nachgewiesen werden und ermöglicht ein tieferes Verständnis der Grundlagen der Regulationsmechanismen der untersuchten Proteasen.

7 Summary

ADAM17 is one of the most important metalloproteases in the ADAM family. Many substrates are processed and released by ADAM17. The substrates include growth factors and cytokines such as AREG and TGF- α as well as receptors such as TNFR1. The wide spectrum of substrates highlights the essential role of ADAM17 in physiological and pathophysiological processes. However, the regulation of the shedding activity remains not clearly defined. Previous publications gave first insights that an elevation of intracellular Ca^{2+} -concentration, the activity of different kinases and the composition of lipids in the plasma membrane play important roles in the regulation of shedding events. Phosphatidylserine externalisation, which is also a hallmark of apoptosis, is of particular importance concerning ADAM17 shedding activity. Recently, it has been shown that transient phosphatidylserine exposure might be a key mechanism for shedding activation.

The plasma membrane is a lipid bilayer with asymmetrical distribution of its phospholipids. Phospholipid scramblases transport distinct phospholipids bidirectionally. Various members of the anoctamin family are phospholipid scramblases. Concerning phosphatidylserine externalisation ANO6 is investigated the most.

ANO6, a Ca^{2+} -dependent phospholipid scramblase, externalises phosphatidylserine. Thus, the hypothesis that ANO6 regulates ADAM17 shedding activity should be verified in this thesis.

In this thesis, it was shown that ANO6 overexpression in HEK293 cells led to enhanced Ca^{2+} -dependent phosphatidylserine externalisation, which was accompanied with enhanced release of AREG and TGF- α . By application of preferential ADAM inhibitors this shedding could be attributed to ADAM17, ADAM10 and other not identified metalloproteases. Stimulation by protein kinase C-activator PMA did not lead to enhanced release of AREG in ANO6 overexpressing cells. In contrast, overexpression of a Ca^{2+} -hypersensitive mutant of ANO6 led to an immense release of AREG and TGF- α without stimulation. Thereby, ADAM10 and -17 were determined as the main sheddases using inhibitor experiments. Moreover, the observed link between ANO6, phosphatidylserine externalization and shedding of ADAM17

substrates could be confirmed by *ANO6* downregulation experiments. *ANO6* downregulation by siRNA in HUVECs led to reduced Ca^{2+} -ionophore stimulated release of TNFR1. The functional relevance of this key mechanism was further confirmed in ex vivo experiments with osteoblasts from *Ano6*^{-/-}-mice embryos und *Ano6*^{+/-}-mice embryos. There was less Ca^{2+} -ionophore stimulated TNFR1 release of *Ano6*^{-/-}-osteoblasts than of *Ano6*^{+/-}-osteoblasts.

In conclusion, the results of this thesis confirm the hypothesis that ANO6 regulates ADAM17 shedding activity. Besides, the shedding activity of other metalloproteases might also be regulated by ANO6. This relation was proven for the first time in in vitro and ex vivo experiments and facilitates a better understanding of regulatory mechanisms of the examined proteases.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Domänenstruktur von ADAM17	3
Abbildung 2: Phospholipidtranslokatoren der Plasmamembran.....	13
Abbildung 3: ANO6-Schema	14
Abbildung 4: Eine ANO6-Überexpression führt zu einer verstärkten Ionomycin-induzierten PS-Externalisierung	46
Abbildung 5: Etablierung eines anti-ANO6-Western Blots	47
Abbildung 6: Vergleich des anti-ANO6-Antikörpers mit einem anti-eGFP-Antikörper ...	48
Abbildung 7: Eine ANO6-Überexpression steigert das Ionomycin-stimulierte AREG-AP-Shedding	50
Abbildung 8: Eine ANO6-Überexpression steigert das Ionomycin-stimulierte TGF- α -AP-Shedding.....	51
Abbildung 9: Eine ANO6-Überexpression steigert das Melittin-stimulierte AREG-AP-Shedding	53
Abbildung 10: Eine ANO6-Überexpression steigert das Melittin-stimulierte TGF- α -AP-Shedding.....	54
Abbildung 11: Eine ANO6-Überexpression beeinflusst nicht das PMA-stimulierte AREG-AP-Shedding	56
Abbildung 12: Die Ca ²⁺ -hypersensitive Mutante <i>pcDNA3.1 ANO6 His D408G</i> induziert konstitutiv eine massive Freisetzung von AREG-AP	57
Abbildung 13: Die Ca ²⁺ -hypersensitive Mutante <i>pcDNA3.1 ANO6 His D408G</i> induziert konstitutiv eine massive Freisetzung von TGF- α -AP	58
Abbildung 14: Die Inhibition der Ca ²⁺ -hypersensitiven Mutante <i>pcDNA3.1 ANO6 His D408G</i> mittels präferenziellen ADAM-Inhibitoren zeigt eine maßgebliche Beteiligung von ADAM17 im AREG-AP-Shedding	59
Abbildung 15: Die Inhibition der Ca ²⁺ -hypersensitiven Mutante <i>pcDNA3.1 ANO6 His D408G</i> mittels präferenziellen ADAM-Inhibitoren zeigt eine maßgebliche Beteiligung von ADAM17 im TGF- α -AP-Shedding.....	60
Abbildung 16: Ein Vergleich verschiedener siRNAs bezüglich des ANO6-Knockdowns in HEK-293-Zellen	61
Abbildung 17: Ein ANO6-Knockdown führt zu einer signifikanten Reduktion des Ionomycin-induzierten TNFR1-Sheddings.....	63
Abbildung 18: Ein ANO6-Knockdown führt zu keiner signifikanten Veränderung des Ionomycin-induzierten CXCL16-Sheddings	64
Abbildung 19: <i>Ano6</i> ^{-/-} -Osteoblasten setzten unter Ionomycin-Stimulation weniger TNFR1 frei als <i>Ano6</i> ^{+/-} -Osteoblasten.....	65
Abbildung 20: Modell zur ADAM17-Shedding-Aktivierung	84

