

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

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

Die Rolle der Transmembrandomäne von ADAM17 für die Substratproteolyse

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

vorgelegt von

Martin Munz

aus Bietigheim-Bissingen

Kiel, 2019

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. K. Reiß

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. J. Saftig

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.03.2020

gez.: Prof. Dr. G. Heine

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
2. Einleitung.....	1
2.1 ADAM – A Disintegrin And Metalloprotease	1
2.1.1 Aufbau von ADAM17	2
2.1.2 Physiologische Relevanz von ADAM17	5
2.1.3 Regulation der Proteasen	8
2.2 Die Plasmamembran	14
2.3 Die Rolle der Transmembrandomäne für das <i>Shedding</i>	17
3. FRAGESTELLUNG	23
4. MATERIAL UND METHODEN.....	25
4.1 Material.....	25
4.1.1 Geräte.....	25
4.1.2 Chemikalien	26
4.1.3 Stimulanzen	28
4.1.4 Inhibitoren	28
4.1.5 Primäre und sekundäre Antikörper	28
4.1.6 Verbrauchsmaterialien	28
4.1.7 Puffer und Lösungen	29
4.1.8 Zellkulturmedien	34
4.1.9 Plasmide	35
4.1.10 Kits	35
4.1.11 Software	36
4.2 Methoden.....	36
4.2.1 Mutagenese.....	36
4.2.2 Mikrobiologische Methoden	40
4.2.3 Zellkultur.....	40
4.2.4 <i>Shedding</i> -Experimente mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Substraten.....	41
4.2.5 Fluoreszenz-Peptid-Substrat-Assay	44
4.2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	45
4.2.7 Immunzytochemie.....	48
4.2.8 Durchflusszytometrie	48
4.2.9 Statistische Auswertung	49
5. ERGEBNISSE	50
5.1 Die Transmembrandomäne von ADAM17 und ihr potenzielles Substratbindemotiv	50
5.2 Mutationen der ADAM17-Transmembrandomäne haben Einfluss auf das Substrat-<i>Shedding</i>.....	55

5.3 Vergleich des ADAM-vermittelten *Sheddings* für potenziell Motiv-assoziierte und nicht-Motiv-assoziierte Substrate..... 59

5.4 Untersuchung der proteolytischen Aktivität und der Proteinexpression von Chimären und ADAM17 WT..... 62

5.5 Die Transmembrandomäne von Amphiregulin und ihre Rolle für die Substratinteraktion..... 67

5.6 Das artifizielle Konsensus-Motivs der Transmembrandomäne von ADAM17 71

6. DISKUSSION 74

6.1 Die Transmembrandomäne von ADAM17 und ihre Rolle für die Substraterkennung 75

6.2 Die Transmembrandomäne von Amphiregulin und ihre mögliche Rolle für die Substraterkennung 86

6.3 Das artifizielle Konsensus-Motiv von ADAM17 ALL weist vergleichbare Eigenschaften auf wie ADAM17 WT..... 88

6.4 Modell des ADAM17-vermittelten *Sheddings*..... 90

7. ZUSAMMENFASSUNG 92

8. SUMMARY 94

9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS 96

10. LITERATURVERZEICHNIS 97

11. PUBLIKATIONEN..... 109

12. ERKLÄRUNG 110

13. DANKSAGUNG..... 111

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen

A

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADAMTS	<i>ADAM with Thrombospondin motif</i>
AMP	Ampicillin
ANO6	Anoctamin 6
AP	Alkalische Phosphatase
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat

B

BSA	Bovines Serumalbumin
-----	----------------------

C

Ca ²⁺	Kalziumion
CANDIS	<i>Conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence</i>
CD (z.B. CD30)	<i>Cluster of differentiation</i>

D

DABCO	Diazabicyclooctane
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DIS	Disintegrin-Domäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>EGF Receptor</i>

F

FCS	Fetales Kälberserum
-----	---------------------

G

GpA Glycophorin A
g Gramm

H

h Stunde
H₂O Wasser
HB-EGF *Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*
HCl Salzsäure, rauchend
HRP Meerrettichperoxidase

I

IKMB *Institute of Clinical Molecular Biology*

K

KCl Kaliumchlorid
kDa Kilodalton
KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat

