

Funktionale Charakterisierung der Metalloprotease ADAM17 und ihrer natürlich vorkommenden Varianten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anne-Sophie Cabron

Kiel, 2020

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2020

Zum Druck genehmigt: 08.09.2020

Prof. Dr. Frank Kempken

(Der Dekan)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	ADAM17: STRUKTUR UND REGULATION	1
1.1.1	Struktur	1
1.1.2	Regulation der ADAM17-Aktivität	5
1.2	ADAM17: FUNKTIONEN IM IMMUNSYSTEM	7
1.3	ADAM17-ASSOZIIERTE KRANKHEITEN	9
1.3.1	Die Rolle von ADAM17 in der Krebserkrankung	11
1.4	ZIELSETZUNG	14
2	MATERIAL	15
2.1	ANTIBIOTIKA	15
2.2	ANTIKÖRPER	15
2.2.1	Primärantikörper	15
2.2.2	Konjugierte Primärantikörper	17
2.2.3	Sekundärantikörper	18
2.3	CHEMIKALIEN	19
2.4	COMPUTER-SOFTWARE	19
2.5	ENZYME	20
2.6	GRÖßENSTANDARD	20
2.7	KITS	20
2.8	PLASMIDE	21
2.9	PRIMER	25
2.9.1	Mutagenese-Primer	25
2.9.2	Sequenzierungsprimer	26
2.10	PUFFER UND LÖSUNGEN	27
2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.10.2	Biotinylierung	27
2.10.3	Durchflusszytometrische Messung	28
2.10.4	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)</i>	28
2.10.5	Furin <i>Cleavage Assay</i>	28
2.10.6	Immunfluoreszenzfärbung	28
2.10.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.10.8	Western Blot	30
2.10.9	Zellyse	30
2.11	ZELLKULTUR	31
2.11.1	Adhärente Zelllinien	31
2.11.2	Makrophagen-Vorläuferzellen	31
2.12	ZELLKULTURMEDIEN	32
3	METHODEN	34
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34

3.1.1	Mutagenese-PCR	34
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.1.3	Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i>	35
3.1.4	Plasmidpräparation	35
3.1.5	DNA-Sequenzierung	35
3.2	ZELLKULTUR.....	36
3.2.1	Adhärente Zelllinien	36
3.2.2	Makrophagen-Vorläufer-Zellen.....	36
3.3	GENTRANSFER IN EUKARYOTISCHE ZELLEN	37
3.3.1	Transiente Transfektion	37
3.3.2	Erhöhung des Virustiters	38
3.3.3	Retrovirale Transduktion.....	38
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
3.4.1	Zellernte und –lyse	38
3.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
3.4.3	SDS-PAGE.....	39
3.4.4	Western Blot Analyse	39
3.4.5	Biotinylierung	40
3.4.6	ELISA	41
3.4.7	Immunpräzipitation.....	41
3.4.8	Furin <i>Cleavage</i> Assay	41
3.4.9	EndoH/PNGaseF-Verdau	42
3.4.10	Zelloberflächen-Aktivitätsassay	42
3.4.11	Aktivitätsassay im Zelllysat	42
3.5	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE.....	43
3.5.1	Zelloberflächenfärbung von ADAM17.....	43
3.5.2	Mehrfachfärbung von Oberflächenmarker	43
3.6	MIKROSKOPISCHE METHODEN	44
3.6.1	Immunfluoreszenzfärbung	44
3.7	STATISTISCHE ANALYSE	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	ETABLIERUNG DES MAKROPHAGEN-VORLÄUFER-ZELLSYSTEMS ZUR FUNKTIONALEN ANALYSE VON ADAM17-VARIANTEN ..	45
4.1.1	Funktionale und strukturelle Analyse von ADAM17-Varianten in HEK- und mEF-Zellen.....	46
4.1.2	Das Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem auf ADAM17 ^{ex/ex} -Hintergrund	54
4.1.3	Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation von ADAM17-Varianten im Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem.....	59
4.2	IDENTIFIKATION VON ADAM17-PUNKTMUTATIONEN AUS TUMORGEWEBE VON DARMKREBS-PATIENTEN	64
4.2.1	Funktionale Charakterisierung von ADAM17-Varianten in der katalytischen Domäne	66
4.2.2	Funktionale Charakterisierung von ADAM17-Varianten außerhalb der katalytischen Domäne	71
4.2.3	Funktionale Charakterisierung von ADAM17-Varianten in der Prodomäne	75
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER ADAM17-VARIANTE D232H	79
4.3.1	Funktionale Analyse der D232H in HEK-Zellen.....	80

4.3.2	Funktionale Analyse der D232H in Makrophagen-Vorläufer-Zellen	83
5	DISKUSSION	86
5.1	AKTIVIERUNG UND MATURIERUNG VON ADAM17 IN IMMORTALISIERTEN IMMUNZELLEN.....	86
5.2	ANALYSE VON NATÜRLICH VORKOMMENDEN ADAM17-VARIANTEN.....	89
5.2.1	Einfluss von ADAM17-Mutationen in der katalytischen Domäne auf Aktivierung und Maturierung	90
5.2.2	Einfluss von ADAM17-Mutationen außerhalb der katalytischen Domäne	91
5.3	CHARAKTERISIERUNG DER KRANKHEITS-ASSOZIERTEN ADAM17-VARIANTE D232H	93
5.4	AUSBLICK.....	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	ABSTRACT	97
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
9	ANHANG	111
9.1	ABKÜRZUNGEN	111
9.2	AMINOSÄUREN	113
9.3	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISSE.....	114
9.3.1	Abbildungsverzeichnis.....	114
9.3.2	Tabellenverzeichnis	115
9.4	PUBLIKATIONEN	116
9.5	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	117

1 EINLEITUNG

1.1 ADAM17: STRUKTUR UND REGULATION

Die biologische Funktion von Proteinen ist streng durch posttranskriptionale Prozesse reguliert. Ein Prozess, der in letzter Zeit an Interesse und Bedeutung gewonnen hat, ist das *Ectodomain-Shedding*^[1, 2]. Dabei wird durch eine Protease der extrazelluläre Teil eines Transmembranproteins irreversibel von der Zelloberfläche abgespalten. Auf diese Weise werden unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Rezeptoren prozessiert. Die nun löslichen Moleküle können autokrin, juxtakrin, parakrin oder auch endokrin wirken^[3, 4].

Eine der wichtigsten *Sheddases* ist die zinkabhängige Metalloprotease ADAM17. Diese wurde 1997 zeitgleich von zwei Forschungsgruppen als *Tumor necrosis factor α Converting Enzyme* (TACE) beschrieben^[5, 6]. ADAM17 gehört der *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM)- oder auch Adamalysin-Familie an. Diese Familie besteht aus 21 Mitgliedern, von denen nur 13 aktive Enzyme sind^[7, 8]. Die Ähnlichkeit der Proteinsequenz von ADAM17 mit anderen Mitgliedern der ADAM-Familie ist sehr gering. So zeigt ADAM10 mit 30% die höchste Homologie zu ADAM17. Diesen beiden Proteasen wird der Großteil der untersuchten Abspaltungsprozesse an der Zelloberfläche zugeordnet^[7].

1.1.1 STRUKTUR

Die Metalloprotease ADAM17 ist ein Typ I Transmembranprotein, das sich in mehrere Domänen gliedert. Die einzelnen Domänen sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Ausgehend vom N-Terminus besteht der extrazelluläre Teil des Proteins aus dem Signalpeptid (nicht dargestellt), der Prodomäne, der katalytischen Domäne, der Disintegrin-Domäne, der Membran-proximalen Domäne und einer *stalk*-Region mit dem *Conserved Adam seventeeN Dynamic Interaction Sequence* (CANDIS)-Motiv. ADAM17 wird über die Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Dieser folgt die cytoplasmatische Domäne^[9-12].

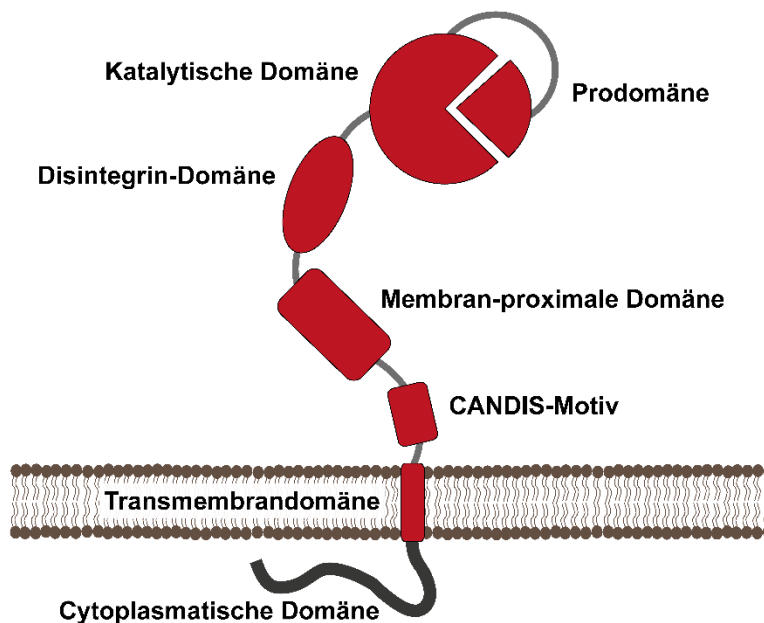


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der ADAM17-Struktur.

Die Metalloprotease ADAM17 ist ein Typ I Transmembranprotein, das aus mehreren Domänen besteht. Ausgehend vom N-Terminus folgt der Prodomäne die katalytische Domäne, die Disintegrin-Domäne, die Membran-proximale Domäne, das CANDIS-Motiv, die Transmembrandomäne sowie die cytoplasmatische Domäne.

Prodomäne

Die Prodomäne (PRO) von ADAM17 umfasst etwa 200 Aminosäuren und enthält eine *cysteine switch* Sequenz (PKVCGY186). Diese Sequenz wurde bereits in anderen Zink-bindenden Metalloproteasen wie den Matrix Metalloproteasen (MMP) beschrieben^[13, 14]. Das enthaltene Cystein an Position 184 koordiniert das Zink-Ion, das im katalytischen Zentrum bindet. Dieses hält ADAM17 während des Transports vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat inaktiv^[15]. Dort wird die PRO durch Proprotein Convertasen wie Furin von der katalytischen Domäne abgespalten. Bisher wurden zwei Furin-Schnittstellen in der PRO von ADAM17 beschrieben^[16]. Eine Schnittstelle befindet sich zwischen PRO und katalytischer Domäne und wird als *downstream* Schnittstelle bezeichnet. Die zweite ist im C-terminalen Bereich der PRO lokalisiert und wird als *upstream* Schnittstelle bezeichnet. Neben der Funktion als Inhibitor dient die PRO ADAM17 als Chaperon für die richtige Faltung und Prozessierung^[15]. Es konnte gezeigt werden, dass eine ADAM17-Variante ohne PRO im ER proteolytisch abgebaut wird. Dabei wurde vermutet, dass die Verdauung durch ADAM17 selbst stattfindet^[15]. Was nach der Abspaltung der PRO mit dieser passiert, ist weitestgehend unklar. Da die PRO eine hohe Affinität (IC_{50}) zur katalytischen Domäne aufweist, besteht die Möglichkeit, dass sie auch nach der Abspaltung an diese assoziiert bleibt^[17]. Die Kristallstruktur der PRO von ADAM17 und anderer ADAMs konnte bisher noch nicht gelöst werden, weshalb keine Informationen zur 3D-Struktur für diese Domäne vorliegen.

Katalytische Domäne

Die katalytische Domäne (KD) mit dem aktiven Zentrum vermittelt die proteolytische Aktivität von ADAM17. Die 3D-Struktur der KD wurde 1998 von Maskos *et al.* mittels Röntgenkristallographie aufgelöst und zeigte eine große Ähnlichkeit mit *snake venom* Metalloproteasen auf^[18]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde ADAM17 eindeutig als Metalloendoprotease in die Familie der Adamalysine eingeordnet. Heutzutage wird ADAM17 als Mitglied der Familie der Metzinkine beschrieben. Das aktive Zentrum von Metzinkinen einschließlich ADAM17 besteht aus einem HEXXHXXGXXHD-Motiv, wobei die drei Histidin-Reste und der Glutaminsäure-Rest das zweiwertige Zink-Ion koordinieren^[19, 20]. Zwischen der Carboxylgruppe der Glutaminsäure und dem Zink-Ion befindet sich ein labiles Wassermolekül, das für den nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung des Substrates benötigt wird. Außerdem ist für die Familie der Metzinkine ein konservierter Methionin-Rest charakteristisch, der als *Met-turn* bezeichnet wird^[19-22]. Dieser dichte 1,4-Turn ist direkt unterhalb der Zinkbindestelle lokalisiert. Er ist strukturell sowie räumlich konserviert und enthält an der dritten Position das konservierte Methionin.

Disintegrin-Domäne

Wie bei anderen Mitgliedern der ADAM-Familie folgt der katalytischen Domäne die Disintegrin-Domäne (DD). Diese zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit mit Disintegrinen, die in Schlangengift gefunden wurden^[23, 24]. Die DD ist unter anderem an der korrekten Ausrichtung der benachbarten Domänen zum Substrat beteiligt^[23, 25]. Sie dient außerdem als Gerüst für ADAM17 und hält es in einer C-Form. Dieses wird durch die Überbrückung der katalytischen Domäne zur Membranproximalen Domäne erreicht, was zu einer Steifheit der extrazellulären Domäne führt^[23, 24]. Die DD der ADAMs ist ebenfalls in der Lage mit Integrinen zu interagieren^[26, 27]. Diese sind für einzelne Mitglieder der ADAM-Familie teilweise spezifisch. Für ADAM17 konnte eine Interaktion mit dem $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin nachgewiesen werden, die nicht nur wichtig für Zell-Zell-Interaktionen ist, sondern die proteolytische Aktivität beeinflusst^[28, 29]. Die Interaktion mit dem $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin kann dabei auf derselben Zelle (*cis*) oder zwischen zwei unterschiedlichen Zellen (*trans*), zum Beispiel zwischen Fibroblasten und Karzinomzellen, stattfinden^[30]. Es wurde beschrieben, dass diese Interaktion die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum sterisch behindert. Dieses führt dann zu einer Inhibierung der *Shedding*-Aktivität von ADAM17^[28-30]. Bereits innerhalb der Zelle, in perinuklearen Regionen, co-lokalisiert ADAM17 mit dem Integrin $\alpha 5 \beta 1$, bevor die Protease an die Zelloberfläche transportiert wird. Nach der Aktivierung löst sich der ADAM17-Integrin-Komplex auf, sodass beide Moleküle aktiv werden können^[29, 31].

Membran-proximale Domäne

Die Membran-proximale Domäne (MPD) ist nur in den atypischen ADAM-Mitgliedern ADAM10 und ADAM17 zu finden^[32]. Bei den anderen ADAM-Proteasen befindet sich C-terminal der Disintegrin-Domäne eine Cysteinreiche Domäne gefolgt von einer EGF-ähnlichen Domäne^[23, 25]. Die durch die Disintegrin-Domäne stabilisierte C-Form bringt die MPD in unmittelbare Nähe zur katalytischen Domäne^[23, 24]. Dadurch ist die MPD an der Substraterkennung, Dimerisierung und der Regulation von ADAM17 beteiligt^[11, 12, 15, 33-37]. Dies wird unter anderem durch die zwei Isoformen der MPD umgesetzt. Die Domäne kann eine sogenannte offene Konformation annehmen. Hier liegt ADAM17 als gestrecktes, flexibles und dadurch aktives Enzym vor. Die zweite Isoform wird als geschlossene Konformation bezeichnet. Wenn ADAM17 geschlossen vorliegt, ist es steif und kompakt. Es kann infolgedessen kein Substrat spalten und ist inaktiv^[11]. Diese beiden Isoformen unterscheiden sich durch die Disulfidbrücken innerhalb der MPD. Das Muster der Disulfidbrücken wird von Protein-Disulfid-Isomerasen verändert. Dadurch kann die Aktivität von ADAM17 anhand der Konformation kontrolliert werden^[11].

CANDIS-Motiv

Zwischen der Membran-proximalen Domäne und der Zellmembran befindet sich in der *stalk*-Region das *Conserved Adam seventeenN Dynamic Interaction Sequence* (CANDIS)-Motiv. Dieses ist evolutionär konserviert, sogar zwischen Menschen und *Drosophila melanogaster*^[10]. Es spielt in der Interaktion zwischen Zellmembran und Substraten sowie bei der Dimerisierung von ADAM17 eine wichtige Rolle^[10]. So ist das CANDIS-Motiv notwendig für die Substraterkennung von Typ I Transmembranproteinen wie zum Beispiel dem Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R), jedoch nicht für Typ II Transmembranproteine wie *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α)^[10, 32].

Transmembrandomäne

Die Hauptaufgabe der Transmembrandomäne ist die Verankerung von ADAM17 in der Zellmembran. Außerdem wurde beschrieben, dass diese Domäne für die Aktivierung und proteolytische Aktivität von ADAM17 benötigt wird^[38, 39].

Cytoplasmatische Domäne

Die Rolle der cytoplasmatischen Domäne (CD) wird noch immer kontrovers diskutiert. In dieser Domäne befinden sich mehrere Phosphorylierungsstellen, an denen ADAM17 posttranskriptional prozessiert werden kann. Vor allem die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) und die *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERKs) sind dabei für die Phosphorylierung und die dadurch bedingte positive Regulation der ADAM17-Aktivität zuständig^[40, 41]. Die azidophile *Polo-like Kinase 2* (PLK2) ist in der Lage ADAM17 am Serin794 in der CD zu phosphorylieren, was zu einem erhöhten *Shedding* von pro-TNF α und TNF-Rezeptoren von der Zelloberfläche führt^[42]. Auf der anderen Seite wurde beschrieben, dass diese Domäne für die kurzzeitige Stimulation der

ADAM17-Aktivität vernachlässigt werden kann^[43, 44]. Andere Forschungsgruppen konnten außerdem zeigen, dass ADAM17-Varianten ohne CD weiterhin biologisch aktiv sind und Substrate *shedden* können^[38, 45].

1.1.2 REGULATION DER ADAM17-AKTIVITÄT

Bisher sind über 80 Substrate von ADAM17 identifiziert. Dazu zählen unter anderem Zytokine (z.B. TNF α) und ihre Rezeptoren (z.B. TNF-Rezeptor I und II, Interleukin 6 Rezeptor) sowie Wachstumsfaktoren (z.B. *Transforming Growth Factor α* , Amphiregulin) und Adhäsionsmoleküle (z.B. L-Selectin)^[5, 6, 46-49]. Aufgrund des breiten Substratspektrums und der Tatsache, dass ADAM17 ubiquitär exprimiert wird, ist diese Protease in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert. Die Prozesse umfassen zum Beispiel Regeneration, Differenzierung, Immunität, (chronische) Inflammation oder Krebs. Aus diesem Grund ist eine strikte Regulation der Funktion von ADAM17 notwendig.

Transgene Mäuse, die ADAM17 überexprimieren, zeigten zwar eine erhöhte Proteinexpression, jedoch keine gesteigerte ADAM17-*Shedding*-Aktivität^[50]. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Aktivität hauptsächlich über posttranskriptionale Prozesse stattfindet (Abbildung 1.2).

Regulation an der Zellmembran

Die Aktivität von ADAM17 kann unterteilt werden in konstitutive und stimulierte, proteolytische Aktivität^[32, 51, 52]. In beiden Fällen handelt es sich um irreversibles *Shedding* von Substraten, wobei letzteres induziert werden muss. Es wurde gezeigt, dass die katalytische Domäne von ADAM17 permanent in der Lage ist, lösliche Substrate konstitutiv abzuspalten. Ein lösliches, fluorogenes Substrat wurde auch unter unstimulierten Bedingungen gespalten^[51, 52]. Im Gegensatz dazu ist für die Prozessierung von membranständigen Substraten jedoch eine Aktivierung und Konformationsänderung von ADAM17 notwendig. Erfolgt eine Stimulation der Zellen durch natürliche Substanzen wie Lipopolysaccharide (LPS) oder unphysiologische Substanzen wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), kommt es zu einer Umlagerung von Phosphatidylserinen in der Zellmembran. Im unstimulierten Zustand befinden sich diese negativ geladenen Moleküle auf der intrazellulären Seite der Zellmembran. Nach der Stimulation katalysieren *Scramblasen* die Umlagerung der Phosphatidylserine von innen nach außen. Hier bindet daraufhin das positiv geladene RKGK-Motiv der offenen, flexiblen Membran-proximalen Domäne von ADAM17 an die negativ geladenen Phosphatidylserine (Abbildung 1.2). Die katalytische Domäne von ADAM17 ist nun dicht an der Zellmembran lokalisiert und kann dort membranständige Substrate *shedden*^[32, 51-53].

Nur ein Teil des gesamten ADAM17 einer Zelle befindet sich an der Zelloberfläche. Ein anderer Teil wird intrazellulär im rauen ER gelagert. Dieses gelangt nach Stimulation schnell an die Zelloberfläche. Dort kann es aber wieder internalisiert und lysosomal abgebaut werden^[54-57].

Weiterhin kann ADAM17 an der Zellmembran durch die Überführung von der offenen in die geschlossene Form inaktiviert werden. Diese Konformationsänderung wird dabei von Protein-Disulfid-Isomerasen katalysiert^[11].

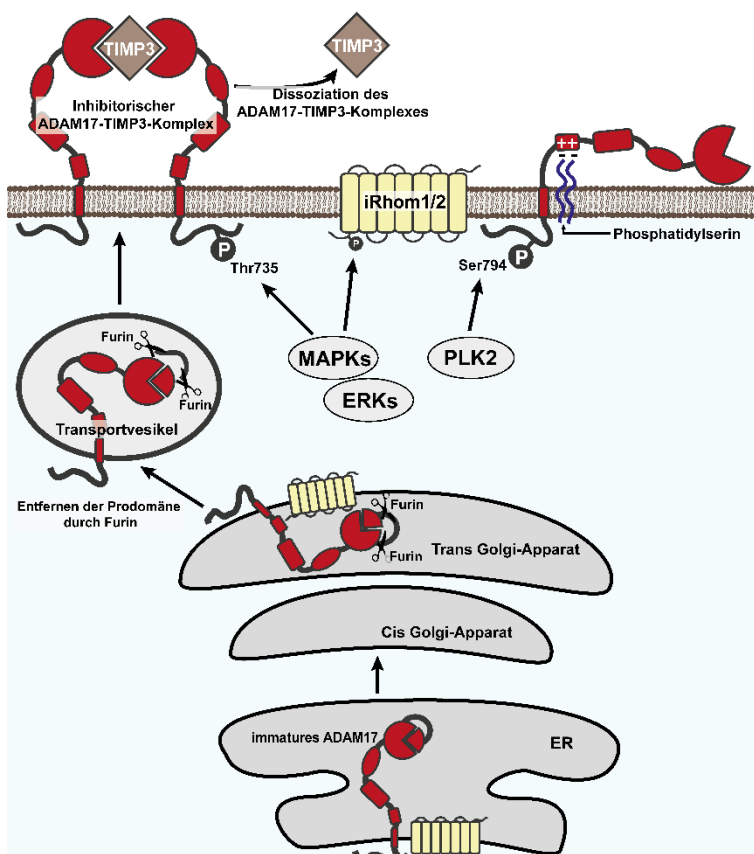


Abbildung 1.2: Maturierung und Regulation der ADAM17-Aktivität.

Die Prodomäne von ADAM17 hält die Protease während des Transports vom ER über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche in einem inaktiven Zustand und dient währenddessen als Chaperon. Die Abspaltung der Prodomäne erfolgt im Golgi-Apparat durch Proprotein Convertasen wie Furin. An der Zelloberfläche bindet der ADAM17-Inhibitor *Tissue Inhibitor of Metalloproteases 3* (TIMP3) an die katalytische Domäne von ADAM17-Dimeren und hält diese somit inaktiv. Bei der Aktivierung der Zelle wird ADAM17 durch MAPKs oder ERKs an Threonin735 phosphoryliert. Dies führt zu der Dissoziation des ADAM17-TIMP3-Komplexes. Das aktive Zentrum ist somit frei, wodurch ADAM17 Substrate spalten kann. Auch die Phosphorylierung des Serins an Position 794 durch die PLK2 aktiviert ADAM17. Die Pseudoproteasen iRhom1 und iRhom2 sind Interaktionspartner von ADAM17. Sie stabilisieren die Protease bereits während des Transports an die Zelloberfläche. Dort interagieren sie mit der cytoplasmatischen Domäne von ADAM17. Die iRhom-Proteine können wie ADAM17 durch MAPKs und ERKs phosphoryliert werden. Dies führt zu einer Verminderung der ADAM17-iRhom-Interaktion und zu einer Aktivierung von ADAM17. Weiter wird die Protease durch die Bindung des positiv-geladenen RKGK-Motivs der offenen Form der Membran-proximalen Domäne an die negativ geladenen Phosphatidylserine aktiviert. Diese werden im Zuge der Zellaktivierung durch *Scramblasen* von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran umgelagert. Adaptiert von Lambrecht *et al.*^[58].

Regulation durch Phosphorylierung und Dimerisierung

Mehrere Kinasen konnten die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 erhöhen, wobei vor allem die p38 MAPKs und die ERKs beschrieben wurden^[40, 41, 57, 59, 60]. Wie genau die Phosphorylierung von ADAM17 dessen Aktivität reguliert, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ADAM17 an Serin794 durch die PLK2 *Shedding*-Aktivität erhöht^[42]. Weiter führt die Phosphorylierung an Threonin735 zu einer Reduzierung der Dimerisierung von ADAM17^[41, 59]. Dieses wiederum aktiviert ADAM17 aufgrund der Dissoziation des TIMP3-ADAM17-Komplexes. *Tissue Inhibitor of Metalloproteases 3* (TIMP3) ist ein natürlich vorkommender und sehr wirksamer Inhibitor von Metzinkinen wie ADAM17^[61]. Er bindet mit einer hohen Affinität an die katalytische Domäne^[60, 62]. Dabei bevorzugt er jedoch ein ADAM17-Dimer an der Zelloberfläche, wodurch beide Proteasen des Dimers inhibiert werden^[41].

Regulation durch iRhoms

iRhoms sind inaktive Intramembran-Serin-Proteasen der Rhomboidfamilie, sogenannte Pseudo-Proteasen^[63]. In Säugetieren kommen iRhom1 und iRhom2 vor, wobei ihre Hauptaufgabe die Regulation der ADAM17-Aktivität zu sein scheint^[63, 64]. Ein *knock-out* dieser Pseudo-Proteasen zeigte, dass die ADAM17-Pro-Form bei Abwesenheit der iRhoms nicht aus dem ER transportiert wird^[65, 66]. Dadurch kann ADAM17 nicht zum Golgi-Apparat transportiert und dort durch Furin prozessiert werden. Dies wiederum führt dazu, dass matures ADAM17 nicht zur Zelloberfläche gelangt, um dort Substrate zu *shedden*. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Kürzlich wurden weitere Funktionen der iRhoms bei der Regulation von ADAM17 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass iRhom notwendig für die Stabilisation von ADAM17 ist. Eine Auflösung des Komplexes resultierte in einer erhöhten lysosomalen Degradation von maturem ADAM17^[67, 68]. Außerdem scheint der cytosomale N-Terminus von iRhom ebenfalls eine regulierende Rolle zu spielen. Dieser wird durch die Stimulation mit zum Beispiel PMA, einem bekannten Aktivator von ADAM17-*Shedding*, durch p38 MAPKs und ERKs phosphoryliert. Diese Kinasen phosphorylieren unter anderem auch die cytoplasmatische Domäne von ADAM17. Die Phosphorylierung von iRhom führt zu einer Rekrutierung von 14-3-3 Proteinen zum N-Terminus. Dies wiederum resultiert in einer verminderten Interaktion von iRhom und ADAM17 an der Zelloberfläche, wodurch schlussendlich ADAM17 aktiviert wird^[67, 68].

1.2 ADAM17: FUNKTIONEN IM IMMUNSYSTEM

Die Aufgabe des Immunsystems ist die Abwehr von Pathogenen, die in den Körper eingedrungen sind. Pathogene sind Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Hefen, Pilze oder andere körperfremde Substanzen. Nach dem Eindringen eines Pathogens in den Organismus spielt vor allem das angeborene Immunsystem eine zentrale Rolle. Es umfasst Leukozyten wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Mastzellen. Auch Phagozyten wie Makrophagen, neutrophile

Granulozyten und dendritische Zellen zählen zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Diese unterschiedlichen Zellen vermitteln die erste Immunantwort des Organismus mithilfe von sezernierten löslichen Zytokinen, Chemokinen und vasoaktiven Peptiden^[69]. Diese Entzündungsreaktion, auch Inflammation genannt, ist ein stark regulierter Prozess, in dem auch ADAM17 eine entscheidende Rolle spielt. ADAM17 spaltet und aktiviert dadurch Zytokine und deren Rezeptoren wie z.B. TNF α und dessen Rezeptoren TNF-Rezeptor I (TNFRI) und TNF-Rezeptor II (TNFRII)^[49]. Das Interleukin 6 (IL-6), das eine vergleichbar wichtige Rolle in der Inflammation spielt, wird durch ADAM17 reguliert, da der IL-6 Rezeptor (IL-6R) ebenfalls ein Substrat dieser Protease ist^[49].

Das Zytokin TNF α gehört der TNF/TNFR-Superfamilie an, die aus 19 Liganden und 29 Rezeptoren besteht^[70]. TNF α ist ein Typ II Transmembranprotein und wird als membrangebundene Pro-Form exprimiert. Um aktiv wirken zu können, muss es durch ADAM17 von der Zelloberfläche gespalten werden. Das lösliche TNF α kann über zwei Rezeptoren, TNFRI und TNFRII, wirken. Im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten TNFRI, wird der TNFRII zellspezifisch exprimiert. Er ist hauptsächlich auf Endothelzellen, Immunzellen und Neuronen zu finden^[71]. Obwohl beide Rezeptoren TNF α binden, unterscheiden sich die ausgelösten Signalkaskaden und Folgen sehr voneinander. Der TNFRI besitzt intrazellulär eine sogenannte *death domain*, die in der Lage ist Apoptose zu induzieren. Der TNFRII besitzt eine solche Domäne nicht^[72-74]. Obwohl membranständiges TNF α auch an die TNF-Rezeptoren binden kann, gehen die meisten pro-inflammatorischen Eigenschaften von der löslichen Form aus^[75]. Dabei ist ADAM17 diejenige Protease, die TNF α von der Zelloberfläche abspaltet. Aus diesem Grund wurde ADAM17 ursprünglich als *TNF α Converting Enzyme* (TACE) beschrieben^[5, 6].

Bei schweren Entzündungskrankheiten wie Sepsis wurden hohe Konzentrationen an löslichem TNF α im Blutserum gefunden^[76]. Dieses kann unter anderem von dessen ebenfalls *gespalteten* Rezeptoren TNFRI und TNFRII abgefangen werden. Dadurch können die löslichen Rezeptoren einen antagonistischen Effekt auf lösliches TNF α haben, der bereits für therapeutische Zwecke verwendet wurde^[71]. Das Fusionsprotein Etanercept besteht aus der extrazellulären Region des TNFRII und dem Fc-Teil des humanen IgG1-Antikörpers. Es bindet lösliches TNF α mit einer hohen Affinität und wurde für die Behandlung von rheumatoider Arthritis und Schuppenflechte zugelassen^[71]. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass die TNF-Rezeptoren durch eine Metalloprotease von der Zelloberfläche abgespalten werden^[77]. 2015 wurde schließlich ADAM17 als die Protease identifiziert, die TNFRI und TNFRII prozessiert^[78, 79]. Die Rezeptoren können aber auch membranständiges TNF α binden und dadurch das sogenannte *reverse signaling* auslösen^[80, 81]. Dieser Prozess gewährleistet unter anderem die Resistenz von Monozyten und Makrophagen gegenüber LPS-Stimulation, aktiviert p38 MAPK Signalwege und induziert Apoptose in primären Monozyten^[82-84].

Ein weiteres Zytokin, das eine zentrale Rolle in der Inflammation sowie im Immunsystem spielt, ist IL-6. Es besitzt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften^[85]. Diese werden durch die Art und Weise der Signalübertragung bestimmt. Bindet IL-6 bei dem sogenannten *classic signaling* an den membranständigen IL-6R, hat das regenerative und anti-inflammatorische Konsequenzen^[86, 87]. Diese Signalübertragung ist dabei an diejenigen Zelltypen gebunden, die den IL-6R exprimieren. IL-6R ist nur an der Zellmembran von Hepatozyten und einigen Leukozyten-Untergruppen zu finden. Das Binden von IL-6 an den löslichen Rezeptor wird *trans signaling* genannt und ist vom Zelltyp unabhängig, da für das Binden des IL-6/IL-6R-Komplexes nur ein membranständiges gp130-Homodimer notwendig ist. Das Glykoprotein gp130 wird ubiquitär von allen Zellen im Körper exprimiert. Dem *trans signaling* werden vor allem die pro-inflammatorischen Eigenschaften von IL-6 zugeschrieben^[88, 89]. Aus diesem Grund ist die Inhibierung der IL-6-Signalübertragung, vor allem des *trans signalings*, eine bemerkenswerte therapeutische Möglichkeit bei entzündlichen Erkrankungen^[86, 90].

Der entscheidende Schritt für die Einleitung der pro-inflammatorischen Funktionen von IL-6 ist die Generierung von löslichem IL-6R. Dies reduziert die Menge an membranständigem IL-6R und somit auch das *classic signaling*. Es stellt den löslichen IL-6R zur Verfügung, der für das *trans signaling* benötigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des löslichen IL-6R im menschlichen Körper durch ADAM17-vermitteltes *Shedding* generiert wird^[91]. Damit ist ADAM17 an dem Prozess des *trans signalings* beteiligt. Der restliche Anteil von löslichem IL-6R entsteht durch alternatives Splicing der IL-6R-mRNA^[91]. Dies resultiert in einer löslichen IL-6R-Form aufgrund des Fehlens der Transmembrandomäne^[92, 93]. ADAM17 stellt somit einen Schalter zwischen dem *classic signaling* und dem *trans signaling* dar, was wiederum die Eigenschaften der IL-6-Signalübertragung beeinflusst^[49].

1.3 ADAM17-ASSOZIIERTE KRANKHEITEN

ADAM17 ist durch die große Substratvielfalt an unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Aufgrund dessen wurde ADAM17 auch mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht. Diese umfassen unter anderem inflammatorische Krankheiten wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD), Schuppenflechte oder Lungenentzündung^[9]. Aber auch bei Krankheiten, die das zentrale Nervensystem betreffen, wie Alzheimer oder auch Multiple Sklerose, spielt ADAM17 eine Rolle^[9].

Die Bedeutung von ADAM17 für den Organismus zeigt sich besonders in *knock-out*-Mausmodellen. Ein vollständigen ADAM17-*knock-out* hat gezeigt, dass die Mäuse größtenteils nicht lebensfähig waren. Die Mehrheit der lebendig geborenen ADAM17-defizienten Mäuse starben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. Von 464 Mäusen überlebten nur sechs Tiere einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen. Dies zeigt deutlich, wie wichtig ADAM17 für den Organismus ist. Um weiterhin die Rolle von ADAM17 im Organismus zu erforschen, wurden konditionale *knock-out*-Mausmodelle etabliert^[94-103]. Dabei konnten unterschiedliche Phänotypen

beobachtet werden. Unter anderem zeigten Mäuse mit einem ADAM17-*knock-out* auf myeloiden Zellen eine Resistenz gegenüber einer LPS-induzierten Endotoxämie^[104].

Vor zehn Jahren konnte ein Mausmodell etabliert werden, in dem die Tiere ein drastisch reduziertes mRNA- und Proteinlevel von ADAM17 aufwiesen und trotzdem lebensfähig waren^[105]. Dieses hypomorphe Mausmodell wurde als ADAM17^{ex/ex} bezeichnet. Es wurde mithilfe der *EXon Induced Translational Stop* (EXITS)-Methode ein zusätzliches Exon, Exon 11a, eingefügt. Dieses enthält ein *in-frame* Stopp-Codon, was bei der Benutzung des Exons zu einem frühzeitigen Abbruch von ADAM17 führt. Dadurch konnte der mRNA- und Proteinspiegel von ADAM17 in allen Geweben auf 5% reduziert werden. In diesen Mäusen kann auf Proteinebene somit kaum oder gar kein ADAM17 detektiert werden. Ebenso zeigen die ADAM17^{ex/ex}-Mäuse ein stark reduziertes *Shedding* von ADAM17-Substraten von der Zelloberfläche. Weitere Merkmale des Phänotyps dieses Mausmodells sind Augen-, Herz- und Hautfehler aufgrund von eingeschränkter Signalübertragung über den *Epidermal Growth Factor* Rezeptor (EGF-R) sowie offene Augen bei der Geburt^[105]. Die Tiere waren auch wesentlich anfälliger für Atherosklerose und Darmentzündungen bei einer chemisch-induzierten Kolitis^[105, 106]. Weiterhin zeigten die Tiere eine reduzierte Regeneration des Darmgewebes^[105]. Im Gegensatz dazu waren die Tiere weniger anfällig gegenüber einer Nierenfibrose^[107].

Bisher wurden in der Literatur drei Patienten mit einer ADAM17-Defizienz beschrieben^[95, 108]. Die ersten beiden Patienten waren ein Geschwisterpaar, das dieselbe Mutation in ADAM17 besaß^[95]. Diese führte zu einem Aktivitätsverlust der Protease. Die Schwester verstarb im Alter von zwölf Jahren an einer mit dem Parvovirus B19 assoziierten Herzmuskelentzündung (Myokarditis). Bei ihrem Bruder wurde eine leichte Kardiomyopathie diagnostiziert. Beide Patienten zeigten neonatale entzündliche Haut- und Darmläsionen, bedingt durch eine autosomal rezessive Vererbung der *Adam17*-Mutation. Dem Bruder wurden im Alter von 17 Jahren mononukleäre Zellen des peripheren Blutes entnommen. Diese zeigten hohe Konzentrationen von Interleukin-1 β und IL-6 nach der Stimulation mit LPS, jedoch verringertes TNF α -*Shedding*. Trotz der immer wiederkehrenden Entzündungen der Haut hatte der Junge ein relativ normales Leben. Im Gegensatz dazu starb der dritte Patient im Alter von zwei Jahren an den Folgen seiner Erkrankung^[108]. Dieser Patient wies eine genetische ADAM17-Defizienz auf, durch die auch auf Proteinebene kein ADAM17 detektiert werden konnte. Der Junge war anfällig für bakterielle Infektionen und zeigte eine Hyper-Inflammation. Aus diesem Grund wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes isoliert und analysiert. Hier konnte eine verringerte Sekretion von Zytokinen nach LPS-Stimulation beobachtet werden. NK-Zellen des Patienten zeigten zudem einen ungewöhnlich hohen Spiegel an CD16. Dieses Protein ist ein Rezeptor, der von NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Er ist beteiligt an der Vermittlung von Phagozytose und der Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität^[69]. Die Abwesenheit von funktionalem ADAM17 hat also nicht nur im Mausmodell schwerwiegende Konsequenzen für die Gesundheit des Organismus.

1.3.1 DIE ROLLE VON ADAM17 IN DER KREBSERKRANKUNG

ADAM17 ist ebenfalls in die Entstehung und Progression von Krebs involviert. Es wurden in Tumorgeweben von unterschiedlichen Krebsarten wie Brust-, Hirn-, Darm-, Nieren-, Leber-, Lungen-, Eierstock-, Pankreas- und Prostatakrebs eine erhöhte ADAM17-mRNA- und Proteinexpression beschrieben^[109-117]. Bei Brustkrebs korrelierte die ADAM17-Expression sogar mit der Tumorinvasivität. Dabei konnte die Proliferation von Brustkrebs-Zelllinien mithilfe eines anti-ADAM17-Antikörpers inhibiert werden^[112]. Weiterhin hatten Patienten mit einer hohen ADAM17-Expression eine kürzere Überlebensrate, was wiederum darauf hindeutet, dass ADAM17 die Metastasierung fördert^[118].

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Tumorprogression durch die Mitwirkung von ADAM17 an unterschiedlichen zellulären Prozessen begünstigt wird. Zu den Substraten von ADAM17 gehören Adhäsionsmoleküle wie L-Selectin, CD44, E-Cadherin oder auch N-Cadherin. Werden diese von der Zelloberfläche abgespalten, kann das Auswirkungen auf Zell-Zell-Interaktionen, Zellmigration und auch Signalübertragung haben. Unter anderem ist ADAM17 an der Signalübertragung durch den EGF-Rezeptor beteiligt. Der Rezeptor sowie einige seiner Liganden (z.B. *Transforming Growth Factor α* (TGF α), Epiregulin, Amphiregulin) sind ebenfalls Substrate von ADAM17. Es wurde bereits beschrieben, dass die Signalübertragung durch die ErbB-Familie, zu der auch EGF-R gehört, am Wachstum unterschiedlicher Tumore beteiligt ist^[119, 120]. Die Aktivierung des EGF-Rs und die daraus resultierende Signalübertragung durch *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Proteinen führt zu einer Induktion der Transkription von Genen, die in Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Angiogenese und Zellfortbestand involviert sind^[121]. Eine Dysregulierung dieser Prozesse aufgrund von gestörten EGF-R-Signalwegen kann zu einer gesteigerten Zellproliferation und zum Umgehen von Apoptose führen. Beide Prozesse sind Kennzeichen von Krebszellen^[122, 123].

ADAM17 und Darmkrebs

Der weltweit dritthäufigste Krebs und Verursacher der häufigsten Krebsbedingten Todesfälle betrifft den Dickdarm^[124]. Das Darmgewebe ist aufgrund seiner ständigen Erneuerung sehr anfällig für die Entstehung von Tumoren. In den Vertiefungen des Darmepithels, den sogenannten Krypten, befinden sich Stammzellen. Diese teilen sich, differenzieren in unterschiedliche Darmepithelzellen und wandern währenddessen von der Krypta zum Villus hinauf. Dies dauert etwa 14 Tage und endet mit der Apoptose der Epithelzellen^[125, 126]. Der Prozess wird unter anderem über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert^[124]. Kommt es aufgrund einer spontanen Mutation zu einer Dysregulation in einem der Signalwege, kann dies zu einer Hochregulation der Proliferation, Inaktivierung von Kontrollmechanismen und anschließend zur Bildung von Tumoren führen^[124, 127, 128].