9 Literaturverzeichnis

- ABEL, S., HUNDHAUSEN, C., MENTLEIN, R., SCHULTE, A., BERKHOUT, T. A., BROADWAY, N., HARTMANN, D., SEDLACEK, R., DIETRICH, S., MUETZE, B., SCHUSTER, B., KALLEN, K.-J., SAFTIG, P., ROSE-JOHN, S., LUDWIG, A., 2004. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN- γ and TNF- α and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* 172, 6362–6372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6362>
- ADRAIN, C., ZETTL, M., CHRISTOVA, Y., TAYLOR, N., FREEMAN, M., 2012. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* 335, 225–228. <https://doi.org/10.1126/science.1214400>
- ALMAÇA, J., TIAN, Y., ALDEHNI, F., OUSINGSAWAT, J., KONGSUPHOL, P., ROCK, J.R., HARFE, B.D., SCHREIBER, R., KUNZELMANN, K., 2009. TMEM16 proteins produce volume-regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A. *J. Biol. Chem.* 284, 28571–28578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010074>
- AMOUR, A., SLOCOMBE, P.M., WEBSTER, A., BUTLER, M., KNIGHT, C.G., SMITH, B.J., STEPHENS, P.E., SHELLEY, C., HUTTON, M., KNÄUPER, V., DOCHERTY, A.J. P., MURPHY, G., 1998. TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 435, 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01031-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01031-X)
- ARRIBAS, J., BECH-SERRA, J.J., SANTIAGO-JOSEFAT, B., 2006. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 57–68. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-7889-6>
- ARRIBAS, J., ESSELENS, C., 2009. ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2319–2335. <https://doi.org/10.2174/138161209788682398>
- ASAKURA, M., KITAKAZE, M., TAKASHIMA, S., LIAO, Y., ISHIKURA, F., YOSHINAKA, T., OHMOTO, H., NODE, K., YOSHINO, K., ISHIGURO, H., ASANUMA, H., SANADA, S., MATSUMURA, Y., TAKEDA, H., BEPPU, S., TADA, M., HORI, M., HIGASHIYAMA, S., 2002. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* 8, 35–40. <https://doi.org/10.1038/nm0102-35>
- BANDSMA, R.H.J., VAN GOOR, H., YOURSHAW, M., HORLINGS, R.K., JONKMAN, M.F., SCHÖLVINCK, E.H., KARRENBELD, A., SCHEENSTRA, R., KÖMHOFF, M., RUMP, P., KOOPMAN-KEEMINK, Y., NELSON, S.F., ESCHER, J.C., CUTZ, E., MARTÍN, M.G., 2015. Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction. *Hum. Pathol.* 46, 923–928. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.02.010>
- BASSÉ, F., STROUT, J.G., SIMS, P.J., WIEDMER, T., 1996. Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺ - dependent transbilayer movement of phospholipid. *J. Biol. Chem.* 271, 17205–17210. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17205>
- BAUD, V., KARIN, M., 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372–377. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5)
- BAX, D.V., MESSENT, A.J., TART, J., VAN HOANG, M., KOTT, J., MACIEWICZ, R.A., HUMPHRIES, M.J., 2004. Integrin $\alpha 5\beta 1$ and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 279, 22377–22386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400180200>
- BELL, J.H., HERRERA, A.H., LI, Y., WALCHECK, B., 2007. Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF- α and its receptors by neutrophils and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 82, 173–176. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307193>

- BEN-EFRAIM, I., ZHOU, Q., WIEDMER, T., GERACE, L., SIMS, P.J., 2004. Phospholipid scramblase 1 is imported into the nucleus by a receptor-mediated pathway and interacts with DNA. *Biochemistry* 43, 3518–3526. <https://doi.org/10.1021/bi0356911>
- BERASAIN, C., AVILA, M., 2014. Amphiregulin. *Semin. Cell Dev. Biol.* 28, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.01.005>
- BETHEL, N.P., GRABE, M., 2016. Atomistic insight into lipid translocation by a TMEM16 scramblase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 14049–14054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607574113>
- BEVERS, E.M., WILLIAMSON, P.L., 2010. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett.* 584, 2724–2730. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.020>
- BLACK, R.A., RAUCH, C.T., KOZLOSZY, 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- α from cells. *Nature* 385, 729–733. <https://doi.org/10.1038/385729a0>
- BLANCHOT-JOSSIC, F., JARRY, A., MASSON, D., BACH-NGOHO, K., PAINEAU, J., DENIS, M.G., LABOISSE, C.L., MOSNIER, J.F., 2005. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J. Pathol.* 207, 156–163. <https://doi.org/10.1002/path.1814>
- 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, 1502–1508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100721>
- BLEIBAUM, F., SOMMER, A., VEIT, M., RABE, B., ANDRÄ, J., KUNZELMANN, K., NEHLS, C., CORREA, W., GUTSMANN, T., GRÖTZINGER, J., BHAKDI, S., REISS, K., 2019. ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *J. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz008>
- BLOBEL, C.P., 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43. <https://doi.org/10.1038/nrm1548>
- BODE, W., GOMIS-RUETH, F.X., STOECKLER, 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, 134–140. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80312-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80312-I)
- BRUNNER, J.D., LIM, N.K., SCHENCK, S., DUERST, A., DUTZLER, R., 2014. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* 516, 207–212. <https://doi.org/10.1038/nature13984>
- CAPUTO, A., CACI, E., FERRERA, L., PEDEMONTE, N., BARSANTI, C., SONDO, E., PFEFFER, U., RAVAZZOLO, R., ZEGARRA-MORAN, O., GALIETTA, L.J. V., 2008. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590–594. <https://doi.org/10.1126/science.1163518>