L

LB Lysogeny Broth

M

mA Milliampere
mg Milligramm
MgCl₂ Magnesiumchlorid
MgSO₄ Magnesiumsulfat
µg Mikrogramm
µl Mikroliter
µM Mikromolar
µm Mikrometer
ml Milliliter
MM Marimastat
mM Millimolar
MMPs Matrix-Metalloproteasen
MP Metalloprotease-Domäne
MPD Membran-proximale-Domäne

N

n.s. nicht signifikant

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
<u>P</u>	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<u>R</u>	
rpm	<i>rounds per minute</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<u>S</u>	
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<u>T</u>	
TACE	<i>Tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	<i>Transforming growth factor-α</i>
TM	Transmembrandomäne
TMEM16F	<i>Transmembrane Protein 16F</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TPA	Tetradecanoylphorbol-acetat
<u>U</u>	
U	Enzymeinheit zur Angabe der Enzymaktivität

V

V

Volt

W

WT

Wildtyp

X

x g

Vielfaches der Erdbeschleunigung

Z

Z

Zytoplasmatische-Domäne

Zn²⁺

Zinkion

ZnCl₂

Zinkchlorid

2. Einleitung

2.1 ADAM – A Disintegrin And Metalloprotease

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen, *A Disintegrin And Metalloproteinases* (ADAMs), zeichnen sich besonders durch ihre Metalloprotease- und ihre Disintegrin-Domäne (DIS) aus. Die proteolytisch aktive Metalloprotease-Domäne (MP) trägt in ihrem Zentrum als namensgebendes Charakteristikum ein Metallion. Die katalytisch aktiven ADAMs vermitteln, entsprechend ihrer großen Anzahl an Substraten, eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen. ADAMs könnten somit als therapeutischer Angriffspunkt dienen. Der Prozess, der die Substrate der ADAMs an ihren Peptidbindungen hydrolytisch spaltet und für viele Zellen einen wesentlichen Regulationsmechanismus darstellt, wird als *Shedding* bezeichnet (Reiss & Saftig 2009). Die meisten Mitglieder der ADAM-Proteinfamilie sind Typ 1 orientierte transmembrangebundene Glykoproteine. ADAM-Proteasen gehören zu der Familie der zinkabhängigen Metzinkine, dargestellt in Abbildung 1. Diese Proteinfamilie wird in vier Untergruppen unterteilt. Eine hochkonservierte Anordnung von drei Histidinresten (HExxHxxGxxH) im aktiven Zentrum ist allen Untergruppen gemein. C-terminal folgt diesem Motiv ein Methionin-*Turn*. Die Motive werden mittels Einbuchstabencodes der Aminosäuren vereinfacht. Neben der Untergruppe der Adamalysine, welcher die ADAMs angehören, gibt es noch die Astacine, die Matrix-Metalloproteasen und die Serralysine (Bode *et al.* 1993).

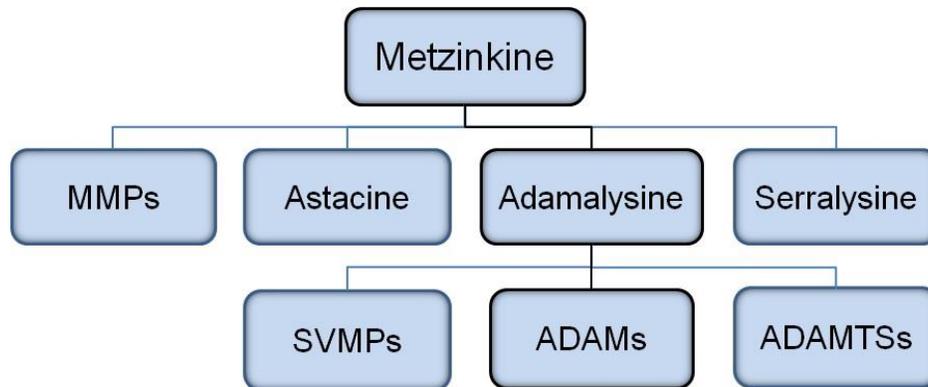


Abbildung 1: Die Zn²⁺-abhängigen Metalloproteasen der Metzinkinfamilie

Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Astacine, Adamalysine und Serralysine gehören zur Familie der Metzinkine. Die ADAMs gehören mit den *Snake Venom MetalloProteinases* (SVMPs) und den *A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs* (ADAMTSs) zu den Adamalysinen (Huxley-Jones *et al.* 2007).