Weiterhin spielen inflammatorische Signalwege, die über Zytokine vermittelt werden eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese und begünstigen die maligne Zellproliferation sowie Metastasierung^[129]. So konnte unter anderem in mehreren Mausmodellen die Inflammation im Darmgewebe durch die Inhibierung des IL-6R *trans signalings* verhindert werden^[130, 131]. Weitere Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass ADAM17 über die Regulation dieser Signalübertragung an der Entstehung von Darmkrebs beteiligt ist (Abbildung 1.3). So konnte bereits gezeigt werden, dass das Blockieren des IL-6R *trans signalings* in Darmkrebs-Mausmodellen die Karzinogenese unterdrückt^[132]. Dies deutet darauf hin, dass das IL-6R *trans signaling* verantwortlich für das epitheliale Tumorwachstum ist. Da der IL-6R ein Substrat von ADAM17 ist und zunächst durch diese Protease von der Zelloberfläche abgespalten werden muss, ist ADAM17 ebenfalls in die Karzinogenese involviert. So wurde bereits in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten eine erhöhte Expression und Aktivität von ADAM17 detektiert^[133]. Weiterhin wurden Makrophagen in der Lamina Propria als Quelle des löslichen IL-6R identifiziert^[134]. Auch eine erhöhte Aktivität des EGF-Rs wird in Verbindung mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko gebracht^[135, 136]. So wurde beschrieben, dass in Krebspatienten EGF-R auf myeloiden Zellen in Darmtumoren exprimiert wird^[137]. Ebenso begünstigt der EGF-R auf myeloiden Zellen und nicht auf epithelialen Darmzellen die Tumorentstehung in einem chemisch-induziertem Darmkrebs-Mausmodell. Hierfür wurden die für die Entstehung von Darmtumoren anfälligen APC^{min/+}-Mäuse mit dem Mutagen Azoxymethan und Natrium-Dextransulfat (DSS) behandelt^[137]. Dies führt zur Entwicklung von inflammatorisch induzierten Tumoren im Darmgewebe^[132].

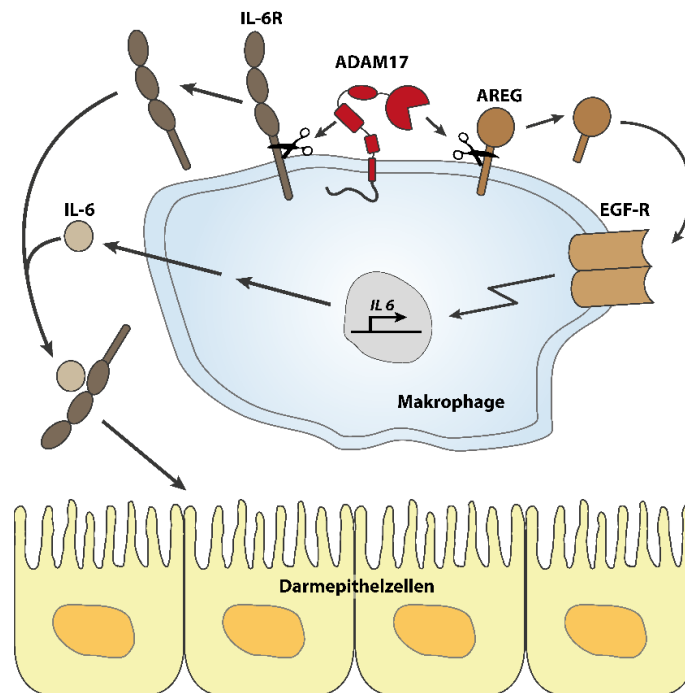


Abbildung 1.3: Die Rolle von ADAM17 bei der Darmkrebsentstehung.

Im Falle einer Inflammation spaltet ADAM17 membranständiges Amphiregulin (AREG), ein Ligand des *Epidermal Growth Factor* Rezeptor (EGF-R), von der Zelloberfläche von Makrophagen. Das lösliche AREG bindet an den EGF-R und aktiviert diesen, was wiederum zu einer Erhöhung der IL-6-Synthese auf Transkriptionsebene führt. Weiterhin spaltet ADAM17 unter inflammatorischen Bedingungen den membranständigen IL-6R von der Zelloberfläche von Makrophagen. Das hat die Generierung von löslichem IL-6R zur Folge, der mit dem sezernierten IL-6 einen Komplex bilden kann. Der Komplex bindet an gp130-Homodimere an der Oberfläche von Darmepithelzellen und stimuliert diese. Dadurch kann das IL-6 *trans signaling* zur Entstehung von Darmkrebs beitragen. Adaptiert nach Schumacher und Rose-John^[138].

Die Aktivierung des EGF-Rs führt zu einer erhöhten Synthese und Sezernierung von IL-6 (Abbildung 1.3)^[137]. Dabei kann der EGF-R durch Liganden wie Amphiregulin (AREG) aktiviert werden^[139]. Dieses Protein wird in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten verstärkt exprimiert^[140]. Versuche in APC^{min/+}-Mäusen, einem etablierten Darmkrebs-Mausmodell, unterstützen die Hypothese, dass ADAM17 über das IL-6R *trans signaling* in die Entstehung von Darmkrebs involviert ist. Die APC^{min/+}-Mäuse besitzen eine heterozygote Mutation im APC-Gen, einem Tumorsuppressorgen. Bei diesen Tieren kommt es zum Verlust des wildtypischen APC-Allels, was zu einer APC-Defizienz und somit zu einem konstitutiv aktiven Wnt/ β -Catenin-Signalweg führt^[135, 141]. Dies hat wiederum ein unkontrolliertes Zellwachstum und spontane Bildung von Tumoren im Darm zur Folge. In aktuellen Versuchen wurde dieses Mausmodell mit den ADAM17-defizienten ADAM17^{ex/ex}-Mäusen gekreuzt^[135]. Dabei zeigten die Mäuse bei Abwesenheit von ADAM17 eine drastisch reduzierte Tumormast. Weiterhin konnten in diesen Tieren nicht nur weniger Tumore detektiert werden, sondern auch die wenigen Tumore der Klasse der geringfügigen Dysplasien zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere mit ADAM17 Tumore der Klasse hochgradiger Dysplasien und Karzinome^[135].

1.4 ZIELSETZUNG

Die Metalloprotease ADAM17 ist aufgrund ihrer Substratvielfalt in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert, weswegen eine strikte Regulation dieses Proteins notwendig ist. Jedoch ist die posttranskriptionale Prozessierung, Maturierung und somit die Funktion der Metalloprotease ADAM17 bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb, weitere Erkenntnisse zu dieser Thematik zu erlangen.

Zunächst soll die Regulation von ADAM17 anhand von Prozessierung durch Furin und Phosphorylierung analysiert werden. Dafür werden funktionale ADAM17-Varianten generiert und in unterschiedlichen Zellsystemen charakterisiert. Diese erfolgt zunächst in ADAM17-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (mEF) sowie in ADAM10- und ADAM17-defizienten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK). ADAM17 spielt durch das *Shedden* von Zytokinen und deren Rezeptoren (z.B. TNF α , TNFR1, TNFR2 und IL-6R) auch in inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle. Aufgrund dessen sollte die posttranskriptionale Prozessierung von ADAM17 auch in einem physiologischen Zellsystem untersucht werden. Das Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem basiert auf immortalisierten Immunzellen, die in Makrophagen-ähnliche und dendritische Zellen-ähnliche Zellen differenziert werden können. Dieses Zellsystem soll auf einem ADAM17-defizienten Hintergrund etabliert und für die funktionale Charakterisierung der ADAM17-Varianten verwendet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Krankheits-assoziierten ADAM17-Mutationen. Hier soll vor allem der Zusammenhang von ADAM17 und Darmkrebs fokussiert werden. Darmkrebs ist eine der häufigsten Krebserkrankungen und wird mit einer erhöhten Expression des *Epidermal Growth Factor* Rezeptor (EGF-R) in Verbindung gebracht. Der EGF-R sowie viele seiner Liganden sind ADAM17-Substrate. Es wurde weiterhin eine erhöhte Expression und Aktivität von ADAM17 in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten beschrieben. Der Zusammenhang von ADAM17 und Darmkrebs ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Aus diesem Grund sollen Mutationen, die in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten beschrieben wurden, analysiert werden. Die Charakterisierung der generierten ADAM17-Varianten erfolgt dabei in ADAM10- und ADAM17-defizienten HEK-Zellen.

Ebenfalls soll die kürzlich in einem Patienten detektierte ADAM17-Mutation D232H funktional untersucht und charakterisiert werden. Dazu steht zum einen das ADAM10- und ADAM17-defiziente HEK-Zellsystem und zum anderen das zuvor etablierte Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem zur Verfügung. Erkenntnisse aus diesen Versuchen sollen dazu beitragen die Regulation und Funktion der ADAM17-Protease in pathologischen Prozessen besser zu verstehen und eventuelle therapeutische Ansätze zu finden.

2 MATERIAL

2.1 ANTIBIOTIKA

Tabelle 2.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Stockkonzentration
Ampicillin	Carl Roth	100 µg/mL
Kanamycin	Carl Roth	50 mg/mL
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories	100 U/mL / 100 µg/mL
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	1 mg/mL
Zeocin	Thermo Fisher Scientific Inc.	100 mg/mL

2.2 ANTIKÖRPER

2.2.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER

Tabelle 2.2: Verwendete primäre Antikörper

Name	Beschreibung und Verdünnung	Hersteller
Anti-ADAM10	Monoklonaler Antikörper gegen eine Sequenz im C-Terminus von humanem ADAM10, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	abcam (ab124695)
Anti-ADAM17	Polyklonaler Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von ADAM17, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T IP: 1:500	abcam (ab39162)
Anti-ADAM17 10.1	Polyklonaler Antikörper gegen die Peptidsequenz CEVKPGRHFNMAKSFPNEEK im extrazellulären Teil von murinem ADAM17, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T FACS: 1:100 verdünnt in FACS-Puffer IF: 1:100 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	Pineda (eigene Herstellung)

Name	Beschreibung und Verdünnung	Hersteller
Anti-ADAM17 18.2	Polyklonaler Antikörper gegen die Peptidsequenz RLQALQPAAMMPPVSAAPKL in der cytoplasmatischen Domäne von murinem ADAM17, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Pineda (eigene Herstellung)
Anti-ADAM17 A300D	Monoklonaler Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne in humanem ADAM17, produziert in Mäusen WB: 1:500 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Trad <i>et al.</i> ^[142] (zur Verfügung gestellt)
Anti-ADAM17 A300E	Monoklonaler Antikörper gegen Cysteinreiche Verlängerung der Membran-proximalen Domäne in humanem ADAM17, produziert in Mäusen IF: 1:50 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	Yamamoto <i>et al.</i> ^[143] (zur Verfügung gestellt)
Anti-ERp57	Monoklonaler Antikörper gegen die humane Protein-Disulfid-Isomerase ER-p57, produziert in Mäusen IF: 1:100 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	abcam (ab13506)
Anti-GAPDH	Monoklonaler Antikörper gegen eine Peptidsequenz nahe dem C-Terminus des humanen GAPDH, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Cell Signalling (2118)
Anti-GM130	Monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus humanes GM130, produziert in Kaninchen IF: 1:100 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	abcam (EP892Y)
Anti-IL-6R C#1	Polyklonaler Antikörper gegen die intrazelluläre Peptidsequenz RDAQSPYDNSNRDYLFPFR des murinen IL-6 Rezeptors, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Pineda (eigene Herstellung)
Anti-KDEL	Monoklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 649 bis 654 (S ⁶⁴⁹ EKDEL ⁶⁵⁴) des Proteins Grp78 aus der Ratte, Klon 10C3, produziert in Mäusen IF: 1:100 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	Enzo (ADI-SPA-827-D)

Name	Beschreibung und Verdünnung	Hersteller
Anti-myc	Monoklonaler Antikörper gegen das Epitop EQKLISEEDLN, Klon 9B11, produziert in Mäusen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T IF: 1:250 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	Cell Signalling (2276)
Anti-PDIA6	Polyklonaler Antikörper gegen die Peptidsequenz DIDLSDVELDDLGKDEL des humanen PDIA6 Proteins, produziert in Kaninchen IF: 1:750 verdünnt in IF <i>Blocking</i> Puffer	abcam (ab11432)
Anti-TNFRII	Monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des TNF-Rezeptors II, produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	abcam (ab221921)
Anti-TNF α	Polyklonaler Antikörper gegen den intrazellulären Teil von murinem TNF α , produziert in Kaninchen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Pineda (eigene Herstellung)
Anti- β -Aktin	Monoklonaler Antikörper gegen β -Aktin, Klon AC-15, produziert in Mäusen WB: 1:1.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Sigma-Aldrich (A5441)

2.2.2 KONJUGIERTE PRIMÄRANTIKÖRPER

Tabelle 2.3: Verwendete konjugierte primäre Antikörper

Name	Beschreibung und Verdünnung	Hersteller
APC anti-mouse F4/80	Monoklonaler Antikörper gegen murines F4/80, konjugiert mit APC, produziert in Ratten Klon BM8	Biolegend (123115)
APC/Fire anti-mouse MHCII	Monoklonaler Antikörper gegen murines MHCII, produziert in Ratten Klon M5/114.15.2	Biolegend (107651)
Brilliant Violet 421 anti-mouse CD115	Monoklonaler Antikörper gegen murines CD115, konjugiert mit Brilliant Violet 421, produziert in Ratten Klon AFS98	Biolegend (135513)

Brilliant Violet 510 anti-mouse CD45	Monoklonaler Antikörper gegen murines CD45, konjugiert mit Brilliant Violet 510, produziert in Ratten Klon 30-F11	Biolegend (103137)
FITC anti-mouse CD11c	Monoklonaler Antikörper gegen murines CD11c, konjugiert mit FITC, produziert in Hamstern Klon N418	Biolegend (117305)
PE anti-mouse CD11b	Monoklonaler Antikörper gegen murines CD11b, konjugiert mit PE, produziert in Ratten Klon M1/70	BD Bioscience (553311)
PE/Cy7 anti-mouse CD206	Monoklonaler Antikörper gegen murines CD206, konjugiert mit PE/Cy7, produziert in Ratten Klon C068C2	Biolegend (141719)

2.2.3 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Tabelle 2.4: Verwendete sekundäre Antikörper

Name	Beschreibung und Verdünnung	Hersteller
Donkey-anti-rabbit IgG AlexaFluor 488	Polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG, konjugiert mit AlexaFluor 488, produziert in Eseln FC: 1:100 verdünnt in FACS-Puffer	Thermo Fisher Scientific (A-21206)
Goat anti-mouse IgG HRP	Polyklonaler Antikörper gegen murines IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), produziert in Ziegen WB: 1:10.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Dianova (115-035-068)
Goat anti-rabbit IgG HRP	Polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG, konjugiert mit HRP, produziert in Ziegen WB: 1:10.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	Dianova (111-035-003)
Goat-anti-mouse IgG AlexaFluor 594	Polyklonaler Antikörper gegen murines IgG, konjugiert mit AlexaFluor 594, produziert in Ziegen IF: 1:500 verdünnt in IF Blocking Puffer	Thermo Fisher Scientific (A-11032)

Name	Beschreibung und Verdünnung	Hersteller
Goat-anti-rabbit IgG AlexaFluor 488	Polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG, konjugiert mit AlexaFluor 488, produziert in Ziegen IF: 1:500 verdünnt in IF Blocking Puffer	Thermo Fisher Scientific (A-11008)
IRDye 680RD Goat-anti-mouse IgG	Polyklonaler Antikörper gegen murines IgG, konjugiert mit IRDye 680RD, produziert in Ziegen WB: 1:5.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	LI-COR (926-68070)
IRDye 800CW Donkey-anti-rabbit IgG	Polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG, konjugiert mit IRDye 800CW, produziert in Eseln WB: 1:5.000 verdünnt in Odyssey/TBS-T	LI-COR (926-32213)

2.3 CHEMIKALIEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entweder von der Firma *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe) oder *Sigma-Aldrich* (Darmstadt) bezogen.

2.4 COMPUTER-SOFTWARE

Tabelle 2.5: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS6	Adobe Inc.
Adobe Photoshop CS6	Adobe Inc.
DNASTAR	DNASTAR Inc.
EndNote X7	Clarivate Analytics
FlowJo V10-CL	BD Bioscience
FluoView 4.2	Olympus
GraphPad PRISM 6	GraphPad Software Inc
ImageStudio 3.1	LI-COR
MS Office 2016	Microsoft Corporation
SerialCloner 2.6.1	Serial Basics

2.5 ENZYME

Die verwendeten Enzyme (Restriktionsenzyme, Polymerasen usw.) wurden bei der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham) oder *New England Biolabs* (Frankfurt am Main) geordert.

2.6 GRÖßENSTANDARD

Für die SDS-PAGE wurde der Größenstandard *PageRuler Plus* (26619) von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham) verwendet. Die Größenstandard *GeneRuler 100bp* (SM0242) und *GeneRuler 1 Kb Plus* (SM1332) für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ebenfalls bei *Thermo Fisher Scientific* (Waltham) geordert.

2.7 KITS

Nachfolgend sind die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Kits gelistet:

Tabelle 2.6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller und Bestellnummer
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (K0692)
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (K0502)
IL-6 Mouse Uncoated ELISA KIT	Invitrogen (88-7064-88)
Mouse Amphiregulin DuoSet ELISA	R&D Systems (DY989)
Mouse IL-6R alpha DuoSet ELISA	R&D Systems (DY1830)
Mouse sTNF RII/TNFRSF1B DuoSet ELISA	R&D Systems (DY426)
NucleoBond Xtra Maxi Kit	MACHERY-NAGEL (740410.100)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (23225)
TNF alpha Mouse Uncoated ELISA Kit	Invitrogen (88-7324-88)
Retro-X Concentrator	Clontech Laboratories (631455)

2.8 PLASMIDE

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 2.7 genannten Plasmide zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden Plasmide selbst hergestellt (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung und Quelle
pcDNA3.1_LV	Expressionsvektor für die Transfektion von Säugetierzellen. Besitzt Resistenzgene für die Selektion mit Ampicillin.
pcDNA3.1_mADAM17- Δ 700	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante Δ 700 des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch die Aminosäuren 700 bis 827 deletiert wurden. Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).
pcDNA3.1_mADAM17- Δ Pro	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante Δ Pro des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch die Aminosäuren 18 bis 214 deletiert wurden. Nach dem Signalpeptid wurde ein Strep-Tag eingefügt. Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).
pcDNA3.1_mADAM17-RVNG-ds	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante RVNG ds des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde Lysin an Position 213 zu Asparagin und Arginin an Position 214 zu Glycin mutiert. Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).
pcDNA3.1_mADAM17-S794A	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante S794A des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Serin an Position 794 durch Alanin ersetzt wurde. Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

Name	Beschreibung und Quelle
pcDNA3.1_mADAM17-wt	<p>Expressionsvektor, dessen Insert für den Wildtyp des murinen ADAM17 codiert.</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris-Rissmann (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).</p>
pcDNA3.1_mIL-6R	<p>Expressionsvektor, dessen Insert für den murinen IL-6-Rezeptor codiert.</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris-Rissmann (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).</p>
pcDNA3.1_mpro-TNF α	<p>Expressionsvektor, dessen Insert für murines pro-TNFα codiert.</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris-Rissmann (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).</p>
pCMV3_SP-myc-mAREG	<p>Expressionsvektor, dessen Insert für murines Amphiregulin mit einem N-terminalem Myc-Tag codiert.</p> <p>Erworben bei der Firma <i>Sino Biological Europe GmbH</i> (Eschborn).</p>
pMXs_IZ_LV	<p>Retroviraler Vektor für die Transduktion von Säugetierzellen. Besitzt Resistenzgene für die Selektion mit Ampicillin und Zeocin.</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).</p>
pMXs_IZ_mADAM17- Δ 700	<p>Retroviraler Vektor, dessen Insert für die Variante Δ700 des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch die Aminosäuren 700 bis 827 deletiert wurden.</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).</p>
pMXs_IZ_mADAM17-RVNG-ds	<p>Retroviraler Vektor, dessen Insert für die Variante RVNG ds des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde Lysin an Position 213 zu Asparagin und Arginin an Position 214 zu Glycin mutiert. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).</p>

Name	Beschreibung und Quelle
pMXs_IZ_mADAM17-S794A	Retroviraler Vektor, dessen Insert für die Variante S794A des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Serin an Position 794 durch Alanin ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt. Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeanette Schwarz (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).
pMXs_IZ_mADAM17-wt-myc	Retroviraler Vektor, dessen Insert für den Wildtyp des murinen ADAM17 codiert. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt. Zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris-Rissmann (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

Tabelle 2.8: Hergestellte Plasmide

Name	Beschreibung
pcDNA3.1_mADAM17-D232H	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante D232H des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Asparaginsäure an Position 232 durch Histidin ersetzt wurde.
pcDNA3.1_mADAM17-D232H-myc	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante D232H des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Asparaginsäure an Position 232 durch Histidin ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.
pcDNA3.1_mADAM17-D616N-myc	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante D616N des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Asparaginsäure an Position 616 durch Asparagin ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.

Name	Beschreibung
pcDNA3.1_mADAM17-D657A-myc	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante D657A des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Asparaginsäure an Position 657 durch Alanin ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.
pcDNA3.1_mADAM17-E319G	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante E319G des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Glutaminsäure an Position 319 durch Glycin ersetzt wurde.
pcDNA3.1_mADAM17-E406X	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante E406X des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch die Aminosäuren 406 bis 827 deletiert wurden.
pcDNA3.1_mADAM17-M435I	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante M435I des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Methionin an Position 435 durch Isoleucin ersetzt wurde.
pcDNA3.1_mADAM17-P471Q	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante P417Q des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Prolin an Position 471 durch Glutamin ersetzt wurde.
pcDNA3.1_mADAM17-R177C-myc	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante R177C des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Arginin an Position 177 durch Cystein ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.
pcDNA3.1_mADAM17-R725H-myc	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante R725H des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Arginin an Position 725 durch Histidin ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.
pcDNA3.1_mADAM17-RVNG-us	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante RVNG us des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde Lysin an Position 57 zu Valin, Arginin an Position 58 zu Asparagin und Asparaginsäure an Position 59 zu Glycin mutiert.

Name	Beschreibung
pcDNA3.1_mADAM17-W111X	Expressionsvektor, dessen Insert für die Variante W111X des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch die Aminosäuren 111 bis 827 deletiert wurden.
pcDNA3.1_mADAM17-wt-myc	Expressionsvektor, dessen Insert für den Wildtyp des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde C-terminal ein Myc-Tag angehängt.
pMXs_IZ_mADAM17-D232H-myc	Retroviraler Vektor, dessen Insert für die Variante D232H des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation eingefügt, wodurch Asparagin an Position 232 durch Histidin ersetzt wurde. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.
pMXs_IZ_mADAM17-RVNG-us	Retroviraler Vektor, dessen Insert für die Variante RVNG us des murinen ADAM17 codiert. Mittels Mutagenese-PCR wurde Lysin an Position 57 zu Valin, Arginin an Position 58 zu Asparagin und Asparaginsäure an Position 59 zu Glycin mutiert. Am C-Terminus wurde ein Myc-Tag angehängt.

2.9 PRIMER

2.9.1 MUTAGENESE-PRIMER

Die verwendeten Mutagenese-Primer wurden auf Grundlage von murinem *Adam17* designt und von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert.

Tabelle 2.9: Verwendete Mutagenese Primer

Name	Sequenz (5' nach 3')
W111X <i>for</i>	AAAGCGAGTACAGCGTGAAGTAGCAGGACTTCTTCAGTGGTC
W111X <i>rev</i>	GACCACTGAAGAAGTCCTGCTACTTCACGCTGTACTIONGCTTT
R177C <i>for</i>	TCTGAAGATATCAAGGATTTTTTCATGTTTGCAGTCTCCAAAAGTATG
R177C <i>rev</i>	CATACTTTTGGGAGACTGCAAACATGAAAAATCCTTGATATCTTCAGA
E319G <i>for</i>	TGGGATGTGAAGATGCTATTAGGGCAATTTAGCTTTGATATAGCTG
E319G <i>rev</i>	CAGCTATATCAAAGCTAAATTGCCCTAATAGCATCTTCACATCCCA
E406X <i>for</i>	GCTGACCTGGTTACAACCTATTAATTGGGACATAATTTTGGAGCAG
E406X <i>rev</i>	CTGCTCCAAAATTATGTCCCAATTAATGAGTTGTAACCAGGTCAGC

Name	Sequenz (5' nach 3')
P417Q <i>for</i>	ATAATTTTGGAGCAGAACATGATCAGGATGGTCTAGCAGAATGTGCC
P417Q <i>rev</i>	GGCACATTCTGCTAGACCATCCTGATCATGTTCTGCTCCAAAATTAT
M435I <i>for</i>	ACCAAGGAGGAAAGTATGTCATATATCCCATAGCTGTGAGCGG
M435I <i>rev</i>	CCGCTCACAGCTATGGGATATATGACATACTTTCCTCCTTGGT
D616N <i>for</i>	CCCGTGTGTGCCGTACGTCAATGCAGAGCAAAGAAGACTTGTTT
D616N <i>rev</i>	AAACAAGTTCTTTTGGCTCTGCATTGACGTACGGCACACACGGG
D657A <i>for</i>	GAGCGATTTTGGGATTTTCATTGCCAGCTGAGCATCAACACTTT
D657A <i>rev</i>	AAAGTGTGATGCTCAGCTGGGCAATGAAATCCCAAATCGCTC
R725H <i>for</i>	GCATGGACTCAGCATCTGTTCCATCATCAAGCCCTTTCCTGC
R725H <i>rev</i>	GCAGGAAAGGGCTTGATGATGTGAACAGATGCTGAGTCCATGC
RVNG <i>us for</i>	CTAATATTCAGCAGCACTCCATAAGGGTAAACGGTCTACAGTCTGCGA CACACTTAG
RVNG <i>us rev</i>	CTAAGTGTGTCGCAGACTGTAGACCGTTTACCCTTATGGAGTGCTGCT GAATATTAG
D232H <i>for</i>	CTTGTAATAACTGGTGGTAGCACATCATCGATTTTATAAATACATGGG
D232H <i>rev</i>	CCCATGTATTTATAAAATCGATGATGTGCTACCACCAGTAATTTACAAG

2.9.2 SEQUENZIERUNGSPRIMER

Die zur Sequenzierung von murinem *Adam17* verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert. Weiterhin wurde der Primer CMV *forward* der Firma GATC Biotech/Eurofins verwendet (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.10: Verwendete Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5' nach 3')
ADAM17 1 <i>for</i>	CTTGTAATAACTGGTG
ADAM17 2 <i>for</i>	TAATAAGATGTTTTCAA
ADAM17 3 <i>for</i>	TTCTGGCAGATAACATC
ADAM17 1 <i>rev</i>	TCTTTCCCGTCCACCAC
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

2.10 PUFFER UND LÖSUNGEN

2.10.1 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Tabelle 2.11: Verwendete Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Name	Konzentration	Komponente
TBE (0,5 x)	44,5 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA pH 8,0
	44,5 mM	Tris-HCl
Agarosegele	0,5 x	TBE
	1 % (w/v)	Agarose
	0,002 % (v/v)	Ethidiumbromid

2.10.2 BIOTINYLIERUNG

Tabelle 2.12: Verwendete Puffer und Lösungen für die Biotinylierung

Name	Konzentration	Komponente
Lysispuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 % (w/v)	SDS
	1 x	<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>
NHS-Sulfo-Biotin-Lösung	1 x	PBS-CM
	1 mg/mL	NHS-Sulfo-Biotin
PBS (1 x)	135 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	9,2 mM	Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-CM	1 x	PBS
	0,1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
Quenching Puffer	1 x	PBS-CM
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0

2.10.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG

Tabelle 2.13: Verwendete Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrische Messung

Name	Konzentration	Komponente
FACS <i>Blocking</i> Puffer	1 x	PBS
	5 % (w/v)	BSA
	1 % (v/v)	Fc Block Maus
FACS-Puffer	1 x	PBS
	5 % (w/v)	BSA

2.10.4 ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)

Tabelle 2.14: Verwendete Puffer und Lösungen für den ELISA

Name	Konzentration	Komponente
PBS (1 x)	150 mM	NaCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
	1,7 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
Stopplösung	1,8 M	H ₂ SO ₄
Waschpuffer (PBS-T)	1 x	PBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20

2.10.5 FURIN CLEAVAGE ASSAY

Tabelle 2.15: Verwendete Puffer und Lösungen für das Furin *Cleavage* Assay

Name	Konzentration	Komponente
Furin Assay Puffer	100 mM	HEPES
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol
	0,5 % (v/v)	Triton X-100

2.10.6 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Tabelle 2.16: Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Name	Konzentration	Komponente
IF <i>Blocking</i> Puffer	1 x	TBS
	0,3 % (v/v)	Triton X-100
	2 % (w/v)	BSA
	5 % (v/v)	Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)

Name	Konzentration	Komponente
TBS (1 x)	10 mM 150 mM	Tris-HCl pH 8,0 NaCl
TBS-Triton	1 x 0,3 % (v/v)	TBS Triton X-100

2.10.7 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Tabelle 2.17: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Name	Konzentration	Komponente
Lämmli Probenpuffer (5 x)	0,3 M 10 % (w/v) 50 % (v/v) 20 % (v/v) 5 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Sammelgel	1,7 mL 500 µL von 30 % 760 µL von 0,5 M 10 µL von 10 % 30 µL von 10 % 3 µL	Aq. dest. Polyacrylamidlösung Tris-HCl, pH 6,8 SDS APS TEMED
SDS Laufpuffer (1 x)	25 mM 192 mM 0,1 % (w/v)	Tris-HCl pH 8,3 Glycin SDS
Trenngel (10 %ig)	4 mL 3,3 mL von 30 % 2,5 mL von 1,5 M 100 µL von 10 % 100 µL von 10 % 4 µL	Aq. dest Polyacrylamidlösung Tris-HCl, pH 8,8 SDS APS TEMED
Trenngel (12 %ig)	3,3 mL 4 mL von 30 % 2,5 mL von 1,5 M 100 µL von 10 % 100 µL von 10 % 4 µL	Aq. dest Polyacrylamidlösung Tris-HCl, pH 8,8 SDS APS TEMED

2.10.8 WESTERN BLOT

Tabelle 2.18: Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot

Name	Konzentration	Komponente
Odyssey/TBS	0,5 x	Odyssey
	0,5 x	TBS
Odyssey/TBS-T	0,5 x	Odyssey
	0,5 x	TBS
	0,025 % (v/v)	Tween 20
<i>Stripping</i> Puffer	100 mM 30 mM pH 2,2	Glycin Magnesiumacetat
TBS (1 x)	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
TBS-T	1 x	TBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Transferpuffer	25 mM	Tris-HCl pH 8,3
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

2.10.9 ZELLYSE

Tabelle 2.19: Verwendete Puffer und Lösungen für die Zellyse

Name	Konzentration	Komponente
Lysispuffer (WB)	1 %	Triton X-100
	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	1,10-Phenanthrolin
	1 x	<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>
Lysispuffer (Aktivität im Zellysat)	1 % (v/v)	Triton X-100
	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	1,10-Phenanthrolin
	4 % (v/v)	Glycerin
	1 x	<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i> <i>EDTA-free</i>

2.11 ZELLKULTUR

2.11.1 ADHÄRENTE ZELLINIEN

Tabelle 2.20: Verwendete adhäre Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK293 wt	<i>Human Embryonic Kidney</i> Zellen, Immortalisierte embryonale Zelllinie aus der humanen Niere	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
HEK293 dKO	<i>Human Embryonic Kidney</i> Zellen, Immortalisierte embryonale Zelllinie aus der humanen Niere, ADAM10- und ADAM17-defizient	Riethmüller <i>et al.</i> 2016
EcoPack 2-293	HEK293 Zellen, transformiert mit dem Adenovirus Typ 5 DNA, exprimieren MMLV Gag, Pol und Env Proteine	Clontech
ADAM17 ^{wt/wt} -mEF	<i>murine Embryonic Fibroblasts</i> , immortalisierte murine embryonale Fibroblasten, isoliert aus ADAM17 ^{wt/wt} -Embryos (E13.5), immortalisiert mit dem großen T Antigen des SV40	Chalaris <i>et al.</i> 2010
ADAM17 ^{ex/ex} -mEF	<i>murine Embryonic Fibroblasts</i> , immortalisierte murine embryonale Fibroblasten, isoliert aus ADAM17 ^{ex/ex} -Embryos (E13.5), immortalisiert mit dem großen T Antigen des SV40	Chalaris <i>et al.</i> 2010

2.11.2 MAKROPHAGEN-VORLÄUFERZELLEN

Tabelle 2.21: Verwendete MØP Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Selektionsantibiotikum
MØP ^{wt/wt}	Primäre CD117-angereicherte Knochenmarkszellen aus ADAM17 ^{wt/wt} -Mäusen, immortalisiert mit einem Estradiol-abhängigen, HoxB8-exprimierenden Vektor	Puromycin
MØP ^{ex/ex}	Primäre CD117-angereicherte Knochenmarkszellen aus ADAM17 ^{ex/ex} -Mäusen, immortalisiert mit einem Estradiol-abhängigen, HoxB8-exprimierenden Vektor	Puromycin

MØP ^{ex/ex} + LV	Primäre CD117-angereicherte Knochenmarkszellen aus ADAM17 ^{ex/ex} -Mäusen, immortalisiert mit einem Estradiol-abhängigen, HoxB8-exprimierenden Vektor, stabil transduziert mit dem Leervektor	Zeocin
MØP ^{ex/ex} + ADAM17 wt	Primäre CD117-angereicherte Knochenmarkszellen aus ADAM17 ^{ex/ex} -Mäusen, immortalisiert mit einem Estradiol-abhängigen, HoxB8-exprimierenden Vektor, stabil transduziert mit murinen ADAM17-Varianten	Zeocin
MØP ^{ex/ex} + ADAM17 RVNG ds		
MØP ^{ex/ex} + ADAM17 RVNG us		
MØP ^{ex/ex} + ADAM17 S794A		
MØP ^{ex/ex} + ADAM17 Δ700		
MØP ^{ex/ex} + ADAM17 D232H		

2.12 ZELLKULTURMEDIEN

Tabelle 2.22: Verwendete Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
DMEM (+/+)	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/L), with Stable Glutamine</i> + 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertes FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
<i>Lysogeny-Broth (LB)-Medium</i>	Milipore Wasser + 1 % (w/v) Trypton + 0,5 % (w/v) NaCl + 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
<i>Lysogeny-Broth (LB)-Platten</i>	Milipore Wasser + 1 % (w/v) Trypton + 0,5 % (w/v) NaCl + 0,5 % (w/v) Hefeextrakt + 2 % Agar
RPMI (+/+)	<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640</i> + 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertes FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
MØP-Medium +Puromycin	RPMI (+/+) + 10 nM β-Estradiol + 10 ng/mL GM-CSF + 2 ng/mL Puromycin

Medium	Zusammensetzung
MØP-Medium +Zeocin	RPMI (+/+) + 10 nM β -Estradiol + 10 ng/mL GM-CSF + 100 ng/mL Zeocin
M-MØ-Medium	RPMI (+/+) + 20 ng/mL M-CSF
GM-MØ-Medium	RPMI (+/+) + 10 ng/mL GM-CSF

3 METHODEN

3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 MUTAGENESE-PCR

Mithilfe der Mutagenese-PCR wurde in die jeweilige *Template*-DNA eine Punktmutation eingeführt. Zunächst wurden entsprechende komplementäre *forward* und *reverse* Primer designt, die in Tabelle 3.1 aufgelistet sind. Der in Tabelle 3.1 aufgeführte Mix wurde auf Eis pipettiert.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung Mix für die Mutagenese-PCR

Komponente	Volumen
PCR-Wasser	30 μ L
5 x HF-Puffer	10 μ L
dNTPs (2 mM)	5 μ L
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	1 μ L
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	1 μ L
DNA (50 ng/ μ L)	1 μ L
DMSO	1,5 μ L
<i>Phusion High Fidelity DNA Polymerase</i>	0,5 μ L
gesamt	50 μ L

Die Reaktion erfolgte mit folgendem PCR-Programm:

Tabelle 3.2: Temperaturprogramm für die Mutagenese-PCR

Temperatur in $^{\circ}$ C	Zeit in sec	Anzahl der Zyklen
98	60	1
98	30	25
57	10	
72	550	
72	1.000	1

Im Anschluss wurde dem PCR-Mix 1 μL DpnI zugefügt, das die *Template*-DNA verdaute. Der verdaute PCR-Mix wurde nachfolgend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.1.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden Gele mit 1 % (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Als Größenstandard dienen je nach Größe des zu analysierenden Fragments *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* oder *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham). Die entsprechenden Fragmente wurde aus den Gelen geschnitten und mithilfe des *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham) aufgereinigt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

3.1.3 HITZESCHOCK-TRANSFORMATION IN CHEMISCH KOMPETENTE *E. COLI*

Für die Hitzeschock-Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue (*Agilent Technologies*, Santa Clara) verwendet. Zu 25 μL auf Eis aufgetauten *E. coli*-Zellen wurden 5 μL aufgereinigtes PCR-Produkt oder 2 μL aufgereinigtes Plasmid (für eine Re-Transformation) pipettiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C und 60 sec. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden 500 μL LB-Medium hinzugefügt und die Zellen erneut im Heizblock inkubiert (37°C, 1 h, 700 rpm). Anschließend wurden 30 – 100 μL der Zellsuspension auf LB-Agarplatten, versetzt mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 PLASMIDPRÄPARATION

Für die Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese oder für die Transfektion der HEK-Zellen wurde Plasmid-DNA benötigt. Um diese herzustellen wurden entweder 1,7 mL oder 150 mL LB-Medium, versetzt mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum, mit einer gepickten Kolonie angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C bei 700 rpm (Heizblock) oder 160 rpm (Schüttler) inkubiert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham) oder das *NucleoBond[®] Xtra Maxi Kit* (*Machery und Nagel*, Düren) verwendet. Es wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

3.1.5 DNA-SEQUENZIERUNG

Das erfolgreiche Einfügen der Punktmutation in *Adam17* mittels Mutagenese-PCR wurde überprüft. Dazu wurden 20 μL aufgereinigte Plasmid-DNA (100 ng/mL) von der Firma *GATC Biotech AG/Eurofins* (Konstanz) sequenziert. Es wurden ebenfalls je 20 μL der Sequenzierungsprimer (10 μM) mitgeschickt. Die Sequenzierungsdaten wurden mithilfe der Programme *DNASTAR* und *SerialCloner* ausgewertet.

3.2 ZELLKULTUR

3.2.1 ADHÄRENTE ZELLLINIEN

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adhärennten Zelllinien sind in Tabelle 2.20 gelistet und beschrieben. Die Zellen wurden in DMEM (+10 % fetales Kälberserum (FCS), +1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), (+/+)) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C im Brutschrank. Im Abstand von 2 bis 3 Tagen wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 mL Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 mL DMEM (+/+) gestoppt und die Zellen bei 1.000 x g und Raumtemperatur (RT) für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 mL DMEM (+/+) resuspendiert und 100 µL in eine neue 10-cm-Zellkulturschale mit 10 mL vorgelegtem DMEM (+/+) überführt.

3.2.1.1 STIMULATION MIT PHORBOL-12-MYRISTAT-13-ACETAT

Die Stimulation der adhärennten Zellen erfolgte 24 oder 48 h nach Transfektion. Die Zellen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit 200 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände und Zellen geerntet. Die Überstände wurden mittels ELISA analysiert (Kapitel 3.4.6).

3.2.2 MAKROPHAGEN-VORLÄUFER-ZELLEN

Die Herstellung der Makrophagen-Vorläufer-Zellen (MØP-Zellen) wurde bereits von Rosas *et al.* beschrieben^[144]. Nach diesem Protokoll wurden Knochenmarkszellen aus ADAM17^{wt/wt}- und ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isoliert. Diese wurden CD177 angereichert und mit einem retroviralen, HoxB8-exprimierenden Vektor transfiziert. Die Expression des *HoxB8*-Gens ist Estradiol-abhängig. In Estradiol-haltigem Medium bleiben die MØP-Zellen somit in ihrem Vorläuferstadium. Die MØP^{wt/wt}- und die MØP^{ex/ex}-Zellen wurden in RPMI-Medium mit β-Estradiol, GM-CSF und Puromycin kultiviert. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 2.22 gelistet.

Weiterhin wurden die MØP^{ex/ex}-Zellen mit verschiedenen murinen ADAM17-Varianten sowie mit dem Leervektor stabil transduziert (Tabelle 2.21). Diese MØP-Zellen enthielten nun eine Zeocin-Resistenz. Um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten, wurden diese Zellen in RPMI-Medium mit β-Estradiol, GM-CSF und Zeocin kultiviert (Tabelle 2.22).

Im Abstand von 2 Tagen wurden die MØP-Zellen passagiert. Dafür wurde die Zellkulturschale mit der Zellsuspension vorsichtig abgespült. Die Zellen wurden für 5 min bei 1.000 x g und RT zentrifugiert und anschließend in 1 mL frischem Medium resuspendiert. Danach wurden 100 µL in eine neue Zellkulturschale überführt und mit 10 mL frischem Medium verdünnt. Nach 20 Passagen wurden die MØP-Zellen verworfen und ein neues Aliquot aufgetaut.

3.2.2.1 DIFFERENZIERUNG DER MØP-ZELLEN

Für die Differenzierung der MØP-Zellen war es notwendig, das Estradiol zu entfernen. Dafür wurden die Zellen mehrfach mit RPMI-Medium (+10 % FCS, +1 % Pen/Strep) gewaschen und im jeweiligen Differenzierungsmedium (Tabelle 2.22) aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden pro Well einer 6-Well-Platte $3,5 \times 10^5$ Zellen für die Differenzierung zu M-MØ-Zellen ausgesät. Für die Differenzierung zu GM-MØ-Zellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte benötigt.

Im Abstand von je 2 Tagen erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Dabei wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 mL warmen PBS gewaschen und 2 mL frisches Differenzierungsmedium auf die Zellen pipettiert. Die Ernte der M-MØ-Zellen und Zellüberstände erfolgte 6 Tage nach Start der Differenzierung. Die GM-MØ-Zellen und Zellüberstände wurden an Tag 8 geerntet.

3.2.2.2 SHEDDING ASSAY

Die MØP-, M-MØ- oder GM-MØ-Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/mL}$ Lipopolysacchariden von *E. coli* O111:B4 (*Sigma-Aldrich, Merck KGaA*, Darmstadt, L3024) oder $25 \mu\text{g/mL}$ Zymosan aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* (*Invivogen, San Diego, tlr1-zyn*) stimuliert. Dafür wurde das Medium mit dem jeweiligen Stimulans versetzt. Nach einer Inkubation von 14 h erfolgte die Ernte der Zellüberstände und Zellen. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA (Kapitel 3.4.5) analysiert.