- CASTOLDI, E., COLLINS, P.W., WILLIAMSON, P.L., BEVERS, E.M., 2011. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* 117, 4399–4400. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332502>
- CHALARIS, A., RABE, B., PALIGA, K., LANGE, H., LASKAY, T., FIELDING, C.A., JONES, S.A., ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J., 2007. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110, 1748–1755. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-067918>
- CHATTERJEE, S., 1999. Neutral sphingomyelinase: past, present and future. *Chem. Phys. Lipids* 102, 79–96. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(99\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(99)00077-8)
- CHRISTOVA, Y., ADRAIN, C., BAMBROUGH, P., IBRAHIM, A., FREEMAN, M., 2013. Mammalian iRhoms have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation. *EMBO Rep.* 14, 884–890. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.128>
- DALEKE, D.L., 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid Res.* 44, 233–42. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200019-JLR200>
- DALEKE, D.L., LYLES, J. V., 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1486, 108–127. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00052-4)
- DENG, L., CHEN, N., LI, Y., ZHENG, H., LEI, Q., 2010. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1806, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.004>
- DÍAZ-RODRÍGUEZ, E., MONTERO, J.C., ESPARÍS-OGANDO, A., YUSTE, L., PANDIELLA, A., 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol. Biol. Cell* 13, 2031–2044. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-11-0561>
- DOMBERNOWSKY, S.L., SAMSDØE-PETERSEN, J., PETERSEN, C.H., INSTRELL, R., HEDEGAARD, A.-M.B., THOMAS, L., ATKINS, K.M., AUCLAIR, S., ALBRECHTSEN, R., MYGIND JOHANSEN, K., FRÖHLICH, C., HOWELL, M., PARKER, P., THOMAS, G., KVEIBORG, M., 2015. The sorting protein PACS-2 promotes ErbB signalling by regulating recycling of the metalloproteinase ADAM17. *Nat. Commun.* 6, 7518. <https://doi.org/doi:10.1038/ncomms8518>
- DREYMUELLER, D., GOETZENICH, A., EMONTZPOHL, C., SOPPERT, J., LUDWIG, A., STOPPE, C., 2016. The perioperative time course and clinical significance of the chemokine CXCL16 in patients undergoing cardiac surgery. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 104–115. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12708>
- DREYMUELLER, D., PRUESSMEYER, J., GROTH, E., LUDWIG, A., 2012. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.09.003>
- DURAN, C., QU, Z., OSUNKOYA, A.O., CUI, Y., HARTZELL, H.C., 2012. ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl⁻ channel family are intracellular proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302, C482–C493. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00140.2011>

- 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, 16336–16348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557322>
- 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, 5776–5781. <https://doi.org/10.1021/ja400340u>
- DÜSTERHÖFT, S., MICHALEK, M., KORDOWSKI, F., OLDEFEST, M., SOMMER, A., RÖSELER, J., REISS, K., GRÖTZINGER, J., LORENZEN, I., 2015. Extracellular juxtamembrane segment of ADAM17 interacts with membranes and is essential for its shedding activity. *Biochemistry* 54, 5791–5801. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00497>
- DUTERTRE, M., LACROIX-TRIKI, M., DRIOUCH, K., DE LA GRANGE, P., GRATADOU, L., BECK, S., MILLEVOI, S., TAZI, J., LIDEREAU, R., VAGNER, S., AUBOEUF, D., 2010. Exon-based clustering of murine breast tumor transcriptomes reveals alternative exons whose expression is associated with metastasis. *Cancer Res.* 70, 896–905. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2703>
- EDWARDS, D.R., HANDSLEY, M.M., PENNINGTON, C.J., 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 258–289. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>
- EHLEN, H.W.A., CHINENKOVA, M., MOSER, M., MUNTER, H.M., KRAUSE, Y., GROSS, S., BRACHVOGEL, B., WUELLING, M., KORNAK, U., VORTKAMP, A., 2013. Inactivation of Anoctamin-6/Tmem16f, a regulator of phosphatidylserine scrambling in osteoblasts, leads to decreased mineral deposition in skeletal tissues. *J. Bone Miner. Res.* 28, 246–259. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1751>
- ENDRES, K., ANDERS, A., KOJRO, E., GILBERT, S., FAHRENHOLZ, F., POSTINA, R., 2003. Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur. J. Biochem.* 270, 2386–2393. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03606.x>
- GAJSKI, G., GARAJ-VRHOVAC, V., 2013. Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.009>
- GARBERS, C., JÄNNER, N., CHALARIS, A., MOSS, M.L., FLOSS, D.M., MEYER, D., KOCH-NOLTE, F., ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J., 2011. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J. Biol. Chem.* 286, 14804–14811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229393>
- GOÑI, F.M., 2014. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 1467–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>
- GOOZ, M., 2010. ADAM-17: The enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45, 146–169. <https://doi.org/10.3109/10409231003628015>.
- GOOZ, P., DANG, Y., HIGASHIYAMA, S., TWAL, W.O., HAYCRAFT, C.J., GOOZ, M., 2012. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin in kidney mesangial cells. *PLoS One* 7, e33350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033350>