Während noch keine ADAMs in einzellern, Bakterien und Pflanzen beschrieben wurden, sind in vielen anderen Spezies verschiedenste ADAMs identifiziert worden (Stone *et al.* 1999). Im menschlichen Genom wurden 21 ADAM-Gene identifiziert. Davon tragen die 13 Gene von ADAMDEC-1, ADAM-8, -9, -10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 und 33 das zinkbindende Motiv und sind damit proteolytisch aktiv. Die anderen Mitglieder könnten wesentlich für Protein-Interaktionen sein (Edwards *et al.* 2009).

2.1.1 Aufbau von ADAM17

Die verschiedenen ADAMs sind in einer sich ähnelnden Domänenstruktur aufgebaut. Diese setzt sich im Allgemeinen von N- nach C-terminal wie folgt zusammen: Signal-Sequenz, Pro-Domäne, MP, Disintegrin-Domäne, cysteinreiche-Region, *Epidermal Growth Factor* (EGF) -ähnliche-Domäne, Transmembrandomäne und Zytoplasmatische-Domäne (Wolfsberg & White 1996). ADAM10 und -17 gelten auch als atypische Mitglieder der ADAM-Familie, da sie anstelle einer cysteinreichen- und EGF-ähnlichen-Domäne über eine Membran-proximale-Domäne (MPD) sowie eine *Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence* (CANDIS)-Region verfügen (Takeda 2009; Lorenzen *et al.* 2012; Düsterhöft *et al.* 2014).

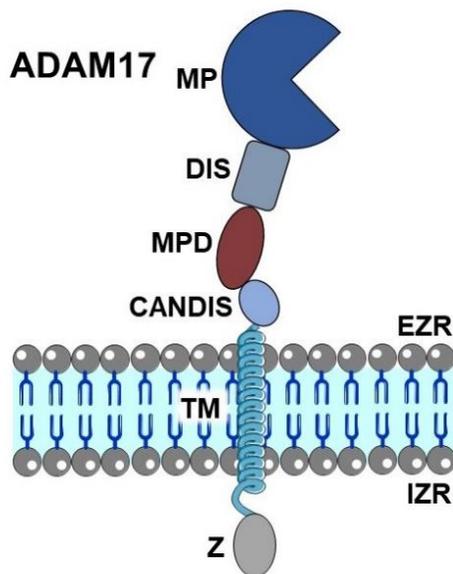


Abbildung 2: Die Domänenstruktur von ADAM17

ADAM17 besitzt eine Signal-Sequenz (nicht dargestellt), Pro-Domäne (nicht dargestellt), katalytische Metalloprotease-Domäne (MP), Disintegrin-Domäne (DIS), Membranproximale-Domäne (MPD), CANDIS-Region (CANDIS), Transmembrandomäne (TM) und eine Zytoplasmatische-Domäne (Z).

EZR (Extrazellulärraum)
IZR (Intrazellulärraum)

Abbildung 2 zeigt die Domänenstruktur von ADAM17. Die transmembrangebundenen ADAMs werden an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums als proteolytisch inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene, synthetisiert. Nach komplexer Glykosylierung und der parallel stattfindenden Reifung werden die Proteine an die Zelloberfläche transportiert (Schlöndorff *et al.* 2000).

Während der Reifung wird die Pro-Domäne durch Furin und andere Proprotein-Konvertasen abgespalten (Endres *et al.* 2003). Möglicherweise bleibt sie mit der MP assoziiert und hält die Protease so in einer inaktiven Konformation (Milla *et al.* 1999; Li & Fan 2004). Die Assoziation besteht darin, dass ein konservierter Cystein-Rest der Pro-Domäne das Zn^{2+} des aktiven Zentrums komplexiert (Van Wart & Birkedal-Hansen 1990). Die N-terminale Pro-Domäne stellt darüber hinaus ein Chaperon für das Enzym dar (Leonard *et al.* 2005).