3.3 GENTRANSFER IN EUKARYOTISCHE ZELLEN

3.3.1 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Für die transiente Transfektion wurden die HEK dKO bzw. die EcoPack-Zellen trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Es wurden 2×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale bzw. 2×10^5 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h war eine Konfluenz von 60-70 % erreicht und der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Der Transfektionsansatz für die Transfektion in der 10 cm Zellkulturschale bestand aus 400 μL DMEM ohne Zusätze, 4 μg DNA und 12 μL Polyethylenimin (PEI) (1 mg/mL). Dieser wurde anschließend gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Bei einer Co-Transfektion wurden je 4 μg der zwei DNA-Konstrukte mit 24 μL PEI in 400 μL DMEM versetzt. Für ein Well einer 6-Well-Platte wurden 200 μL DMEM ohne Zusätze mit 1 μg DNA und 3 μL PEI (1 mg/mL) pipettiert, gevortext und ebenfalls 20 min bei RT inkubiert. Auch hier wurden im Fall einer Co-Transfektion je 1 μg der DNA-Konstrukte mit dem dreifachen Volumen PEI vermischt. Die mEF-Zellen wurden mithilfe des *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (*Roche, Basel, 6366244001*) nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Die Ernte der Zellen und/oder der Überstände erfolgte 24 bis 48 h nach Transfektion.

3.3.2 ERHÖHUNG DES VIRUSTITERS

Die EcoPack-Zellen wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, mit retroviralen DNA-Konstrukten transfiziert. Das Zellkulturmedium enthielt die virulenten Partikel und wurde nach 24 h geerntet. Das so produzierte infektiöse Medium wurde mithilfe des *Retro-XTM Concentrator* (631455) der Firma *Clontech Laboratories* (Kusatsu) aufkonzentriert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

3.3.3 RETROVIRALE TRANSDUKTION

Für die retrovirale Transduktion wurden 5×10^5 MØP^{ex/ex}-Zellen in RPMI-Medium (+10 mM β -Estradiol, +100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GM-CSF) ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 150 μL konzentriertem Virus der jeweiligen ADAM17-Variante und 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene inkubiert. Nach 3 Tagen begann die Selektion mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin. Der Erfolg der Transduktion wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Kapitel 3.4.3).

3.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.4.1 ZELLERNTE UND -LYSE

Die Suspensionszellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte das Resuspendieren in Lysispuffer für WB (Tabelle 2.19). Von adhären wachsende Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL PBS mit einem Zellschaber mechanisch von der Zellkulturschale abgelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 1.000 x g und 4°C wurde das entstandene Zellpellet in Lysispuffer resuspendiert. Die resuspendierten Zellpellets wurden für 30 sec gevortext und für 1 h bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert. Danach wurden die Zelllysate bei 21.000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

3.4.2 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des *PierceTM BCA Protein Assay Kit* von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham). Es wurde nach Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die Proben wurden 1:10 mit PBS verdünnt und in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Plate mit Flachboden pipettiert. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sowie nur PBS als Negativkontrolle. Die Platte wurde im *Tecan Rainbow Microplate Reader* (*Tecan Group*, Männedorf) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und mit der Software *MagellanTM 3*

(Tecan Group, Männedorf) analysiert. Mithilfe der Software *Excel 2016* (Microsoft, Redmond) erfolgte die Auswertung der Daten.

3.4.3 SDS-PAGE

Mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Molekülgröße in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür wurden zunächst SDS-Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen gegossen. In Tabelle 2.17 sind die jeweiligen Rezepte für ein 1,5 mm dickes Trenngel gelistet.

Um einem Austrocknen des Gels bei Polymerisierung vorzubeugen, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet und 3 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und Reste mit einem Filterpapier aufgesaugt. Danach wurde das Trenngel mit dem Sammelgel übergossen und für weitere 3 h bei RT auspolymerisiert. Das Rezept für das Sammelgel ist in Tabelle 2.17 gelistet.

Die zu analysierenden Proben wurden im Vorfeld mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zwischenzeitlich wurde das Gel in die Gelkammer eingespannt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Es folgte das Auftragen der Proben in die Taschen des Sammelgels, wobei die jeweilige Menge versuchsabhängig war. Als Größenstandard wurden 7 µL des *PageRuler Plus* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war.

Für die reduzierende und nicht-reduzierende SDS-PAGE wurden 40 µg Protein pro Probe mit 4 x *NuPAGE LDS Sample Buffer* (NP0007) und 10 x *NuPAGE Sample Reducing Agent* (NP0004) von der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham) versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 70°C wurden die Proben auf ein 10%iges Bis-Tris-Gel (*ThermoFisher Scientific*, Waltham) aufgetragen. Hier erfolgte die Elektrophorese ebenfalls bei 130 V bis zur gewünschten Auftrennung.

3.4.4 WESTERN BLOT ANALYSE

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF Membran (*Immobilon® FL*, Millipore, Merck KGaA oder *Roti®-PVDF*, Roth, Karlsruhe) mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Dazu wurde zuvor die Membran für 1 min in Methanol aktiviert und in *Blotting* Puffer (Tabelle 2.18) äquilibriert. Danach wurde ein Blot-Sandwich bestehend aus 6 Whatmann-Paper, PVDF-Membran und dem Gel luftblasenfrei aufeinandergelegt. Das Blot-Sandwich wurde in eine Gelhalterung und diese anschließend in eine Elektrodenhalterung der Firma *BioRad* (Hercules) eingespannt. Zusammen mit einer Kühleinheit wurde die Halterung in eine *Blotting*-Kammer gesteckt und mit kaltem Transferpuffer aufgefüllt. Nachfolgend wurde eine Spannung von 120 V für 90 min bei 4°C angelegt.

Daran schloss sich das Blockieren der Membran in 5 % BSA in PBS oder Odyssey/TBS für 1 h bei RT an. Zwischenzeitlich wurde das Gel über Nacht in Coomassie-Lösung gefärbt, am nächsten Tag in Aq. dest. entfärbt und eingescannt. Die blockierte Membran wurde über Nacht mit dem Primärantikörper (Kapitel 2.2.1) rollend bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mehrfach mit TBS-T (5 min, RT, Roller) gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Kapitel 2.2.3) für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran detektiert.

Für die Detektion mittels ECL Substrat (*Pierce™ SuperSignal West Pico* oder *Pierce™ SuperSignal West Femto enhanced Chemiluminescent* (ECL) Substrat) wurde das Gerät *ImageQuant LAS4000* der Firma *GE Healthcare* (Chicago) verwendet. Alternativ erfolgte die Detektion des Fluoreszenz-Signals der konjugierten Sekundärantikörper an dem Gerät *Odyssey® Fc* der Firma *LI-COR* (Lincoln).

Vor der erneuten Inkubation mit primären Antikörpern wurde die Membran zuvor mit *Stripping* Puffer (Tabelle 2.18) für 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschriffe mit TBS-T bevor der Primärantikörper auf die Membran gegeben wurde. Es wurde wie oben beschrieben weitergearbeitet.

3.4.5 BIOTINYLIERUNG

Für die Biotinylierung wurden 2×10^6 HEK dKO-Zellen ausgesät und mit den ADAM17-Varianten transfiziert (Kapitel 3.3.1). Nach 24 h wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt und zweimal mit kaltem PBS-CM (Tabelle 2.12) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit NHS-Sulfo-Biotin-Lösung (Tabelle 2.12) für 30 min bei 4°C. Als Kontrollen wurden die Zellen mit PBS-CM inkubiert. Die Biotin-Lösung wurde abgenommen und 10 mL kalter *Quenching* Puffer (Tabelle 2.12) auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4°C schlossen sich 3 Waschschriffe mit PBS-CM an. Die Zellen wurden abgeschabt und in 200 µL Lysispuffer (Tabelle 2.12) für 30 min bei 4°C und unter ständigem Rollen lysiert. Daran schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 13.000 x g und 4°C an. Die Überstände wurden in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Danach wurden 20 µg pro Probe als Lysatkontrolle abgenommen. Alle Proben wurden auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt und mit Lysispuffer auf 250 µL aufgefüllt. Zwischenzeitlich wurden pro Probe 75 µL Streptavidin-Beads dreimal mit je 100 µL Lysispuffer gewaschen (500 x g, 2 min, 4°C). Die Beads wurden zu den Proben pipettiert, woran sich eine Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad anschloss. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei 1500 x g und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und mehrfach mit 500 µL Lysispuffer gewaschen (1.000 x g, 2 min, 4°C). Nach dem letzten Waschschriff wurde der Überstand mit einer Hamiltonpipette abgenommen. Die Beads wurden nun mit 40 µL 1 x Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 20 min bei 60°C aufgeköcht. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 1.500 x g und 4°C wurden die Überstände in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Kapitel 3.4.3).

3.4.6 ELISA

Die Analyse der geernteten Zellüberstände erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Dafür wurde nach Anleitung des jeweiligen Herstellers des Kits gearbeitet. Die verwendeten Kits sind in Tabelle 2.6 gelistet.

3.4.7 IMMUNPRÄZIPITATION

Es wurden 2×10^6 HEK dKO-Zellen ausgesät, mit den ADAM17-Varianten transfiziert (Kapitel 3.3.1) und nach 48 h geerntet. Die Zellen wurden in 200 μ L Lysispuffer (Tabelle 2.19) resuspendiert, für 30 sec gevortext und für 1 h bei 4°C und ständigem Rollern inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und 800 μ g Protein pro Probe in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 1,6 μ g anti-ADAM17-Antikörper von *abcam* (Cambridges) zugefügt und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Zwischenzeitlich erfolgte das Blockieren der magnetischen *Protein G Dynabeads* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, 10004D). Dafür wurden 40 μ L Beads pro Probe zweimal mit 5 % BSA in PBS gewaschen und in 500 μ L 5 % BSA in PBS über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die blockierten Beads dreimal mit Lysispuffer gewaschen und im Anschluss zum Zelllysate-Antikörper-Mix gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C auf dem Drehrad erfolgten 3 Waschschrte mit Lysispuffer. Danach wurden 40 μ L 1 x Lämmli-Probenpuffer zugefügt und die Proben für 15 min bei 65°C und 700 rpm im Heizblock aufgeköcht. Die Überstände wurden in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Kapitel 3.4.3).

3.4.8 FURIN CLEAVAGE ASSAY

Für das Furin *Cleavage* Assay wurden 2×10^6 HEK dKO-Zellen, ausgesät, transfiziert und nach 48 h geerntet. Die Zellen wurden lysiert und anschließend immunpräzipitiert (Kapitel 3.4.7). Die magnetischen *Protein G Dynabeads* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, 10004D) wurden nach der Inkubation mit dem Zelllysate-Antikörper-Mix mit 70 μ L Furin Assay Puffer (Tabelle 2.15) und 1 U rekombinantes Furin (*New England Biolabs*, Frankfurt am Main, P8077S) für 30 min bei 30°C inkubiert. Als Kontrollen dienten Proben ohne rekombinantes Furin. Anschließend wurden 17,5 μ L 5 x Lämmli-Probenpuffer zugefügt und die Proben für 10 min bei 99°C und 700 rpm im Heizblock aufgeköcht. Danach erfolgte die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot (Kapitel 3.4.3).

3.4.9 ENDOH/PNGASEF-VERDAU

Es wurden 2×10^6 HEK dKO-Zellen ausgesät und, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mechanisch von der Zellkulturschale abgelöst, mit 1 mL PBS gewaschen und anschließend in 200 μ L Lysispuffer (Tabelle 2.19) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C auf dem Roller erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 21.000 x g und 4°C für 15 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 3.4.2). Danach wurden je 20 μ g Protein nach Anleitung des Herstellers *New England Biolabs* (Frankfurt am Main) mit EndoH (P0702S) oder PNGaseF (P0704S) inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Kapitel 3.4.3).

3.4.10 ZELLOBERFLÄCHEN-AKTIVITÄTSASSAY

Um die Aktivität von ADAM17 an der Zelloberfläche zu analysieren, wurden zunächst 2×10^6 HEK dKO-Zellen ausgesät und, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen von der Zellkulturschale trypsiniert und gezählt. Anschließend wurden 2×10^5 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch PBS mit 20 μ M TACE Substrat IV (*Calbiochem, Merck KGaA*, Darmstadt, 616407) ersetzt. Dieses ADAM17-spezifische Substrat ist fluorogen und mit einem *Quencher* versehen. Die Oberflächenaktivität wurde über einen Zeitraum von 120 min an einem *Tecan Infinite 200 Pro* (*Tecan Group*, Männedorf) bei einer Emissionswellenlänge von 405 nm und einer Extinktionswellenlänge von 320 nm gemessen. Für die Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve des Fluoreszenzsignals über die gemessene Zeit ermittelt.

3.4.11 AKTIVITÄTSASSAY IM ZELLYSAT

Es wurden 2×10^6 HEK dKO-Zellen ausgesät und, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach mit einem Zellschaber von der Zellkulturoberfläche abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt (1.000 x g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in Lysispuffer (Tabelle 2.19) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 4°C und unter ständigem Rollen. Anschließend wurde das Zelllysate für 15 min bei 21.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, ermittelt und pro Probe 3 Aliquots von je 150 μ g in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Die Proben wurden mit Lysispuffer auf 50 μ L aufgefüllt und mit 20 μ M TACE Substrat IV (*Calbiochem, Merck KGaA*, Darmstadt, 616407) versetzt. Es schloss sich eine Inkubation von 30 min bei 37°C an. Danach wurde die ADAM17-Aktivität an einem *Synergy HT microplate reader* (*BioTec*, Winooski) bei einer Emissionswellenlänge von 405 nm und einer Extinktionswellenlänge von 320 nm gemessen.

3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

3.5.1 ZELLOBERFLÄCHENFÄRBUNG VON ADAM17

Für die Analyse von ADAM17 an der Zelloberfläche wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Dafür wurden $2,5 \times 10^5$ MØP-Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die adhärenenten HEK dKO-Zellen mussten vorsichtig mit kalten PBS von der Oberfläche des jeweiligen Zellkulturgefäßes gespült werden. Anschließend wurden sowohl die HEK dKO- als auch die MØP-Zellen für 5 min, $1.000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert und in 1 mL PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen blockiert. Für die transfizierten HEK dKO-Zellen wurde 5 % BSA in PBS (FACS-Puffer) verwendet. Der FACS *Blocking* Puffer für die MØP-Zellen enthielt zusätzlich Fc Block (1:100, *Biolegend*, San Diego). Nach einer Inkubation von 10 min bei 4°C wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5 min, $1.000 \times g$, 4°C) und mit dem extrazellulär bindenden ADAM17-Antikörper 10.1 (1:100 in FACS-Puffer, *Pineda*, Berlin) für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem Sekundärintikörper *donkey- α -rabbit IgG AlexaFluor 488* (1:100 in FACS-Puffer, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham) für 1 h bei 4°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen in 200 μL FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte am *FACS Canto II* (*BD Bioscience*, Franklin Lakes). Für die Auswertung der Daten wurde die Software *FlowJo* (*Tree Star*, Ashland) verwendet.

3.5.2 MEHRFACHFÄRBUNG VON OBERFLÄCHENMARKER

Um die Differenzierung der MØP-Zellen zu analysieren, wurden verschiedene Oberflächenmarker angefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden die differenzierten Zellen mit kaltem PBS ab gespült und für 5 min bei $100 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Von den undifferenzierten MØP-Zellen wurden $2,5 \times 10^5$ in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, pelletiert ($1.000 \times g$, 5 min, 4°C) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die differenzierten und undifferenzierten Zellen in FACS *Blocking* Puffer (Fc Block, 1:100 in FACS-Puffer) für 10 min inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in FACS-Puffer. Danach wurden die Zellen im Antikörper-Mix resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die in Kapitel 2.2.2 konjugierten Antikörper jeweils 1:100 in FACS-Puffer verdünnt verwendet. Nach zwei Waschschriften mit FACS-Puffer folgte die Fixierung der Färbung mit 10 % *Lysis/Fixation Solution* (*Biolegend*, San Diego, 422401) verdünnt in Aq. dest. für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und mit dem *FACS Canto II* (*BD Bioscience*, Franklin Lakes) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *FlowJo* (*Tree Star*, Ashland).

3.6 MIKROSKOPISCHE METHODEN

3.6.1 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Es wurden $2,5 \times 10^5$ MØP-Zellen auf Deckgläser ausgesät und zu M-MØ- oder GM-MØ-Zellen ausdifferenziert. Nach der Differenzierung wurden die Zellen wie in 3.2.2.2 mit LPS (*Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, L3024*) oder Zymosan (*Invivogen, San Diego, tlrI-zyn*) stimuliert. Die HEK dKO-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro Well auf Deckgläser ausgesät, transfiziert und 24 h später, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, mit PMA stimuliert. Die Zellen auf den Deckgläsern wurden mit PBS gewaschen und für 15 min in PBS mit 4 % PFA bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte für 30 min in PBS mit 0,3 % Triton-X-100. Danach wurden die Zellen in Immunfluoreszenz (IF) *Blocking* Puffer (Tabelle 2.16) für 1 h bei RT blockiert. Die primären Antikörper wurden, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, in IF *Blocking* Puffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in IF *Blocking* Puffer verdünnt (Kapitel 2.2.3). Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Mowiol und Dabco eingebettet und auf Objektträger fixiert. Das Einbettmedium enthielt ebenfalls DAPI (1 µg/mL) zum Anfärben der Zellkerne. Die angefärbten Zellen wurden an einem *Olympus IX 81 cLSM* Mikroskop von der Firma *Olympus (Shinjuku)* aufgenommen. Dazu wurde ein U Plan S Apo 100 x Immersionsobjektiv (numerische Apertur 1,40) und die Software *FV10-ASW 4.2 Viewer* von *Olympus (Shinjuku)* verwendet.

3.7 STATISTISCHE ANALYSE

Die gezeigten Werte sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Für die Datenanalyse wurden die Programme *Microsoft Excel* und *Graphpad 6* verwendet. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des ungepaarten Student's t-Test oder einer einfachen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*), gefolgt vom Dunnetts oder Tukey Test. Als signifikant wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen. Dieser wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Weitere Markierungen entsprechen folgenden p-Werten: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$; **** $p \leq 0,001$.

4 ERGEBNISSE

Teile dieses Kapitels und der Diskussion sind bereits in den Artikeln „*Structural and Functional Analyses of the Shedding Protease ADAM17 in HoxB8-Immortalized Macrophages and Dendritic-like Cells*“ (Cabron *et al.*, 2018)^[145] und „*Functional Characterization of Colon Cancer-Associated Mutations in ADAM17: Modifications in the Pro-Domain Interfere with Trafficking and Maturation.*“ (Pavlenko and Cabron *et al.*, 2019)^[146] veröffentlicht.

Zunächst werden die Ergebnisse zur Charakterisierung von funktionalen ADAM17-Varianten gezeigt. Hier wurde ein Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem etabliert, das aus immortalisierten primären Immunzellen besteht. Das sollte zu einem besseren Verständnis der Aktivierung und Regulation dieser Metalloprotease führen. Im nächsten Unterkapitel wird die Charakterisierung von Darmkrebs-assoziierten ADAM17-Varianten thematisiert. Diese wurden beim Durchsuchen von Datenbanken, die Informationen über somatische Mutationen in Tumorgewebe von Krebspatienten auflisten, gefunden. Aus den Ergebnissen sollen Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen ADAM17-Mutation und Darmkrebs gezogen werden. Im letzten Teil dieses Kapitel wird die ADAM17-Variante D232H fokussiert. Der Patient, bei dem diese Mutation sequenziert wurde, weist unterschiedliche Symptome auf. Eine Charakterisierung der Konsequenzen dieser Mutation auf ADAM17 könnte zu neuen therapeutischen Ansätzen führen.

4.1 ETABLIERUNG DES MAKROPHAGEN-VORLÄUFER-ZELLSYSTEMS ZUR FUNKTIONALEN ANALYSE VON ADAM17-VARIANTEN

Für die strukturelle und funktionale Untersuchung des ADAM17-Proteins wurden vier Varianten generiert (Abbildung 4.1). Da für das Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem primäre Zellen aus Mäusen verwendet wurden, erfolgte die Klonierung der Varianten in murinem ADAM17. Zudem weisen die Proteinsequenzen von humanem und murinem ADAM17 eine hohe Homologie auf. Durch Einfügen einer Punktmutation kommt es bei der $\Delta 700$ zu einem frühzeitigen Abbruch am C-Terminus nach Aminosäure 699. Somit besitzt diese Variante nur noch 6 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne. Die beiden Furin-resistenten Varianten wurden durch das Einfügen eines RVNG-Motivs generiert. Dazu wurde die *downstream* Furin-Schnittstelle (ds) von RVKR zu RVNG und die *upstream* Schnittstelle (us) RKRD ebenfalls zu RVNG mutiert. Weiterhin erfolgte das Entfernen der Phosphorylierungsstelle an Position 794. Dazu wurde die Aminosäure Serin an dieser Stelle mittels Punktmutation in ein Alanin mutiert. Diese Variante kann nun nicht mehr durch die Serin/Threonin-Proteinkinase PLK2 an dieser Position phosphoryliert werden.

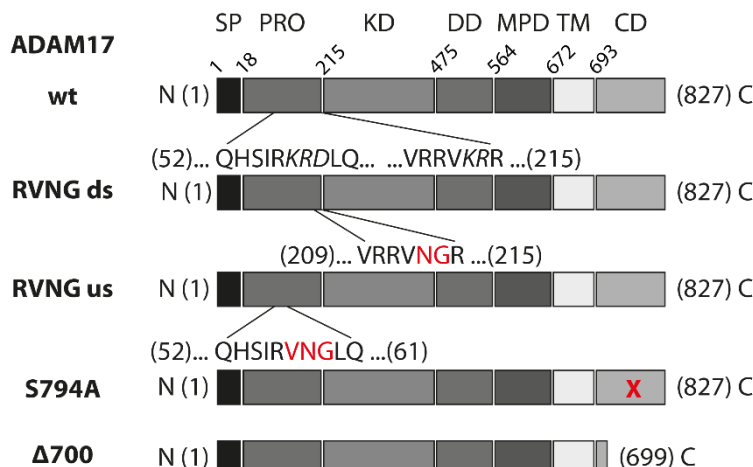


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des murinen ADAM17-Proteins mit den jeweiligen Domänen und die verwendeten ADAM17-Varianten^[145].

Dargestellt ist der ADAM17 Wildtyp (wt) mit folgenden Domänen: Signalpeptid (SP), Prodomäne (PRO), Katalytische Domäne (KD), Disintegrin-Domäne (DD), Membran-proximale Domäne (MPD), Transmembrandomäne (TM) und Cytoplasmatische Domäne (CD). Bei den Varianten RVNG ds und RVNG us wurden Mutationen in der Prodomäne eingefügt, die in Rot gekennzeichnet sind. Die Variante S794A weist eine Punktmutation in der CD auf, die mit einem roten X dargestellt ist. Bei der Abbruchvariante $\Delta 700$ fehlen die letzten 127 Aminosäuren.

Die ADAM17-Varianten wurden anschließend auf Expression, zelluläre Lokalisation und proteolytische Aktivität untersucht, um Rückschlüsse auf die posttranskriptionalen Prozesse von ADAM17 ziehen zu können. Dazu wurden zunächst Experimente in ADAM17-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (mEF) und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) durchgeführt.

4.1.1 FUNKTIONALE UND STRUKTURELLE ANALYSE VON ADAM17-VARIANTEN IN HEK- UND MEF-ZELLEN

Die verwendeten mEF-Zellen stammen aus ADAM17^{wt/wt}- oder hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen. Die ADAM17-defizienten mEF^{ex/ex}-Zellen wurden mit den ADAM17-Varianten transient transfiziert. Als Kontrolle wurden auch der ADAM17 Wildtyp (wt) und der Leervektor (LV) mitgeführt. Zunächst erfolgte die Überprüfung der Expression der Varianten mittels SDS-PAGE und Western Blot (Abbildung 4.2 A). Für diese wurden Antikörper verwendet, die an unterschiedliche Epitope binden.

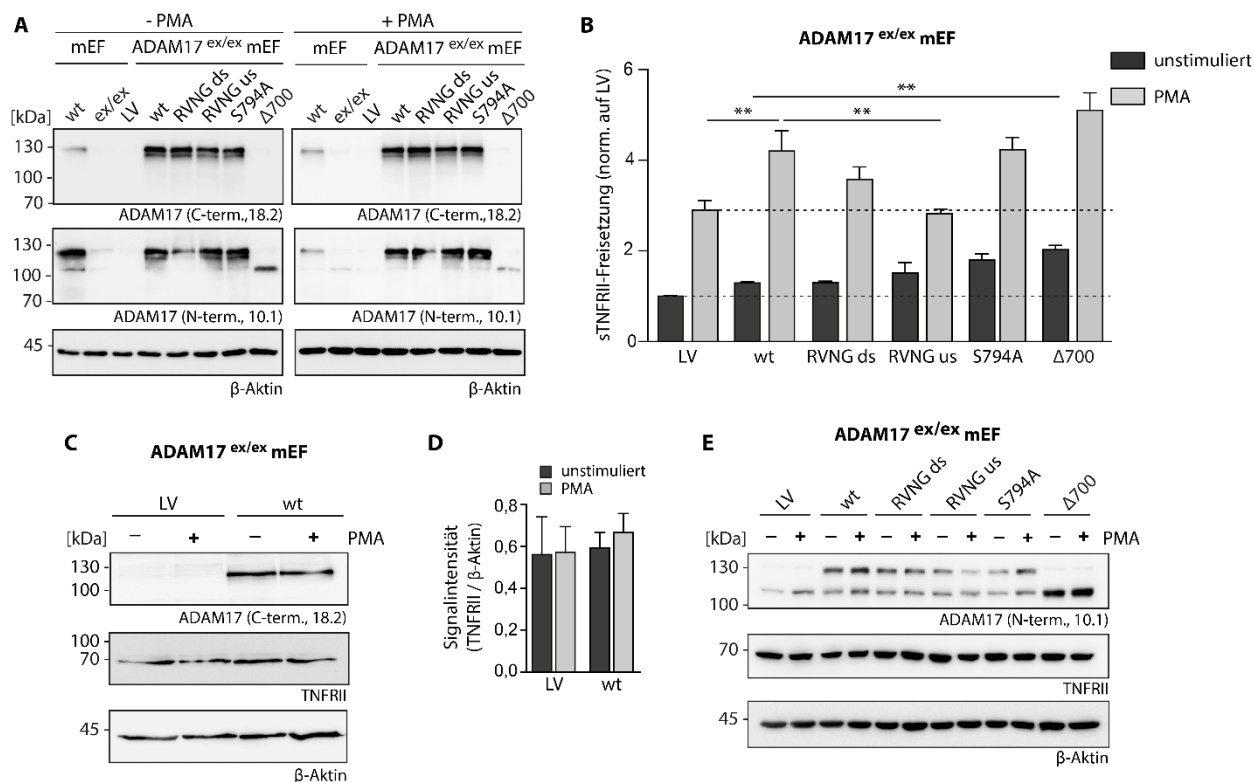


Abbildung 4.2: Charakterisierung der ADAM17-Varianten in mEF-Zellen^[145].

A) Repräsentative Immunblots von endogen exprimiertem ADAM17 in wildtypischen mEF-Zellen ($ADAM17^{wt/wt}$ -mEF) und transient überexprimiertem ADAM17 in $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF. Die Zellen wurden unstimuliert und mit PMA stimuliert (200 nM, 2 h) analysiert. ADAM17 wurde sowohl mit dem C-terminal bindenden Antikörper 18.2 als auch mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1 untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. B) ELISA von endogenem TNFRII in Überständen von $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF-Zellen rekonstituiert mit den ADAM17-Varianten. Die $ADAM17$ -defizienten mEF-Zellen wurden mit dem LV, wt und den ADAM17-Varianten transfiziert. Es folgte die Ernte und Analyse der Überstände (TNFRII-ELISA). Die schwarzen Balken zeigen das konstitutive ADAM17-*Shedding* und die grauen nach Stimulation mit PMA. Die Werte sind auf den unstimulierten LV normiert und stammen aus 3 unabhängigen Experimenten. C) Repräsentativer Immunblot zur Kontrolle des Einflusses von PMA auf die TNFRII-Expression in $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF-Zellen. $ADAM17$ -defiziente mEF-Zellen wurden mit dem LV und dem ADAM17 wt transient transfiziert und teilweise für 2 h mit PMA stimuliert. D) Quantifizierung der TNFRII-Expression zur Kontrolle des Einflusses von PMA. Proteinexpression von endogenem TNFRII in unstimulierten und stimulierten (PMA, 2 h) Zellen wurden mittels Western Blot analysiert und auf die Ladekontrolle (β -Aktin) normiert. E) Repräsentativer Immunblot von $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF-Zellen rekonstituiert mit den ADAM17-Varianten. $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF-Zellen wurden mit dem LV, wt und den ADAM17-Varianten RVNG ds, RVNG us, S794A und $\Delta 700$ transient transfiziert. Die Zellen wurden unstimuliert und stimuliert (PMA, 2 h) untersucht. Für die Detektion von ADAM17 wurde der C-terminal bindende Antikörper 10.1 verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Expression aller Varianten in den $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF-Zellen (Abbildung 4.2 A). Die Variante $\Delta 700$ war dabei nur mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1 zu detektieren. Das Epitop, an dem der Antikörper 18.2 am C-Terminus bindet, ist bei dieser Variante nicht vorhanden. Es ist ebenfalls sichtbar, dass die untransfizierten $ADAM17^{ex/ex}$ -mEF-Zellen keine detektierbare Proteinexpression von ADAM17 aufweisen. Die endogene ADAM17-Expression in den $ADAM17^{wt/wt}$ -mEF-Zellen ist geringer als die Überexpression in den

ADAM17^{ex/ex}-mEF-Zellen, die mit ADAM17 rekonstituiert wurden. Die Stimulation der Zellen mit PMA hatte keinen Einfluss auf die Expression von ADAM17. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin gewählt. Es ist sichtbar, dass jeweils die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Für die Analyse der proteolytischen Aktivität der ADAM17-Varianten wurden die Überstände der Zellen mittels ELISA auf löslichen endogenen TNF α -Rezeptor II (TNFRII) untersucht (Abbildung 4.2 B). Dafür wurden sowohl Überstände von unstimulierten als auch von PMA stimulierten Zellen analysiert. Es ist im Vergleich zum LV ein signifikant höherer Spiegel an löslichem TNFRII (sTNFRII) beim wt nach PMA-Stimulation zu sehen. Auch die ADAM17-Varianten RVNG ds, S794A und Δ 700 wiesen nach Stimulation einen höheren sTNFRII-Spiegel als der LV auf. Dieses lässt auf eine erhöhte ADAM17-Aktivität in den mit ADAM17 rekonstituierten ADAM17^{ex/ex}-mEF - Zellen schließen. Im Gegensatz dazu weist die zweite Furin-resistente Mutante RVNG us ein signifikant niedrigeren Spiegel an löslichem TNFRII auf, was auf eine fehlende ADAM17-Aktivität hindeutet. Im unstimulierten Zustand ist nur für die Variante Δ 700 eine signifikant höhere Freisetzung an löslichem TNFRII im Vergleich zum wt zu beobachten.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Stimulation mit PMA Einfluss auf die Expression des TNFRII hat. Dafür wurden ADAM17^{ex/ex}-mEF -Zellen mit dem LV und dem wt transient transfiziert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 4.2 C). Im Immunblot und der Quantifizierung wird deutlich, dass die Bandenintensität und somit die Expression von TNFRII nicht von PMA beeinflusst wird (Abbildung 4.2 C, D). Dort ist im Vergleich zu den unstimulierten Zellen kein An- oder Abstieg der Proteinexpression zu verzeichnen. Ferner ist kein signifikanter Unterschied zwischen LV und wt zu beobachten. Als Ladekontrolle und Referenz für die Normierung wurde β -Aktin verwendet.

Auch für die restlichen ADAM17-Varianten wurde der Einfluss von PMA auf die Expression des Substrates TNFRII untersucht (Abbildung 4.2 E). Die endogene TNFRII-Expression in den ADAM17^{ex/ex}-mEF -Zellen blieb auch für die analysierten ADAM17-Varianten RVNG ds, RVNG us, S794A und Δ 700 von der Behandlung mit PMA unbeeinflusst.

Als zweites Zellsystem für die Analyse von funktionalen ADAM17-Varianten wurden ADAM10- und ADAM17-defiziente humane embryonale Nierenzellen (HEK dKO) verwendet. Diese Zelllinie wurde innerhalb des Biochemischen Instituts durch Deletion der ADAM10- und ADAM17-Gene mittels des CRISPR/Cas9-Systems generiert^[147].

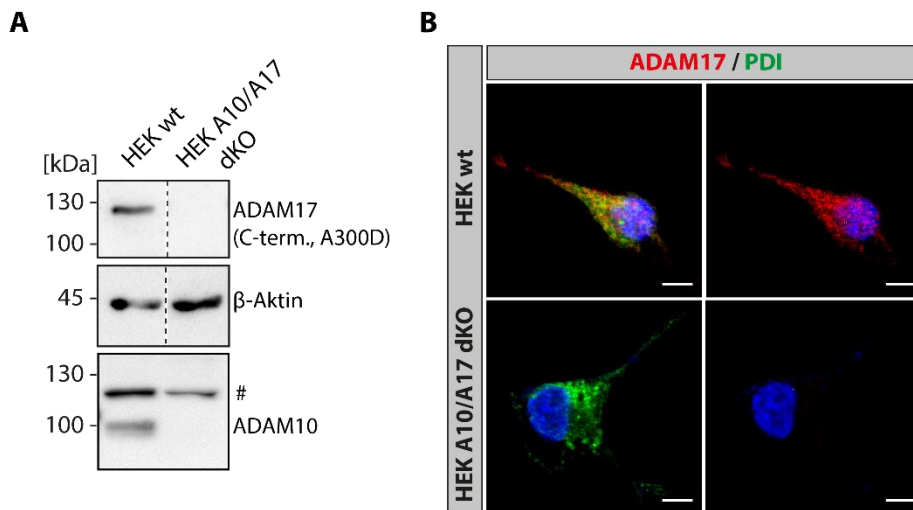


Abbildung 4.3: Überprüfung der ADAM17-Defizienz der HEK dKO-Zellen^[145].

A) Repräsentativer Immunblot von HEK wt- und HEK dKO-Zellen zur Kontrolle der ADAM10- und ADAM17-Defizienz. Für die Detektion von ADAM17 wurde der C-terminal bindende Antikörper A300D verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Unspezifische Banden sind mit einem # gekennzeichnet. B) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HEK wt und HEK dKO-Zellen zur Kontrolle der ADAM10- und ADAM17-Defizienz. Für die Detektion von ADAM17 (rot) wurde der Antikörper A300E verwendet, der spezifisch humanes ADAM17 detektiert. Als ER-Marker wurde ein Antikörper gegen PDI (grün) verwendet. Als Kontrolle dienten HEK wt-Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Die doppelte Gen-Defizienz (ADAM10/17) wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Proteinebene überprüft (Abbildung 4.3 A). Für die Detektion von ADAM17 wurde der Antikörper A300D verwendet. Dabei zeigte nur die Probe der HEK wt-Zellen eine Bande auf Höhe von ~120 kDa, was dem Molekulargewicht von humanem ADAM17 entspricht. Diese Bande war bei den HEK dKO-Zellen nicht detektierbar. Ein vergleichbares Ergebnis wurde ebenfalls für ADAM10 erzielt (Abbildung 4.3 A). Hier zeigten die HEK dKO keine Bande bei ~100 kDa, was der molekularen Größe von ADAM10 entspricht. Somit konnte mittels SDS-PAGE und Western Blot die doppelte Defizienz der HEK dKO-Zellen gezeigt werden.

Weiterhin wurde die ADAM17-Defizienz auch mittels Immunfluoreszenz überprüft (Abbildung 4.3 B). Dabei konnte in den HEK wt-Zellen ADAM17 (rot) detektiert werden. Dieses co-lokalisierte teilweise mit dem ER-Marker PDI (grün). Im Vergleich dazu konnte keine spezifische Detektion von ADAM17 in den HEK dKO-Zellen beobachtet werden, was bedeutet, dass diese Zellen defizient für ADAM17 sind.

Die ADAM17-Defizienz der HEK dKO-Zellen wurde somit zweifach bestätigt und die Zellen konnten zur Untersuchung der ADAM17-Varianten verwendet werden. Dafür wurde wie bereits bei den ADAM17-defizienten mEF-Zellen die Expression, zelluläre Lokalisation und proteolytische Aktivität der ADAM17-Konstrukte untersucht (Abbildung 4.4).

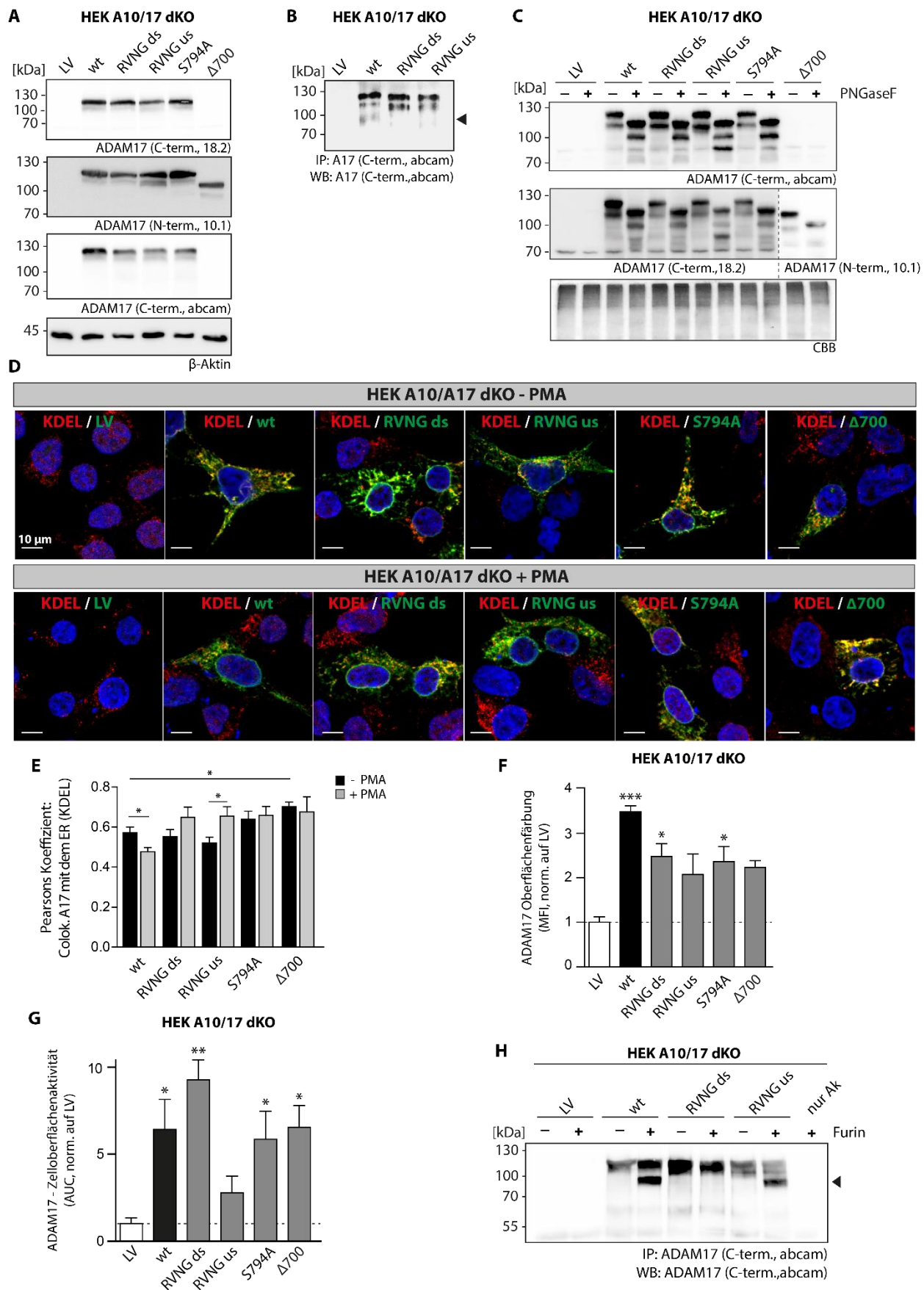


Abbildung 4.4: Charakterisierung der ADAM17-Varianten in HEK dKO-Zellen^[145].

A) Repräsentativer Immunblot zur Kontrolle der Expression von ADAM17-Varianten in HEK dKO-Zellen. Untersucht wurden neben dem LV und wt die ADAM17-Varianten RVNG ds, RVNG us, S794A und Δ 700. Zur Detektion von ADAM17 wurden C-terminal bindende (18.2 und abcam) und ein N-terminal bindender (10.1) Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **B)** Repräsentativer Immunblot von immunpräzipitiertem ADAM17 aus HEK dKO-Zellen, die mit ADAM17 rekonstituiert wurden. Untersucht wurden neben dem LV und wt die beiden Furin-resistenten Varianten RVNG ds und us. Für die Immunpräzipitation wurde der C-terminal bindende Antikörper von abcam verwendet. Dieser wurde ebenfalls für die Detektion eingesetzt. Der schwarze Pfeil weist auf die mature Form von ADAM17 hin. **C)** Repräsentativer Immunblot von HEK dKO-Zellen rekonstituiert mit ADAM17 nach der Behandlung mit PNGaseF. Die Detektion von ADAM17 erfolgte mit den C-terminal bindenden Antikörpern 18.2 und abcam. Für die Detektion der Variante Δ 700 wurde der N-terminal bindende Antikörper 10.1 verwendet. Als Ladekontrolle diente das Coomassiegefärbte SDS-Gel. **D)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Co-Lokalisation von HEK dKO-Zellen, die mit ADAM17 rekonstituiert wurden. Dargestellt ist die zelluläre Lokalisation von ADAM17 in HEK dKO-Zellen (oben unstimuliert, unten für 2 h mit PMA stimuliert). In rot ist KDEL als ER-Marker zu sehen. Für die Färbung von ADAM17 (grün) wurde der Antikörper 10.1 verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. **E)** Quantifizierung der Co-Lokalisation von ADAM17 mit dem ER (KDEL). Diese ist angegeben als Pearsons Koeffizient, wobei die Werte zwischen 0 (keine Co-Lokalisation) und 1 (100 % Co-Lokalisation) liegen. Es wurden je fünf Zellen aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. **F)** Durchflusszytometrische Analyse von ADAM17 an der Oberfläche von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Für die Färbung wurde der extrazellulär-bindende Antikörper 10.1 verwendet. Es wurde die Population der Einzelzellen (FSC-A x FSC-H) ausgewählt und als Histogramm (AlexaFluor 488) dargestellt. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität aus drei individuellen Experimenten normiert auf den LV. **G)** ADAM17-Zelloberflächenaktivitätsassay von lebenden HEK dKO-Zellen rekonstituiert mit den ADAM17-Varianten. Für den Assay wurde ein fluorogenes TNF α -Peptid verwendet. Die gemessene Aktivität entspricht dabei der gemessenen Fluoreszenzintensität des gespaltenen Peptids über einen Zeitraum von 100 min. Die Fläche unter dem Graphen des Fluoreszenzsignals wurde bestimmt und auf den LV normiert. Gezeigt sind die Werte aus drei individuellen Experimenten. **H)** Repräsentativer Immunblot des Furin *Cleavage* Assay. Es wurden Lysate von HEK dKO-Zellen transfiziert mit LV, wt, RVNG ds und RVNG us immunpräzipitiert und mit je 1 U rekombinanten Furin inkubiert. Die obere Bande bei ~120 kDa entspricht immatorem ADAM17, das nicht von Furin prozessiert wurde. Die untere Bande bei ~90 kDa (schwarzer Pfeil) ist matures ADAM17, bei dem die Prodomäne von Furin abgespalten wurde.