- GOUGH, P.J., GARTON, K.J., WILLE, P.T., RYCHLEWSKI, M., DEMPSEY, P.J., RAINES, E.W., 2004. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J. Immunol.* 172, 3678–3685. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3678>
- GRITLI-LINDE, A., VAZIRI SANI, F., ROCK, J.R., HALLBERG, K., IRIBARNE, D., HARFE, B.D., LINDE, A., 2009. Expression patterns of the Tmem16 gene family during cephalic development in the mouse. *Gene Expr. Patterns* 9, 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.gexp.2008.11.002>
- GRÖTZINGER, J., LORENZEN, I., DÜSTERHÖFT, S., 2017. Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17 : The role of the extracellular region. *BBA - Mol. Cell Res.* 1864, 2088–2095. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.024>
- GYOBU, S., ISHIHARA, K., SUZUKI, J., SEGAWA, K., NAGATA, S., 2017. Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 6274–6279. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703391114>
- GYOBU, S., MIYATA, H., IKAWA, M., YAMAZAKI, D., TAKESHIMA, H., SUZUKI, J., NAGATA, S., 2016. A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility. *Mol. Cell. Biol.* 36, 645–659. <https://doi.org/10.1128/MCB.00919-15>
- HAFEZI-MOGHADAM, A., THOMAS, K.L., PROROCK, A.J., HUO, Y., LEY, K., 2001. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J. Exp. Med.* 193, 863–872. <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.863>
- HALL, K.C., HILL, D., OTERO, M., PLUMB, D. A., FROEMEL, D., DRAGOMIR, C.L., MARETZKY, T., BOSKEY, A., CRAWFORD, H.C., SELLERI, L., GOLDRING, M.B., BLOBEL, C.P., 2013. ADAM17 controls endochondral ossification by regulating terminal differentiation of chondrocytes. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3077–3090. <https://doi.org/10.1128/MCB.00291-13>
- HANKINS, H.M., BALDRIDGE, R.D., XU, P., GRAHAM, T.R., 2015. Role of flippases, scramblases, and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic* 16, 35–47. <https://doi.org/doi:10.1111/tra.12233>
- HORIUCHI, K., KIMURA, T., MIYAMOTO, T., MIYAMOTO, K., AKIYAMA, H., TAKAISHI, H., MORIOKA, H., NAKAMURA, T., OKADA, Y., BLOBEL, C.P., TOYAMA, Y., 2009. Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. *J. Immunol.* 182, 2093–2101. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802491>
- HORIUCHI, K., KIMURA, T., MIYAMOTO, T., TAKAISHI, H., OKADA, Y., TOYAMA, Y., BLOBEL, C.P., 2007a. Cutting edge: TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J. Immunol.* 179, 2686–2689. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2686>
- HORIUCHI, K., LE GALL, S., SCHULTE, M., YAMAGUCHI, T., REISS, K., MURPHY, G., TOYAMA, Y., HARTMANN, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P., 2007b. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell* 18, 176–188. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-01-0014>
- IZUMI, Y., HIRATA, M., HASUWA, H., IWAMOTO, R., UMATA, T., MIYADO, K., TAMAI, Y., KURISAKI, T., SEHARA-FUJISAWA, A., OHNO, S., MEKADA, E., 1998. A metalloprotease–disintegrin, MDC9/meltrin- γ / ADAM9 and PKC δ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17, 7260–7272. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7260>

- JACKSON, L.F., QIU, T.H., SUNNARBORG, S.W., CHANG, A., ZHANG, C., PATTERSON, C., LEE, D.C., 2003. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* 22, 2704–2716. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg264>
- KASINA, S., SCHERLE, P.A., HALL, C.L., MACOSKA, J.A., 2009. ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation. *Cell Prolif.* 42, 799–812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00645.x>
- KATOH, M., KATOH, M., 2004. Identification and characterization of TMEM16E and TMEM16F genes in silico. *Int. J. Oncol.* 24, 1345–1349. <https://doi.org/10.3892/ijo.24.5.1345>
- KODIGEPALLI, K.M., BOWERS, K., SHARP, A., NANJUNDAN, M., 2015. Roles and regulation of phospholipid scramblases. *FEBS Lett.* 589, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.036>
- KOENEN, R.R., PRUESSMEYER, J., SOEHNLEIN, O., FRAEMOHS, L., ZERNECKE, A., SCHWARZ, N., REISS, K., SARABI, A., LINDBOM, L., HACKENG, T.M., WEBER, C., LUDWIG, A., 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* 113, 4799–4809. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-152330>
- 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, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19429-4>
- KUNZELMANN, K., OUSINGSAWAT, J., BENEDETTO, R., CABRITA, I., SCHREIBER, R., 2019. Contribution of anoctamins to cell survival and cell death. *Cancers* 11, 382. <https://doi.org/10.3390/cancers11030382>
- LANG, F., GULBINS, E., LERCHE, H., HUBER, S.M., KEMPE, D.S., FÖLLER, M., 2008. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 22, 373–380. <https://doi.org/10.1159/000185448>
- LE GALL, S.M., BOBÉ, P., REISS, K., HORIUCHI, K., NIU, X.-D., LUNDELL, D., GIBB, D.R., CONRAD, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P., 2009. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , L-selectin, and tumor necrosis factor α . *Mol. Biol. Cell* 20, 1785–1794. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-11-1135>
- LE GALL, S.M., MARETZKY, T., ISSUREE, P.D. A, NIU, X.-D., REISS, K., SAFTIG, P., KHOKHA, R., LUNDELL, D., BLOBEL, C.P., 2010. ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell Sci.* 123, 3913–3922. <https://doi.org/10.1242/jcs.069997>
- LEMJABBAR, H., BASBAUM, C., 2002. Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to staphylococcus aureus in epithelial cells. *Nat. Med.* 8, 41–46. <https://doi.org/10.1038/nm0102-41>
- LENDECKEL, U., KOHL, J., ARNDT, M., CARL-MCGRATH, S., DONAT, H., RÖCKEN, C., 2005. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131, 41–48. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0619-y>
- LENTZ, B.R., 2003. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog. Lipid Res.* 42, 423–438. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00025-0)