Die MP der proteolytisch aktiven ADAMs enthält das hochkonservierte Zinkbindemotiv (HExxHxxGxxH) und schließt sich der Pro-Domäne an. Die Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums sind für die Aktivität sehr wichtig. Es wird nicht nur die notwendige Konformation geschaffen, sondern auch Wassermoleküle für die hydrolytische Spaltung der Substrate bereitgehalten (Bode *et al.* 1993; Gomis-Rüth 2003; Pérez *et al.* 2007).

Die Arbeitsgruppe um Caescu spricht der katalytischen Domäne eine Beteiligung an der spezifischen Erkennung des Substrats *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) zu. Durch die strukturierte Analyse einer Vielzahl an Peptiden wurde die Position gefunden, an der ADAM17 seine Substrate hydrolytisch spaltet. Dabei stellte die Gruppe fest, dass der Aufbau dieser Schnittstelle nicht durch die immer gleichen Aminosäuren zustande kommt, sondern sowohl auf Seite der Protease als auch auf Seite des Substrats mehrere Bereiche für das *Shedding* von entscheidender Bedeutung sind (Caescu *et al.* 2010).

Die Disintegrin-Domäne vermittelt durch ihre Fähigkeit zur Interaktion mit den Integrinen Zelladhäsion. Beispielsweise vermittelt das sich auf den Spermien befindliche ADAM2 (Fertilin β) durch Interaktion mit den $\alpha_6\beta_1$ -Integrinen, welche auf der Eizelloberfläche lokalisiert sind, den Fusionsprozess. Tetraspanin CD9 stellt dabei ein wichtiges Protein für die Interaktion dieser beiden Proteine dar (Evans 2001).

Durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß konnte eine wesentliche Rolle der MPD für die schlussendliche *Shedding*-Aktivierung von ADAM17 gefunden werden (siehe Kapitel 2.1.3) (Sommer *et al.* 2016). Durch eine wahrscheinlich C-förmige Konformation des extrazellulären Bereichs von ADAM17 befindet sich die MPD nahe am aktiven Zentrum. Die MPD soll ebenfalls an der Abspaltung der Pro-Domäne beteiligt sein und des Weiteren als substraterkennende Struktur dienen (Takeda *et al.* 2006).

Kürzlich wurde darüber hinaus zwischen der MPD und der Transmembrandomäne die CANDIS-Region identifiziert. Diese spielt für die Substraterkennung von Typ 1 Transmembranproteinen wie dem Interleukin-6-Rezeptor und dem Interleukin-1-Rezeptor II eine Rolle. Die CANDIS-Region ist für die Substraterkennung der Klasse der Typ 2 Transmembranproteine, wozu beispielsweise TNF- α zählt, jedoch nicht relevant (Düsterhöft *et al.* 2014).

Eine andere Studie zeigt eine Rolle der nicht katalytischen Domänen von ADAM17 und der Sekundärstruktur seiner Substrate für die Substraterkennung. Fluoreszierendes Substrat, welches auf der Schneidesequenz von TNF- α beruhte und verschiedene verkürzte ADAM17 Varianten kamen zum Einsatz. Die nicht katalytischen Domänen sollten entscheidend zur Substraterkennung beitragen und die Form und Größe einer Kohlenhydratbindestelle in der katalytischen Domäne beeinflussen. Durch eine α -helikale

Sekundärstruktur des Substrats kam es zudem zu einer verminderten Aktivität von ADAM17. Hauptsächlich verantwortlich sollte dafür eine Veränderung in den Peptid-Bindewinkeln sein (Stawikowska *et al.* 2013).

Die Transmembrandomäne steht im Zentrum von dieser Arbeit. Lange Zeit wurde als ihre Hauptfunktion nur die Verankerung der Protease in der Zellmembran angenommen. Neuere Ergebnisse weisen der Transmembrandomäne allerdings eine Schlüsselrolle bei der Substraterkennung und bei der Regulation des *Shedding*-Prozesses zu (Li *et al.* 2007, 2017).