Zunächst wurde die Expression der ADAM17-Konstrukte in den HEK dKO-Zellen analysiert (Abbildung 4.4 A). Dabei zeigte sich, dass alle ADAM17-Varianten in den HEK dKO-Zellen gleichmäßig exprimiert wurden. Die Varianten RVNG ds, RVNG us und S794A sowie der wt zeigten eine Bande auf Höhe von 120 kDa, was dem Molekulargewicht von immatorem ADAM17 entspricht. Die Bande der Abbruchvariante Δ 700 wies eine Größe von etwa 100 kDa auf. Das ist durch das Fehlen der letzten 128 Aminosäuren bei dieser Variante zu erklären. Aufgrund dessen fehlten die Epitope, an denen die C-terminalen Antikörper 18.2 und abcam binden. Somit konnte die Δ 700 nur mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1 detektiert werden.

Alle Konstrukte zeigten im Western Blot eine schwache zweite Bande unterhalb der Bande des immaturren ADAM17. Um zu klären, ob es sich dabei um matures ADAM17 handelt, wurde ADAM17 immunpräzipitiert und analysiert (Abbildung 4.4 B). Immatures ADAM17 wird von der Proprotein Convertase Furin prozessiert, wobei die Prodomäne abgespalten wird^[16]. Das Molekulargewicht von ADAM17 reduziert sich somit von 120 kDa auf etwa 90 kDa. Für die Analyse der zweiten Bande (Abbildung 4.4 A) wurde neben dem wt auch die Furin-resistenten Varianten RVNG ds und RVNG us untersucht. Diese Varianten können nicht mehr an jeweils einer der beiden Furin-Schnittstellen prozessiert werden und dienen somit als negative Kontrolle. Nach

der Immunpräzipitation sind für den wt drei Banden sichtbar. Die stärkste auf Höhe von 120 kDa entspricht dabei immaturem ADAM17. Diese Bande ist ebenfalls für die beiden Varianten RVNG ds und RVNG us zu detektieren. Wie bereits zuvor ist auch nach der Immunpräzipitation eine zweite etwas kleinere Bande auf Höhe von etwa 110 kDa bei allen untersuchten Konstrukten zu beobachten. Nur bei dem wt ist auch eine dritte Bande auf Höhe von 90 kDa sichtbar. Dieses entspricht der Größe von maturem ADAM17. Somit ist die zweite Bande unterhalb der Bande von immaturem ADAM17, die bei allen Konstrukten beobachtet wurde, nicht matures ADAM17.

Weiterhin wurde überprüft, ob die ADAM17-Varianten unterschiedliche Glykosylierungsmuster aufweisen. Dazu wurde Protein der jeweiligen Konstrukte mit der Peptid: N-Glycosidase F (PNGaseF) verdaut und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4.4 C). Es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten und dem wt beobachtet werden. Die Abbruchvariante $\Delta 700$ konnte erneut nur mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1 detektiert werden. Hier war, wie auch bei den anderen Konstrukten, nach der Inkubation mit PNGaseF eine Verschiebung der ADAM17-Bande um etwa 10kDa zu sehen. Die eingefügten Punktmutationen sowie die Deletion des Großteils der cytoplasmatischen Domäne hatte keinen Einfluss auf die Glykosylierung von ADAM17 in HEK dKO-Zellen.

Die Analyse der Lokalisation der ADAM17-Konstrukte erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten HEK dKO-Zellen vor und nach PMA-Stimulation (Abbildung 4.4 D,E). Als Referenz wurde zudem auch das ER (rot) mithilfe eines anti-KDEL-Antikörpers gefärbt. Es ist zu sehen, dass alle untersuchten Konstrukte mit dem ER co-lokalisieren (Abbildung 4.4 E). Diese nimmt nach Stimulation mit PMA bei dem wt und der Variante RVNG us signifikant ab, was auf einen Transport aus dem ER an die Zelloberfläche hindeutet. Die Variante $\Delta 700$ zeigt im Vergleich zum wt eine signifikant höhere Co-Lokalisation von ADAM17 und ER in unstimulierten und stimulierten Zellen. Dies könnte ein Hinweis auf einen ineffizienten Transport dieser Variante aus dem ER zur Zelloberfläche oder zu anderen Zellkompartimenten sein.

Um die Lokalisation der Varianten eingehender zu analysieren, wurde ADAM17 an der Zelloberfläche von HEK dKO-Zellen angefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 4.4 F). Hier zeigten alle Varianten eine verminderte Oberflächenlokalisierung von ADAM17 im Vergleich zum wt. Bei den Varianten RVNG ds und S794A war diese sogar signifikant vermindert. Somit scheint der Transport aus dem ER an die Zelloberfläche bei den untersuchten Varianten in HEK dKO ineffizient zu sein.

Neben der Oberflächenlokalisierung wurde ebenfalls die Aktivität der Mutanten an der Zelloberfläche von lebenden HEK dKO-Zellen analysiert (Abbildung 4.4 G). Dabei zeigten fast alle untersuchten Varianten eine mit dem wt vergleichbare ADAM17-Aktivität gegenüber dem verwendeten TNF α -Peptid. Nur die Variante RVNG us zeigte eine deutlich verminderte Aktivität. Die Varianten RVNG ds und S794A, die eine signifikant niedrigere Zelloberflächenlokalisierung als der wt aufwiesen (Abbildung 4.4 F), zeigten hier eine ADAM17-Aktivität ähnlich dem wt. Damit

scheinen die eingefügten Mutationen keinen Einfluss auf die Aktivität an der Zelloberfläche zu haben, jedoch den Transport dorthin zu stören.

Um die Furin-Resistenz der Varianten RVNG_{ds} und RVNG_{us} zu überprüfen, wurde ein Furin *Cleavage* Assay durchgeführt (Abbildung 4.4 H). Dafür wurde ADAM17 aus Zelllysaten von transfizierten HEK dKO-Zellen immunpräzipitiert und mit rekombinantem Furin inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot. Während der Inkubation mit Furin spaltet dieses Enzym die Prodomäne von ADAM17 ab, was zu einer Größenänderung von ~120 kDa zu ~90 kDa führt und deutlich beim wt zu beobachten war. Ohne Furin liegt ADAM17 ungespalten (immatur) vor und es ist eine deutliche Bande bei etwa 120 kDa zu sehen. Nach Inkubation mit Furin ist eine zweite deutliche Bande auf Höhe von etwa 90 kDa zu detektieren. Dieses entspricht der Größe von prozessiertem (maturem) ADAM17. Bei der Variante RVNG_{ds} wurde die Furin-Schnittstelle so mutiert, dass Furin diese nicht mehr erkennt und spaltet. Dieses bestätigt die fehlende zweite Bande nach Inkubation mit Furin (Abbildung 4.4 H). Überraschenderweise zeigte die Variante RVNG_{us} wie der wt eine zweite, jedoch schwächere Bande nach Inkubation mit Furin. Bei dieser Variante wurde die *upstream* Furin-Schnittstelle mutiert. Es ist allerdings möglich, dass ADAM17 noch an der *downstream* Schnittstelle von Furin prozessiert werden kann.

Die Orientierung der beiden Schnittstellen ist in dem Strukturmodell in Abbildung 4.5 zu sehen. Bisher konnte die 3D-Struktur der Prodomäne von ADAM17 nicht gelöst werden. Aus diesem Grund wurde für das hier gezeigte Modell die veröffentlichte Kristallstruktur von Adamalysin als Grundlage verwendet. Die Furin-Schnittstellen (RVNG_{us}, RVNG_{ds}) sind hier in Orange dargestellt. Die *upstream* Schnittstelle befindet sich nahe dem N-Terminus. Die *downstream* Schnittstelle befindet sich am C-terminalen Ende der Prodomäne. Weiterhin ist die Asparaginsäure an Position 190 farblich gekennzeichnet. Diese ist analog der Asparaginsäure an Position 194 von Adamalysin. In beiden Fällen koordiniert es das Zink-Ion im aktiven Zentrum des jeweiligen Enzyms.

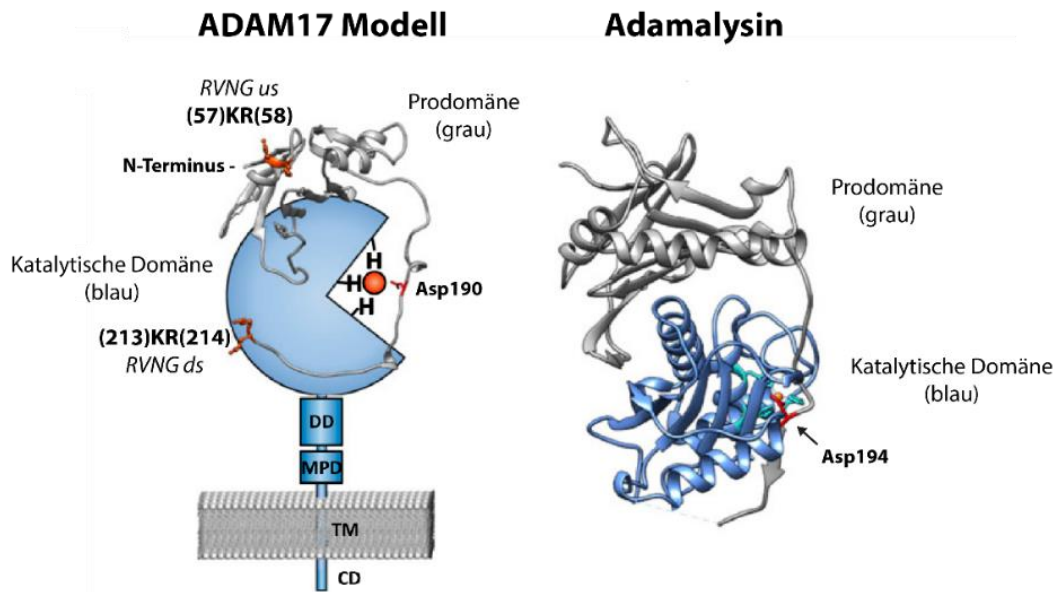


Abbildung 4.5: Strukturmodelle der Proteine ADAM17 und Adamalysin^[145].

Die Proteinmodelle zeigen die Prodomäne (grau) und die katalytische Domäne (blau) von ADAM17 und Adamalysin. In Orange sind die *upstream* und *downstream* Furin Schnittstelle in ADAM17 dargestellt. Die ADAM17-Prodomäne und ihre Orientierung zur katalytischen Domäne wurde auf Grundlage der veröffentlichten Kristallstruktur von Adamalysin (rechts, PDB: 3P24) und unter Verwendung von *Swiss Model Expaty* erstellt. Die in Rot gezeigte Asparaginsäure 194 in Adamalysin ist analog der Asparaginsäure 190 in der Prodomäne von ADAM17. Beide Asparaginsäuren interagieren mit dem Zink-Ion (oranger Punkt). Für die Darstellung der Strukturen wurde *UCSF Chimera* verwendet.

4.1.2 DAS MAKROPHAGEN-VORLÄUFER-ZELLSYSTEM AUF ADAM17^{EX/EX}-HINTERGRUND

Nach wie vor wird über die posttranskriptionale Regulation von ADAM17 diskutiert. Vor allem die Rolle der cytoplasmatischen Domäne und deren Phosphorylierung in der Aktivierung von ADAM17 sind noch nicht vollständig geklärt. Ebenso ist der genaue Mechanismus der Abspaltung der Prodomäne durch Proprotein Convertasen wie Furin nicht vollständig verstanden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der beiden posttranskriptionalen Prozesse auf die Maturierung und Aktivierung von ADAM17 in einem physiologischeren Zellsystem (Hoxb8-immortalisierte Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem (MØP)) untersucht. Dafür wurden Knochenmarkszellen aus ADAM17^{wt/wt}- und ADAM17^{ex/ex}-Mäusen entnommen und wie in Abbildung 4.6 A aufgearbeitet. Zunächst wurden die CD117-angereicherten Knochenmarkszellen mit einem retroviralen pMXs-Vektor transfiziert. Dieser enthielt das Gen *HoxB8* mit einer vorgelagerten Estrogen-bindenden Domäne. Das bedeutet, dass bei Anwesenheit von Estradiol das *HoxB8*-Gen abgelesen wird und dadurch die MØP-Zellen in ihrem Vorläufer-Stadium gehalten werden. Für die Analyse der funktionalen ADAM17-Varianten wurden die ADAM17-defizienten MØP-Zellen retroviral mit dem LV, dem wt und den Varianten transduziert. Wurde nun das Estradiol aus dem Zellkulturmedium entfernt, konnten die MØP-Zellen gezielt ausdifferenziert werden. Durch Zugabe des Monozyten-Kolonien-stimulierenden Faktors (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*, M-CSF) differenzierten die Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen aus.

Erfolgte die Zugabe des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF), differenzierten die MØP-Zellen zu dendritischen Zellen ähnlichen Zellen. Im Anschluss an die Differenzierung wurden die Zellen charakterisiert und funktional untersucht.

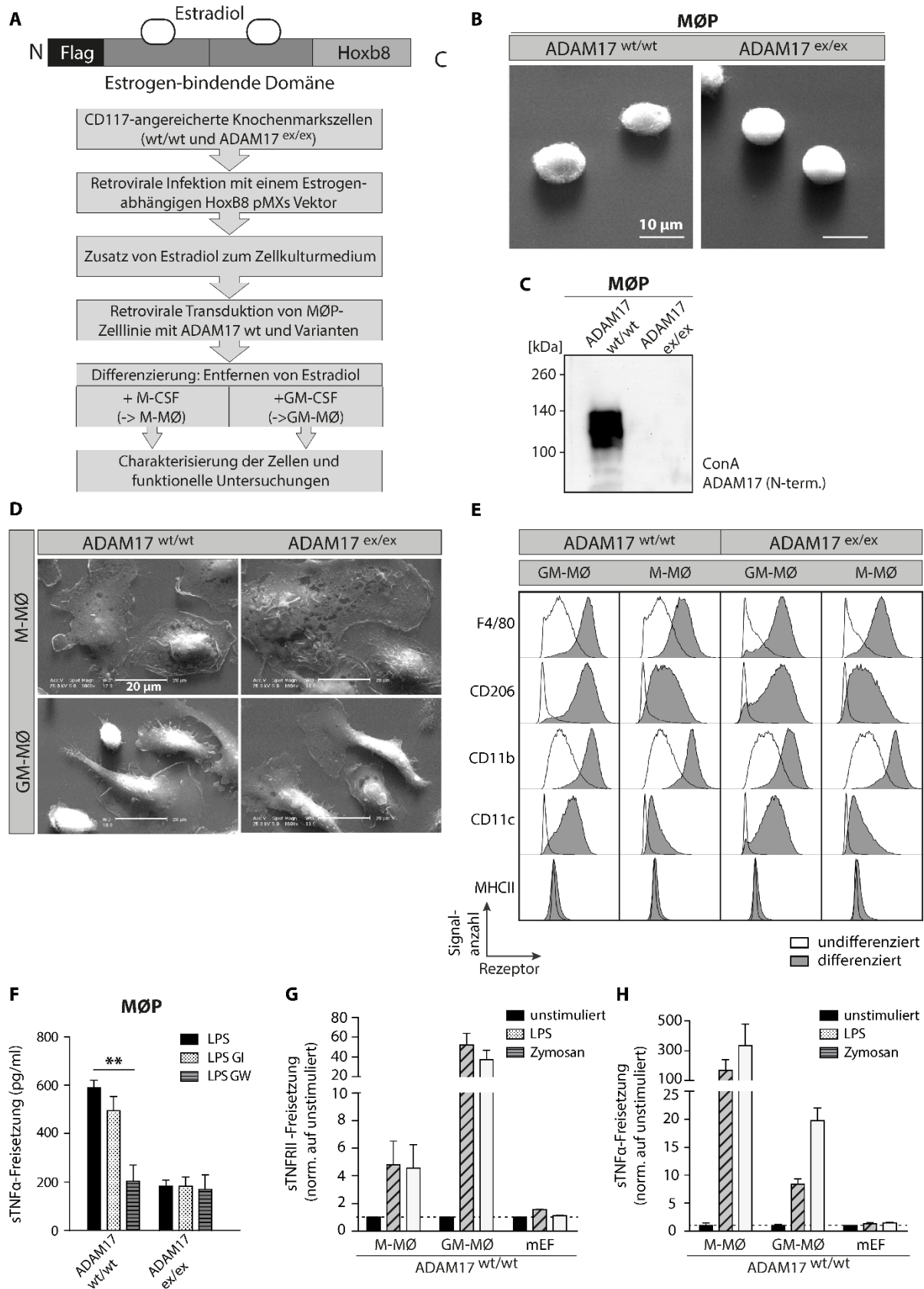


Abbildung 4.6: Etablierung und Charakterisierung der MØP-Zellen auf ADAM17^{ex/ex}-Hintergrund^[145].

A) Fließdiagramm zur Herstellung von HoxB8-immortalisierten MØP-Zellen. Oben dargestellt ist ein Schema des retroviralen HoxB8-Expressionsplasmids, das für die Generierung der immortalisierten MØP-Zellen verwendet wurde. Die HoxB8-Expression ist Estradiol-abhängig. Darunter ist dargestellt, wie aus Knochenmarkszellen der ADAM17^{wt/wt}- und ADAM17^{ex/ex}-Mäusen die MØP-Zellen hergestellt wurden. Diese können anschließend mit M-CSF oder GM-CSF weiter differenziert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (**B**) und Immunblot (**C**) von undifferenzierten ADAM17^{wt/wt}- und ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen. Es ist kein optischer Unterschied zwischen den undifferenzierten ADAM17^{wt/wt}- und den ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen zu erkennen. Beide Zelllinien weisen eine runde Zellform auf. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Im Immunblot ist nach einer ConA-Fällung deutlich zu sehen, dass die ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen keine detektierbare ADAM17-Proteinexpression aufweisen. Die Experimente und Aufnahmen wurden von Jeanette Schwarz und Philipp Arnold durchgeführt. **D)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der zu M-MØ oder GM-MØ differenzierten MØP-Zellen. Es wurden sowohl die wt als auch die ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen (M-MØ) oder dendritischen Zellen-ähnlichen Zellen (GM-MØ) ausdifferenziert. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm. Das Experiment und die Aufnahmen wurden von Jeanette Schwarz und Philipp Arnold durchgeführt. **E)** Durchflusszytometrische Analyse von Differenzierungsmarkern auf GM-MØ- und M-MØ-Zellen. Dargestellt sind Histogramme von differenzierten ADAM17^{wt/wt}- und ADAM17^{ex/ex}-Zellen im Vergleich zu undifferenzierten MØP-Zellen. Dabei sind die grauen Histogramme die der differenzierten und die weißen die der undifferenzierten Zellen. Dabei zeigt sich ein Anstieg der Differenzierungsmarker für die jeweils differenzierten Zellen. Abgebildet sind repräsentative Histogramme von drei unabhängigen Experimenten. **F)** TNFα-ELISA mit Überständen von wildtypischen und ADAM17-defizienten MØP-Zellen, die mit LPS stimuliert wurden. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem ADAM10-Inhibitor GI (hellgrau) oder mit dem ADAM10 und ADAM17-Inhibitor GW (dunkelgrau) behandelt. Vergleich der ADAM17-Aktivierung und *Shedding*-Aktivität von mEF- und differenzierten MØP-Zellen aus wildtypischen Mäusen. ELISAs von löslichem TNFRII (**G**) und löslichem TNFα (**H**) aus Überständen der mit LPS oder Zymosan behandelten Zellen.

Zunächst wurde untersucht, ob die ADAM17^{wt/wt}- und ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen sich morphologisch voneinander unterscheiden. In den Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wird deutlich, dass keine sichtbaren Unterschiede in der Zellform zu beobachten waren (Abbildung 4.7 B). Die ADAM17-Defizienz wurde mittels ConA-Fällung, und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abbildung 4.7 C). Auch nach der Differenzierung mit M-CSF oder GM-CSF waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den Zellen zu erkennen (Abbildung 4.7 D). Es konnte jedoch eine Änderung der Zellform durch die Differenzierung beobachtet werden. Die runden MØP-Zellen entwickelten unter Zugabe von M-CSF eine für Makrophagen typische Zellform. Ähnliches war auch unter Zugabe von GM-CSF zu sehen. Hier bildeten die Zellen Ausläufer, die denen von dendritischen Zellen ähnelten. Die Differenzierung wurde auch mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurden unterschiedliche Zellmarker für Makrophagen oder dendritische Zellen angefärbt und mit denen von undifferenzierten MØP-Zellen verglichen (Abbildung 4.7 E). Wie erwartet, zeigten die differenzierten Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen einen Anstieg in der Expression der Marker F4/80, CD206, CD11b und CD11c. Dabei wiesen die mittels GM-CSF zu dendritischen Zellen-ähnlichen Zellen differenzierten GM-MØ-Zellen eine höhere Expression an CD206 und CD11c auf als die M-MØ-Zellen.

Die ADAM17-Defizienz in den ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen wurden nicht nur auf Proteinebene bestätigt. Es wurde auch die proteolytische Aktivität von ADAM17 in den wildtypischen und den ADAM17-defizienten Zellen analysiert (Abbildung 4.6 F). Dafür wurden die Zellen mit Lipopolysacchariden von *E. coli* stimuliert. Dieses führte zu einer Signalkaskade ausgehend vom *Toll-like-Receptor 4* (TLR4) bis hin zur Aktivierung von ADAM17. LPS sind Bestandteile der

äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und werden zur Aktivierung von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen verwendet^[148, 149]. Es ist zu sehen, dass in den Überständen der ADAM17^{wt/wt}-MØP-Zellen im Vergleich zu den Überständen von ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen eine wesentlich höhere Konzentration von löslichem TNF α (sTNF α) vorlag. Durch die Behandlung der Zellen mit dem ADAM10-Inhibitor GI konnte diese Konzentration nur geringfügig reduziert werden. Erst die Inkubation mit dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW führte zu einer signifikanten Reduktion der sTNF α -Konzentration in den Überständen der wildtypischen MØP-Zellen auf einen Spiegel ähnlich der ADAM17^{ex/ex}-MØP-Zellen. Weder die Inkubation mit GI noch mit GW hatte einen Einfluss auf die sTNF α -Konzentration bei den ADAM17-defizienten MØP-Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen kein ADAM17 exprimieren und keine detektierbare ADAM17-Aktivität aufweisen.

Die MØP-Zellen stellen ein physiologischeres Zellsystem für die Analyse von ADAM17 dar als die vorher verwendeten mEF-Zellen. Das liegt unter anderem daran, dass für die Aktivierung von ADAM17 natürlich vorkommende Stimuli verwendet werden können. Für die Stimulation der mEF-Zellen wurde standardmäßig PMA verwendet. Die MØP-Zellen hingegen lassen sich mit LPS und Zymosan stimulieren. Wie bereits erwähnt sind LPS Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien und dienen als Modell der bakteriellen Infektion^[148, 149]. Zymosan kommt in der Zellwand von Hefen vor und aktiviert Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen über den *Toll-like-Receptor 2* (TLR2) und Dectin-1^[150-152]. Es ist ein etabliertes Modell für die Infektion mit Pilzen. Beide Stoffe stimulieren die angeborene Immunantwort, in der unter anderem ADAM17 eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass mEF-Zellen nicht mit LPS oder Zymosan stimuliert werden können (Abbildung 4.6 G, H). Für die Analyse wurden die sTNF α - und sTNFRII-Spiegel in Überständen der differenzierten, wildtypischen M-MØ-, GM-MØ-Zellen sowie in wildtypischen mEF-Zellen ermittelt. Die Werte der stimulierten Zellen wurden auf die Werte der unstimulierten Zellen normiert. Es wird deutlich, dass nach Stimulation mit LPS und Zymosan die Spiegel an löslichem Substrat für die differenzierten MØ-Zellen stark ansteigen. Dies ist jedoch nicht bei den mEF-Zellen detektierbar. Hier blieben die sTNF α - und sTNFRII-Spiegel auf dem Niveau der unstimulierten Zellen. Damit wurde gezeigt, dass mEF-Zellen nicht mit den natürlichen ADAM17-Stimuli LPS und Zymosan stimuliert werden können.

Zusammenfassend wurde mit den MØP-Zellen im Vergleich zu den HEK- oder mEF-Zellen ein physiologischeres Zellsystem vorgestellt. Es konnte auch auf einem ADAM17-defizienten Hintergrund etabliert werden. Dieses Zellsystem stellt also ein geeignetes Zellsystem zur Analyse von ADAM17-Varianten dar.

4.1.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION UND LOKALISATION VON ADAM17-VARIANTEN IM MAKROPHAGEN-VORLÄUFER-ZELLSYSTEM

Um die Aktivierung und Maturierung von ADAM17 besser zu verstehen, wurden ADAM17-defiziente MØP-Zellen retroviral mit den funktionalen ADAM17-Varianten rekonstituiert und anschließend differenziert. Zunächst erfolgte die Überprüfung der Expression der Varianten in undifferenzierten und differenzierten Zellen (Abbildung 4.7).

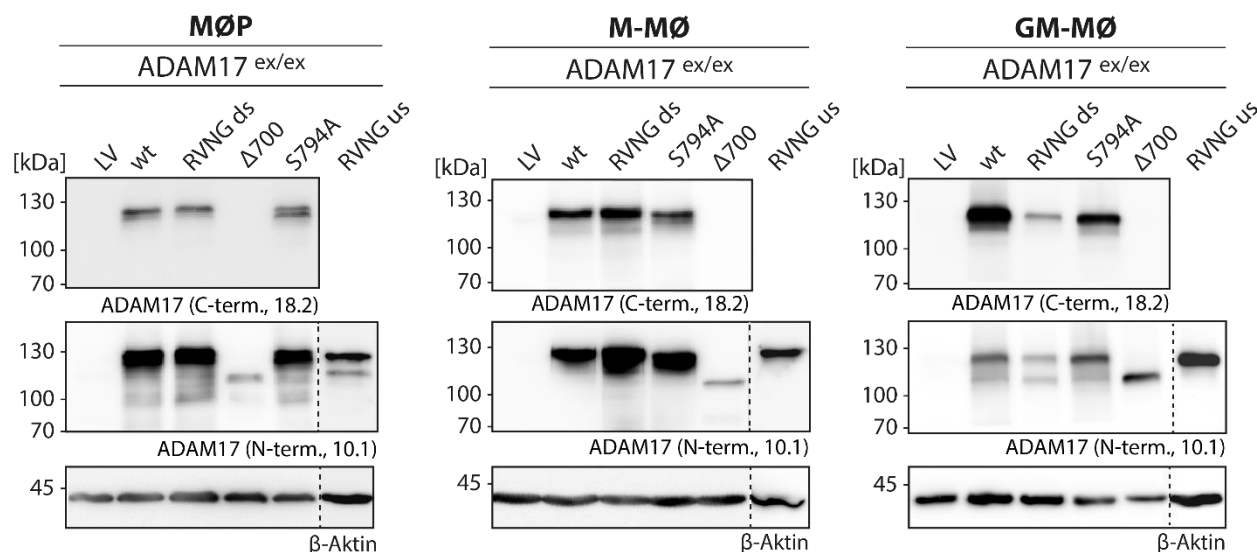


Abbildung 4.7: Untersuchungen zur Expression von ADAM17-Varianten im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem^[145].

Repräsentative Immunblots zur Kontrolle der Expression der ADAM17-Varianten in undifferenzierten MØP, differenzierten M-MØ und GM-MØ auf ADAM17^{ex/ex}-Hintergrund. Für die Detektion wurden die Antikörper 18.2 und 10.1 verwendet. Die Variante Δ700 konnte nur mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1 detektiert werden. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Für die Detektion von ADAM17 wurde je ein C- und N-terminal bindender Antikörper verwendet. Alle Varianten konnten in den undifferenzierten MØP-Zellen detektiert werden. Die Abbruchvariante Δ700 konnte nur mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1 detektiert werden. Auch in diesem Zellmodell zeigte sie das entsprechend reduzierte Molekulargewicht von ~100 kDa. In den differenzierten M-MØ- und GM-MØ-Zellen konnte eine ADAM17-Expression nachgewiesen werden. Somit war die retrovirale Transduktion zur Rekonstitution von ADAM17 in die ADAM17-defizienten MØP-Zellen erfolgreich.

Als nächstes erfolgte die Untersuchung der proteolytischen Aktivität der jeweiligen ADAM17-Varianten in den rekonstituierten Zellen (Abbildung 4.8). Dafür wurden zunächst die Spiegel der *geshreddeten* Substrate TNFα und TNFRII in Überständen der undifferenzierten und differenzierten MØ-Zellen nach Stimulation mit LPS und Zymosan untersucht (Abbildung 4.8 A, B).

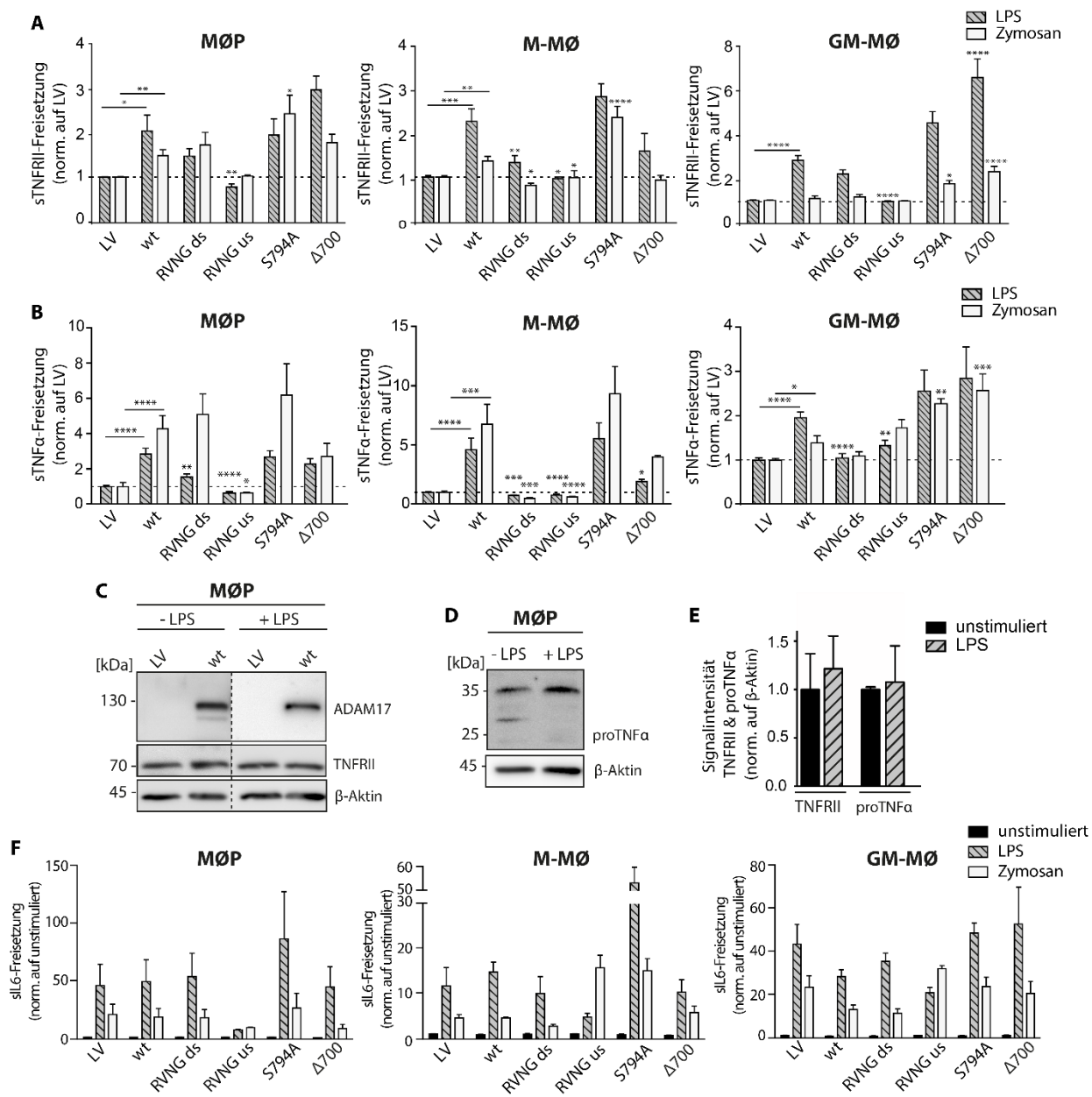


Abbildung 4.8: Funktionale Charakterisierung von ADAM17-Varianten im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem^[145].

ELISAs von löslichem TNFRII (A) und löslichem TNFα (B) aus Überständen von ADAM17-defizienten MØP-, M-MØ- und GM-MØ-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten und dem wt rekonstituiert wurden. Die Zellen wurden mit LPS oder Zymosan stimuliert. Die Werte sind auf den LV normiert und stammen aus drei individuellen Experimenten. Repräsentativer Immunoblot zur Untersuchung des Einflusses von LPS auf die Expression der untersuchten ADAM17-Substrate TNFRII (C) und TNFα (D) in MØP-Zelllysaten. Es wurden Antikörper eingesetzt, die jeweils cytoplasmatische Epitope erkannten. Als Ladekontrolle diente jeweils β-Aktin. (E) Densitometrische Auswertung der TNFRII- (~70 kDa) und TNFα- (~35 kDa) Bande. Die Werte wurde auf die Ladekontrolle β-Aktin normiert. Es wurde kein Einfluss von LPS auf die Expression beobachtet. Die Werte stammen aus drei individuellen Experimenten. (F) Interleukin 6 (IL-6)-ELISA von Zellüberständen von MØP-, M-MØ- und GM-MØ-Zellen rekonstituiert mit ADAM17-Varianten. Die Zellen wurden unstimuliert (schwarze Balken) und stimuliert mit LPS (graue Balken) oder Zymosan (weiße Balken) untersucht. Die Werte wurden auf die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind Daten aus drei individuellen Experimenten.

Nach Stimulation konnte TNFRII-*Shedding* für die MØP-, M-MØ- und GM-MØ-Zellen, die mit dem wt, den Varianten S794A und Δ 700 rekonstituiert wurden, detektiert werden (Abbildung 4.8 A). Die zwei Furin-resistenten Varianten RVNG ds und RVNG us zeigten in den differenzierten Zellen eine reduzierte ADAM17-Aktivität gegenüber TNFRII. Dieses bestätigt die Wichtigkeit der Prozessierung der ADAM17-Prodomäne durch Furin nicht nur an der *downstream*, sondern auch an der *upstream* Furin-Schnittstelle. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das zweite Substrat TNF α beobachtet werden (Abbildung 4.8 B). Auch hier wurden teilweise signifikant niedrigere sTNF α -Spiegel detektiert. Insgesamt führte die Stimulation mit Zymosan in den undifferenzierten und differenzierten Zellen im Vergleich zu TNF α zu einem weniger effizienten TNFRII-*Shedding*. Die Varianten S794A und Δ 700 waren weiterhin konnten beide Substrate weiterhin *shedden*. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die cytoplasmatische Domäne bzw. die Phosphorylierung durch PLK2 keine entscheidende Rolle für die proteolytische Aktivität von ADAM17 spielt.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Inkubation mit LPS einen Einfluss auf die Expression der untersuchten Substrate hat. Dazu wurden MØP-Zellen mit LPS inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 4.8 C, D). Die Bandenintensität für TNFRII und pro-TNF α wurde für die densitometrische Auswertung auf die Bandenintensität von β -Aktin normiert (Abbildung 4.8. E). Sowohl im Western Blot als auch in der Quantifizierung wurde deutlich, dass LPS keinen Einfluss auf die Expression der beiden Substrate hatte.

Nach Aktivierung erfolgt die Ausschüttung von IL-6 durch Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und Monozyten. Durch die Bestimmung der Konzentration von Interleukin 6 (IL-6) in den Überständen der unstimulierten und stimulierten MØP-, M-MØ- und GM-MØ-Zellen, konnte überprüft werden, ob die Stimulation durch LPS und Zymosan erfolgreich war (Abbildung 4.8 F). Die Freisetzung von IL-6 durch die untersuchten Zellen sollte unabhängig von ADAM17 sein. Somit ist auch ein Anstieg bei den Zellen transduziert mit dem LV zu erwarten. Die gezeigten Werte sind auf die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Es war bei fast allen Konstrukten unabhängig vom Zelltyp ein deutlicher Anstieg von IL-6 im Überstand zu detektieren. Eine Ausnahme stellte die Variante RVNG us dar. Diese zeigte in den MØP-Zellen nur leicht erhöhte IL-6-Konzentrationen. Im Gegensatz zu den anderen Varianten verursachte die Stimulation mit Zymosan bei der RVNG us in den differenzierten Zellen einen höheren IL-6-Spiegel im Überstand als LPS. Die Variante S794A wies in den M-MØ-Zellen den höchsten IL-6-Spiegel nach Stimulation mit LPS auf. Zusammenfassend kann anhand dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass sich die etablierten MØP-, M-MØ- und GM-MØ-Zellen mit LPS und Zymosan stimulieren lassen.

Um zusätzlich auch die Maturierung von ADAM17 zu verstehen, wurde als nächstes die zelluläre Lokalisation der ADAM17-Varianten untersucht (Abbildung 4.9). Dazu wurden differenzierte sowie und mit LPS stimulierte M-MØ- und GM-MØ-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert (Abbildung 4.9 A). Für die Detektion von ADAM17 (rot) wurde ein anti-myc-Antikörper verwendet, da die entsprechenden Konstrukte mit einer myc-Sequenz versehen sind. Die Färbung des ERs

erfolgte durch Verwendung eines Antikörpers gegen den ER-Marker PDI (grün). In den weißen Kästen sind die markierten Bereiche vergrößert dargestellt.

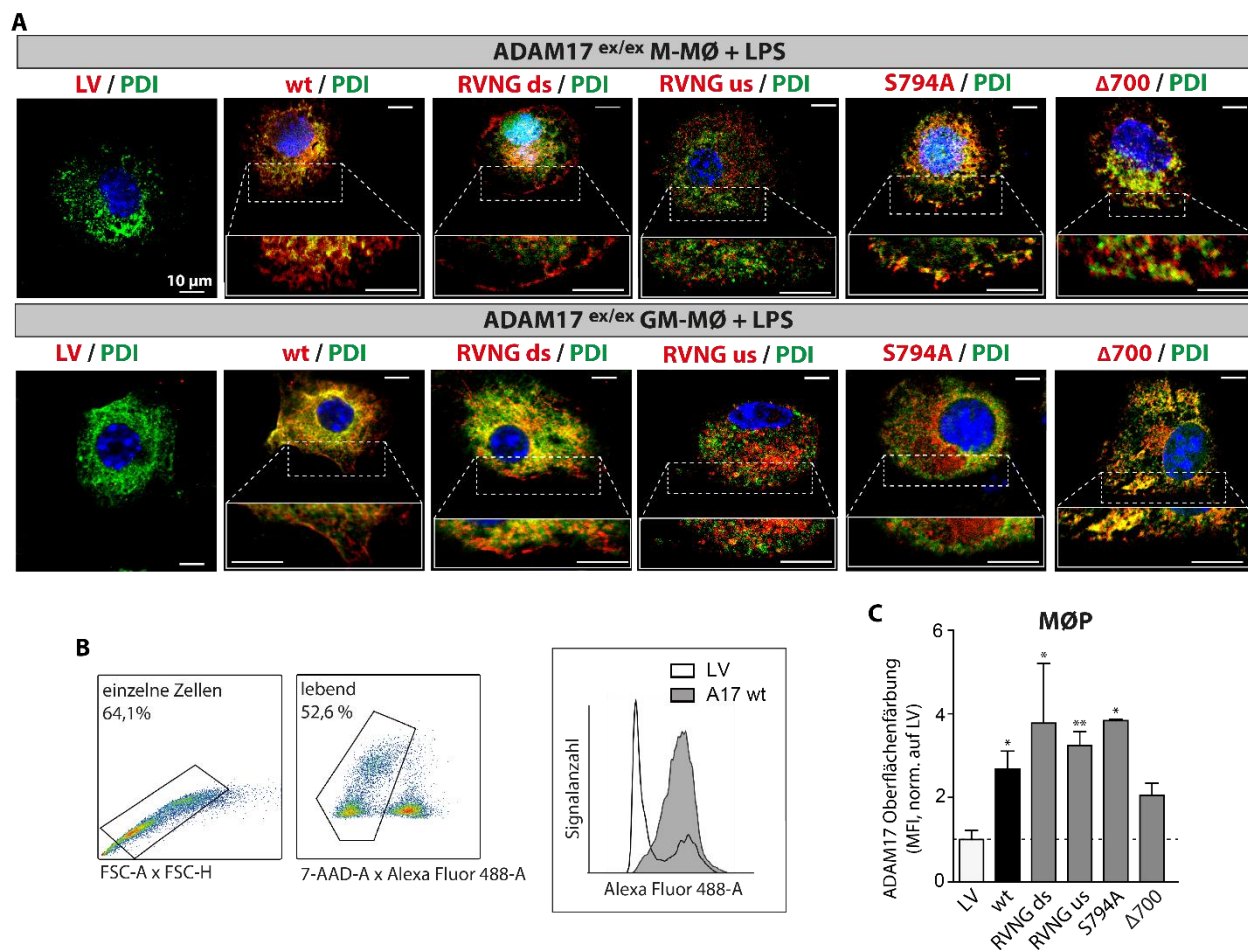


Abbildung 4.9: Charakterisierung der Lokalisation von ADAM17-Varianten im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem^[145].

A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von ADAM17-defizienten M-MØ- und GM-MØ-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten und dem wt rekonstituiert wurden. Die Zellen wurden mit LPS stimuliert. Für die Färbung von ADAM17 (rot) wurde ein anti-myc-Antikörper verwendet. Als ER-Marker wurden PDI (grün) gewählt. Die weißen Boxen zeigen Vergrößerungen der Strukturen an der Zelloberfläche. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. **B-C)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenlokalisierung von ADAM17 in stabil transduzierten MØP-Zellen. Für die Färbung wurde der extrazellulär-bindende Antikörper 10.1 verwendet. **B)** Für die Analyse wurden zunächst die einzelnen Zellen (FSC-A x FSC-H), dann die lebenden (7-AAD negativ) ausgewählt und als Histogramm (AlexaFluor488) dargestellt. **C)** Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität, die auf den LV normiert wurde. Die Werte stammen aus drei individuellen Experimenten.