- LEONARD, J.D., LIN, F., MILLA, M.E., 2005. Chaperone-like properties of the prodomain of TNF α - converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem. J.* 387, 797–805. <https://doi.org/10.1042/BJ20041727>
- LEPPKES, M., ROULIS, M., NEURATH, M.F., KOLLIAS, G., BECKER, C., 2014. Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. *Int. Immunol.* 26, 509–515. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu051>
- LEVENTIS, P.A., GRINSTEIN, S., 2010. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 407–427. <https://doi.org/DOI.10.1146/annurev.biophys.093008.131234>
- LI, X., PÉREZ, L., PAN, Z., FAN, H., 2007. The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res.* 17, 985–998. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.98>
- LI, Y., BRAZZELL, J., HERRERA, A., WALCHECK, B., 2006. ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood* 108, 2275–2279. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005827>
- LISI, S., D'AMORE, M., SISTO, M., 2014. ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity. *Immunol. Lett.* 162, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.008>
- LIU, C., HERMANN, T.E., 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore 253, 5892–5894.
- LIU, S.I., CHENG, H.H., HUANG, C.J., CHANG, H.C., CHEN, W.C., CHEN, I.S., HSU, S.S., CHANG, H.T., HUANG, J.K., CHEN, J.S., 2008. Melittin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases and subsequent death in canine renal tubular cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 417–424. <https://doi.org/10.1177/0960327108094606>
- 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, 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.012>
- 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, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.056>
- LUDWIG, A., HUNDHAUSEN, C., LAMBERT, M.H., BROADWAY, N., ANDREWS, R.C., BICKETT, D.M., LEESNITZER, M.A., BECHERER, J.D., 2005. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8, 161–171. <https://doi.org/10.2174/1386207053258488>
- LUM, L., REID, M.S., BLOBEL, C.P., 1998. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273, 26236–26247. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.26236>
- MADGE, L.A., SIERRA-HONIGMANN, M.R., POBER, J.S., 1999. Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). *J. Biol. Chem.* 274, 13643–13649. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13643>

- MARETZKY, T., EVERS, A., ZHOU, W., SWENDEMAN, S.L., WONG, P.-M., RAFII, S., REISS, K., BLOBEL, C.P., 2011. Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat. Commun.* 2, 229. <https://doi.org/10.1038/ncomms1232>
- MARTIN, S.J., REUTELINGSPERGER, C.P., MCGAHON, A.J., RADER, J.A., VAN SCHIE, R.C.A.A., LAFACE, D.M., GREEN, D.R., 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545–1556. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1545>
- MASKOS, K., FERNANDEZ-CATALAN, C., HUBER, R., BOURENKOV, G.P., BARTUNIK, H., ELLESTAD, G. A., REDDY, P., WOLFSON, M.F., RAUCH, C.T., CASTNER, B.J., DAVIS, R., CLARKE, H.R., PETERSEN, M., FITZNER, J.N., CERRETTI, D.P., MARCH, C.J., PAXTON, R.J., BLACK, R. A, BODE, W., 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3408–3412. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3408>
- MATTHEIJ, N.J.A., BRAUN, A., VAN KRUCHTEN, R., CASTOLDI, E., PIRCHER, J., BAATEN, C.C.F.M.J., WU LLING, M., KUIJPERS, M.J.E., KOHLER, R., POOLE, A.W., SCHREIBER, R., VORTKAMP, A., COLLINS, P.W., NIESWANDT, B., KUNZELMANN, K., COSEMANS, J.M.E.M., HEEMSKERK, J.W.M., 2016. Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling, and protein cleavage. *FASEB J.* 30, 727–737. <https://doi.org/10.1096/fj.15-280446>
- MCGOWAN, P.M., MCKIERNAN, E., BOLSTER, F., RYAN, B.M., HILL, A.D.K., MCDERMOTT, E.W., EVOY, D., O’HIGGINS, N., CROWN, J., DUFFY, M.J., 2008. ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Ann. Oncol.* 19, 1075–1081. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm609>
- MCGOWAN, P.M., RYAN, B.M., HILL, A.D.K., MCDERMOTT, E., O’HIGGINS, N., DUFFY, M.J., 2007. ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 13, 2335–2343. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2092>
- MCINNES, I., SCHETT, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>
- MORENO, M., GIRALT, E., 2015. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins* 7, 1126–1150. <https://doi.org/10.3390/toxins7041126>
- 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., 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* 385, 733–736. <https://doi.org/10.1038/385733a0>
- MURTHY, A., DEFAMIE, V., SMOOKLER, D.S., DI GRAPPA, M.A., HORIUCHI, K., FEDERICI, M., SIBILIA, M., BLOBEL, C.P., KHOKHA, R., 2010. Ectodomain shedding of EGFR ligands and TNFR1 dictates hepatocyte apoptosis during fulminant hepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2731–2744. <https://doi.org/10.1172/JCI42686>

- NICOLSON, G.L., 2014. The fluid - mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 1451–1466. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>
- OUSINGSAWAT, J., WANITCHAKOOL, P., SCHREIBER, R., WUELLING, M., VORTKAMP, A., KUNZELMANN, K., 2015. Anoctamin-6 controls bone mineralization by activating the calcium transporter NCX1. *J. Biol. Chem.* 290, 6270–6280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602979>
- PEDEMONTE, N., GALIETTA, L.J.V., 2014. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol. Rev.* 94, 419–459. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2011>
- PEIRETTI, F., CANAULT, M., DEPREZ-BEAUCLAIR, P., BERTHET, V., BONARDO, B., JUHAN-VAGUE, I., NALBONE, G., 2003. Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp. Cell Res.* 285, 278–285. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00052-1)
- 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., KOZLOSZY, 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, 1281–1284. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1281>
- POSTEA, O., KOENEN, R.R., HRISTOV, M., WEBER, C., LUDWIG, A., 2008. Homocysteine up-regulates vascular transmembrane chemokine CXCL16 and induces CXCR6⁺ lymphocyte recruitment in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1700–1709. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00223.x>
- PRUESSMEYER, J., LUDWIG, A., 2009. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.09.005>
- RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J., THOMAS, P.D., HUANG, X., BATEMAN, A., FINN, R.D., 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- REDDY, P., SLACK, J.L., DAVIS, R., CERRETTI, D.P., KOZLOSZY, C.J., BLANTON, R.A., SHOWS, D., PESCHON, J.J., BLACK, R.A., 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 14608–14614. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14608>
- REISS, K., BHAKDI, S., 2017. The plasma membrane: penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 2082–2087. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.006>
- REISS, K., SAFTIG, P., 2009. The ‘A Disintegrin And Metalloprotease’ (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.11.002>
- ROGHANI, M., BECHERER, J.D., MOSS, M.L., ATHERTON, R.E., ERDJUMENT-BROMAGE, H., ARRIBAS, J., BLACKBURN, R.K., WESKAMP, G., TEMPST, P., BLOBEL, C.P., 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274, 3531–3540. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3531>

- ROSE-JOHN, S., HEINRICH, P.C., 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* 300, 281–290. <https://doi.org/10.1042/bj3000281>
- ROTHMAN, J.E., LENARD, J., 1977. Membrane asymmetry. *Science* 195, 743–753. <https://doi.org/10.1126/science.402030>
- RYSAVY, N.M., SHIMODA, L.M.N., DIXON, A.M., SPECK, M., STOKES, A.J., TURNER, H., UMEMOTO, E.Y., 2014. Beyond apoptosis: The mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. *Bioarchitecture* 4, 127–137. <https://doi.org/10.1080/19490992.2014.995516>
- SAFTIG, P., REISS, K., 2011. The ‘A Disintegrin And Metalloproteases’ ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur. J. Cell Biol.* 90, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.005>
- SAHIN, U., WESKAMP, G., KELLY, K., ZHOU, H.M., HIGASHIYAMA, S., PESCHON, J., HARTMANN, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P., 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769–779. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307137>
- SHELLER, J., CHALARIS, A., GARBERS, C., ROSE-JOHN, S., 2011. ADAM17: A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 32, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.005>
- SCHLÖNDORFF, J., BECHERER, J.D., BLOBEL, C.P., 2000. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). *Biochem. J.* 347, 131–138. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470131>
- SCHLÖNDORFF, J., BLOBEL, C.P., 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112, 3603–3617.
- SCHRAMME, A., ABDEL-BAKKY, M.S., KÄMPFER-KOLB, N., PFEILSCHIFTER, J., GUTWEIN, P., 2008. The role of CXCL16 and its processing metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 in the proliferation and migration of human mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.088>
- SCHREIBER, R., ULIAKINA, I., KONGSUPHOL, P., WARTH, R., MIRZA, M., MARTINS, J.R., KUNZELMANN, K., 2010. Expression and function of epithelial anoctamins. *J. Biol. Chem.* 285, 7838–7845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065367>
- SCHROEDER, B.C., CHENG, T., JAN, Y.N., JAN, L.Y., 2008. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019–1029. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.003>
- SCHWARZ, J., SCHMIDT, S., WILL, O., KOUDELKA, T., KÖHLER, K., BOSS, M., RABE, B., THOLEY, A., SCHELLER, J., SCHMIDT-ARRAS, D., SCHWAKE, M., ROSE-JOHN, S., CHALARIS, A., 2014. Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor α ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* 289, 3080–3093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536847>
- SCUDIERI, P., CACI, E., VENTURINI, A., SONDO, E., PIANIGIANI, G., MARCHETTI, C., RAVAZZOLO, R., PAGANI, F., GALIETTA, L.J.V., 2015. Ion channel and lipid scramblase activity associated with expression of TMEM16F/ANO6 isoforms. *J. Physiol* 593, 3829–3848. <https://doi.org/10.1113/JP270691>