Es konnte bei allen untersuchten Varianten eine Co-Lokalisation von ADAM17 mit dem ER-Marker PDI beobachtet werden. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den M-MØ- und GM-MØ-Zellen sichtbar. Die Zellen, die mit dem wt oder der Variante RVNG ds transfiziert wurden, zeigten Signale für ADAM17 außerhalb des ERs. Dieses deutet auf eine Lokalisation von ADAM17 an der Zelloberfläche hin. Um dieses eingehender zu untersuchen, wurde extrazelluläres ADAM17

angefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.9 B, C). Zunächst erfolgte die Sortierung nach Einzelzellen, die mithilfe eines Punktdiagramms, in dem *Forward Scatter Area* gegen *Forward Scatter Height* aufgetragen wurde (Abbildung 4.9 B, links). Wenn ein Partikel im Durchflusszytometer den Laserstrahl passiert, führt dies zur Brechung des Lichtes und dadurch zu einem Spannungsimpuls. Dieser Impuls kann durch drei Größen beschrieben werden: *Area*, *Height* und *Width*. Die Höhe (*Height*) des Impulses beschreibt die Lichtbrechung des Partikels, wenn dieser in der Mitte des Laserstrahls ist und es zur maximalen Lichtbrechung kommt. Unter *Area* versteht man die Fläche des Spannungsimpulses, die aus der Integration der Lichtbrechung über die Zeit des gemessenen Partikels berechnet wird. Die Weite (*Width*) eines Spannungsimpulses wird aus der Höhe und der Fläche dieses Impulses errechnet. Wird nun die *Forward Scatter Area* gegen die *Forward Scatter Height* aufgetragen, können Zellklumpen oder -dupletten von Einzelzellen unterschieden werden. Diese Zellaggregate haben im Vergleich zu einer einzelnen Zelle eine größere Fläche, aber annähernd die gleiche Höhe des Spannungsimpulses. Das wurde genutzt, um Einzelzellen für die weitere Analyse auszuwählen. Anschließend wurden die 7-AAD-negativen Zellen ausgewählt, da diese die lebende Zellpopulation darstellt. Das Peptid 7-Aminoactinomycin (7-AAD) kann nicht in Zellen mit intakter Zellmembran (lebende Zellen) eindringen und färbt somit nur apoptotische Zellen an. Für die Population der lebenden Zellen wurde das AlexaFluor488-Signal als Histogramm angezeigt. Die Quantifizierung erfolgte über die Mittlere Fluoreszenzintensität des AlexaFluor488-Signals normiert auf den LV (Abbildung 4.9 C). Alle untersuchten ADAM17-Varianten erreichten die Zelloberfläche in den undifferenzierten MØP-Zellen. Die Varianten RVNG ds, RVNG us und S794A zeigten dabei etwas höhere Werte als der wt. Nur die Abbruchvariante $\Delta 700$ wies verglichen mit dem wt eine leicht erniedrigte Oberflächenlokalisation von ADAM17 auf, die allerdings im Gegensatz zu allen anderen Varianten auch nicht signifikant erhöht war (Abbildung 4.9 C).

Zusammenfassend konnte das etablierte MØP-Zellsystem auf ADAM17-defizientem Hintergrund für die Analyse von funktionalen ADAM17-Varianten verwendet werden. Die proteolytische Aktivität war besonders bei den Furin-resistenten Varianten RVNG ds und RVNG us eingeschränkt. Das zeigt die zentrale Rolle der Abspaltung der Prodomäne für die Aktivität von ADAM17. Die cytoplasmatische Domäne scheint im Gegensatz dazu eine zu vernachlässigende Rolle für die Funktion von ADAM17 zu spielen. Die Ergebnisse legen nahe, dass diese Domäne jedoch wichtig für den Transport von ADAM17 ist.

4.2 IDENTIFIKATION VON ADAM17-PUNKTMUTATIONEN AUS TUMORGEWEBE VON DARMKREBS-PATIENTEN

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, wird ein Zusammenhang von ADAM17 mit der Entstehung und Progression von Krebs angenommen. Aus diesem Grund wurden im Zuge dieser Arbeit die Datenbanken IntOGen, COSMIC, TCGA und ICGC auf Mutationen im Gen *Adam17* durchsucht. In diesen Datenbanken sind Sequenzierungsdaten zu somatischen Mutationen, die in Tumorgewebe von Krebspatienten gefunden wurden, aufgelistet. Sucht man in der Datenbank COSMIC nach Einträgen zu *Adam17*, erhält man 189 Ergebnisse. Werden Tumorgewebeproben betrachtet, die aus dem Dickdarm inklusive Caecum und Colon entnommen wurden, findet man 2331 Patientenproben. Dabei enthalten 40 dieser Proben eine Mutation im Gen *Adam17*. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung von sieben Mutationen, die in Tumorgeweben von Darmkrebspatienten oder Pankreaskrebspatienten gefunden wurden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Auflistung der analysierten ADAM17-Varianten

Humane ADAM17 Mutation	Position der Mutation in der cDNA	Position der Mutation im Protein	Betroffene Domäne in ADAM17	Verteilung im Gewebe	Quelle (Datenbank)
R177C	c.529C>T	p.R177C	Prodomäne (PRO)	Caecum, ZNS	COSMIC, ICGC, TCGA
E319G	c.956A>G	p.E319G	Katalytische Domäne (KD)	Colon	COSMIC, ICGC, TCGA
E406X	c.1216G>T	p.E406X	Katalytische Domäne (KD)	Colon	COSMIC
M435I	c.1305G>A	p.M435I	Katalytische Domäne (KD)	Colon	COSMIC, IntOGen
P417Q	c.1250C>T	p.P417Q	Katalytische Domäne (KD)	Ösophagus, Pankreas	ICGC, TCGA
D616N	c.1846G>A	p.D616N	Membran-proximale Domäne (MPD)	Colon, Uterus	TCGA
D657A	c.1970A>C	p.D657A	Membran-proximale Domäne (MPD)	Colon	COSMIC
R725H	c.2174G>A	p.R725H	Cytoplasmatische Domäne (CD)	Colon	COSMIC

Bei den ausgewählten Punktmutationen handelt es sich um *missense*-Mutationen, die zu einer veränderten Aminosäure führen. Eine Ausnahme stellt die Mutation E406X dar. Hier codiert der neue Drei-Basen-Code für ein Stopp-Codon. Diese Variante besteht somit nur aus den ersten 405 Aminosäuren. Demnach fehlen dieser Variante ein Teil der katalytischen Domäne, inklusive zwei der drei Histidine des aktiven Zentrums, die Disintegrin-Domäne, die Membran-proximale Domäne, die Transmembran-Domäne und die Cytoplasmatische Domäne. Die weiteren Mutationen verteilen sich auf die Prodomäne (R177C), katalytische Domäne (E319G, M435I und P417Q), Membran-proximale Domäne (D616N und D657A) und cytoplasmatische Domäne (R725H). Die ungefähre Position der Mutationen ist in Abbildung 4.10 A schematisch dargestellt.

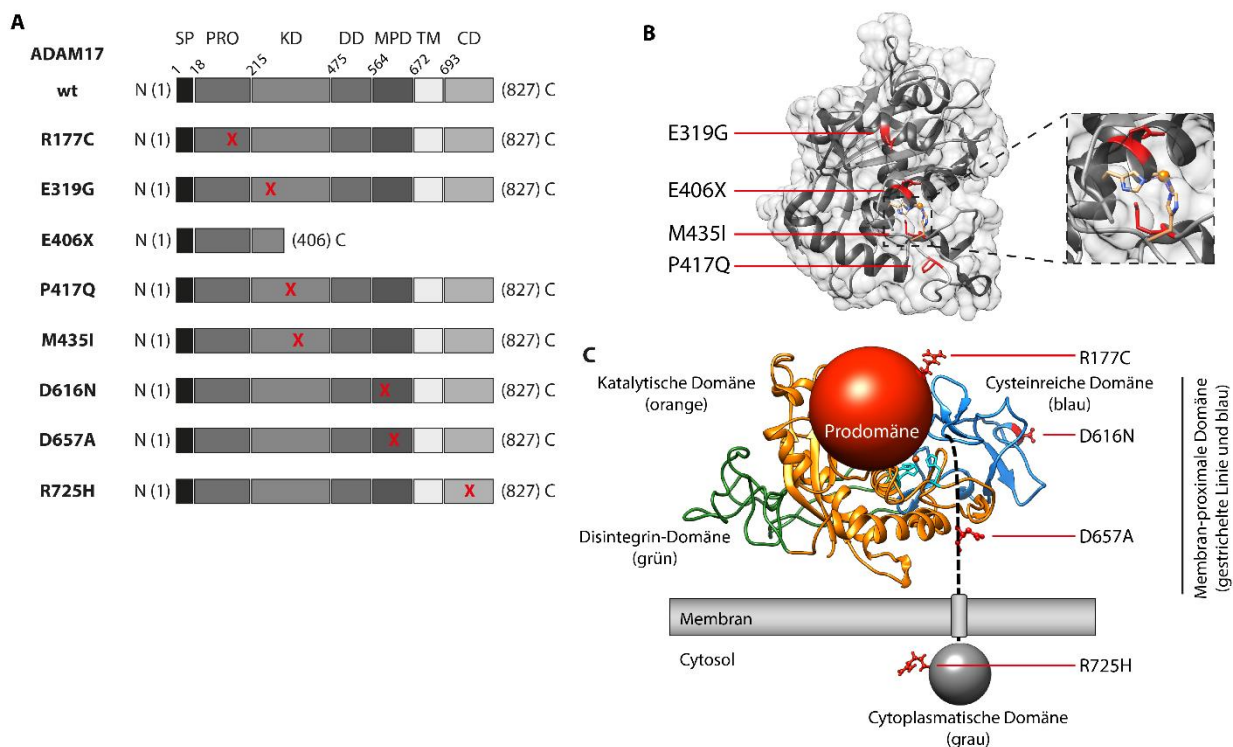


Abbildung 4.10: Übersicht über die untersuchten ADAM17-Varianten^[146].

A) Schematische Übersicht der unterschiedlichen Domänen von murinem ADAM17. Weiter sind die untersuchten ADAM17-Varianten aufgelistet. Das rote Kreuz zeigt die Position der Punktmutation an. **B)** Kristallstruktur der katalytischen Domäne von ADAM17. In Rot sind die untersuchten Varianten E319G, E406X, P471Q und M435I hervorgehoben. Ebenso ist das aktive Zentrum mit dem koordinierten Zink-Atom farblich hervorgehoben. **C)** Strukturmodell des Proteins ADAM17 mit Prodomäne (rot), katalytische Domäne (orange), Cysteinreiche Domäne (blau), Disintegrin-Domäne (grün) und cytoplasmatischer Domäne (grau). Die untersuchten ADAM17-Varianten R177C (Prodomäne), D616 (Cysteinreiche Domäne), D657A (Membran-proximale Domäne) und R725H (cytoplasmatische Domäne) sind in Rot dargestellt. Das ADAM17-Modell wurde mithilfe von *Swiss-Model Expsy* und der Struktur von ADAM10 (PDB: 6BE6) erstellt.

Bisher wurde nur die 3D-Struktur der katalytischen Domäne gelöst (Abbildung 4.10 B). Die untersuchten Varianten sind in Rot dargestellt. Ebenfalls farblich vorgehoben sind die drei Histidine des aktiven Zentrums, sowie das koordinierte Zink-Atom. Die Orientierung der katalytischen Domäne zu den restlichen ADAM17-Domänen ist in Abbildung 4.10 C dargestellt. Anhand der gelösten 3D-Struktur von ADAM10 (PDB: 6BE6) wurde die Cysteinreiche Domäne (blau) und die Disintegrin-Domäne (grün) neben der katalytischen Domäne (orange) modelliert. Über die 3D-Struktur der Prodomäne (rot) und der cytoplasmatischen Domäne (grau) sind keine ausreichenden Informationen vorhanden, um eine Struktur darzustellen. Sie wurde aus diesem Grund jeweils schematisch als Kugel dargestellt.

4.2.1 FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG VON ADAM17-VARIANTEN IN DER KATALYTISCHEN DOMÄNE

Zunächst wurden die ADAM17-Varianten in der katalytischen Domäne kloniert und analysiert. Dazu wurden die Punktmutationen in humanem *Adam17* in einen pCMV6-Vektor eingefügt. Jedoch konnte nur Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli*s isoliert werden, die nur Fragmente des humanen *Adam17*-Gens enthielten. Anscheinend wirkte das humane ADAM17 in dem pCMV6-Vektor toxisch auf die verwendeten *E. coli*s. Ähnliches wurde bereits von Chavaroche *et al.* beschrieben^[153]. Dieser toxische Effekt war bei der Verwendung von murinem ADAM17 in einem pCDNA3.1-Vektor nicht zu beobachten, weswegen die nachfolgende Charakterisierung der Punktmutationen in murinem ADAM17 erfolgte. Dafür wurden die in Kapitel 4.1.1 verwendeten ADAM10- und ADAM17-defizienten HEK-Zellen (HEK dKO) verwendet. Diese Zellen lassen sich im Gegensatz zum MØP-Zellsystem einfach und schnell transfizieren. Das ermöglichte eine schnelle Analyse der ADAM17-Varianten, weswegen sie für die Charakterisierung verwendet wurden. Die HEK dKO-Zellen wurden mit den jeweiligen ADAM17-Varianten rekonstituiert und auf eine gleichmäßige Expression untersucht (Abbildung 4.11).

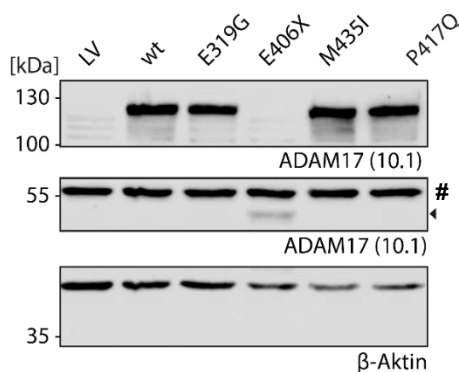


Abbildung 4.11: Untersuchung der Expression von ADAM17-Varianten in der katalytischen Domäne.

Repräsentativer Immunblot von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Die Detektion von ADAM17 erfolgte mit dem N-terminal bindenden Antikörper 10.1. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Unspezifische Banden sind mit einem # gekennzeichnet.

Es zeigte sich ein gleichmäßiges Expressionsniveau für ADAM17 wt und die Varianten E319G, M435I und P417Q. Die Abbruchvariante E406X weist aufgrund des vorzeitigen Stopps nur ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa auf, was auch im Immunblot sichtbar war (Abbildung 4.11). Hier zeigte sie verglichen mit wt und den restlichen Varianten ebenfalls eine niedrigere Bandenintensität.

Um den Einfluss der jeweiligen Punktmutation auf die proteolytische Aktivität von ADAM17 zu untersuchen, wurden die HEK dKO-Zellen mit der jeweiligen Variante und einem Substrat co-transfiziert. Als Substrate wurden murines TNF α , muriner IL-6 Rezeptor (IL-6R) und murines Amphiregulin (AREG) gewählt (Abbildung 4.12). Es erfolgte die Konzentrationsbestimmung der löslichen Substrate in Überständen der co-transfizierten Zellen.

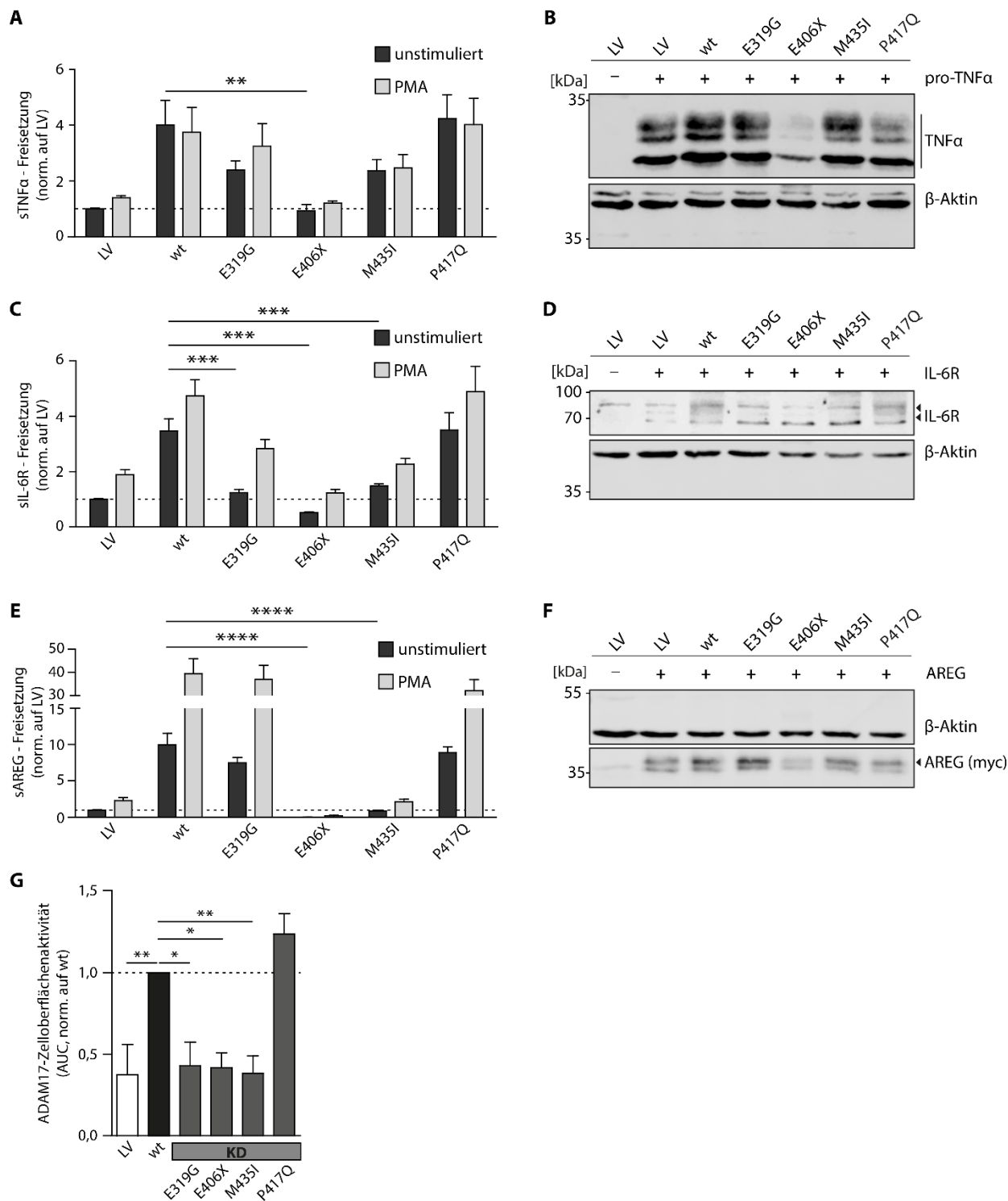


Abbildung 4.12: Proteolytische Aktivität von ADAM17-Mutationen in der katalytischen Domäne.

ELISA von löslichem TNFα (A), IL-6R (C) und AREG (E) in Überständen von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Die Zellen wurden mit PMA (2 h) stimuliert. Die dargestellten Werte sind auf den unstimulierten LV normiert und stammen aus drei individuellen Experimenten. Repräsentative Immunblots zeigen die Expression der Substrate TNFα (B), IL-6R (D) und AREG (F). Als Ladekontrolle diente jeweils β-Aktin. (G) ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche von dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Für die Detektion

der proteolytischen Aktivität wurde ein fluorogenes TNF α -Peptid verwendet. Die Fluoreszenzintensität wurde alle 30 sec über einen Zeitraum von 120 min gemessen. Für die Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve der Fluoreszenzintensität herangezogen und auf den wt normiert. Die dargestellten Werte stammen aus drei individuellen Experimenten.

Die mit dem ADAM17 wt rekonstituierten Zellen zeigten im Überstand einen deutlich höheren Spiegel an sTNF α , sIL-6R und sAREG im Vergleich zum LV, das durch Stimulation mit PMA noch erhöht werden konnte (Abbildung 4.12 A, C, E). Dieser Effekt war ebenfalls bei der Variante P417Q zu beobachten. Die Abbruchvariante E406X zeigte keine Aktivität für die untersuchten Substrate. Das war zu erwarten, da dieser Variante ein Teil der katalytischen Domäne und somit das aktive Zentrum fehlt. Bei den Substraten IL-6R und AREG konnte eine signifikant verringerte ADAM17-Aktivität der Variante M435I beobachtet werden (Abbildung 4.12 C, E). Der Spiegel an sTNF α war zwar erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Überraschenderweise zeigte die Variante E319G eine Aktivität gegenüber AREG, nicht jedoch gegenüber TNF α oder IL-6R (Abbildung 4.12 A, C, E). Die gleichmäßige Expression der Substrate wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abbildung 4.12 B, D, F). Dabei konnte für die Variante E406X eine leicht verminderte Expression detektiert werden.

Weiterhin erfolgte die Analyse der proteolytischen Aktivität der ADAM17-Varianten mithilfe eines Zelloberflächen-Aktivitätsassay in lebenden Zellen (Abbildung 4.12 G). Die HEK dKO-Zellen wurden mit der jeweiligen Variante, sowie mit wt rekonstituiert. Als Negativkontrolle wurden HEK dKO-Zellen gewählt, die mit dem LV transfiziert wurden. Nur der wt und die Variante P417Q zeigten eine signifikante ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche. Die Varianten E319G, E406X und M435I waren gegenüber dem verwendeten TNF α -Peptids inaktiv, was auf einen gestörten Transport der Varianten an die Zelloberfläche hindeuten kann. Um dies zu untersuchen, wurde die Lokalisation der Varianten analysiert (Abbildung 4.13). Dies erfolgte zunächst mittels Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten HEK dKO-Zellen (Abbildung 4.13 A).

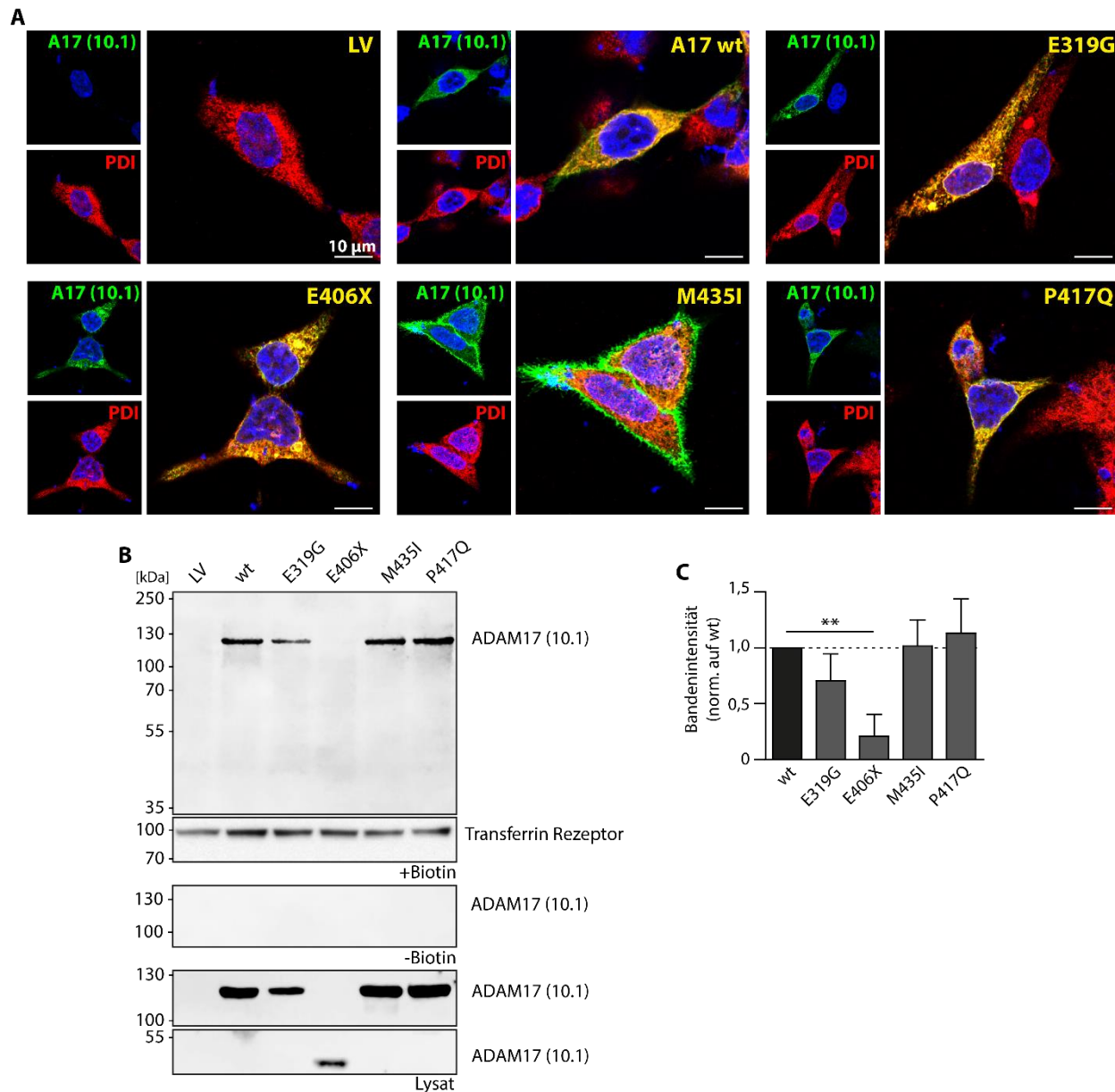


Abbildung 4.13: Einfluss von ADAM17-Mutationen in der katalytischen Domäne auf die zelluläre Lokalisation.

A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Für die Detektion von ADAM17 (grün) wurde der N-terminal bindende Antikörper 10.1 verwendet. PDI (rot) diente als ER-Marker. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. **B)** HEK dKO-Zellen wurden mit den ADAM17-Varianten transfiziert und mit Biotin behandelt. Die so biotinylierten Oberflächenproteine wurden präzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion von ADAM17 wurde der N-terminal bindende Antikörper 10.1 verwendet. Als Kontrolle für die Biotinylierung und Präzipitation der Oberflächenproteine wurde der Transferrin Rezeptor gewählt. Transfizierte HEK dKO-Zellen, die nicht mit Biotin behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle. Für die Überprüfung der Expression wurden Lysate der verwendeten Zellen ebenfalls mittels Western Blot analysiert. **C)** Dargestellt ist die Quantifizierung der Oberflächenexpression von ADAM17 in HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten transfiziert wurden. Dafür wurde die Bandenintensität der Biotin-Blots ermittelt sowie auf die Bandenintensität der Lysatkontrolle und anschließend auf den wt normiert.

In den Immunfluoreszenzaufnahmen sind ADAM17 (grün) und PDI als ER-Marker (rot) zu sehen. Die Zellkerne (blau) der HEK dKO-Zellen wurden mittels DAPI angefärbt. Es ist zu sehen, dass in den Zellen, die mit dem LV transfiziert wurden, kein ADAM17 detektierbar war (Abbildung 4.13 A). Zellen, die mit ADAM17 wt rekonstituiert wurden, zeigten eine Co-Lokalisation (gelb) von ADAM17 mit dem ER. Weiterhin konnte für diese Zellen eine Lokalisation von ADAM17 außerhalb des ERs, vermutlich an der Zelloberfläche, beobachtet werden. Ähnliches konnte für die Variante P417Q gezeigt werden. Die Varianten E319G und E406X zeigten eine hohe Co-Lokalisation mit dem ER. Besonders die Abbruchvariante E406X scheint sich im ER zu akkumulieren. Überraschenderweise zeigte die Variante M435I eine deutliche Lokalisation von ADAM17 außerhalb des ERs. Ob ADAM17 hier auch an die Zelloberfläche der HEK dKO-Zellen transportiert wird oder nur in andere Zellkompartimente außerhalb des ERs, wurde mittels Biotinylierung von Oberflächenproteinen untersucht (Abbildung 4.13 B, C). Hierfür wurden HEK dKO-Zellen mit den jeweiligen Varianten bzw. wt rekonstituiert und mit einer Biotin-haltigen Lösung inkubiert. Dabei koppelte Biotin an alle Proteine an der Zelloberfläche, die im Anschluss daran immunpräzipitiert wurden. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf ADAM17 untersucht. Als Kontrolle für den Erfolg der Biotinylierung wurde der Transferrin Rezeptor analysiert. Dabei handelt es sich um ein Membranprotein, das zur Aufnahme von Eisen in die Zelle benötigt wird und an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Es konnte für alle untersuchten Konstrukte eine deutliche Bande für dieses Protein gezeigt werden. Somit kann von einer erfolgreichen Biotinylierung der Oberflächenproteine ausgegangen werden. Weiterhin wurde die Proben auf ADAM17 untersucht. Dafür wurde der Antikörper 10.1 verwendet. Wie bereits beschrieben, bindet dieser an der katalytischen Domäne von ADAM17. Bis auf die Variante E406X konnten alle weiteren Varianten und der wt an der Zelloberfläche detektiert werden. Das war zu erwarten, da die E406X keine Transmembrandomäne und somit keine Verankerung in der Zellmembran aufweist. In der Lysatkontrolle war eine Bande für die E406X auf Höhe von ~45 kDa detektierbar. Somit konnte gezeigt werden, dass diese Variante zwar exprimiert, jedoch nicht an die Zelloberfläche transportiert wird. Die Variante M435I zeigte eine ähnlich starke Bande wie der wt. Auch die Variante P417Q erreichte die Zelloberfläche in HEK dKO-Zellen, jedoch zu einem größeren Anteil als der wt. Die Variante E319G zeigte im Gegensatz dazu eine schwächere Bande in den mit Biotin-behandelten Zellen. Alle Varianten konnten in der Lysatkontrolle detektiert werden, zeigten aber unterschiedliche Expressionsniveaus. Aus diesem Grunde wurde für die Quantifizierung von ADAM17 an der Zelloberfläche die Bandenintensität der mit Biotin behandelten Proben auf die Bandenintensität der Lysatkontrolle normiert. Anschließend erfolgte die Normierung aller Proben auf den wt (Abbildung 4.13 C). Dabei wurde deutlich, dass die Varianten P417Q und M435I sowie der wt die Zelloberfläche annähernd gleich stark erreichen. Die Variante P417Q wies dabei eine leicht höhere Oberflächenlokalisierung im Vergleich zur M435I und dem wt auf. Die Varianten E319G und E406X erreichten die Zelloberfläche zu einem geringeren Anteil als der wt. Die Erniedrigung der Oberflächenlokalisierung war dabei nur für die E406X signifikant.

Zusammengefasst hatten die Mutationen in der katalytischen Domäne keinen Einfluss auf die Expression von ADAM17, jedoch beeinträchtigten sie die ADAM17-Aktivität negativ. Die Variante P417Q stellt dabei jedoch eine Ausnahme dar, da sie gegenüber den untersuchten Substraten TNF α , IL-6R, AREG und einem fluorogenem TNF α -Peptid eine Aktivität auf Niveau des wt zeigte. Die Abbruchvariante E406X zeigte dabei durchgehend eine erniedrigte proteolytische Aktivität gegenüber den untersuchten Substraten sowie eine signifikant verminderte Oberflächenlokalisation. Interessanterweise konnte für die Variante E319G eine ADAM17-Aktivität gegenüber AREG, aber nicht gegenüber TNF α und IL-6R beobachtet werden.

4.2.2 FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG VON ADAM17-VARIANTEN AUßERHALB DER KATALYTISCHEN DOMÄNE

Als nächstes erfolgte die Charakterisierung von ADAM17-Punktmutationen außerhalb der katalytischen Domäne. So befindet sich die R177C in der Prodomäne. Die Varianten D616N und D657A sind in der Membran-proximalen Domäne gefunden worden. Die vierte Mutation R725H betrifft die cytoplasmatische Domäne. Analog zu den ADAM17-Varianten in der katalytischen Domäne erfolgte zunächst die Untersuchung der Expression in HEK dKO-Zellen. Dabei wurden die Zellen mit einem pcDNA3.1 Expressionsvektor, der murines ADAM17 mit der jeweiligen Punktmutation enthielt, transfiziert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. In Abbildung 4.14 ist ein repräsentativer Immunblot gezeigt.

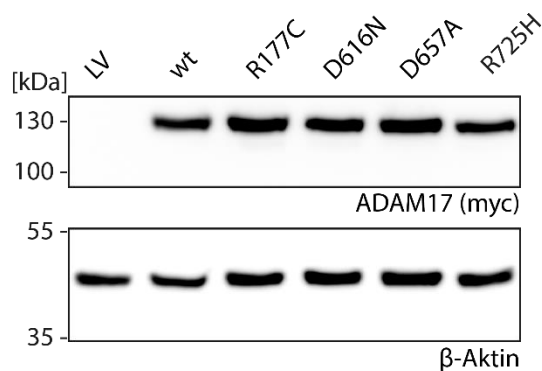


Abbildung 4.14: Untersuchung der Expression von Darmkrebs-assoziierten ADAM17-Varianten außerhalb der katalytischen Domäne^[146].

Repräsentativer Immunblot von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Die ADAM17-Konstrukte waren am C-Terminus mit einem myc-Tag versehen. Für die Detektion wurde ein anti-myc-Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Da die untersuchten Konstrukte eine C-terminalen myc-Markierung hatten, konnte für die Detektion von ADAM17 ein anti-myc Antikörper verwendet werden. Dabei war eine gleichmäßige Expression der Varianten und des wts zu beobachten. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Auch hier konnten keine deutlichen Unterschiede im Expressionsniveau detektiert werden.

Als nächstes wurde der Einfluss der Punktmutationen auf die proteolytische Aktivität von ADAM17 untersucht (Abbildung 4.15). Dazu wurden HEK-dKO-Zellen mit den ADAM17-Substraten TNF α oder IL-6R und der jeweiligen Variante co-transfiziert. Die gleichmäßige Expression der Substrate in den HEK dKO-Zellen wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abbildung 4.15 C, D). Die Konzentrationsbestimmung des löslichen Substrats (sTNF α oder sIL-6R) erfolgte in zellfreien Überständen der co-transfizierten HEK dKO-Zellen mittels ELISA. Für die Stimulation von ADAM17 wurden die Zellen mit PMA inkubiert.

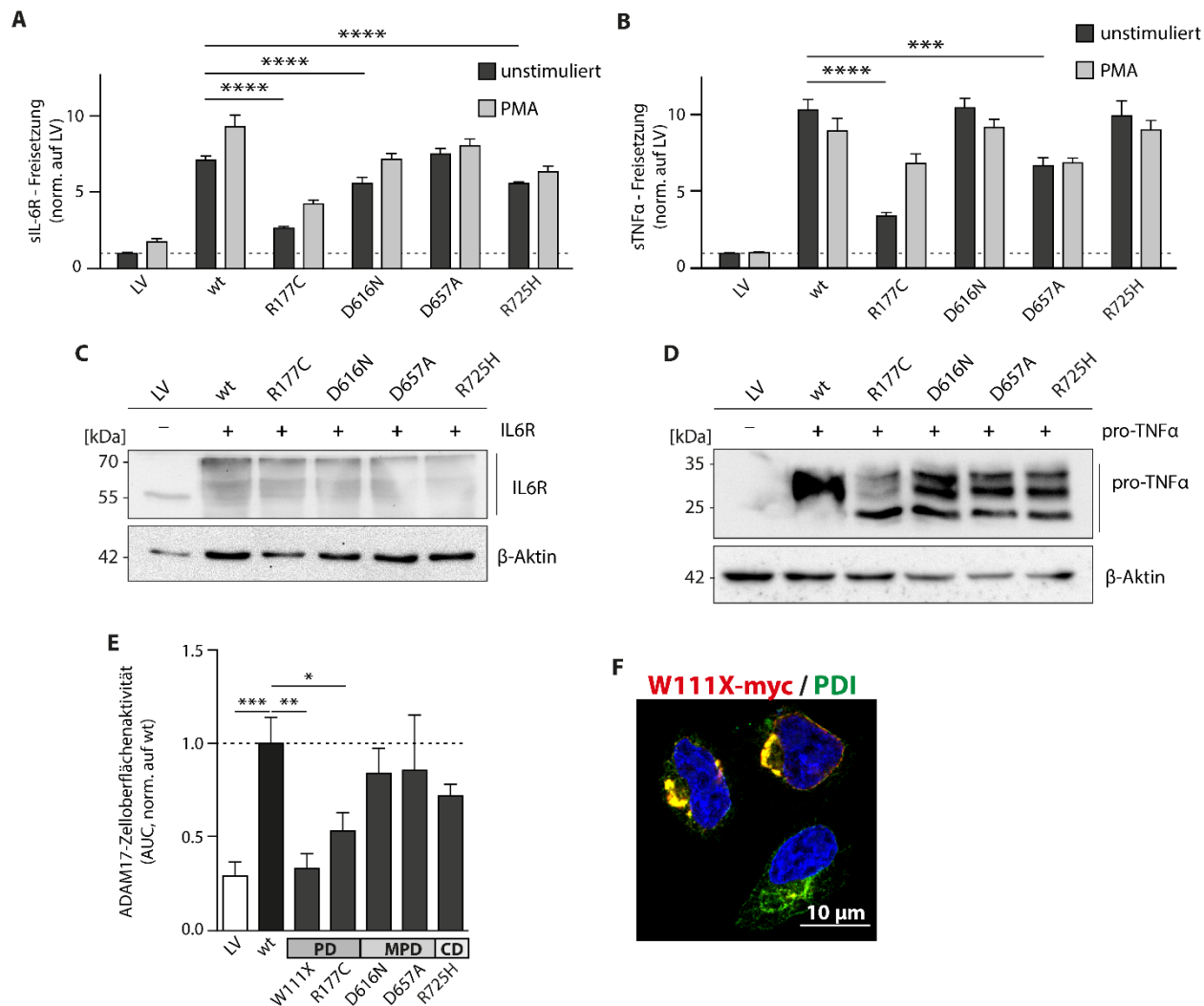


Abbildung 4.15: Proteolytische Aktivität der Darmkrebs-assoziierten ADAM17-Varianten außerhalb der katalytischen Domäne^[146].

ELISA von löslichem IL-6R (A) und TNF α (B) in Überständen von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten und den Substraten co-transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit PMA (2 h) stimuliert. Die gleichmäßige Expression der Substrate IL-6R (C) und TNF α (D) wurde überprüft. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. E) ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche von lebenden HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten transfiziert wurden. Als Negativkontrolle wurde die ADAM17-Variante W111X mitgeführt. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals aufgrund der Spaltung des verwendeten fluorogenen TNF α -Peptid durch ADAM17 wurde alle 30 sec über einen Zeitraum von 120 min gemessen. Die Werte zeigen die Fläche unter der Fluoreszenzintensität über Zeit normiert auf den wt. Dargestellt sind Daten aus

drei individuellen Experimenten. F) Repräsentatives Immunfluoreszenzbild der ADAM17-Variante W111X. Für die Detektion von ADAM17 (rot) wurde ein myc-Antikörper gegen den C-terminalen myc-Tag verwendet. Die Färbung des ERs (grün) erfolgte mittels eines PDI-Antikörpers. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Die Zellen, die dem ADAM17 wt transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu LV transfizierten Zellen signifikant höhere sTNF α - und sIL-6R-Spiegel im Überstand (Abbildung 4.15 A, B). Überraschenderweise zeigte die Variante R177C, die in der Prodomäne lokalisiert ist, für beide untersuchten Substrate eine signifikante Reduktion der ADAM17-*Shedding*-Aktivität. Die Varianten D616N und D657A in der Membran-proximalen Domäne oder R725H in der cytoplasmatische Domäne (R725H) waren generell in der Lage TNF α und IL-6R zu *shedden*. Dabei zeigten die Varianten D616N und R725H im Vergleich zum ADAM17 wt zwar einen signifikant niedrigeren sIL-6R-, jedoch einen mit dem wt vergleichbaren sTNF α -Spiegel. Im Die Variante D657A wies im Gegensatz dazu einen ähnlichen sIL-6R-Spiegel wie der wt auf, zeigte jedoch eine signifikant verminderte *Shedding*-Aktivität für TNF α . Für die weitere Charakterisierung der proteolytischen Aktivität wurde die ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche von lebenden HEK dKO-Zellen untersucht (Abbildung 4.15 E). Hier zeigten die Varianten D616N, D657A und R725H verglichen mit dem wt eine leicht reduzierte Aktivität, die jedoch nicht signifikant war. Nur die Variante R177C, die die Prodomäne betrifft, wies eine signifikante Reduktion in der ADAM17-Oberflächenaktivität auf. Neben dem LV wurde die Variante W111X (p.W111X, c.332G>A, COSMIC) als eine weitere Negativkontrolle bei diesem Experiment verwendet. Diese Variante bricht nach Aminosäure 111 ab und besteht damit nur aus dem Signalpeptid, sowie einem Teil der Prodomäne. Aus diesem Grund weist sie weder ein aktives Zentrum, noch eine *Shedding*-Aktivität auf. In Immunfluoreszenzbilder war eine deutlich Akkumulation im ER zu beobachten (Abbildung 4.15 F). Dies lässt auf einen gestörten Transport der Variante aus dem ER in andere Zellkompartimente wie die Zelloberfläche schließen.

Die Lokalisation von ADAM17 an der Zelloberfläche ist notwendig für das *Shedding* von Substraten. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der Lokalisation der Varianten in HEK dKO-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 4.16 A, B) und Durchflusszytometrie (Abbildung 4.16 C).