- SEALS, D.F., COURTNEIDGE, S.A., 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7–30. <https://doi.org/10.1101/gad.1039703>
- SHEIKINE, Y., SIRSJÖ, A., 2008. CXCL16/SR-PSOX-A friend or a foe in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 197, 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.034>
- SHIMAOKA, T., KUME, N., MINAMI, M., HAYASHIDA, K., KATAOKA, H., KITA, T., YONEHARA, S., 2000. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 40663–40666. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000761200>
- SHIMIZU, T., IEHARA, T., SATO, K., FUJII, T., SAKAI, H., OKADA, Y., 2013. TMEM16F is a component of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *AJP Cell Physiol.* 304, C748–C759. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2012>
- SINGER, S.J., NICOLSON, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- SOMMER, A., FRIES, A., CORNELSEN, I., SPECK, N., KOCH-NOLTE, F., GIMPL, G., ANDRÄ, J., BHAKDI, S., REISS, K., 2012. Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *J. Biol. Chem.* 287, 23678–23689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362756>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms11523>
- STERNLICHT, M.D., SUNNARBORG, S.W., KOUROS-MEHR, H., YU, Y., LEE, D.C., WERB, Z., 2006. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development* 132, 3923–3933. <https://doi.org/10.1242/dev.02314>
- STONE, A.L., KROEGER, M., SANG, Q.X.A., 1999. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. *J. Protein Chem.* 18, 447–465. <https://doi.org/10.1023/A:1020692710029>
- SUNNARBORG, S.W., LEANN HINKLE, C., STEVENSON, M., RUSSELL, W.E., RASKA, C.S., PESCHON, J.J., CASTNER, B.J., GERHART, M.J., PAXTON, R.J., BLACK, R.A., LEE, D.C., 2002. Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J. Biol. Chem.* 277, 12838–12845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112050200>
- SUZUKI, J., DENNING, D.P., IMANISHI, E., HORVITZ, H.R., NAGATA, S., 2013a. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* 341, 403–406. <https://doi.org/10.1126/science.1236758>
- SUZUKI, J., FUJII, T., IMAO, T., ISHIHARA, K., KUBA, H., NAGATA, S., 2013b. Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J. Biol. Chem.* 288, 13305–133116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457937>
- SUZUKI, J., IMANISHI, E., NAGATA, S., 2014. Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 289, 30257–30267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583419>

- SUZUKI, J., UMEDA, M., SIMS, P.J., NAGATA, S., 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature09583>
- SUZUKI, T., SUZUKI, J., NAGATA, S., 2014. Functional swapping between transmembrane proteins TMEM16A and TMEM16F. *J. Biol. Chem.* 289, 7438–7447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542324>
- SZTEYN, K., SCHMID, E., NURBAEVA, M.K., YANG, W., MÜNZER, P., KUNZELMANN, K., LANG, F., SHUMILINA, E., 2012. Expression and functional significance of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO6 in dendritic cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 30, 1319–1332. <https://doi.org/10.1159/000343321>
- TAKEDA, S., 2009. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.07.009>
- TELLIER, E., CANAULT, M., REBSOMEN, L., BONARDO, B., JUHAN-VAGUE, I., NALBONE, G., PEIRETTI, F., 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp. Cell Res.* 312, 3969–3980. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.027>
- TRACEY, D., KLARESKOG, L., SASSO, E.H., SALFELD, J.G., TAK, P.P., 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 117, 244–279. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.10.001>
- VAN WART, H.E., BIRKEDAL-HANSEN, H., 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 5578–5582. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5578>
- VAN ZEE, K.J., KOHNO, T., FISCHER, E., ROCK, C.S., MOLDAWER, L.L., LOWRY, S.F., 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4845–4849. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4845>
- VEIT, M., KOYRO, K.I., AHRENS, B., BLEIBAUM, F., MUNZ, M., RÖVEKAMP, H., ANDRÄ, J., SCHREIBER, R., KUNZELMANN, K., SOMMER, A., BHAKDI, S., REISS, K., 2018. Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 1598–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.011>
- WALCHECK, B., HERRERA, A.H., ST. HILL, C., MATTILA, P.E., WHITNEY, A.R., DELEO, F.R., 2006. ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 36, 968–976. <https://doi.org/10.1002/eji.200535257>
- WALEV, I., TAPPE, D., GULBINS, E., BHAKDI, S., 2000. Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *J. Leukoc. Biol.* 68, 865–872.
- WALTER, S., BUCHNER, J., 2002. Molecular chaperones - cellular machines for protein folding. *Angew. Chemie Int. Ed.* 41, 1098–1113. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020402\)41:7<1098::AID-ANIE1098>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1098::AID-ANIE1098>3.0.CO;2-9)
- WANITCHAKOOL, P., WOLF, L., KOEHL, G.E., SIRIANANT, L., SCHREIBER, R., KULKARNI, S., DUVVURI, U., KUNZELMANN, K., 2014. Role of anoctamins in cancer and apoptosis. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* 369, 20130096. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0096>