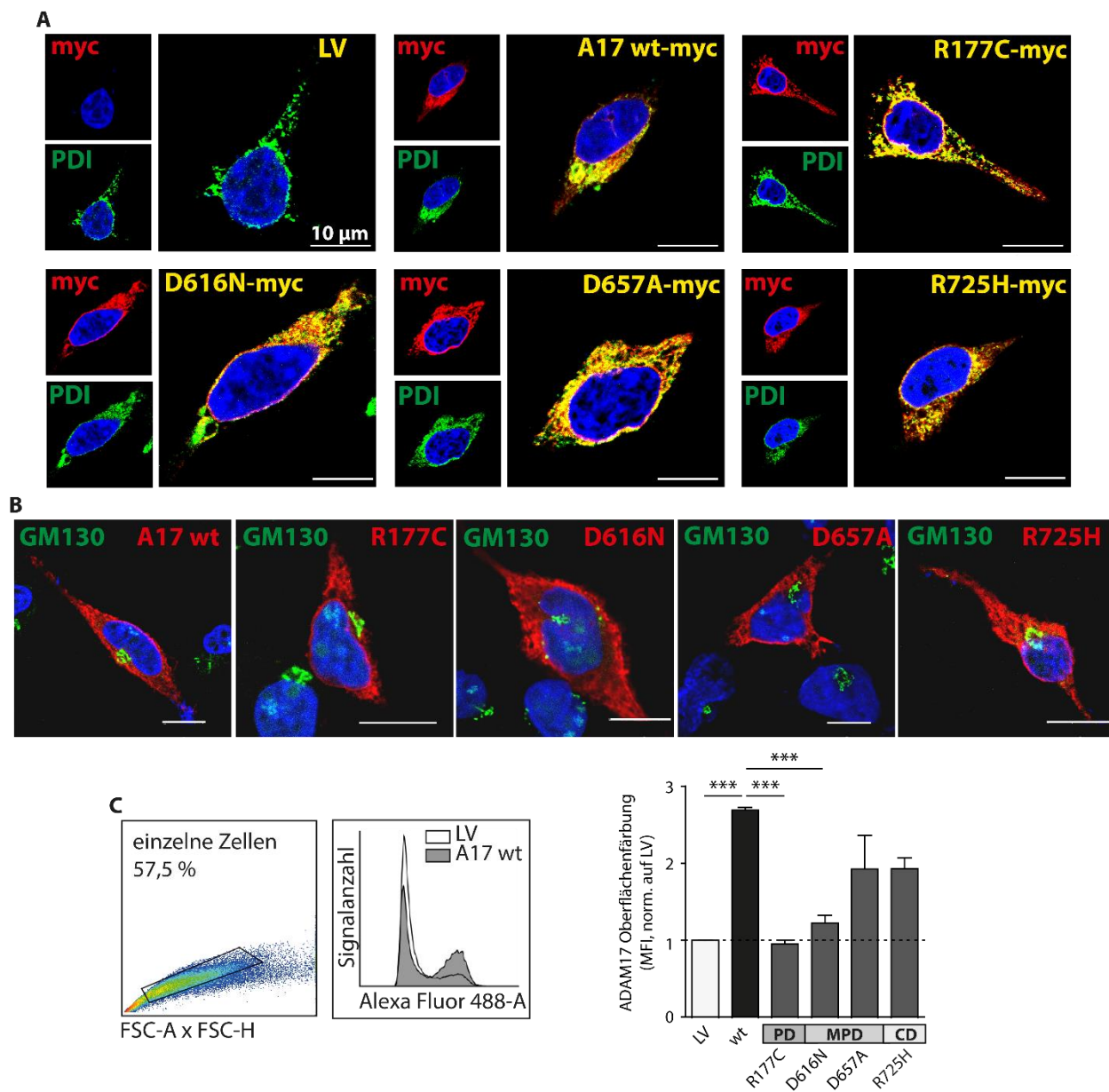


Abbildung 4.16: Einfluss der ADAM17-Varianten auf die zelluläre Lokalisation^[146].

A-B) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Für die Färbung von ADAM17 (rot) wurde ein myc-Antikörper gegen den C-terminale myc-Tag der ADAM17-Varianten verwendet. Weiterhin wurde das ER (A, PDI, grün) oder der Golgi-Apparat (B, GM130, grün) angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. **C)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenlokalisierung von ADAM17 in HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten rekonstituiert wurden. Die Färbung erfolgte mithilfe des extrazellulärbindenden Antikörpers 10.1. Für die Analyse wurden die einzelnen Zellen (FSC-A x FSC-H) ausgewählt und als Histogramm (AlexaFluor488) dargestellt. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität, die auf den LV normiert wurde. Die Werte stammen aus drei individuellen Experimenten.

Zunächst wurde die Co-Lokalisation mit dem ER (Abbildung 4.15 A) und dem Golgi-Apparat (Abbildung 4.15 B) untersucht. Für die Detektion von ADAM17 (rot) wurde ein anti-myc-Antikörper verwendet. Das ER (grün) wurde mittels anti-PDI-Antikörper und der Golgi-Apparat (grün) mittels anti-GM130-Antikörper angefärbt. Die Bereiche, in denen ADAM17 mit einem der Zell-Kompartimente co-lokalisiert, sind gelb. Es war zu sehen, dass sich alle untersuchten Varianten im ER (Abbildung 4.16 A), aber nicht im Golgi-Apparat (Abbildung 4.16 B) aufhalten. Das ist nicht überraschend, da ADAM17 über den sekretorischen Weg maturiert. Die Detektion an der Zelloberfläche mittels konfokaler Mikroskopie war nicht ausreichend genau. Aufgrund dessen erfolgte die Analyse von ADAM17 an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 4.16 C). Für die Detektion wurde der anti-ADAM17-Antikörper 10.1 verwendet. Dieser bindet an der katalytischen Domäne, die sich extrazellulär an der Zellmembran befindet. Zunächst wurden die einzelnen Zellen im Punktdiagramm aufgetragen, in dem *Forward Scatter Area* gegen *Forward Scatter Height* dargestellt sind. Anschließend erfolgte die Auftragung des AlexaFluor 488 Signals im Histogramm. Für die quantitative Auswertung wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (des AlexaFluor 488 Signals) der jeweiligen Varianten auf die des LVs normiert. Dabei zeigte sich, dass keine der Varianten die Zelloberfläche im gleichen Maße erreicht wie der wt. Die Varianten R177C in der Prodomäne und D616N in der Membran-proximalen Domäne wiesen zudem eine signifikante Reduzierung der ADAM17-Zelloberflächenlokalisation auf. Dies könnte auf einen gestörten Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche hinweisen.

Gesamtheitlich suggerieren die Daten, dass die Mutationen in der Membran-proximalen Domäne die Substraterkennung beeinträchtigen. Dies führte zu einer reduzierten ADAM17-Aktivität. Die Mutation in der Prodomäne hatte jedoch einen größeren negativen Einfluss auf die *Shedding*-Aktivität von ADAM17. Das scheint auch den Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche zu betreffen. Hier zeigten die Mutationen in der Prodomäne und in der vorderen Membran-proximalen Domäne den größten negativen Effekt.

4.2.3 FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG VON ADAM17-VARIANTEN IN DER PRODOMÄNE

Die Mutation R177C in der Prodomäne hatte interessanterweise einen starken negativen Einfluss auf die proteolytische Aktivität und Zelloberflächenlokalisation von ADAM17. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Prodomäne von ADAM17 als dessen Chaperon fungieren kann^[154]. Die Prodomäne hat somit eine wichtige Funktion, die aus diesem Grund genauer untersucht wurde. Es erfolgte eine genauere Charakterisierung der ADAM1-Variante R177C. Zum Vergleich wurde ein ADAM17-Konstrukt ohne Prodomäne mitgeführt (Δ Pro). Bei der ADAM17-Variante Δ Pro folgt auf das Signalpeptid zunächst ein Streptavidin-Tag und dann die katalytische Domäne, sowie alle weiteren ADAM17-Domänen (Abbildung 4.16 A).

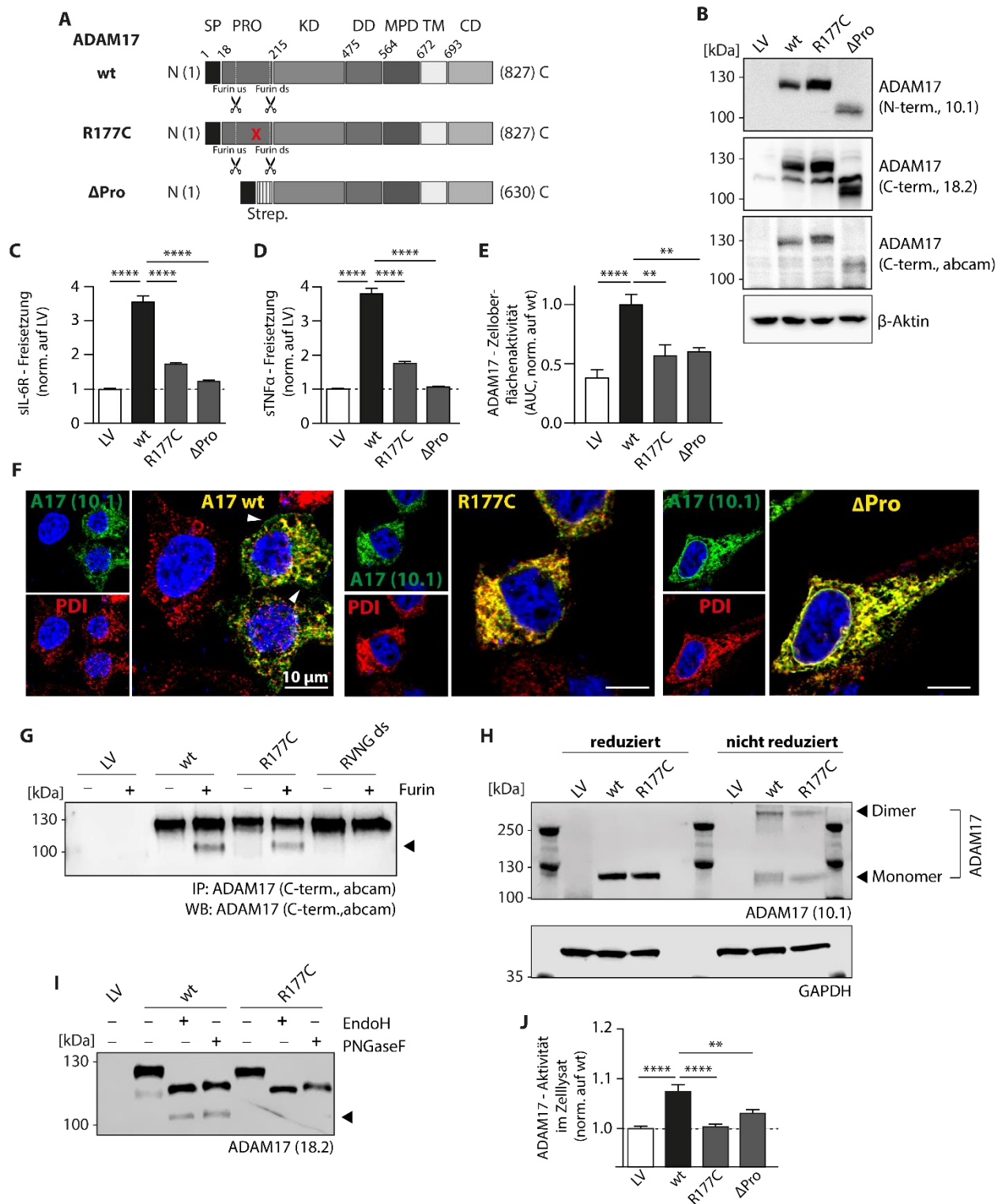


Abbildung 4.17: Funktion und Einfluss von ADAM17-Mutationen in der Prodomäne auf proteolytische Aktivität und zelluläre Lokalisation^[146].

A) Schematische Übersicht des murinen ADAM17 in unterschiedlichen Domänen des Proteins. Weiterhin sind die untersuchten ADAM17-Varianten R177C und ΔPro aufgelistet. Das rote Kreuz zeigt die Position der Punktmutation an. Der Variante ΔPro fehlt die komplette Prodomäne. **B)** Repräsentativer Immunblot zur Kontrolle der Expression von den

ADAM17-Varianten R177C und Δ Pro in HEK dKO-Zellen. Zur Detektion von ADAM17 wurden C-terminal bindende (18.2, abcam) und ein N-terminal bindender (10.1) Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. ELISA von löslichem IL-6R (**C**) und TNF α (**D**) in Überständen von HEK dKO-Zellen, die mit den ADAM17-Varianten oder dem wt rekonstituiert wurden, zur Analyse der ADAM17-*Shedding*-Aktivität. Die Zellen wurden mit PMA (2 h) stimuliert. Die gezeigten Werte sind auf den LV normiert und stammen aus drei individuellen Experimenten. **E**) ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche von HEK dKO-Zellen, die mit dem ADAM17 wt, R177C und Δ Pro transfiziert wurden, gemessen alle 30 sec über 120 min mithilfe eines fluorogenen TNF α -Peptids. Die Werte zeigen die Fläche unter der Kurve der Fluoreszenzintensität über die Zeit normiert auf den wt. Die Daten stammen aus drei individuellen Experimenten. **F**) Repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von HEK dKO-Zellen, die mit dem ADAM17 wt, R177C und Δ Pro transfiziert wurden. Gefärbt wurden ADAM17 (10.1, grün) und das ER (PDI, rot). Die weißen Pfeile weisen auf die Oberflächenlokalisierung von ADAM17 hin. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. **G**) Repräsentativer Immunblot des Furin *Cleavage* Assay. Es wurden Lysate von HEK dKO-Zellen, die mit LV, wt, R177C und RVNG ds transfiziert wurden, immunpräzipitiert sowie mit je 1 U rekombinanten Furin inkubiert. Die obere Bande bei ~120 kDa entspricht immatorem ADAM17, das nicht von Furin prozessiert wurde. Die untere Bande bei ~90 kDa (schwarzer Pfeil) ist matures ADAM17, bei dem die Prodomain von Furin abgespalten wurde. **H**) Repräsentativer Immunblot von ADAM17 wt und R177C unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. Für die Detektion von ADAM17 wurde der N-terminal bindende Antikörper 10.1 verwendet. Als Ladekontrolle diente GAPDH. **I**) Repräsentativer Immunblot von HEK dKO-Zellen, die mit ADAM17 rekonstituiert wurden, nach der Behandlung mit PNGaseF oder EndoH. Die Detektion von ADAM17 erfolgte mit den C-terminal bindenden Antikörper 18.2. **J**) ADAM17-Aktivität im Zelllysat von HEK dKO-Zellen, die mit dem ADAM17 wt, R177C und Δ Pro rekonstituiert wurden, unter Verwendung eines fluorogenen TNF α -Peptids. Dargestellt ist die auf den wt normierte Fluoreszenzintensität nach 30 min. Die Werte stammen aus drei individuellen Experimenten.

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Expression in HEK dKO-Zellen (Abbildung 4.17 B). Dazu wurde diese mit den ADAM17-Varianten transfiziert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Detektion von ADAM17 erfolgte mit einem N- und zwei C-terminal bindenden Antikörpern. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Expression von wt, R177C und Δ Pro. Die Variante Δ Pro zeigte eine Bande bei etwa 100 kDa, was der Größe von maturem ADAM17 nach Abspaltung der Prodomäne entspricht.

Weiterhin wurde die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 gegenüber den Substraten TNF α und IL-6R mittels ELISA untersucht (Abbildung 4.17 C, D). Dabei zeigten die R177C und die Δ Pro eine signifikant reduzierte Aktivität verglichen mit wt, die ebenfalls für die Analyse der ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche zu beobachten war (Abbildung 4.17 E). Sowohl die Variante R177C als auch die Variante Δ Pro zeigten eine im Vergleich zum wt signifikant niedrigere Aktivität gegenüber dem verwendeten TNF α -Peptid.

Der Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche ist notwendig für dessen proteolytische Aktivität. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der zellulären Lokalisation der beiden Varianten R177C und Δ Pro im Vergleich zum wt mittels Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 4.17 F). Da die Variante Δ Pro über keinen C-terminalen myc-Tag verfügte, wurde für die Färbung von ADAM17 (grün) der N-terminal bindende Antikörper 10.1 verwendet. Dadurch war eine Detektion von ADAM17 an der Zelloberfläche der HEK dKO-Zellen, die mit dem wt transfiziert wurden, möglich (weiße Pfeile). Die Varianten R177C und Δ Pro wiesen im Gegensatz dazu eine hohe Co-Lokalisation mit dem ER-Marker PDI (rot) auf. Das bedeutet, dass die Varianten sich im ER aufhalten und die Zelloberfläche vermutlich aufgrund eines gestörten Transports nicht erreichen.

Es wurde bereits beschrieben, dass ADAM17 durch die Proprotein Convertase Furin prozessiert wird. Dabei wird die Prodomäne an zwei Schnittstellen von der katalytischen Domäne abgespalten, was für die Aktivität von ADAM17 notwendig ist^[16]. Es stellte sich die Frage, ob die Mutation R177C in der Prodomäne die Prozessierung durch Furin beeinflusst. Aus diesem Grund wurden HEK dKO-Zellen mit den jeweiligen Varianten transfiziert und ADAM17 anschließend immunpräzipitiert (Abbildung 4.17 G). Als Negativkontrolle wurde die Variante RVNG ds verwendet. Hier ist die *downstream* Furin-Schnittstelle so mutiert, dass Furin nicht mehr spalten kann. Für die Detektion von ADAM17 im Western Blot wurde der C-terminal bindende Antikörper abcam verwendet. Es war bei allen untersuchten Varianten eine starke Bande bei ~120 kDa zu sehen. Dies entspricht dem Molekulargewicht von immatorem ADAM17. Nach Inkubation mit rekombinantem Furin konnte nur beim wt und der Variante R177C eine zweite, schwächere Bande bei ~100 kDa (schwarzer Pfeil) detektiert werden, die dem Molekulargewicht von maturem ADAM17 entspricht. Diese Daten zeigen, dass die Mutation R177C die Prozessierung durch Furin in einem *in vitro*-Ansatz nicht verhindert. Die proteolytische Aktivität dieser Variante scheint somit aus einem anderen Grund beeinträchtigt zu sein. Um den Grund für die Inaktivität der R177C zu finden, wurden weitere Analysen durchgeführt.

Durch die Punktmutation wurde das Arginin zu einem Cystein mutiert. Das Einfügen eines zusätzlichen Cysteins kann zur Bildung neuer Disulfidbrücken und der Dimerisierung von ADAM17 führen. Dies wurde mithilfe einer SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen untersucht (Abbildung 4.17 H). Hier konnte bei ~130 kDa das ADAM17-Monomer und bei ~260 kDa das Dimer detektiert werden. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen dem wt und der Variante R177C.

In der Prodomäne von ADAM17 befinden sich drei potentielle Glykosylierungsstellen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Mutation R177C Einfluss auf das Glykosylierungsmuster hat (Abbildung 4.17 I). Aus HEK dKO-Zellen, die mit dem wt oder der Variante R177C transfiziert wurden, erfolgte die Isolation von Protein. Das wurde anschließend mit Endoglykosidase H (EndoH) oder PNGaseF inkubiert sowie mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Es zeigte sich, dass beide Konstrukte die gleiche Sensitivität gegenüber den Enzymen aufwiesen. Jedoch wurde für den wt eine weitere Bande bei ~100 kDa detektiert, wobei es sich um matures ADAM17 handeln könnte. Da zuvor gezeigt wurde, dass die R177C-Variante *in vitro* von rekombinantem Furin prozessiert werden kann (Abbildung 4.17 G), deutet das Fehlen der zweiten Bande hier auf eine fehlende Prozessierung durch Furin in der Zelle hin.

Die Variante R177C zeigte in dem Zelloberflächen-Aktivitätsassay keine ADAM17-Aktivität. Dafür kommen zwei Gründe infrage. Der Erste wäre, dass diese Variante aufgrund der Punktmutation inaktiv ist. Der zweite Grund könnte ein gestörter Transport an die Zelloberfläche sein. In diesem Fall würde die Punktmutation nicht die Aktivität von ADAM17 beeinflussen, sondern den Transport an die Zelloberfläche stören. Erreicht die Variante nicht die Oberfläche, kann sie dort auch keine Substrate *shedden*. Um dies zu überprüfen, wurde ein Aktivitätsassay mit Zelllysaten von transfizierten HEK dKO-Zellen und einem fluorogenen TNF α -Peptid durchgeführt (Abbildung 4.17

J). Dabei konnte nur für den wt eine ADAM17-Aktivität detektiert werden. Die Varianten R177C und Δ Pro zeigten eine signifikant reduzierte Aktivität gegenüber dem TNF α -Peptid.

Zusammengefasst hat die Mutation R177C sowie das Fehlen der gesamten Prodomäne einen negativen Einfluss auf den Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche und auf die Maturierung. Beide Varianten R177C und Δ Pro zeigten eine massiv eingeschränkte proteolytische Aktivität von ADAM17. Die Dimerisierung scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Die Daten deuten auf eine zentrale Rolle der Prodomäne für die proteolytische Aktivität von ADAM17 hin.

4.3 CHARAKTERISIERUNG DER ADAM17-VARIANTE D232H

Kürzlich wurde bei der Sequenzierung von Gewebeproben eines Patienten mit Herz- und Hautproblemen eine Mutation im *Adam17*-Gen entdeckt. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, kann eine Dysfunktion von ADAM17 zu gesundheitlichen Problem und zum Tod führen. Es besteht somit die Vermutung, dass diese sequenzierte Mutation D232H im Zusammenhang mit den bestehenden Erkrankungen des Patienten steht. Um mögliche Therapiestrategien zu finden, ist eine vorherige Charakterisierung der D232H notwendig. In Abbildung 4.18 A ist die Lokalisation der Variante D232H anhand von murinen ADAM17 schematisch dargestellt. Da die Mutation in dem etablierten murinem MØP-Zellsystem untersucht werden soll, erfolgte die Klonierung in murinem ADAM17.

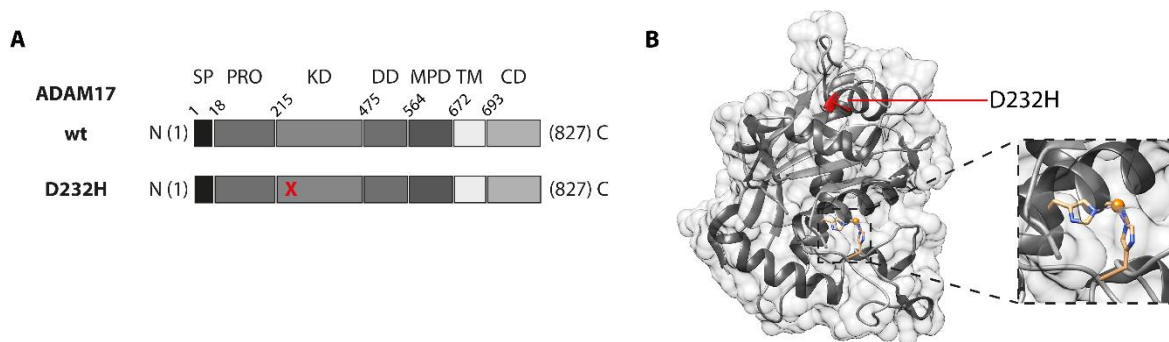


Abbildung 4.18: Schematische Darstellungen der ADAM17-Variante D232H.

A) Dargestellt ist murines ADAM17 mit folgenden Regionen: Signalpeptid (SP), Prodomäne (PRO), katalytische Domäne (KD), Disintegrin-Domäne (DD), Membran proximale Domäne (MPD), Transmembran-Domäne (TM) und cytoplasmatische Domäne (CD). Die Punktmutation der ADAM17-Variante D232H ist mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Die Mutation befindet sich in der katalytischen Domäne. **B)** Kristallstruktur der katalytischen Domäne von ADAM17. In Rot ist die untersuchte Variante D232H hervorgehoben. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums und das koordinierte Zink-Atom sind farblich hervorgehoben.

Die Punktmutation, die zu einem Austausch der Aminosäure Asparaginsäure mit einem Histidin führt, betrifft die katalytische Domäne. Es ist weiterhin sichtbar, dass sich die mutierte Aminosäure nicht in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befindet (Abbildung 4.18 B). Um den Einfluss dieser Variante auf die Aktivität und Lokalisation von murinem ADAM17 zu untersuchen, wurde zunächst das HEK dKO-Zellsystem verwendet.

4.3.1 FUNKTIONALE ANALYSE DER D232H IN HEK-ZELLEN

Zuerst wurde die Expression der Variante D232H in HEK dKO-Zellen untersucht. Dazu wurden diese Zellen transfiziert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 4.19 A). Es konnte beobachtet werden, dass die Variante D232H mit und ohne C-terminaler myc-Sequenz in den HEK dKO-Zellen exprimiert wird. Dabei zeigte die Variante mit der myc-Markierung im Vergleich zum wt jedoch eine geringere Proteinexpression als die Variante ohne Markierung.

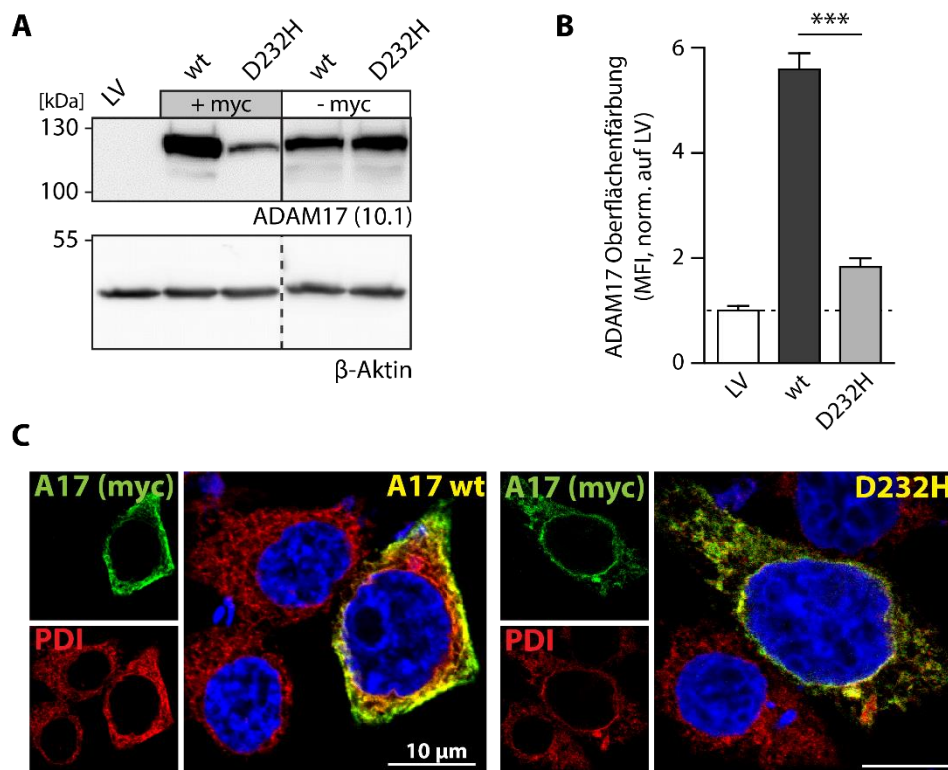


Abbildung 4.19: Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der ADAM17-Variante D232H in HEK dKO-Zellen.

A) Repräsentativer Immunblot von HEK dKO-Zellen, die mit ADAM17 rekonstituiert wurden. Die Konstrukte wurden mit C-terminalem myc-Tag und ohne diesen untersucht. Die Detektion erfolgte mithilfe des N-terminal bindenden Antikörper 10.1. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. **B)** Durchflusszytometrische Analyse von ADAM17 an der Oberfläche von HEK dKO-Zellen, die mit der ADAM17-Variante D232H oder dem wt rekonstituiert wurden. Für die Färbung wurde der extrazellulär-bindende Antikörper 10.1 verwendet. Es wurde die Population der Einzelzellen (FSC-A x FSC-H) ausgewählt und als Histogramm (AlexaFluor 488) dargestellt. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität aus drei

individuellen Experimenten, die auf den LV normiert wurden **C**) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HEK dKO-Zellen, die mit der ADAM17-Variante D232H oder dem wt rekonstituiert wurden. Für die Färbung von ADAM17 (grün) wurde ein myc-Antikörper verwendet. Als ER-Marker wurde PDI (rot) angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Weiterhin wurde die Lokalisation der Variante D232H im HEK dKO-Zellsystem mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 4.19 B) untersucht. Es zeigte sich deutlich, dass die Variante D232H nicht an die Oberfläche der HEK dKO-Zellen transportiert wird (Abbildung 4.19 B). Zuvor konnte jedoch gezeigt werden, dass die Variante exprimiert wird. Das deutet darauf hin, dass sich die Variante in der Zelle akkumuliert. Um dies näher zu untersuchen, wurden transfizierte HEK dKO-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert (Abbildung 4.19 C). Dabei wurde das ER co-gefärbt und als Referenz verwendet. Es ist bei den Zellen, die mit dem ADAM17 wt rekonstituiert wurden, deutlich zu beobachten, dass das Protein das ER verlässt und sich an der Zelloberfläche lokalisiert. Das ist nicht der Fall bei den HEK dKO-Zellen, die mit der Variante D232H transfiziert wurden. Hier deutet die gelbe Färbung auf eine Co-Lokalisation mit dem ER hin. Weiterhin bestätigt die IF-Färbung die fehlende Oberflächenlokalisierung der Variante D232H.

Für die Analyse der ADAM17-Aktivität wurde zunächst das Zelloberflächenaktivitätsassay (Kapitel 3.4.10) durchgeführt. Hier wurde auch die Variante D232H mit und ohne myc-Markierung untersucht (Abbildung 4.20 A). Beide Varianten zeigten eine signifikant verminderte ADAM17-Aktivität an der Oberfläche von lebenden HEK dKO-Zellen, die ähnlich dem LV war. Um zu untersuchen, ob die verminderte Aktivität auf die fehlende Oberflächenlokalisierung dieser Variante zurückzuführen ist, wurde der Aktivitätsassay auch im Zelllysate durchgeführt (Abbildung 4.20 B). Auch hier zeigte die Variante eine ADAM17-Aktivität auf Niveau des LVs. Somit scheint die Variante D232H sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zelllysate von HEK dKO-Zellen bei Verwendung eines TNF α -Peptids inaktiv zu sein.

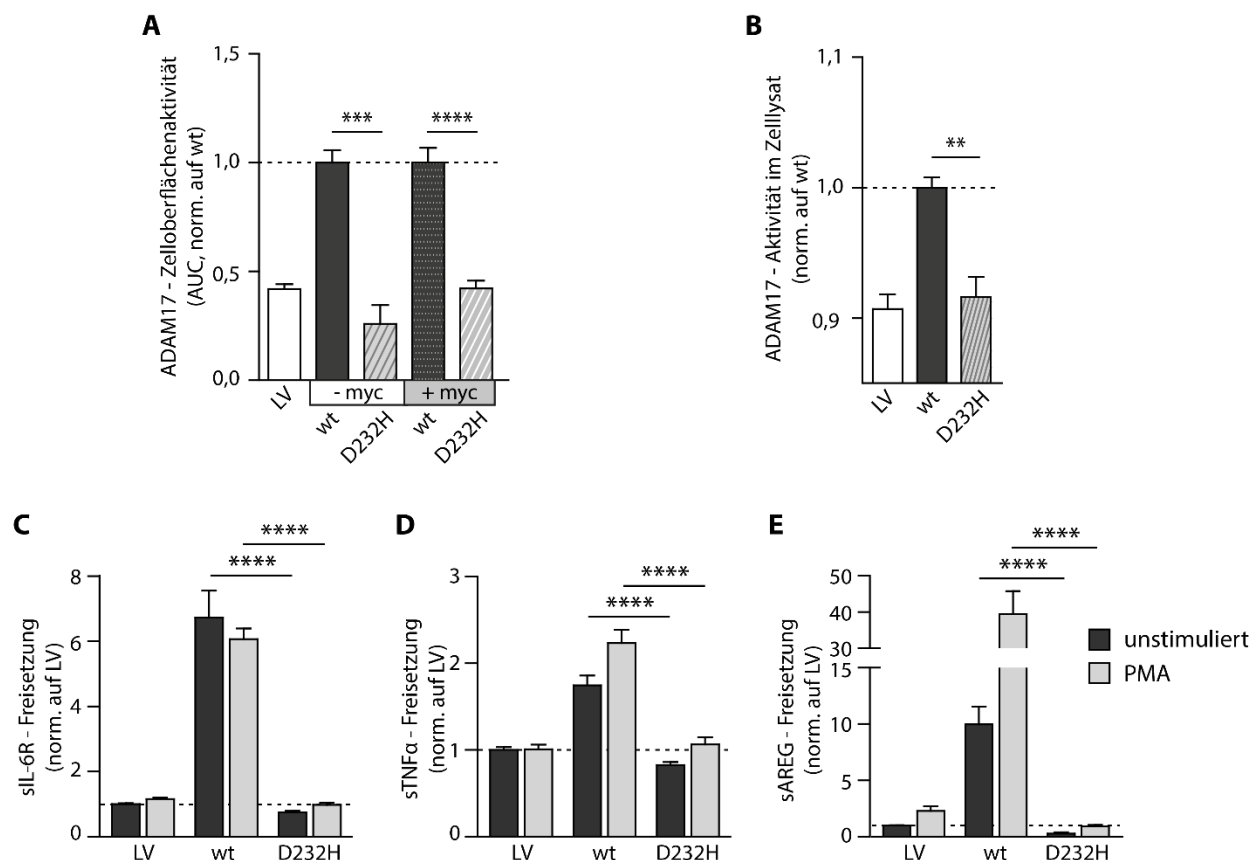


Abbildung 4.20: Funktionale Charakterisierung der ADAM17-Variante D232H in HEK dKO-Zellen.

A) ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche von HEK dKO-Zellen, die mit der ADAM17-Variante D232H transfiziert wurden, gemessen alle 30 sec über 120 min mithilfe eines fluorogenen TNF α -Peptids. Die Werte zeigen die Fläche unter der Kurve der Fluoreszenzintensität über die Zeit, die auf den wt normiert wurde. Untersucht wurden sowohl der wt als auch die ADAM17-Variante D232H mit C-terminaler myc-Markierung und ohne diese. Die Daten stammen aus drei individuellen Experimenten. **B)** ADAM17-Aktivität im Zellysate von HEK dKO-Zellen, die mit der ADAM17-Variante D232H transfiziert wurde, unter Verwendung eines fluorogenen TNF α -Peptids. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität nach 30 min und normiert auf den wt. Die Werte stammen aus drei individuellen Experimenten. ELISA von löslichem IL-6R **(C)**, TNF α **(D)** und AREG **(E)** in Überständen von HEK dKO-Zellen rekonstituiert mit der ADAM17-Variante D232H oder dem wt zur Analyse der ADAM17-*Shedding*-Aktivität. Die Zellen wurden mit PMA (2 h) stimuliert. Die gezeigten Werte sind auf den LV normiert und stammen aus drei individuellen Experimenten.

Um die Aktivität der Variante eingehender zu untersuchen, wurden die HEK dKO-Zellen mit den ADAM17-Substraten IL-6R, TNF α und AREG co-transfiziert. Die Zellüberstände wurden anschließend mittels ELISA analysiert (Abbildung 4.20 C-E). Die Variante D232H zeigte für keines der gewählten Substrate eine messbare Aktivität. Auch nach Stimulation der Zellen konnten nur Substratspiegel auf Niveau des LVs detektiert werden. Dadurch zeigte die Variante D232H in allen Aktivitätsassays eine signifikant verminderte ADAM17-Aktivität und kann somit als inaktiv bezeichnet werden.

4.3.2 FUNKTIONALE ANALYSE DER D232H IN MAKROPHAGEN-VORLÄUFER-ZELLEN

In 4.1 wurde das Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem zur Analyse von ADAM17 eingeführt. Dieses im Vergleich zu mEF- und HEK-Zellen physiologischere Zellsystem soll nun auch für die Charakterisierung der Variante D232H verwendet werden. Dazu wurden zunächst ADAM17-defiziente MØP-Zellen mit der Variante D232H stabil transduziert. Anschließend erfolgte die Kontrolle der ADAM17-Expression in den undifferenzierten MØP-Zellen sowie in den differenzierten GM-MØ- und M-MØ-Zellen (Abbildung 4.21 A). Dabei konnte in allen Zelltypen die Expression der Variante D232H nachgewiesen werden. Im Vergleich zum ADAM17 wt zeigte die D232H in den MØP und M-MØ-Zellen eine höhere Proteinexpression, die in den GM-MØ-Zellen nicht detektiert wurde.

Die Analyse der Aktivität dieser Variante erfolgte mittels ELISAs und den ADAM17-Substraten TNF α und TNFRII. Diese Substrate werden von den MØP-Zellen endogen exprimiert. Die Zellen wurden mit den natürlichen Stimulatoren LPS und Zymosan behandelt und die Zellüberstände wurden im Anschluss mittels ELISA untersucht (Abbildung 4.21 B, C). Dabei zeigte die Variante D232H überwiegend eine signifikant verminderte Aktivität im Vergleich zum wt. Eine Ausnahme war in Bezug auf das TNF α -*Shedding* bei den M-MØ-Zellen zu verzeichnen. Hier zeigte die Variante D232H nach Stimulation mit LPS und Zymosan einen sTNF α -Spiegel ähnlich dem wt. Der sTNF α -Spiegel nach LPS-Stimulation war zwar signifikant niedriger im Vergleich zum wt, jedoch wesentlich höher im Vergleich zu den MØP- und GM-MØ-Zellen. Ähnliches war auch für das Substrat TNFRII zu beobachten. Hier zeigte die Variante in allen Zelltypen eine signifikant niedrige ADAM17-Aktivität gegenüber TNFRII. Jedoch war auch hier der sTNFRII-Spiegel nach Stimulation mit LPS und Zymosan in den M-MØ-Zellen höher als in den anderen beiden Zelltypen. Wie bereits in den HEK-dKO-Zellen beobachtet, ist die Variante D232H auch in dem physiologischeren Zellsystem inaktiv.

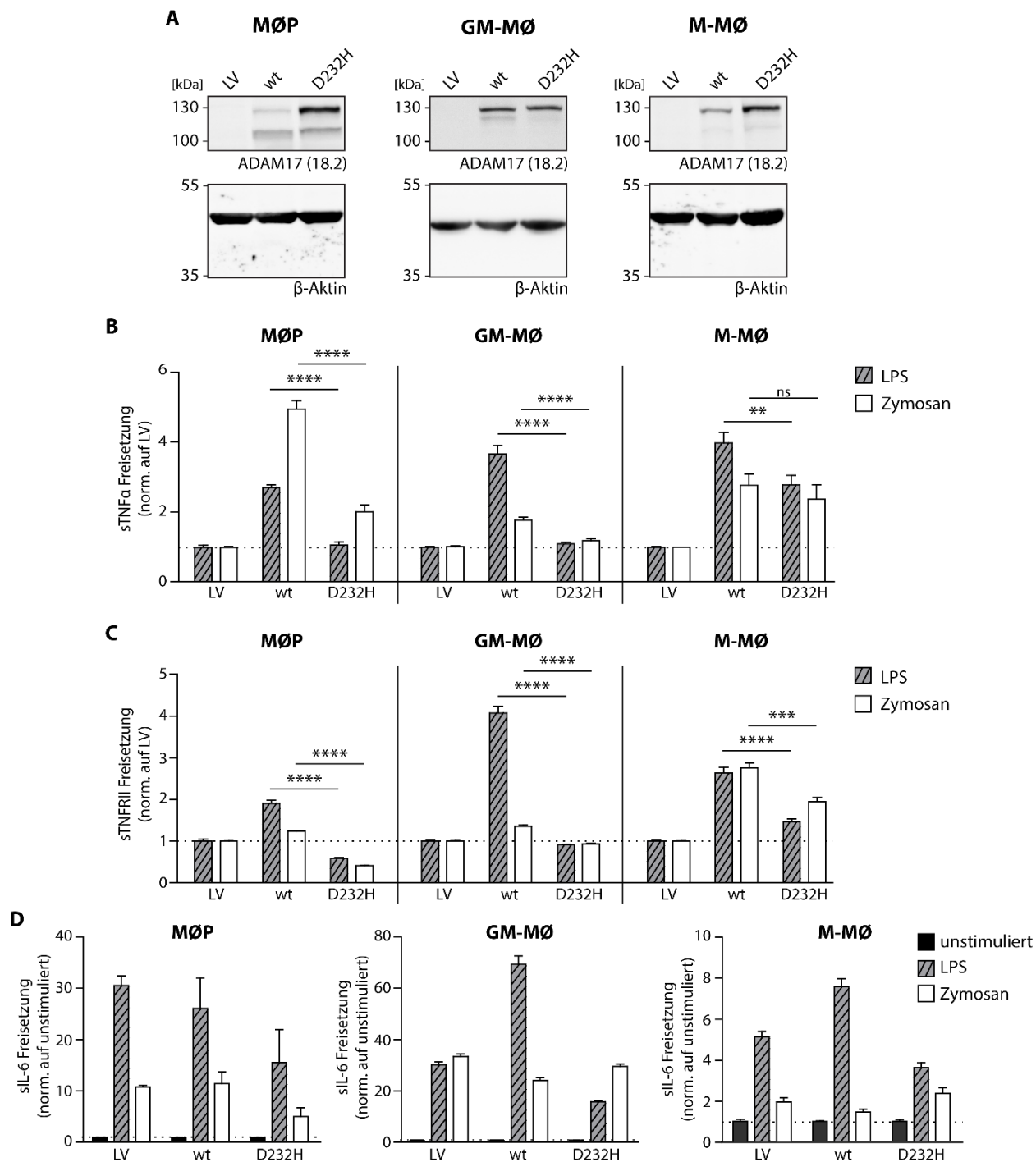


Abbildung 4.21: Funktionale Charakterisierung der ADAM17-Variante im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem.

A) Repräsentative Immunblots zur Untersuchung der Expression der ADAM17-Variante D232H in MØP-, GM-MØ- und M-MØ-Zellen. Für die Detektion wurde der C-terminal bindende Antikörper 18.2 verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. ELISA von löslichem TNF α (**B**) oder TNFRII (**C**) in Überständen von MØP-, GM-MØ- und M-MØ-Zellen, die mit der ADAM17-Variante D232H oder dem wt rekonstituiert wurden, zur Analyse der ADAM17-Shedding-Aktivität. Die Zellen wurden mit LPS oder Zymosan stimuliert. Die Werte sind auf den LV normiert und stammen aus drei individuellen Experimenten. **D)** IL6-ELISA von Zellüberständen von MØP-, M-MØ- und GM-MØ-Zellen, die mit der ADAM17-Variante D232H oder dem wt rekonstituiert wurden. Die Zellen wurden unstimuliert (schwarze Balken) und stimuliert mit LPS

(graue Balken) oder Zymosan (weiße Balken) untersucht. Die Werte wurden auf die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind Daten aus drei individuellen Experimenten.

Um die erfolgreiche Stimulation der MØP-Zellen sowie der GM-MØ- und M-MØ-Zellen zu überprüfen, wurde die IL-6-Freisetzung analysiert (Abbildung 4.21 D). Dieses Zytokin wird infolge der Stimulation von Immunzellen ausgeschüttet und kann im Zellüberstand detektiert werden. Diese Freisetzung ist unabhängig von ADAM17. Es war für die verwendeten Konstrukte LV, wt und D232H eine Erhöhung des IL-6-Spiegels nach Stimulation mit LPS zu detektieren, was auf die undifferenzierten und differenzierten Zellen zutrifft. Dabei zeigen Zellen, die mit der Variante D232H rekonstituiert wurden, den niedrigsten Anstieg nach Stimulation. Die Stimulation der Zellen mit Zymosan führte ebenfalls zu einem Anstieg des IL-6-Spiegels in den analysierten Zellüberständen. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass bei den M-MØ-Zellen der Anstieg bei allen Konstrukten geringer war. Hier war ein Anstieg auf das 1,5- bis 2,5-fache zu verzeichnen, wobei bei den MØP-Zellen teilweise ein Anstieg um das 10-fache zu detektieren war. Insgesamt kann jedoch die Stimulation der Zellen mit LPS und Zymosan als erfolgreich bezeichnet werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Mutation D232H die Aktivität und Lokalisation von ADAM17 stark beeinträchtigt. So zeigte die Variante in HEK dKO-Zellen eine signifikant erniedrigte Oberflächenlokalisation. Sowohl in den HEK dKO-Zellen als auch in den MØP-Zellen (undifferenziert und differenziert) konnte eine deutlich verminderte ADAM17-Aktivität gegenüber unterschiedlichen Substraten detektiert werden. Interessanterweise war die Sezernierung von IL-6 in den immortalisierten Immunzellen durch die Mutation D232H negativ beeinflusst.

5 DISKUSSION

5.1 AKTIVIERUNG UND MATURIERUNG VON ADAM17 IN IMMORTALISIERTEN IMMUNZELLEN

Für ADAM17 wurden bisher über 80 verschiedene Substrate beschrieben, unter denen sich wichtige Moleküle für die Regulation von Immunantwort und Inflammation befinden^[155]. So spielt ADAM17 eine entscheidende Rolle in TNF α -vermittelten Signalwegen, da nicht nur TNF α selbst ein ADAM17-Substrat ist, sondern auch seine beiden Rezeptoren TNFRI und TNFRII. Charakteristische Kennzeichen der Inflammation sind erhöhte Konzentration an TNF α und IL-6, wobei ADAM17 wesentlich an der Regulation beider Substrate beteiligt ist. Aus diesem Grund ist ADAM17 eine entscheidende Protease in inflammatorischen Prozessen. So wird unter anderem unter Beteiligung von ADAM17 über Makrophagen, die TNF α in hohem Maße sezernieren, die inflammatorische Antwort reguliert^[156]. Dabei ist ADAM17 aufgrund seiner Substratvielfalt in pro- und anti-inflammatorische Signalwege involviert^[49]. Als Beispiel kann die Signalübertragung durch TNF α durch dessen ADAM17-abhängiges *Shedden* von der Zelloberfläche aktiviert werden. Da ADAM17 aber auch die TNF-Rezeptoren abspaltet, können diese in löslicher Form als Antagonist zum löslichen TNF α wirken und somit die Signalübertragung vermindern^[157]. Es wird deutlich, dass eine Regulation der inflammatorischen Prozesse durch ADAM17 eine strikte Regulation der Proteaseaktivität dieses Enzyms erfordert. Die zellulären Mechanismen der Maturierung und Aktivierung, sowie die Substraterkennung von ADAM17 sind dabei noch nicht vollständig verstanden. Bisher beschäftigten sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Rolle der posttranskriptionalen Modifizierung und ihrem Einfluss auf die Maturierung und Aktivität von ADAM17. Dabei erfolgten die meisten Versuche zur Analyse des biologischen Verhaltens von spezifischen ADAM17-Mutanten in ADAM17-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (mEF) oder in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), wobei ADAM17 überexprimiert wurde^[16, 38, 42, 44, 158]. Diese nicht physiologischen Zellsysteme haben jedoch den Nachteil, dass die Substrate teilweise heterolog exprimiert und nicht natürliche Stimuli verwendet werden können, um die Funktion von ADAM17 zu beurteilen. Folglich wurden die ADAM17-Substrate wie pro-TNF α oder TGF α in den meisten Experimenten mit den zu untersuchenden ADAM17-Mutanten co-transfiziert und das *Shedding* mithilfe von PMA induziert^[159]. Die daraus resultierenden Unterschiede in den verwendeten Zellsystemen und die nicht physiologischen Bedingungen erschweren die Interpretation und den Vergleich der Studien, was teilweise zu kontroversen Ergebnissen und Diskussionen führt. Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines physiologischeren Zellsystems zur Analyse der posttranskriptionalen Prozesse während der Maturierung und Aktivierung von ADAM17.

Das Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem (MØP) wurde aus Knochenmarkszellen, die ADAM17^{ex/ex}-Mäusen entnommen wurden, generiert. Das mRNA- und Proteinlevel von ADAM17 ist in diesem Mausmodell auf 5% reduziert, wodurch dies als ADAM17-defizient gilt^[105]. Das konnte in der vorliegenden Arbeit auch für die MØP-Zellen bestätigt werden. Auch ein vermindertes *Shedding* von ADAM17-Substraten wurde bei den ADAM17^{ex/ex}-Mäusen

beschrieben und konnte darüber hinaus für die MØP-Zellen gezeigt werden. Die mittels HoxB8 immortalisierten Immunzellen des MØP-Zellsystems können genetisch modifiziert werden und deswegen für die Analyse von ADAM17 in einem physiologischeren Kontext genutzt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Zellsystems ist die Möglichkeit der Differenzierung in dendritische Zellen oder Makrophagen-ähnliche Zellen (GM-MØ und M-MØ-Zellen)^[144, 160]. Weiterhin exprimieren diese Zellen die ADAM17-Substrate TNF α , sowie dessen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 endogen, weswegen diese untersucht wurden. Außerdem konnten für die Stimulation der immortalisierten Immunzellen die natürlichen Stimuli Lipopolysaccharide (LPS) und Zymosan verwendet werden. LPS kommt in der Zellwand von gram-negativen Bakterien vor und kann über den *Toll-like-Receptor* 4 (TLR4) Zellen des Immunsystems aktivieren. Das führt dann vor allem zur Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen^[161, 162]. Als Bestandteil der Zellwand von Hefen ist auch Zymosan in der Lage, Immunzellen zu aktivieren, was in diesem Fall über den TLR2 und Dectin-1 vermittelt wird. Zusammengefasst machen diese Eigenschaften die MØP-Zellen verglichen mit mEF- und HEK-Zellen zu einem physiologischen und somit relevanten Zellsystem für die Analyse von ADAM17.

Die Rolle der cytoplasmatischen Domäne in der Aktivierung von ADAM17 wird bis heute kontrovers diskutiert. In bisherigen Untersuchungen wurde unter anderem gezeigt, dass die ersten fünf Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne notwendig für die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 sind^[44]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Abbruchvariante Δ 700, der bis auf die ersten fünf Aminosäuren die cytoplasmatische Domäne fehlt, analysiert. Dabei konnte sowohl in den mEF- und HEK-Zellen als auch im MØP-Zellsystem eine proteolytische Aktivität für diese Variante detektiert werden. Dies stimmt mit bisherigen Forschungsergebnissen überein, die zeigten, dass die Aktivierung von ADAM17 durch unterschiedliche Stimuli unabhängig von der cytoplasmatischen Domäne ist^[38, 43, 158, 163-165]. Dieses steht im Kontrast zu anderen Ergebnissen, in denen die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne Voraussetzung für die Aktivierung von ADAM17 ist^[40, 42, 57, 59]. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse können die verschiedenen experimentellen Bedingungen wie etwa das verwendete Zellsystem, Substrat oder ADAM17-Konstrukt sein. Einige der verwendeten ADAM17-Konstrukte enthielten eine C-terminale Markierung mit geladenen Aminosäuren wie z.B. einen His-Tag. Dies bestätigt die Hypothese, dass die ersten Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne für die Verankerung von ADAM17 in der korrekten Mikroumgebung der Lipid-Doppelmembran oder die Stabilisierung der Transmembran verantwortlich sind^[44]. Die Aktivierung von ADAM17 kann auch abhängig vom Zelltyp und somit von der Expression und Verfügbarkeit von Co-Faktoren sein. So wurde kürzlich iRhom2 als Co-Faktor von ADAM17 beschrieben^[65, 66, 166]. Dieses Protein ist eine inaktive Intramembran-Serin-Protease der Rhomboidfamilie und wird auch als Pseudoprotease bezeichnet^[63]. Es wurde gezeigt, dass iRhom2 entscheidend in den Transport, die Stabilisierung und Aktivierung von ADAM17 involviert ist^[67]. Die Phosphorylierung des cytoplasmatischen Teil von iRhom2 könnte ein Grund sein, weswegen die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 nicht notwendig für das induzierte *Shedding* von Substraten ist^[67]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die ADAM17-Variante Δ 700 die Zelloberfläche sowohl in HEK-Zellen, als auch in den immortalisierten Immunzellen im Gegensatz zum ADAM17 Wildtyp nur zu

einem geringeren Anteil erreicht. Dabei war die Verminderung der Zelloberflächenlokalisation in den Immunzellen etwas stärker ausgeprägt als in den nicht physiologischen HEK-Zellen, obwohl für die Analyse beider Zellsysteme die gleichen experimentellen Bedingungen angewendet wurden. Dies führt zu der Annahme, dass die cytoplasmatische Domäne am Transport von ADAM17 aus Zellkompartimenten an die Zelloberfläche beteiligt ist. Trotz dieser Erkenntnisse ist weitere Forschung zur Rolle dieser Domäne in der Regulation von ADAM17 notwendig, um die bestehende kontroverse Diskussion um diese Domäne aufzulösen^[35, 38, 40-45, 54, 158, 167].

Die *Shedding*-Aktivität der Variante $\Delta 700$ stellt die Rolle der intrazellulären Phosphorylierung bei der Aktivierung von ADAM17 infrage. Die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne wurde bereits als Merkmal der ADAM17-Aktivierung betrachtet^[40, 42, 59, 85, 168]. So wurde unter anderem die Phosphorylierung von ADAM17 an Serin794 durch die PLK2 als wichtige Regulation der *Shedding*-Aktivität beschrieben^[42]. Deshalb wurde im Zuge dieser Arbeit die Variante S794A analysiert, die aufgrund der Mutation nicht phosphoryliert werden kann. Es konnte kein Einfluss dieser Mutation auf die ADAM17-Aktivität oder die Zelloberflächenlokalisation in mEF-, HEK- oder immortalisierten Immunzellen beobachtet werden. Somit scheint die Phosphorylierung von ADAM17 an dieser Position für die Aktivierung und Maturierung eine untergeordnete Rolle zu haben. Möglicherweise kompensieren andere Mechanismen wie die Interaktion mit iRhom oder die Verankerung von ADAM17 in der korrekten Mikroumgebung der Lipid-Doppelmembran durch die ersten Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne, die fehlende Phosphorylierung^[44, 67].

Ein wichtiger und komplexer Schritt für die Aktivierung von ADAM17 ist die Abspaltung der Prodomäne durch Proprotein Convertasen wie Furin, die im Golgi-Apparat stattfindet. Dort schneidet Furin zwischen Prodomäne und katalytischer Domäne an der *downstream* Schnittstelle^[169, 170]. 2015 wurde eine weitere Schnittstelle innerhalb der Prodomäne (*upstream* Schnittstelle) identifiziert^[16]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung der RVNG us durch rekombinantes Furin zu maturem ADAM17 (~90 kDa) führte, da diese Variante weiterhin an der *downstream* Schnittstelle gespalten werden konnte. Verglichen mit dem ADAM17 Wildtyp konnte jedoch ein geringerer Anteil an maturem ADAM17 detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigte die RVNG ds nur eine geringe Reduzierung des Molekulargewichts nach Inkubation mit Furin, was darauf hindeutet, dass ADAM17 hier nur an der *upstream* Schnittstelle prozessiert wurde. Beide RVNG-Mutationen hatten Einfluss auf die Aktivität von ADAM17. In mEF- und HEK-Zellen konnten diese Varianten an der Zelloberfläche detektiert werden, wobei die RVNG us eine geringere proteolytische Aktivität zeigte. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen von Wong *et al.* in diesen nicht immunologischen Zellsystemen^[16]. Im Gegensatz dazu zeigten beide RVNG-Varianten nur eine geringe proteolytische Aktivität in den immortalisierten Immunzellen, obwohl der Transport an die Zelloberfläche nicht beeinträchtigt war. Da die RVNG ds nicht an der *downstream* Schnittstelle prozessiert werden kann, kann die Prodomäne nicht von der katalytischen Domäne entfernt werden. Das katalytische Zentrum ist nicht für Substrat zugänglich und ADAM17 somit inaktiv. Die RVNG us kann zwar an der *downstream* Schnittstelle prozessiert werden, zeigte aber trotzdem keine proteolytische Aktivität. Die Prodomäne besitzt eine hohe Affinität zur katalytischen Domäne und hat somit einen

autoinhibitorischen Effekt auf diese. Die Prozessierung der Prodomäne an der *upstream* Schnittstelle führt vermutlich zu einer Konformationsänderung, wodurch diese von der katalytischen Domäne dissoziiert. Da dies bei der RVNG us nicht möglich ist, bleibt die Prodomäne assoziiert an die katalytische Domäne und verhindert somit das *Shedding* von Substraten. Interessanterweise wurde zuvor in Cos-7 Zellen gezeigt, dass eine Inhibierung von Proprotein Convertasen keinen Einfluss auf die ADAM17-*Shedding*-Aktivität hatte^[38]. Dies deutet darauf hin, dass die Rolle der Prozessierung durch Furin noch nicht vollständig aufgeklärt ist und vor allem in myeloiden Zellen untersucht werden muss.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit mit dem MØP-Zellsystem ein auf Immunzellen basierendes und somit physiologischeres Zellsystem für die Analyse von ADAM17 etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne sowie deren Phosphorylierung durch die PLK2 nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität von ADAM17 hatten. Im Gegensatz dazu scheint die Prozessierung durch Furin eine bedeutendere Rolle in der Aktivierung von ADAM17 zu spielen. Die genauen Mechanismen der Aktivierung und Maturierung von ADAM17 in Immunzellen konnte nicht vollständig geklärt werden. Aufgrund der Tatsache, dass das MØP-Zellsystem genetisch modifiziert werden kann, stellt es ein solides Zellsystem zur Analyse weiterer Proteine oder Signalwege zur Aufklärung von immunologischen Prozessen dar.

5.2 ANALYSE VON NATÜRLICH VORKOMMENDEN ADAM17-VARIANTEN

ADAM17 ist aufgrund seiner Substratvielfalt an unterschiedlichen biologischen Prozessen und deren Regulation beteiligt. Ein Beispiel dafür ist der EGF-R-Signalweg, in den ADAM17 durch das *Shedden* des Rezeptors selbst und dessen Liganden involviert ist. Dieser Signalweg steuert unter anderem die Proliferation, die Migration, die Adhäsion, die Differenzierung und das Überleben von Zellen. Kommt es zu einer Störung des EGF-R-Signalweges, ist eine mögliche Folge das unkontrollierte Zellwachstum oder sogar die Entstehung von Tumoren. Aus diesem Grund wurde bereits der Zusammenhang von Krebs und dysregulierten EGF-R-Signalwegen beschrieben^[171]. In einigen Tumorgeweben konnte sogar eine erhöhte Expression und Aktivität des EGF-Rs beobachtet werden^[172-174]. Da sowohl der Rezeptor als auch viele seiner Liganden von ADAM17 prozessiert werden, rückt auch diese Protease in den Fokus der Forschung. So konnte kürzlich in einem Mausmodell gezeigt werden, dass ADAM17 für die über den EGF-R vermittelte Induktion der IL-6-Synthese notwendig ist^[135]. Das wiederum induzierte über IL-6 *trans signaling* die Tumorentstehung im Darmgewebe. Das IL-6 *trans signaling* ist ebenfalls ein Prozess, bei dem ADAM17 für das *Shedden* des IL-6Rs verantwortlich ist. Es konnte in weiteren Untersuchungen in Mausmodellen gezeigt werden, dass ADAM17 über seine Rolle in der Inflammation an der Entstehung von Darmkrebs direkt beteiligt ist^[105, 135, 175].

Um ein besseres Verständnis der Verbindung von ADAM17 und der Progression von Krebs zu erhalten, wurden im Zuge dieser Arbeit die Datenbanken IntOGen, COSMIC, TCGA und ICGC nach Mutationen im *Adam17*-Gen durchsucht. Diese Datenbanken enthalten Informationen über somatische Mutationen, die aus Tumorgewebe von Krebspatienten stammen. Im Zuge des Screenings der Datenbanken nach ADAM17-Mutationen zeigten Proben aus Dick- und Dünndarmtumoren verglichen mit Tumoren in anderen Geweben am häufigsten Mutationen in *Adam17*. Da kürzlich veröffentlichte Daten ADAM17 eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Krebs im Colon, einem Teil des Dickdarms, zuweisen, wurde im Zuge dieser Arbeit der Fokus auf Mutationen gelegt, die in Dickdarntumorgewebe gefunden wurden^[135, 137, 175].

5.2.1 EINFLUSS VON ADAM17-MUTATIONEN IN DER KATALYTISCHEN DOMÄNE AUF AKTIVIERUNG UND MATURIERUNG

Zunächst wurden vier ADAM17-Mutationen charakterisiert, die die katalytische Domäne betreffen. Die E319G, E406X und M435I wurden in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten gefunden. Die P417Q stammt aus Sequenzierungsdaten von Tumorgewebe aus Ösophagus- und Pankreaskrebs-Patienten. Die Varianten variierten in ihrer proteolytischen Aktivität hinsichtlich membranständigem IL-6R, pro-TNF α und AREG. So hatte die Mutation P417Q weder Einfluss auf das *Shedden* der untersuchten Substrate, noch auf die Maturierung von ADAM17. Wie zu erwarten war zeigte die Abbruchvariante E406X den größten Einfluss auf die Aktivierung und Maturierung von ADAM17. Diese Variante besitzt kein aktives Zentrum, wodurch das Spalten von Substraten nicht möglich ist. Die verminderte Proteinexpression im Zelllysate und an der Zelloberfläche sind vermutlich auf eine Degradation im ER zurückzuführen.

Die Struktur der katalytischen Domäne hat Einfluss auf die proteolytische Aktivität von ADAM17. So bildet zum Beispiel das Methionin an Position 435 den in Metzinkinen hoch konservierten *Met-turn*^[19-22]. Dieser wurde bereits 2007 als notwendig für die Proteaseaktivität von ADAM17 beschrieben^[176]. Eine Änderung des Methionins in Serin, Leucin oder Isoleucin führte zu einem verminderten *Shedding* von membranständigem TGF α , TNF α und L-Selectin. Im Rahmen dieser Arbeit konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Auch hier konnte eine verringerte proteolytische Aktivität gegenüber membranständigen Substraten wie TNF α , IL-6R und AREG beobachtet werden. Weiterhin zeigte diese Variante keinerlei ADAM17-Aktivität gegenüber einem löslichen TNF α -Peptid. In der 3D-Struktur der katalytischen Domäne von ADAM17 wird deutlich, dass sich die Mutation M435I in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befindet. So ist es wahrscheinlich, dass das Methionin in dessen Stabilisierung involviert ist. So vermutete bereits Perez *et al.*, dass diese Aminosäure die Struktur des Komplexes aus aktivem Zentrum und Zink-Ion aufrechterhält und dadurch die notwendige Stabilität für die Hydrolyse der Peptidbindung im Substrat sicherstellt^[176]. Die Expression und der Transport der Variante M435I war nicht drastisch beeinflusst. So zeigte diese Variante zwar eine vermehrte Lokalisation außerhalb des ERs, jedoch verglichen zum Wildtyp keine übermäßige Lokalisation an der Zelloberfläche.

Interessanterweise zeigte die Variante E319G eine selektive Aktivität gegenüber unterschiedlichen ADAM17-Substraten. So war sie in der Lage AREG und zu einem geringeren Anteil TNF α von der Zelloberfläche zu *shedden*, nicht aber IL-6R. Auch ein lösliches TNF α -Peptid konnte nicht durch diese Variante prozessiert werden. Im Strukturmodell der katalytischen Domäne von ADAM17 wird deutlich, dass sich diese Variante abseits des aktiven Zentrums befindet, wodurch eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum und dem koordinierten Zink-Ion unwahrscheinlich ist. Weiterhin ist zu sehen, dass diese Mutation zur Außenseite des Proteins gerichtet ist, was vermutlich darauf hindeutet, dass die umliegende Region dieser Domäne an der Substraterkennung involviert ist. Das könnte die selektive Aktivität dieser Variante erklären.

Für die Analyse der ADAM17-Aktivität der Varianten wurde neben membranständigem TNF α und IL-6R auch das Substrat AREG untersucht. Es wird vermutet, dass AREG eine Rolle in der Entstehung und Progression von Darmkrebs spielt^[177]. So wurde unter anderem in Gewebe von Darmkrebspatienten eine Überexpression von AREG gefunden^[140]. Weiterhin ist AREG über das IL-6R *trans signaling* an der Entstehung von Darmkrebs involviert. Hier aktiviert es diesen als Ligand des EGF-Rs, was zu einer erhöhten Synthese und Sekretion von IL-6 führt. Der durch ADAM17 gespaltene IL-6R bilden mit IL-6 einen Komplex, der mittels IL-6 *trans signaling* Zellen des Darmepithels aktiviert^[135].

5.2.2 EINFLUSS VON ADAM17-MUTATIONEN AUßERHALB DER KATALYTISCHEN DOMÄNE

Neben Mutationen in der katalytischen Domäne wurden auch Mutationen in den weiteren Domänen von ADAM17 in den Datenbanken gefunden. So betraf die R177C die Prodomäne, die D616N und D657A die Membran-proximale Domäne und die R725H die cytoplasmatische Domäne. Die Varianten außerhalb der Prodomäne variierten in ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber membranständigem IL-6R, pro-TNF α sowie einem löslichen TNF α -Peptid. Dabei zeigte die D616N-Variante, die im N-Terminus der Membran-proximalen Domäne lokalisiert ist, eine signifikante Reduzierung im IL-6R-*Shedding* (~25%), jedoch nicht gegenüber pro-TNF α . Das verdeutlicht die Rolle dieser Domäne in der Erkennung von ADAM17-Substraten und bei der Vermittlung von Spezifität und proteolytischer Aktivität besonders gegenüber dem IL-6R^[12]. Wie im ADAM17-Strukturmodell verdeutlicht, zeigt diese Mutation zur Außenseite des Proteins, wodurch die umliegende Region vermutlich in die Vermittlung der IL-6R-Erkennung involviert ist. Die Variante R725H in der cytoplasmatischen Domäne zeigte ebenfalls ein reduziertes *Shedding* von IL-6R, obwohl sie anscheinend in ausreichender Weise zur Zelloberfläche transportiert wird. Alle untersuchten Varianten außerhalb der katalytischen Domäne werden verglichen zum ADAM17 Wildtyp zu einem geringeren Anteil an die Zelloberfläche transportiert. Dabei scheint der Transport nur für die Varianten D657A in der Membran-proximalen Domäne und R725H in der cytoplasmatischen Domäne ausreichend für eine proteolytische Aktivität von ADAM17 zu sein.

Interessanterweise beeinflusste die Variante R177C in der Prodomäne die proteolytische Aktivität und den Transport von ADAM17 am stärksten. Die Prodomäne ist neben der Rolle als Inhibitor bei der Translation auch als Chaperon während des Transports von ADAM17 aus dem ER zum Golgi-Apparat beschrieben worden^[154, 178, 179]. Innerhalb des trans-Golgi-Netzwerks wird die Prodomäne von Proprotein Convertasen wie Furin abgespalten, wobei diese jedoch noch bis zur Zelloberfläche an die katalytische Domäne assoziieren und somit ADAM17 inhibieren kann^[16]. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Prodomäne als ADAM17-spezifischen Inhibitor für die Regulierung der Aktivität an der Zelloberfläche zu nutzen^[17, 178-180]. Das wiederum könnte in Zukunft für die Beeinflussung von einer erhöhten EGF-R-Signalübertragung, die in vielen Krebsarten beschrieben wurde, genutzt werden^[136, 171, 180]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Variante R177C ähnlich wie eine Variante (Δ Pro), der die ganze Prodomäne fehlt, die Aktivität sowie die Maturierung und Zelloberflächenlokalisierung negativ beeinflusst. Dies führte zu der Annahme, dass die R177C-Mutation die Prodomäne und somit die ADAM17-Aktivität stark beeinträchtigt. Die Mutation R177C wurde in Tumorgewebe von zwei unterschiedlichen Krebspatienten (Caecum und Hirn) gefunden (COSMIC Datenbank, Sanger Institut). Analog zu diesen Erkenntnissen konnte in bisherigen Untersuchungen gezeigt werden, dass Sekretion von rekombinantem ADAM17 ohne Prodomäne in Insektenzellen mangelhaft war^[15]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation innerhalb der Prodomäne die Biologie von ADAM17 so stark beeinflusste, dass nicht nur die Aktivität an der Zelloberfläche, sondern auch im Zelllysate drastisch verringert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der Prodomäne in der Stabilisierung, Faltung und dadurch auch Proteaseaktivität von ADAM17. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, wie die Prodomäne mit der katalytischen Domäne interagieren und dadurch die Maturierung von ADAM17 steuert, sind weitestgehend unbekannt. Dieses liegt vor allem daran, dass die Proteinstruktur der Prodomäne bisher nicht aufgelöst wurde. Somit können keine fundierten Hypothesen zur Orientierung der Prodomäne zur katalytischen Domäne aufgestellt werden. Weiterhin wurde die N-Glykosylierung von ADAM17 als wichtige Regulation der Aktivität beschrieben^[153, 170]. Es konnten innerhalb der Proteinsequenz drei mögliche N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden, wovon eine sich in unmittelbarer Nähe der R177C-Mutation befindet (N174-V175-S176). Die Nähe der Mutation zu dieser Stelle könnte Einfluss auf die Maturierung von ADAM17 haben. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Glykosylierung der Varianten R177C im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dabei zeigte sich, dass für die R177C kein matures ADAM17 detektiert werden konnte. Da in einem vorherigen Versuch gezeigt wurde, dass rekombinantes Furin die Prodomäne *in vitro* abspaltet, kann eine Störung der Prozessierung ausgeschlossen werden.

Insgesamt zeigten die hier untersuchten Varianten in und außerhalb der katalytischen Domäne eine unveränderte oder verringerte Aktivität gegenüber ADAM17-Substraten. Dies ist überraschenderweise gegensätzlich zu den bisherigen Erkenntnissen in der ADAM17-vermittelten Krebsentstehung. Hier wurden häufig hochregulierte EGF-R-Signalwege beobachtet, die zu einer Tumorentstehung aufgrund von erhöhtem *Shedding* von Liganden des EGF-R durch ADAM17 führten. Die Daten der hier charakterisierten ADAM17-Varianten legen nahe, dass die Tumorentstehung und die Mutation im *Adam17*-Gen hier nicht im Zusammenhang stehen.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Sequenzierungsdaten der Varianten aus Datenbanken stammen, die keinerlei weitere Informationen zum genetischen Hintergrund der Patienten liefert. Dadurch ist unklar, ob die hier beschriebenen Mutationen aktiv die Tumorentstehung begünstigten und aufgrund dessen sogenannte *driver mutations* sind oder andere Mutationen in bekannten Onkogenen, wie das *KRAS*-Gen, hauptsächlich in die Tumorentstehung involviert waren^[181-183]. Dadurch wären die Mutationen im *Adam17*-Gen nur sogenannte *passenger mutations*. Diese Mutationen sind nicht an der Tumorentstehung beteiligt, da sie nicht in einem kausalen Zusammenhang zur Proliferation der Zelle stehen. Sie treten vielmehr als Folge von Reparaturfehlern auf^[184]. Ebenfalls wurde in Mausmodellen mit einer genetischen Herunterregulierung von ADAM17, wie in den hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen, die fehlende ADAM17-Funktion in Zusammenhang mit einer erhöhten Inflammation gebracht^[105]. Grund für die beobachtete erhöhte Inflammation im Darmgewebe war vor allem die gestörte Regeneration des Darmepithels in der Abwesenheit von ADAM17^[105]. Interessanterweise wurde beschrieben, dass eine erhöhte Inflammation die Tumorentstehung begünstigt anstatt sie zu verhindern^[185]. Dadurch wird dieses zu einem Risikofaktor in Bezug auf Darmkrebs^[127].

Diese Arbeit konnte Einblicke in die Rolle der katalytischen Domäne und der Membran-proximalen Domäne in der Substraterkennung liefern. Darüber hinaus bestätigte diese Arbeit die Bedeutung der Prodomäne für die Maturierung und Funktion von ADAM17. Dies wiederum unterstützt die Annahme, dass ADAM17 über die Beteiligung an inflammatorischen Prozessen, die bereits in Zusammenhang mit der Tumorentstehung gebracht wurden, in die Regulation von Darmkrebs involviert ist.

5.3 CHARAKTERISIERUNG DER KRANKHEITS-ASSOZIERTEN ADAM17-VARIANTE D232H

Die Protease ADAM17 ist lebensnotwendig für den Organismus, was vor allem durch die Letalität der ADAM17-defizienten *knock-out*-Maus deutlich wird. Diese Tiere sterben innerhalb weniger Stunden nach Geburt. Auch für den Menschen hat eine ADAM17-Defizienz erhebliche Folgen. So wurden bisher nur drei Patienten mit Mutationen in *Adam17* beschrieben, die inaktives ADAM17 zur Folge hatten^[95, 108]. Diese Patienten wiesen vor allem wiederkehrende Infektionen und Entzündungen der Haut auf.

Kürzlich wurde in Sequenzierungsdaten eines weiteren Patienten eine Mutation im *Adam17*-Gen gefunden. Diese führt an Position 232 zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Histidin und betrifft die katalytische Domäne von ADAM17. Im Strukturmodell dieser Domäne wird deutlich, dass sich die Mutation nicht in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befindet. Dadurch ist ein direkter Einfluss auf die Koordinierung des Zink-Ions oder eine andere Störung des aktiven Zentrums unwahrscheinlich. Die Mutation könnte zu einer Konformationsänderung in der katalytischen Domäne führen, die wiederum die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums stört. Um mögliche therapeutische Ansätze für den Patienten zu finden, musste zunächst der Einfluss der Variante D232H auf die proteolytische Aktivität und die Maturierung von ADAM17 untersucht werden. In dem nicht physiologischen HEK-Zellsystem konnte gezeigt werden, dass die

Expression der Variante unabhängig von der Mutation war. Jedoch war der Transport an die Zelloberfläche stark gestört, was sich auch auf die proteolytische Aktivität auswirkte. So war die D232H nicht in der Lage membranständiges TNF α , IL-6R, AREG oder ein lösliches TNF α -Peptid zu prozessieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Mutation im N-terminalen Bereich der Prodomäne die Funktion von ADAM17 so stark beeinflusste, dass die Aktivität selbst im Zelllysate drastisch verringert war.

Natürliche Killerzellen, die aus dem peripheren Blut eines der ADAM17-defizienten Patienten entnommen wurden, zeigten nach LPS-Stimulation eine verringerte Sekretion von Zytokinen^[108]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ähnliches für die Krankheits-assoziierte Variante D232H beschrieben werden. Hier wurden jedoch für die Analyse keine primären Immunzellen des Patienten untersucht, sondern das zuvor etablierte M ϕ P-Zellsystem verwendet. Dieses Zellsystem konnte bereits für die Charakterisierung von funktionalen ADAM17-Varianten angewendet werden. Da die Entnahme von Blut für den Patienten nicht problemlos war, stellte die Verwendung des M ϕ P-Zellsystem eine geeignete Alternative dar. Es konnte gezeigt werden, dass alle immortalisierten Immunzellarten die D232H exprimieren konnten, wobei die proteolytische Aktivität von ADAM17 nach Stimulation stark eingeschränkt war. So war die Variante nicht in der Lage membranständiges TNF α und TNFR2 in einem physiologischeren Zellsystem zu *shedden*. Interessanterweise zeigten alle M ϕ P-Zellarten nach Stimulation mit natürlichen Stimuli eine verringerte IL-6-Sekretion. Dabei ist es nicht ersichtlich, ob die Mutation IL-6 auf Protein- oder mRNA-Ebene beeinflusst. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Insgesamt konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mutation D232H die Aktivität und Maturierung von ADAM17 stark stört. Die Variante scheint die proteolytische Aktivität dabei nicht durch die fehlende Oberflächenlokalisation zu verringern, sondern aufgrund eines noch nicht aufgeklärten Mechanismus.

5.4 AUSBLICK

Die Mechanismen der Maturierung und Aktivierung von ADAM17 sind sehr komplex und konnten im Rahmen dieser Arbeit weiter charakterisiert, jedoch nicht vollständig geklärt werden. So konnte zwar gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne und dessen Phosphorylierung durch die PLK2 nicht notwendig für die Aktivierung und Maturierung von ADAM17 sind. Wie diese jedoch stattdessen vermittelt wird, blieb unklar. Die Prozessierung der Prodomäne durch Furin scheint eine bedeutende Rolle in der Aktivierung von ADAM17 zu spielen. Hier sollte weitere Untersuchungen zum zugrundeliegenden Mechanismus durchgeführt werden. Die Auflösung der 3D-Struktur der Prodomäne ist hierbei von großer Bedeutung. Bisher konnte diese noch nicht aufgeklärt werden und nur anhand von anderen strukturverwandten Proteinen modelliert werden^[145]. Es könnte ebenfalls versucht werden, eine Prodomäne rekombinant zu exprimieren, die bereits an der *upstream* Schnittstelle prozessiert wurde. Hier könnte analysiert werden, ob das zu einer Veränderung der Affinität der Prodomäne zur katalytischen Domäne führt. Weiterhin wären Untersuchungen zur Prozessierung von ADAM17 durch Furin in Tiermodellen interessant.

Hier könnte analysiert werden, ob eine Inhibition von Furin ebenfalls zu einem verminderten ADAM17-*Shedding* führt oder andere Enzyme die Prozessierung stellvertretend für Furin katalysieren. Die Rolle von iRhom2 in der Aktivierung, Stabilisierung und Maturierung von ADAM17 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, sollte jedoch nicht vernachlässigt werden. Die Pseudoprotease wurde als ein Co-Faktor von ADAM17 beschrieben und scheint notwendig für die Regulation von ADAM17 zu sein^[63-68]. Erste Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von iRhom2 in den differenzierten MØP-Zellen zeigten, dass diese in den immortalisierten Immunzellen unabhängig von ADAM17 war^[145]. Das MØP-Zellsystem kann ebenfalls für die Analyse weiterer für Immunzellen typischer Prozesse verwendet werden. So wurde es bereits für Untersuchungen der Rolle von ADAM17 im Auf-und Abbau von Podosomen in den differenzierten M-MØ-Zellen, sowie für die Analyse der mesenchymalen Migration verwendet^[145, 186].

Die Charakterisierung von ADAM17-Varianten, die in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten gefunden wurden, konnte Einblicke in den Einfluss dieser auf die Aktivierung und Maturierung von ADAM17 liefern. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur Mutationen in der Membranproximalen Domäne, sondern auch in der katalytischen Domäne, eine Rolle in der Substraterkennung spielen. Hierzu sollten noch weitere Versuche durchgeführt werden, die die Interaktion der einzelnen Varianten mit unterschiedlichen Substraten eingehender untersucht, zum Beispiel mittels einer Co-Immünpräzipitation von ADAM17 und Substrat.

Wie für die funktionalen ADAM17-Varianten bereits genannt, kann auch die Untersuchung der Rolle von iRhom2 für diese Mutationen zu neuen Erkenntnissen führen. So könnten die Mutationen in den unterschiedlichen Domänen von ADAM17 die Interaktion mit iRhom2 negativ beeinträchtigen.

Die Analyse von Krankheits-assoziierten Mutationen kann zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen des betroffenen Proteins führen. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Mutation D232H in ADAM17 deren Aktivität und Oberflächenlokalisation stark beeinträchtigt, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression hat. So könnten Chaperone und Chaperon-Modulatoren eingesetzt werden, um die Faltung der D232H und somit eventuell deren Transport an die Zelloberfläche zu unterstützen. Ähnliches wurde bereits für neurodegenerative Erkrankungen (Parkinson) oder Mukoviszidose durchgeführt^[187-189]. Hier konnten teilweise die Aktivitäten von Enzymen durch den Einsatz von Chaperon-Modulatoren wiederhergestellt werden. Sollten erste Versuche im MØP-Zellsystem erfolgreich sein, könnten mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blutes des Patienten entnommen werden und ebenfalls mit Chaperon-Modulatoren behandelt werden. Ein weiterer Therapieansatz für den Patienten könnte eine Knochenmarkstransplantation darstellen. Hier müssten zunächst Versuche in ADAM17-defizienten Mäusen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob mit transplantierten Knochenmarkszellen der immunologische Phänotyp der Mäuse aufgehoben werden kann. Ebenfalls muss die Verträglichkeit der Knochenmarksspende überprüft werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Prozess des *Ectodomain-Sheddings* beschreibt das irreversible Abspalten des extrazellulären Teils von membranständigen Proteinen^[1, 2]. So werden unter anderem Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, Zytokine oder Rezeptoren von der Zelloberfläche durch *Sheddasen*, wie zum Beispiel *A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 17*, abgespalten. Diese ubiquitär exprimierte Metalloprotease zählt zu den wichtigsten *Sheddasen* und kann über 80 verschiedene Substrate prozessieren^[5, 6, 46-49]. Dadurch ist ADAM17 in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie die Regeneration, Differenzierung, Immunität, (chronische) Inflammation oder Krebs involviert^[155]. Eine strikte Regulation der Aktivierung und Maturierung der Protease ist dabei notwendig, jedoch noch nicht vollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionale ADAM17-Varianten charakterisiert und dadurch Erkenntnisse über die posttranskriptionale Prozessierung von ADAM17 gewonnen werden. Dafür wurde das Makrophagen-Vorläufer-Zellsystem (MØP-Zellsystem) etabliert. Dies ist ein physiologischeres Zellsystem zur Analyse von ADAM17, da es auf immortalisierten Immunzellen basiert. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne und deren Phosphorylierung durch die *Polo-like Kinase 2* für die Aktivierung von ADAM17 zu vernachlässigen ist. Im Gegensatz dazu spielt die Abspaltung der Prodomäne durch Furin eine entscheidende Rolle.

Die Regulation von Signalwegen ist von großer Bedeutung und führt bei einer Störung zu Krankheiten oder der Entstehung von Krebs. Aufgrund der Beteiligung von ADAM17 an dem EGF-R-Signalwegen über das *Shedden* des Rezeptors selbst und viele seiner Liganden, wurde diese Protease bereits als wichtiger Faktor in der Entstehung und Progression von Darmkrebs beschrieben^[133, 135]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität und Maturierung von ADAM17-Mutationen analysiert, die in Tumorgewebe von Darmkrebspatienten gefunden wurden. Dabei zeigten die untersuchten Varianten eine verminderte oder unveränderte ADAM17-Aktivität. Interessanterweise beeinträchtigte eine Mutation in der Prodomäne die Funktion und den Transport von ADAM17 am stärksten. Weitere Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht nur die Membran-proximale Domäne in der Substraterkennung involviert ist, sondern auch die katalytische Domäne. Die Erkenntnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass ADAM17 über die Regulation von inflammatorischen Prozessen an der Tumorentstehung beteiligt ist.

Im letzten Teil der Arbeit wurde das zuvor etablierte MØP-Zellsystem für die Charakterisierung einer Krankheits-assoziierten ADAM17-Variante verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mutation, die sich in der katalytischen Domäne, aber abseits des aktiven Zentrums, befindet, sowohl die Aktivität als auch den Transport an die Zelloberfläche schwerwiegend beeinträchtigt. Diese Erkenntnisse können als Grundlage für die Suche nach therapeutischen Ansätzen dienen.

7 ABSTRACT

Ectodomain shedding is a process in which the extracellular part of a membrane bound protein is irreversibly cleaved [1, 2]. Sheddases are enzymes that catalyze the ectodomain shedding of e.g. growth factors, cytokines or receptors. One of the most important sheddases is the ubiquitously expressed A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 17. So far, more than 80 substrates were described to be processed by this protease^[5, 6, 46-49]. Because of this variety of substrates, ADAM17 is involved in different physiological and pathophysiological processes like regeneration, differentiation, immunity, (chronic) inflammation or tumorigenesis^[155]. A strict regulation of ADAM17 activation and maturation is crucial but still not completely understood. The aim of this study was to focus on the characterization of functional ADAM17 variants in order to get insights in the posttranscriptional processes that regulate ADAM17 function. For this, a macrophage progenitor cell system was established, which is based on HoxB8 immortalized immune cells. This physiological cell system was introduced to analyze ADAM17 function, showing the cytoplasmic domain of ADAM17 and its phosphorylation via PLK2 to be dispensable for ADAM17-mediated shedding. On the other side, furin-dependent cleavage of the prodomain was crucial for the ADAM17 activity.

If the essential regulation of ADAM17 signaling events are impaired, diseases or tumorigenesis are possible consequences. ADAM17 was described to be one of the risk factors for developing and progression of colon cancer due to its involvement in the EGF-R signaling through shedding of this receptor itself or the majority of its ligands^[133, 135]. As a result, the aim of this work was to analyze the ADAM17 activity and maturation of mutation found in tumor tissue of colon cancer patients. Interestingly, the variants showed diminished or unchanged ADAM17-mediated shedding. Surprisingly, a mutation in the pro domain severely affected the function and transport of the protease. Furthermore, the results lead to the suggestion that not only the membrane-proximal domain is responsible for substrate recognition, but also the catalytic domain. Taken together, this results strengthens the hypothesis that ADAM17 is involved in the tumorigenesis through regulation of inflammation.