- WATANABE, R., SAKURAGI, T., NOJI, H., NAGATA, S., 2018. Single-molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201717956. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717956115>
- WEI, J.C.C., HSU, Y.W., HUNG, K.S., WONG, R.H., HUANG, C.H., LIU, Y.T., GUO, Y.C., IKEGAWA, S., CHANG, W.C., 2013. Association study of polymorphisms rs452569 and rs17095830 and the risk of ankylosing spondylitis in a taiwanese population. *PLoS One* 8, e52801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052801>
- WEISS, H.J., LAGES, B., 1997. Family studies in Scott syndrome. *Blood* 90, 475–476.
- WHITE, J.M., 2003. ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.001>
- WIEDMER, T., ZHAO, J., NANJUNDAN, M., SIMS, P.J., 2003. Palmitoylation of phospholipid scramblase 1 controls its distribution between nucleus and plasma membrane. *Biochemistry* 42, 1227–1233. <https://doi.org/10.1021/bi026679w>
- WILLIAMSON, 2016. Phospholipid scramblases. *Lipid Insights* 8, 41–44. <https://doi.org/10.4137/LPI.S31785>
- WOLFSBERG, T.G., STRAIGHT, P.D., GERENA, R.L., HUOVILA, A P., PRIMAKOFF, P., MYLES, D.G., WHITE, J.M., 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1152>
- WONG, E., MARETZKY, T., PELEG, Y., BLOBEL, C.P., SAGI, I., 2015. The functional maturation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 requires processing at a newly identified proprotein convertase (PC) cleavage site. *J. Biol. Chem.* 290, 12135–12146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.624072>
- WU, L., CLAAS, A.M., SARKAR, A., LAUFFENBURGER, D.A., HAN, J., 2015. High-throughput protease activity cytometry reveals dose-dependent heterogeneity in PMA-mediated ADAM17 activation. *Integr Biol* 7, 513–524. <https://doi.org/10.1039/c5ib00019j>.
- WUTTGE, D.M., ZHOU, X., SHEIKINE, Y., WÄGSÄTER, D., STEMME, V., HEDIN, U., STEMME, S., HANSSON, G.K., SIRSJÖ, A., 2004. CXCL16/SR-PSOX is an interferon- γ -regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 750–755. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000124102.11472.36>
- XU, P., DERYNCK, R., 2010. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell.* 37, 551–566. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.034>
- YANG, H., KIM, A., DAVID, T., PALMER, D., JIN, T., TIEN, J., HUANG, F., CHENG, T., COUGHLIN, S.R., JAN, Y.N., JAN, L.Y., 2012. TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell* 151, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.036>
- YANG, Y.D., CHO, H., KOO, J.Y., TAK, M.H., CHO, Y., SHIM, W.-S., PARK, S.P., LEE, J., LEE, B., KIM, B.-M., RAOUF, R., SHIN, Y.K., OH, U., 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210–1215. <https://doi.org/10.1038/nature07313>

- YOUNAN, P., IAMPIETRO, M., SANTOS, R.I., RAMANATHAN, P., POPOV, V.L., BUKREYEV, A., 2018. Role of transmembrane protein 16F in the incorporation of phosphatidylserine into budding ebola virus virions. *J. Infect. Dis.* 218, 335–345. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy485>
- YU, C., ALTERMAN, M., DOBROWSKY, R.T., 2005. Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J. Lipid Res.* 46, 1678–1691. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500060-JLR200>
- YU, K., WHITLOCK, J.M., LEE, K., ORTLUND, E.A., CUI, Y.Y., HARTZELL, H.C., 2015. Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. *Elife* 4, e06901. <https://doi.org/10.7554/eLife.06901>
- ZAITSEVA, E., ZAITSEV, E., MELIKOV, K., ARAKELYAN, A., MARIN, M., VILLASMIL, R., MARGOLIS, L.B., MELIKYAN, G.B., LEONID, V., 2017. Fusion stage of HIV-1 entry depends on virus-induced cell surface exposure of phosphatidylserine. *Cell Host Microbe* 22, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.012>. FUSION
- ZHOU, B.S., PEYTON, M., HE, B., LIU, C., GIRARD, L., LO, Y., BARIBAUD, F., MIKAMI, I., REGUART, N., YANG, G., LI, Y., YAO, W., VADDI, K., GAZDAR, A.F., FRIEDMAN, S.M., DAVID, M., NEWTON, R.C., FRIDMAN, J.S., MINNA, J.D., SCHERLE, P.A., 2006. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*. 10, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.024>
- ZHOU, Q., ZHAO, J., STOUT, J.G., LUHM, R.A., WIEDMER, T., SIMS, P.J., 1997. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. *J. Biol. Chem.* 272, 18240–18244. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18240>
- ZWAAL, R.F.A., COMFURIUS, P., BEVERS, E.M., 2004. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1636, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2003.07.003>
- INTERNETQUELLE TGFA transforming growth factor alpha [*Homo sapiens* (human)], Stand 07.04.2019, 12:30 Uhr. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7039>

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Karina Reiß** für die sehr gute Betreuung und die Überlassung dieses spannenden Forschungsprojektes bedanken. Vielen Dank für die vielen wertvollen Ratschläge!

Ebenso geht mein Dank an **Dr. Anselm Sommer** für die hervorragende Einarbeitung und Unterstützung. Ich möchte mich insbesondere für die wissenschaftlichen Anregungen und die unermüdliche Hilfe bei der Suche nach Problemlösungen zu jeder Zeit bedanken. Bei **Dr. Maria Sperrhacke** möchte ich mich für die vielen praktischen Hinweise bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch **Hagen Rövekamp**, der immer ein offenes Ohr hat. Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken. Für die exzellente technische Einarbeitung geht mein Dank an **Björn Ahrens**.

Vielen Dank auch meinen Kooperationspartnern, die an diesem Projekt beteiligt waren, insbesondere **Prof. Dr. Andrea Vortkamp** und **Prof. Dr. Karl Kunzelmann**.

Außerdem möchte ich mich für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung der **IRTG des SFB 877** bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht zudem an meine beste Freundin **Shanice May**. Danke, dass du immer für mich da bist!

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei **Martin Munz** für die Unterstützung und gemeinsame Freizeit: die gemeinsamen Reisen, Kitesurf- und Snowboard-Sessions!

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen **Eltern** und **Tobias** für die unendliche Unterstützung über all die Jahre!

11 Erklärung und Veröffentlichung

Hiermit versichere ich, Katharina Isabelle Koyro, an Eides statt, dass ich meine Dissertation, abgesehen von den Ratschlägen meiner akademischen Betreuer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist und dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe. Meine Arbeit wurde bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegt. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Teile dieser Arbeit wurden in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Veit, M., **Koyro, K.I.**, Ahrens, B., Bleibaum, F., Munz, M., Rövekamp, H., Andrä, J., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Sommer, A., Bhakdi, S., Reiss, K., 2018. **Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function.** *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 1598–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.011>

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in den Pflichtexemplaren nicht abgedruckt.