Moreover, the last objective of this work was the characterization of a disease-associated mutation in ADAM17 utilizing the established MØP cell system. This ADAM17 mutation is localized in the catalytic domain, but not in close proximity to the active center. Furthermore, this variant showed strongly impaired ADAM17-mediated shedding and transport to the cell surface. In summary, these results help to understand the role of ADAM17 in disease pathology and might contribute to novel therapeutic treatments in order to rescue ADAM17 activity.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Lichtenthaler, S. F., Lemberg, M. K. and Fluhrer, R. **(2018)** "Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments" Embo j (37): e99456
- [2] Murphy, G., Murthy, A. and Khokha, R. **(2008)** "Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue" Trends Immunol (29): 75-82
- [3] Wiley, H. S., Woolf, M. F., Opresko, L. K., Burke, P. M., Will, B., Morgan, J. R. and Lauffenburger, D. A. **(1998)** "Removal of the membrane-anchoring domain of epidermal growth factor leads to intracrine signaling and disruption of mammary epithelial cell organization" J Cell Biol (143): 1317-1328
- [4] Borrell-Pages, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J. and Arribas, J. **(2003)** "TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors" Embo j (22): 1114-1124
- [5] Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. and Cerretti, D. P. **(1997)** "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells" Nature (385): 729-733
- [6] 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. and et al. **(1997)** "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α " Nature (385): 733-736
- [7] Edwards, D. R., Handsley, M. M. and Pennington, C. J. **(2008)** "The ADAM metalloproteinases" Mol Aspects Med (29): 258-289
- [8] Murphy, G. **(2009)** "Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'" Semin Cell Dev Biol (20): 138-145
- [9] Gooz, M. **(2010)** "ADAM-17: the enzyme that does it all" Crit Rev Biochem Mol Biol (45): 146-169
- [10] Düsterhöft, S., Hobel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G. H., Chalaris, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Lorenzen, I. and 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
- [11] Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C. W., Tholey, A., Sonnichsen, F. D., Grötzinger, J. and 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
- [12] Lorenzen, I., Lokau, J., Düsterhöft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S. and 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
- [13] Van Wart, H. E. and Birkedal-Hansen, H. **(1990)** "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family" Proc Natl Acad Sci U S A (87): 5578-5582
- [14] Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H. E. **(1990)** "Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation" Proc Natl Acad Sci U S A (87): 364-368
- [15] Milla, M. E., Leesnitzer, M. A., Moss, M. L., Clay, W. C., Carter, H. L., Miller, A. B., Su, J. L., Lambert, M. H., Willard, D. H., Sheeley, D. M., Kost, T. A., Burkhart, W., Moyer, M.,

- Blackburn, R. K., Pahel, G. L., Mitchell, J. L., Hoffman, C. R. and Becherer, J. D. (1999) "Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)" J Biol Chem (274): 30563-30570
- [16] Wong, E., Maretzky, T., Peleg, Y., Blobel, C. P. and 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" Journal of Biological Chemistry (290): 12135-12146
- [17] Wong, E., Cohen, T., Romi, E., Levin, M., Peleg, Y., Arad, U., Yaron, A., Milla, M. E. and Sagi, I. (2016) "Harnessing the natural inhibitory domain to control TNFalpha Converting Enzyme (TACE) activity in vivo" Sci Rep (6): 35598
- [18] 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. and Bode, W. (1998) "Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme" Proc Natl Acad Sci U S A (95): 3408-3412
- [19] Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X. and Stöckler, W. (1993) "Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'" FEBS Lett (331): 134-140
- [20] Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B. and Bode, W. (1995) "The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases" Protein Sci (4): 823-840
- [21] Hooper, N. M. (1994) "Families of zinc metalloproteases" FEBS Lett (354): 1-6
- [22] Black, R. A. and White, J. M. (1998) "ADAMs: focus on the protease domain" Curr Opin Cell Biol (10): 654-659
- [23] Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M. and Nikolov, D. B. (2005) "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans" Cell (123): 291-304
- [24] Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H. and Araki, S. (2006) "Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold" Embo j (25): 2388-2396
- [25] Takeda, S. (2009) "Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases" Semin Cell Dev Biol (20): 146-152
- [26] Bridges, L. C., Sheppard, D. and Bowditch, R. D. (2005) "ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7" Biochem J (387): 101-108
- [27] Huang, J., Bridges, L. C. and White, J. M. (2005) "Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members" Mol Biol Cell (16): 4982-4991
- [28] Bax, D. V., Messent, A. J., Tart, J., van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R. A. and Humphries, M. J. (2004) "Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells" J Biol Chem (279): 22377-22386
- [29] Gööz, P., Dang, Y., Higashiyama, S., Twal, W. O., Haycraft, C. J. and 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
- [30] Trad, A., Riese, M., Shomali, M., Hedeman, N., Effenberger, T., Grötzinger, J. and Lorenzen, I. (2013) "The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblastcarcinoma cell interactions" Int J Oncol (42): 1793-1800
- [31] Saha, A., Backert, S., Hammond, C. E., Gooz, M. and Smolka, A. J. (2010) "Helicobacter pylori CagL activates ADAM17 to induce repression of the gastric H, K-ATPase alpha subunit" Gastroenterology (139): 239-248

- [32] Grötzinger, J., Lorenzen, I. and Düsterhöft, S. (2017) "Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region" Biochim Biophys Acta Mol Cell Res (1864): 2088-2095
- [33] Lorenzen, I., Trad, A. and 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
- [34] Li, X. and Fan, H. (2004) "Loss of ectodomain shedding due to mutations in the metalloprotease and cysteine-rich/disintegrin domains of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE)" J Biol Chem (279): 27365-27375
- [35] Wang, Y., Herrera, A. H., Li, Y., Belani, K. K. and Walcheck, B. (2009) "Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding" J Immunol (182): 2449-2457
- [36] Willems, S. H., Tape, C. J., Stanley, P. L., Taylor, N. A., Mills, I. G., Neal, D. E., McCafferty, J. and Murphy, G. (2010) "Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17" Biochem J (428): 439-450
- [37] Tape, C. J., Willems, S. H., Dombernowsky, S. L., Stanley, P. L., Fogarasi, M., Ouwehand, W., McCafferty, J. and Murphy, G. (2011) "Cross-domain inhibition of TACE ectodomain" Proc Natl Acad Sci U S A (108): 5578-5583
- [38] Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D. A., Niu, X.-D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D. and Blobel, C. P. (2010) "ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site" Journal of Cell Science (123): 3913-3922
- [39] Li, X., Maretzky, T., Perez-Aguilar, J. M., Monette, S., Weskamp, G., Le Gall, S., Beutler, B., Weinstein, H. and Blobel, C. P. (2017) "Structural modeling defines transmembrane residues in ADAM17 that are crucial for Rhd2-ADAM17-dependent proteolysis" J Cell Sci (130): 868-878
- [40] Xu, P. and Derynck, R. (2010) "Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation" Mol Cell (37): 551-566
- [41] Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M. and Derynck, R. (2012) "TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association" Sci Signal (5): ra34
- [42] 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. and Chalaris, A. (2014) "Polo-like Kinase 2, a Novel ADAM17 Signaling Component, Regulates Tumor Necrosis Factor α Ectodomain Shedding" Journal of Biological Chemistry (289): 3080-3093
- [43] Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J. and Black, R. A. (2000) "Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme" J Biol Chem (275): 14608-14614
- [44] Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.-W., Rabe, B., Rose-John, S. and Chalaris, A. (2013) "Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17" Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research (1833): 3355-3367
- [45] Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P. and Blobel, C. P. (2007) "Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx" Mol Biol Cell (18): 176-188
- [46] Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J. and Black, R. A. (1998) "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development" Science (282): 1281-1284

- [47] Hinkle, C. L., Sunnarborg, S. W., Loiselle, D., Parker, C. E., Stevenson, M., Russell, W. E. and Lee, D. C. (2004) "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency" J Biol Chem (279): 24179-24188
- [48] Sahin, U. and Blobel, C. P. (2007) "Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17" FEBS Lett (581): 41-44
- [49] Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C. and Rose-John, S. (2011) "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration" Trends Immunol (32): 380-387
- [50] Yoda, M., Kimura, T., Tohmonda, T., Morioka, H., Matsumoto, M., Okada, Y., Toyama, Y. and Horiuchi, K. (2013) "Systemic overexpression of TNFalpha-converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo" PLOS ONE (8): e54412
- [51] Reiss, K. and Bhakdi, S. (2017) "The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function" Biochim Biophys Acta Mol Cell Res (1864): 2082-2087
- [52] 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., Gutschmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S. and Reiss, K. (2016) "Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function" Nat Commun (7): 11523
- [53] Sommer, A., Bhakdi, S. and Reiss, K. (2016) "How membrane asymmetry regulates ADAM17 sheddase function" Cell Cycle (15): 2995-2996
- [54] Doedens, J. R., Mahimkar, R. M. and Black, R. A. (2003) "TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation" Biochem Biophys Res Commun (308): 331-338
- [55] Dombernowsky, S. L., Samsøe-Petersen, J., Petersen, C. H., Instrell, R., Hedegaard, A. M., Thomas, L., Atkins, K. M., Auclair, S., Albrechtsen, R., Mygind, K. J., Frohlich, C., Howell, M., Parker, P., Thomas, G. and Kveiborg, M. (2015) "The sorting protein PACS-2 promotes ErbB signalling by regulating recycling of the metalloproteinase ADAM17" Nat Commun (6): 7518
- [56] Lorenzen, I., Lokau, J., Korpys, Y., Oldefest, M., Flynn, C. M., Kunzel, U., Garbers, C., Freeman, M., Grotzinger, J. and Dusterhoft, S. (2016) "Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation" Sci Rep (6): 35067
- [57] Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. and Murphy, G. (2005) "ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking" J Cell Sci (118): 2371-2380
- [58] Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M. and Hammad, H. (2018) "The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity" Nat Rev Immunol (18): 745-758
- [59] Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L. and Pandiella, A. (2002) "Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding" Mol Biol Cell (13): 2031-2044
- [60] Wisniewska, M., Goettig, P., Maskos, K., Belouski, E., Winters, D., Hecht, R., Black, R. and Bode, W. (2008) "Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex" J Mol Biol (381): 1307-1319
- [61] Murphy, G. (2011) "Tissue inhibitors of metalloproteinases" Genome Biol (12): 233
- [62] Lee, M. H., Verma, V., Maskos, K., Nath, D., Knauper, V., Dodds, P., Amour, A. and Murphy, G. (2002) "Engineering N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3 to be a better inhibitor against tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme" Biochem J (364): 227-234
- [63] Zettl, M., Adrain, C., Strisovsky, K., Lastun, V. and Freeman, M. (2011) "Rhomboid family pseudoproteases use the ER quality control machinery to regulate intercellular signaling" Cell (145): 79-91

- [64] Lee, W., Kim, Y., Park, J., Shim, S., Lee, J., Hong, S. H., Ahn, H. H., Lee, H. and Jung, Y. K. (2015) "iRhom1 regulates proteasome activity via PAC1/2 under ER stress" Sci Rep (5): 11559
- [65] Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N. and Freeman, M. (2012) "Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE" Science (335): 225-228
- [66] McIlwain, D. R., Lang, P. A., Maretzky, T., Hamada, K., Ohishi, K., Maney, S. K., Berger, T., Murthy, A., Duncan, G., Xu, H. C., Lang, K. S., Haussinger, D., Wakeham, A., Itie-Youten, A., Khokha, R., Ohashi, P. S., Blobel, C. P. and Mak, T. W. (2012) "iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS" Science (335): 229-232
- [67] Grieve, A. G., Xu, H., Kunzel, U., Bambrough, P., Sieber, B. and Freeman, M. (2017) "Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling" Elife (6): e23968
- [68] Cavadas, M., Oikonomidi, I., Gaspar, C. J., Burbridge, E., Badenes, M., Felix, I., Bolado, A., Hu, T., Bileck, A., Gerner, C., Domingos, P. M., von Kriegsheim, A. and Adrain, C. (2017) "Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE" Cell Rep (21): 745-757
- [69] Janeway, C. J., Travers, P. and Walport, M. (2012) "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease" New York: Garland Science (8th Edition)
- [70] Brenner, D., Blaser, H. and Mak, T. W. (2015) "Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die" Nat Rev Immunol (15): 362-374
- [71] Kalliolias, G. D. and Ivashkiv, L. B. (2016) "TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies" Nat Rev Rheumatol (12): 49-62
- [72] Bhardwaj, A. and Aggarwal, B. B. (2003) "Receptor-mediated choreography of life and death" J Clin Immunol (23): 317-332
- [73] Wajant, H. (2003) "Death receptors" Essays Biochem (39): 53-71
- [74] Sedger, L. M. and McDermott, M. F. (2014) "TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future" Cytokine Growth Factor Rev (25): 453-472
- [75] Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (1995) "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor" Cell (83): 793-802
- [76] Lv, S., Han, M., Yi, R., Kwon, S., Dai, C. and Wang, R. (2014) "Anti-TNF- α therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis" Int J Clin Pract (68): 520-528
- [77] Müllberg, J., Durie, F. H., Otten-Evans, C., Alderson, M. R., Rose-John, S., Cosman, D., Black, R. A. and Mohler, K. M. (1995) "A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor" J Immunol (155): 5198-5205
- [78] Maney, S. K., McIlwain, D. R., Polz, R., Pandyra, A. A., Sundaram, B., Wolff, D., Ohishi, K., Maretzky, T., Brooke, M. A., Evers, A., Vasudevan, A. A., Aghaeepour, N., Scheller, J., Münk, C., Häussinger, D., Mak, T. W., Nolan, G. P., Kelsell, D. P., Blobel, C. P., Lang, K. S. and Lang, P. A. (2015) "Deletions in the cytoplasmic domain of iRhom1 and iRhom2 promote shedding of the TNF receptor by the protease ADAM17" Sci Signal (8): ra109
- [79] Deng, M., Loughran, P. A., Zhang, L., Scott, M. J. and Billiar, T. R. (2015) "Shedding of the tumor necrosis factor (TNF) receptor from the surface of hepatocytes during sepsis limits inflammation through cGMP signaling" Sci Signal (8): ra11
- [80] Sun, M. and Fink, P. J. (2007) "A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family" J Immunol (179): 4307-4312
- [81] Juhász, K., Buzás, K. and Duda, E. (2013) "Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation" Expert Rev Clin Immunol (9): 335-348

- [82] Eissner, G., Kirchner, S., Lindner, H., Kolch, W., Janosch, P., Grell, M., Scheurich, P., Andreesen, R. and Holler, E. **(2000)** "Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages" J Immunol (164): 6193-6198
- [83] Waetzig, G. H., Rosenstiel, P., Arlt, A., Till, A., Bräutigam, K., Schäfer, H., Rose-John, S., Seegert, D. and Schreiber, S. **(2005)** "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1" Faseb j (19): 91-93
- [84] Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S. and Schreiber, S. **(2002)** "p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease" J Immunol (168): 5342-5351
- [85] Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. **(2011)** "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6" Biochim Biophys Acta (1813): 878-888
- [86] Garbers, C., Heink, S., Korn, T. and Rose-John, S. **(2018)** "Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine" Nat Rev Drug Discov (17): 395-412
- [87] Wolf, J., Rose-John, S. and Garbers, C. **(2014)** "Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system" Cytokine (70): 11-20
- [88] Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S. and Scheller, J. **(2011)** "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer" Eur J Cell Biol (90): 484-494
- [89] Garbers, C., Aparicio-Siegmund, S. and Rose-John, S. **(2015)** "The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition" Curr Opin Immunol (34): 75-82
- [90] Tanaka, T., Narazaki, M., Ogata, A. and Kishimoto, T. **(2014)** "A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy" Semin Immunol (26): 88-96
- [91] Riethmueller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C. W., Flynn, C. M., Lokau, J., Agthe, M., Düsterhöft, S., Zhu, Y., Grötzinger, J., Lorenzen, I., Koudelka, T., Yamamoto, K., Pickhinke, U., Wichert, R., Becker-Pauly, C., Rädisch, M., Albrecht, A., Hessefort, M., Stahnke, D., Unverzagt, C., Rose-John, S., Tholey, A. and Garbers, C. **(2017)** "Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation" PLoS Biol (15): e2000080
- [92] Müller-Newen, G., Köhne, C., Keul, R., Hemmann, U., Müller-Esterl, W., Wijdenes, J., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H. and Heinrich, P. C. **(1996)** "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing" Eur J Biochem (236): 837-842
- [93] Lust, J. A., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A. and Maihle, N. J. **(1992)** "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor" Cytokine (4): 96-100
- [94] Ardito, C. M., Grüner, B. M., Takeuchi, K. K., Lubeseder-Martellato, C., Teichmann, N., Mazur, P. K., Delgiorno, K. E., Carpenter, E. S., Halbrook, C. J., Hall, J. C., Pal, D., Briel, T., Herner, A., Trajkovic-Arsic, M., Sipos, B., Liou, G. Y., Storz, P., Murray, N. R., Threadgill, D. W., Sibilia, M., Washington, M. K., Wilson, C. L., Schmid, R. M., Raines, E. W., Crawford, H. C. and Siveke, J. T. **(2012)** "EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis" Cancer Cell (22): 304-317
- [95] 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. and Kelsell, D. P. **(2011)** "Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion" N Engl J Med (365): 1502-1508

- [96] Fan, H., Turck, C. W. and Derynck, R. **(2003)** "Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide" J Biol Chem (278): 18617-18627
- [97] Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Miyamoto, K., Akiyama, H., Takaishi, H., Morioka, H., Nakamura, T., Okada, Y., Blobel, C. P. and 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
- [98] La Marca, R., Cerri, F., Horiuchi, K., Bachi, A., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Blobel, C. P., Quattrini, A., Salzer, J. L. and Taveggia, C. **(2011)** "TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination" Nat Neurosci (14): 857-865
- [99] Long, C., Wang, Y., Herrera, A. H., Horiuchi, K. and Walcheck, B. **(2010)** "In vivo role of leukocyte ADAM17 in the inflammatory and host responses during E. coli-mediated peritonitis" J Leukoc Biol (87): 1097-1101
- [100] Murthy, A., Defamie, V., Smookler, D. S., Di Grappa, M. A., Horiuchi, K., Federici, M., Sibilio, M., Blobel, C. P. and Khokha, R. **(2010)** "Ectodomain shedding of EGFR ligands and TNFR1 dictates hepatocyte apoptosis during fulminant hepatitis in mice" J Clin Invest (120): 2731-2744
- [101] Murthy, A., Shao, Y. W., Narala, S. R., Molyneux, S. D., Zúñiga-Pflücker, J. C. and Khokha, R. **(2012)** "Notch activation by the metalloproteinase ADAM17 regulates myeloproliferation and atopic barrier immunity by suppressing epithelial cytokine synthesis" Immunity (36): 105-119
- [102] Weskamp, G., Mendelson, K., Swendeman, S., Le Gall, S., Ma, Y., Lyman, S., Hinoki, A., Eguchi, S., Guaiquil, V., Horiuchi, K. and Blobel, C. P. **(2010)** "Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes" Circ Res (106): 932-940
- [103] Yan, F., Liu, L., Dempsey, P. J., Tsai, Y. H., Raines, E. W., Wilson, C. L., Cao, H., Cao, Z., Liu, L. and Polk, D. B. **(2013)** "A Lactobacillus rhamnosus GG-derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor" J Biol Chem (288): 30742-30751
- [104] Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y. and Blobel, C. P. **(2007)** "Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock" J Immunol (179): 2686-2689
- [105] Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Hasler, R., Becker, C., Neurath, M. F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J. and Rose-John, S. **(2010)** "Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice" J Exp Med (207): 1617-1624
- [106] Nicolaou, A., Zhao, Z., Northoff, B. H., Sass, K., Herbst, A., Kohlmaier, A., Chalaris, A., Wolfrum, C., Weber, C., Steffens, S., Rose-John, S., Teupser, D. and Holdt, L. M. **(2017)** "Adam17 Deficiency Promotes Atherosclerosis by Enhanced TNFR2 Signaling in Mice" Arterioscler Thromb Vasc Biol (37): 247-257
- [107] Kefaloyianni, E., Muthu, M. L., Kaeppler, J., Sun, X., Sabbisetti, V., Chalaris, A., Rose-John, S., Wong, E., Sagi, I., Waikar, S. S., Rennke, H., Humphreys, B. D., Bonventre, J. V. and Herrlich, A. **(2016)** "ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis" JCI Insight (1): e87023
- [108] Tsukerman, P., Eisenstein, E. M., Chavkin, M., Schmiedel, D., Wong, E., Werner, M., Yaacov, B., Averbuch, D., Molho-Pessach, V., Stepensky, P., Kaynan, N., Bar-On, Y., Seidel, E., Yamin, R., Sagi, I., Elpeleg, O. and Mandelboim, O. **(2015)** "Cytokine secretion and NK cell activity in human ADAM17 deficiency" Oncotarget (6): 44151-44160
- [109] Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., Bach-Ngohou, K., Paineau, J., Denis, M. G., Laboisse, C. L. and 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
- [110] Ding, X., Yang, L. Y., Huang, G. W., Wang, W. and Lu, W. Q. (2004) "ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma" World J Gastroenterol (10): 2735-2739
- [111] Karan, D., Lin, F. C., Bryan, M., Ringel, J., Moniaux, N., Lin, M. F. and Batra, S. K. (2003) "Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas" Int J Oncol (23): 1365-1371
- [112] Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H. and 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
- [113] Ringel, J., Jesnowski, R., Moniaux, N., Lüttges, J., Ringel, J., Choudhury, A., Batra, S. K., Klöppel, G. and Löhr, M. (2006) "Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma" Cancer Res (66): 9045-9053
- [114] Roemer, A., Schwettmann, L., Jung, M., Roigas, J., Kristiansen, G., Schnorr, D., Loening, S. A., Jung, K. and Lichtinghagen, R. (2004) "Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome" Oncol Rep (11): 529-536
- [115] Tanaka, Y., Miyamoto, S., Suzuki, S. O., Oki, E., Yagi, H., Sonoda, K., Yamazaki, A., Mizushima, H., Maehara, Y., Mekada, E. and Nakano, H. (2005) "Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer" Clin Cancer Res (11): 4783-4792
- [116] Zheng, X., Jiang, F., Katakowski, M., Kalkanis, S. N., Hong, X., Zhang, X., Zhang, Z. G., Yang, H. and Chopp, M. (2007) "Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness" Cancer Sci (98): 674-684
- [117] Zhou, B. B., Peyton, M., He, B., Liu, C., Girard, L., Caudler, E., Lo, Y., Baribaud, F., Mikami, I., Reguart, N., Yang, G., Li, Y., Yao, W., Vaddi, K., Gazdar, A. F., Friedman, S. M., Jablons, D. M., Newton, R. C., Fridman, J. S., Minna, J. D. and 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
- [118] McGowan, P. M., McKiernan, E., Bolster, F., Ryan, B. M., Hill, A. D., McDermott, E. W., Evoy, D., O'Higgins, N., Crown, J. and Duffy, M. J. (2008) "ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer" Ann Oncol (19): 1075-1081
- [119] Kenny, P. A. and Bissell, M. J. (2007) "Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer" J Clin Invest (117): 337-345
- [120] Arribas, J. and Esselens, C. (2009) "ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases" Curr Pharm Des (15): 2319-2335
- [121] Silva, C. M. (2004) "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis" Oncogene (23): 8017-8023
- [122] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) "Hallmarks of cancer: the next generation" Cell (144): 646-674
- [123] Sebastian, S., Settleman, J., Reshkin, S. J., Azzariti, A., Bellizzi, A. and Paradiso, A. (2006) "The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover" Biochim Biophys Acta (1766): 120-139
- [124] De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P. and Delrio, P. (2015) "Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review)" Oncol Rep (34): 1087-1096
- [125] Peifer, M. (2002) "Developmental biology: colon construction" Nature (420): 274-275, 277
- [126] Kosinski, C., Li, V. S., Chan, A. S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., Leung, S. Y. and Chen, X. (2007) "Gene expression patterns

- of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors" Proc Natl Acad Sci U S A (104): 15418-15423
- [127] Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. and Karin, M. (2010) "Inflammation and colon cancer" Gastroenterology (138): 2101-2114.e2105
- [128] Tariq, K. and Ghias, K. (2016) "Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms" Cancer Biol Med (13): 120-135
- [129] Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001) "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet (357): 539-545
- [130] Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schürmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S. and Neurath, M. F. (2000) "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo" Nat Med (6): 583-588
- [131] Mitsuyama, K., Matsumoto, S., Rose-John, S., Suzuki, A., Hara, T., Tomiyasu, N., Handa, K., Tsuruta, O., Funabashi, H., Scheller, J., Toyonaga, A. and Sata, M. (2006) "STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice" Gut (55): 1263-1269
- [132] Becker, C., Fantini, M. C., Schramm, C., Lehr, H. A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P. R., Blessing, M., Rose-John, S. and Neurath, M. F. (2004) "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling" Immunity (21): 491-501
- [133] Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, P. R., Rose-John, S. and Neurath, M. F. (2005) "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer" Cell Cycle (4): 217-220
- [134] Matsumoto, S., Hara, T., Mitsuyama, K., Yamamoto, M., Tsuruta, O., Sata, M., Scheller, J., Rose-John, S., Kado, S. and Takada, T. (2010) "Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model" J Immunol (184): 1543-1551
- [135] Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., Tangermann, S., Kenner, L., Schleder, M., Sibilia, M., Linder, M., Altendorf-Hofmann, A., Knosel, T., Gruber, E. S., Oberhuber, G., Bolik, J., Rehman, A., Sinha, A., Lokau, J., Arnold, P., Cabron, A. S., Zunke, F., Becker-Pauly, C., Preaudet, A., Nguyen, P., Huynh, J., Afshar-Sterle, S., Chand, A. L., Westermann, J., Dempsey, P. J., Garbers, C., Schmidt-Arras, D., Rosenstiel, P., Putoczki, T., Ernst, M. and Rose-John, S. (2018) "ADAM17 is required for EGF-R-induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling" J Exp Med (215): 1205-1225
- [136] Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B. M., Natarajan, A., Hecking, M. and Holcman, M. (2007) "The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis" Differentiation (75): 770-787
- [137] Srivatsa, S., Paul, M. C., Cardone, C., Holcman, M., Amberg, N., Pathria, P., Diamanti, M. A., Linder, M., Timelthaler, G., Dienes, H. P., Kenner, L., Wrba, F., Prager, G. W., Rose-John, S., Eferl, R., Liguori, G., Botti, G., Martinelli, E., Greten, F. R., Ciardiello, F. and Sibilia, M. (2017) "EGFR in Tumor-Associated Myeloid Cells Promotes Development of Colorectal Cancer in Mice and Associates With Outcomes of Patients" Gastroenterology (153): 178-190.e110
- [138] Schumacher, N. and Rose-John, S. (2019) "ADAM17 Activity and IL-6 Trans-Signaling in Inflammation and Cancer" Cancers (Basel) (11): 1736
- [139] Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. and Todaro, G. J. (1988) "Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-

- acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7" Proc Natl Acad Sci U S A (85): 6528-6532
- [140] Cook, P. W., Pittelkow, M. R., Keeble, W. W., Graves-Deal, R., Coffey, R. J., Jr. and Shipley, G. D. (1992) "Amphiregulin messenger RNA is elevated in psoriatic epidermis and gastrointestinal carcinomas" Cancer Res (52): 3224-3227
- [141] Yamada, Y. and Mori, H. (2007) "Multistep carcinogenesis of the colon in Apc(Min/+) mouse" Cancer Sci (98): 6-10
- [142] Trad, A., Hedemann, N., Shomali, M., Pawlak, V., Grotzinger, J. and Lorenzen, I. (2011) "Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17" J Immunol Methods (371): 91-96
- [143] Yamamoto, K., Trad, A., Baumgart, A., Huske, L., Lorenzen, I., Chalaris, A., Grötzinger, J., Dechow, T., Scheller, J. and Rose-John, S. (2012) "A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell-mediated lysis of prostate cancer cells" Biochem J (445): 135-144
- [144] Rosas, M., Osorio, F., Robinson, M. J., Davies, L. C., Dierkes, N., Jones, S. A., Reis e Sousa, C. and Taylor, P. R. (2011) "Hoxb8 conditionally immortalised macrophage lines model inflammatory monocytic cells with important similarity to dendritic cells" Eur J Immunol (41): 356-365
- [145] Cabron, A. S., El Azzouzi, K., Boss, M., Arnold, P., Schwarz, J., Rosas, M., Dobert, J. P., Pavlenko, E., Schumacher, N., Renne, T., Taylor, P. R., Linder, S., Rose-John, S. and Zunke, F. (2018) "Structural and Functional Analyses of the Shedding Protease ADAM17 in HoxB8-Immortalized Macrophages and Dendritic-like Cells" J Immunol (201): 3106-3118
- [146] Pavlenko, E., Cabron, A. S., Arnold, P., Dobert, J. P., Rose-John, S. and Zunke, F. (2019) "Functional Characterization of Colon Cancer-Associated Mutations in ADAM17: Modifications in the Pro-Domain Interfere with Trafficking and Maturation" Int J Mol Sci (20): 2198
- [147] Riethmueller, S., Ehlers, J. C., Lokau, J., Düsterhöft, S., Knittler, K., Dombrowsky, G., Grötzinger, J., Rabe, B., Rose-John, S. and Garbers, C. (2016) "Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17" Sci Rep (6): 25550
- [148] Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Adachi, Y., Kosugi, A. and Miyake, K. (2003) "Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14" J Exp Med (198): 1035-1042
- [149] Takashiba, S., Van Dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A. W. and Shapira, L. (1999) "Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB" Infect Immun (67): 5573-5578
- [150] Sanguedolce, M. V., Capo, C., Bongrand, P. and Mege, J. L. (1992) "Zymosan-stimulated tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes. Down-modulation by phorbol ester" J Immunol (148): 2229-2236
- [151] Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999) "The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens" Nature (401): 811-815
- [152] Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasprowitz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D. and Pulendran, B. (2006) "Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance" J Clin Invest (116): 916-928

- [153] Chavarroche, A., Cudic, M., Giulianotti, M., Houghten, R. A., Fields, G. B. and Minond, D. **(2014)** "Glycosylation of a disintegrin and metalloprotease 17 affects its activity and inhibition" Anal Biochem (449): 68-75
- [154] Leonard, J. D., Lin, F. and Milla, M. E. **(2005)** "Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch" Biochem J (387): 797-805
- [155] Zunke, F. and Rose-John, S. **(2017)** "The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology" Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research (1864): 2059-2070
- [156] Parameswaran, N. and Patial, S. **(2010)** "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages" Crit Rev Eukaryot Gene Expr (20): 87-103
- [157] Yu, M., Lam, J., Rada, B., Leto, T. L. and Levine, S. J. **(2011)** "Double-stranded RNA induces shedding of the 34-kDa soluble TNFR1 from human airway epithelial cells via TLR3-TRIF-RIP1-dependent signaling: roles for dual oxidase 2- and caspase-dependent pathways" J Immunol (186): 1180-1188
- [158] Hall, K. C. and Blobel, C. P. **(2012)** "Interleukin-1 Stimulates ADAM17 through a Mechanism Independent of its Cytoplasmic Domain or Phosphorylation at Threonine 735" PLOS ONE (7): e31600
- [159] Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P. C. and Rose-John, S. **(1992)** "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor" Biochem Biophys Res Commun (189): 794-800
- [160] Wang, G. G., Calvo, K. R., Pasillas, M. P., Sykes, D. B., Hacker, H. and Kamps, M. P. **(2006)** "Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8" Nat Methods (3): 287-293
- [161] Janssens, S. and Beyaert, R. **(2003)** "Role of Toll-like receptors in pathogen recognition" Clin Microbiol Rev (16): 637-646
- [162] Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M. and Coffman, R. L. **(2007)** "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists" Nat Med (13): 552-559
- [163] Le Gall, S. M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X. D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P. and 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 alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha" Mol Biol Cell (20): 1785-1794
- [164] Li, X., Yan, Y., Huang, W. and Yang, Y. **(2009)** "The study of the inhibition of the recombinant TACE prodomain to endotoxemia in mice" Int J Mol Sci (10): 5442-5454
- [165] Maretzky, T., Le Gall, S. M., Worpenberg-Pietruk, S., Eder, J., Overall, C. M., Huang, X. Y., Poghosyan, Z., Edwards, D. R. and Blobel, C. P. **(2009)** "Src stimulates fibroblast growth factor receptor-2 shedding by an ADAM15 splice variant linked to breast cancer" Cancer Res (69): 4573-4576
- [166] Maretzky, T., Mcllwain, D. R., Issuree, P. D., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P. A., Mak, T. W. and Blobel, C. P. **(2013)** "iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding" Proc Natl Acad Sci U S A (110): 11433-11438
- [167] Maretzky, T., Evers, A., Zhou, W., Swendeman, S. L., Wong, P. M., Rafii, S., Reiss, K. and Blobel, C. P. **(2011)** "Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17" Nat Commun (2): 229
- [168] Zhang, Q., Thomas, S. M., Lui, V. W., Xi, S., Siegfried, J. M., Fan, H., Smithgall, T. E., Mills, G. B. and Grandis, J. R. **(2006)** "Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation" Proc Natl Acad Sci U S A (103): 6901-6906
- [169] Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Klimpel, K. R. and Thomas, G. **(1992)** "Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence

- Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen" J Biol Chem (267): 16396-16402
- [170] Peiretti, F., Canault, M., Deprez-Beauclair, P., Berthet, V., Bonardo, B., Juhan-Vague, I. and Nalbone, G. (2003) "Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme" Exp Cell Res (285): 278-285
- [171] Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2005) "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors" Nat Rev Cancer (5): 341-354
- [172] Spano, J. P., Lagorce, C., Atlan, D., Milano, G., Domont, J., Benamouzig, R., Attar, A., Benichou, J., Martin, A., Morere, J. F., Raphael, M., Penault-Llorca, F., Breau, J. L., Fagard, R., Khayat, D. and Wind, P. (2005) "Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival" Ann Oncol (16): 102-108
- [173] Haraldsdottir, S. and Bekaii-Saab, T. (2013) "Integrating anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer" J Gastrointest Oncol (4): 285-298
- [174] Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lutolf, U. M. and Kleihues, P. (2004) "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study" Cancer Res (64): 6892-6899
- [175] Mustafi, R., Dougherty, U., Mustafi, D., Ayaloglu-Butun, F., Fletcher, M., Adhikari, S., Sadiq, F., Meckel, K., Haider, H. I., Khalil, A., Pekow, J., Konda, V., Joseph, L., Hart, J., Fichera, A., Li, Y. C. and Bissonnette, M. (2017) "ADAM17 is a Tumor Promoter and Therapeutic Target in Western Diet-associated Colon Cancer" Clin Cancer Res (23): 549-561
- [176] Perez, L., Kerrigan, J. E., Li, X. and Fan, H. (2007) "Substitution of methionine 435 with leucine, isoleucine, and serine in tumor necrosis factor alpha converting enzyme inactivates ectodomain shedding activity" Biochem Cell Biol (85): 141-149
- [177] Berasain, C. and Avila, M. A. (2014) "Amphiregulin" Semin Cell Dev Biol (28): 31-41
- [178] Gonzales, P. E., Solomon, A., Miller, A. B., Leesnitzer, M. A., Sagi, I. and Milla, M. E. (2004) "Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain" J Biol Chem (279): 31638-31645
- [179] Li, X., Yan, Y., Huang, W., Yang, Y., Wang, H. and Chang, L. (2009) "The regulation of TACE catalytic function by its prodomain" Mol Biol Rep (36): 641-651
- [180] Saad, M. I., Alhayyani, S., McLeod, L., Yu, L., Alanazi, M., Deswaerte, V., Tang, K., Jarde, T., Smith, J. A., Prodanovic, Z., Tate, M. D., Balic, J. J., Watkins, D. N., Cain, J. E., Bozinovski, S., Algar, E., Kohmoto, T., Ebi, H., Ferlin, W., Garbers, C., Ruwanpura, S., Sagi, I., Rose-John, S. and Jenkins, B. J. (2019) "ADAM17 selectively activates the IL-6 trans-signaling/ERK MAPK axis in KRAS-addicted lung cancer" EMBO Mol Med (11): e9976
- [181] Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996) "Lessons from hereditary colorectal cancer" Cell (87): 159-170
- [182] McFarland, C. D., Yaglom, J. A., Wojtkowiak, J. W., Scott, J. G., Morse, D. L., Sherman, M. Y. and Mirny, L. A. (2017) "The Damaging Effect of Passenger Mutations on Cancer Progression" Cancer Res (77): 4763-4772
- [183] Pon, J. R. and Marra, M. A. (2015) "Driver and passenger mutations in cancer" Annu Rev Pathol (10): 25-50
- [184] Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B. L., Chiew, Y. E., DeFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton,

- D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M. H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A. and Stratton, M. R. **(2007)** "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes" Nature (446): 153-158
- [185] Dvorak, H. F. **(1986)** "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing" N Engl J Med (315): 1650-1659
- [186] Accarias, S., Sanchez, T., Labrousse, A., Ben-Neji, M., Boyance, A., Poincloux, R., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V. **(2020)** "Genetic engineering of Hoxb8-immortalized hematopoietic progenitors - a potent tool to study macrophage tissue migration" J Cell Sci (133): jcs236703
- [187] Friesen, E. L., De Snoo, M. L., Rajendran, L., Kalia, L. V. and Kalia, S. K. **(2017)** "Chaperone-Based Therapies for Disease Modification in Parkinson's Disease" Parkinsons Dis (2017): 5015307
- [188] Bose, S. and Cho, J. **(2017)** "Targeting chaperones, heat shock factor-1, and unfolded protein response: Promising therapeutic approaches for neurodegenerative disorders" Ageing Res Rev (35): 155-175
- [189] Hanrahan, J. W., Sato, Y., Carlile, G. W., Jansen, G., Young, J. C. and Thomas, D. Y. **(2019)** "Cystic Fibrosis: Proteostatic correctors of CFTR trafficking and alternative therapeutic targets" Expert Opin Ther Targets (23): 711-724

9 ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
Aq. dest.	<i>Aqua destilata</i> , destilliertes Waaser
AS	Aminosäure
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
AREG	Amphiregulin
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , Rezeptor des EGF
ELISA	<i>Emzyme linked immunosorbent assay</i>
EndoH	Endoglycosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GI	GI254023X; ADAM10 Inhibitor
GW	GW280264X; ADAM10 und ADAM17 Inhibitor
h	Stunde bzw. human
HEK	human embryonic kidney
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
KO	<i>knock-out</i>
KRAS	Kirsten Rat Sarkoma

LPS	Lipopolysaccharid
mEF	murine embryonale Fibroblasten
MFI	<i>median fluorescence intensity</i> , Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
ml	Milliliter
mg	Milligramm
norm	normiert
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PEI	Polyethylenimin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNGaseF	Peptide-N-Glycosidase F
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
TACE	<i>Tumor necrosis factor alpha converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Trispuffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF-R	Rezeptor des TNF α
TNF α	Tumornekrosefaktor α
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromolar
U	Unit
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>Weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
WB	Western Blot
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

9.2 AMINOSÄUREN

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

9.3 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISSE

9.3.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der ADAM17-Struktur.....	2
Abbildung 1.2: Maturierung und Regulation der ADAM17-Aktivität.	6
Abbildung 1.3: Die Rolle von ADAM17 bei der Darmkrebsentstehung.....	13
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des murinen ADAM17-Proteins mit den jeweiligen Domänen und die verwendeten ADAM17-Varianten ^[145]	46
Abbildung 4.2: Charakterisierung der ADAM17-Varianten in mEF-Zellen ^[145]	47
Abbildung 4.3: Überprüfung der ADAM17-Defizienz der HEK dKO-Zellen ^[145]	49
Abbildung 4.4: Charakterisierung der ADAM17-Varianten in HEK dKO-Zellen ^[145]	51
Abbildung 4.5: Strukturmodelle der Proteine ADAM17 und Adamalysin ^[145]	54
Abbildung 4.6: Etablierung und Charakterisierung der MØP-Zellen auf ADAM17 ^{ex/ex} -Hintergrund ^[145]	57
Abbildung 4.7: Untersuchungen zur Expression von ADAM17-Varianten im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem ^[145]	59
Abbildung 4.8: Funktionale Charakterisierung von ADAM17-Varianten im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem ^[145]	60
Abbildung 4.9: Charakterisierung der Lokalisation von ADAM17-Varianten im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem ^[145]	62
Abbildung 4.10: Übersicht über die untersuchten ADAM17-Varianten ^[146]	65
Abbildung 4.11: Untersuchung der Expression von ADAM17-Varianten in der katalytischen Domäne.....	66
Abbildung 4.12: Proteolytische Aktivität von ADAM17-Mutationen in der katalytischen Domäne.	67
Abbildung 4.13: Einfluss von ADAM17-Mutationen in der katalytischen Domäne auf die zelluläre Lokalisation.	69
Abbildung 4.14: Untersuchung der Expression von Darmkrebs-assoziierten ADAM17-Varianten außerhalb der katalytischen Domäne ^[146]	71
Abbildung 4.15: Proteolytische Aktivität der Darmkrebs-assoziierten ADAM17-Varianten außerhalb der katalytischen Domäne ^[146]	72
Abbildung 4.16: Einfluss der ADAM17-Varianten auf die zelluläre Lokalisation ^[146]	74
Abbildung 4.17: Funktion und Einfluss von ADAM17-Mutationen in der Prodomäne auf proteolytische Aktivität und zelluläre Lokalisation ^[146]	76
Abbildung 4.18: Schematische Darstellungen der ADAM17-Variante D232H.	79
Abbildung 4.19: Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der ADAM17-Variante D232H in HEK dKO-Zellen.	80
Abbildung 4.20: Funktionale Charakterisierung der ADAM17-Variante D232H in HEK dKO-Zellen.	82
Abbildung 4.21: Funktionale Charakterisierung der ADAM17-Variante im ADAM17-defizienten MØP-Zellsystem.....	84

9.3.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Verwendete Antibiotika	15
Tabelle 2.2: Verwendete primäre Antikörper.....	15
Tabelle 2.3: Verwendete konjugierte primäre Antikörper	17
Tabelle 2.4: Verwendete sekundäre Antikörper	18
Tabelle 2.5: Verwendete Software.....	19
Tabelle 2.6: Verwendete Kits.....	20
Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide	21
Tabelle 2.8: Hergestellte Plasmide	23
Tabelle 2.9: Verwendete Mutagenese Primer	25
Tabelle 2.10: Verwendete Sequenzierungsprimer	26
Tabelle 2.11: Verwendete Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	27
Tabelle 2.12: Verwendete Puffer und Lösungen für die Biotinylierung	27
Tabelle 2.13: Verwendete Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrische Messung	28
Tabelle 2.14: Verwendete Puffer und Lösungen für den ELISA	28
Tabelle 2.15: Verwendete Puffer und Lösungen für das Furin <i>Cleavage</i> Assay.....	28
Tabelle 2.16: Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz	28
Tabelle 2.17: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
Tabelle 2.18: Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	30
Tabelle 2.19: Verwendete Puffer und Lösungen für die Zelllyse	30
Tabelle 2.20: Verwendete adhärente Zelllinien	31
Tabelle 2.21: Verwendete MØP Zellen	31
Tabelle 2.22: Verwendete Zellkulturmedien.....	32
Tabelle 3.1: Zusammensetzung Mix für die Mutagenese-PCR	34
Tabelle 3.2: Temperaturprogramm für die Mutagenese-PCR	34
Tabelle 4.1: Auflistung der analysierten ADAM17-Varianten	64

9.4 PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Originalbeiträge:

Functional Characterization of Colon Cancer-Associated Mutations in *ADAM17*: Modifications in the Pro-Domain Interfere with Trafficking and Maturation

Pavlenko*, E., **Cabron***, A. S. , Arnold P., Dobert J. P., Rose-John S. and Zunke F.

Int J Mol Sci. 2019 May 4; 20(9). pii: E2198

(* geteilte Erstautorenschaft)

Structural and Functional Analyses of the Shedding Protease ADAM17 in HoxB8-Immortalized Macrophages and Dendritic-like Cells

Cabron, A. S., El Azzouzi, K., Boss, M., Arnold, P., Schwarz, J., Rosas, M., Dobert, J. P., Pavlenko, E., Schumacher, N., Renné, T., Taylor, P. R., Linder, S., Rose-John, S. and Zunke, F.

J Immunol. 2018 Nov 15; 201(10): 3106-3118

Weitere Publikationen:

ADAM17 is required for EGF-R-induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling

Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., Tangemann, S., Kenner, L., Schlederer, M., Sibia, M., Linder, M., Altendorf-Hofmann, A., Knosel, T., Gruber, E. S., Oberhuber, G., Bolik, J., Rehman, A., Sinha, A., Lokau, J., Arnold, P., **Cabron, A. S.**, Zunke, F., Becker-Pauly, C., Preaudet, A., Nguyen, P., Huynh, J., Afshar-Sterle, S., Chand, A. L., Westermann, J., Dempsey, P. J., Garbers, C., Schmidt-Arras, D., Rosenstiel, P., Putoczki, T., Ernst, M. and Rose-John, S.

J Exp Med. 2018 Apr 2; 215(4): 1205-1225

9.5 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, Anne-Sophie Cabron, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mithilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen sowie der Beratung durch meinen Betreuer selbst verfasst habe. Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Weiterhin wurde diese Arbeit von mir nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht.

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

Ich bin einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Kiel, 09.09.2020

Anne-Sophie Cabron