Die Zytoplasmatischen-Domänen der verschiedenen ADAMs weisen erhebliche Unterschiede in ihrer Länge und Sequenz auf. Viele ADAMs, im Besonderen ADAM17, weisen das PXXP-Motiv auf, das eine mögliche Bindestelle für Proteine mit einer SH3-Domäne darstellt. Des Weiteren sind durch das Vorhandensein von Serin- und Threonin-Resten mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen für diverse Kinasen vorhanden. Dadurch werden der Zytoplasmatischen-Domäne einige mögliche Funktionen zugesprochen. Eine Beteiligung an der Regulation und auch an dem intrazellulären Transport und subsequent der zellulären Lokalisation werden diskutiert (Seals & Courtneidge 2003; Edwards *et al.* 2009).

In dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, die für murine Proteasen codieren. Vergleicht man mittels *Clone Manager 9* die Sequenz von ADAM17 der Maus mit der des Menschen, ist eine über 99%ige Homologie festzustellen. Vor allem im Bereich der Transmembrandomäne von ADAM10 und -17 liegt eine 100%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz beider Spezies vor.

2.1.2 Physiologische Relevanz von ADAM17

Bekanntheit erlangte ADAM17 als *Tumor necrosis factor- α -converting enzyme* (TACE) durch seine Fähigkeit TNF- α freizusetzen (Black *et al.* 1997). TNF- α ist an der Pathogenese vieler entzündlicher Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen entscheidend beteiligt (Zelová & Hošek 2013).

Die physiologische Relevanz der Proteasen wird durch *Knockout*-Experimente im Maus-Modell besonders deutlich. ADAM10-*Knockout*-Mäuse sterben neuneinhalb Tage nach Konzeption intrauterin. Schwerwiegende Missbildungen sind im Bereich des Nervensystems, der Somiten und im kardiovaskulären System zu finden (Hartmann *et al.* 2002). Für ADAM10 wird zudem angenommen, dass diese Protease eine protektive Rolle für den Morbus Alzheimer innehält, indem es das *Amyloid Precursor Protein* (APP) als Alpha-Sekretase schneidet (Saftig & Lichtenthaler 2015). ADAM17-*Knockout*-Mäuse sterben entweder ebenfalls intrauterin, meist 17,5 Tage nach Konzeption, oder kurz nach der Geburt. Die *Knockout*-Tiere ähneln dem Phänotyp der Tiere, welchen der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) oder dessen Liganden, wie der *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α) oder der *Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor* (HB-EGF), fehlen. Diese zeichnen sich ebenfalls durch schwerwiegende Entwicklungsdefizite im Bereich des Herzens, der Haut und den Augen aus (Peschon *et al.* 1998; Jackson *et al.* 2003).

Anhand von *Knockout*-Mäusen konnten weitere interessante Beobachtungen gemacht werden. Fehlt nur den myeloiden Zellen der Maus funktionelles ADAM17, sind diese vor einem LPS-induzierten Endotoxinschock geschützt. Dies führen die Autoren darauf zurück, dass die *Knockout*-Mäuse eine niedrigere TNF- α Serumkonzentration als die Wildtyp-Mäuse aufwiesen (Horiuchi *et al.* 2007a). Neben der Beobachtung, dass ADAM17 durch die Freisetzung von TNF- α eine proinflammatorische Wirkung vermittelt, zeigen andere Arbeiten die wesentliche Rolle von ADAM17 für die Regeneration während der Immunantwort. Mäuse, die nur etwa 5 % von ADAM17 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen exprimieren, sind lebensfähig. Sie zeigen jedoch ein reduziertes *Shedding* von ADAM17 Substraten und einen veränderten Phänotyp. Durch die Störung des EGFR Signalweges kommt es zu Defekten an den Augen, dem Herzen und der Haut. Obwohl sich der Gastrointestinaltrakt dieser Mäuse als unauffällig präsentiert, sind diese wesentlich anfälliger für Entzündung in Form einer durch *Dextran Sulfate Sodium*-induzierten Kolitis. Dies führen die Autoren auf das fehlende *Shedding* der EGFR-Liganden zurück und eine damit verbundene fehlerhafte Regeneration des Epithels und der epithelialen Barriere (Chalaris *et al.* 2010).

Die EGFR-Liganden werden als membrangebundene Vorläuferproteine hergestellt und durch eine proteolytische Spaltung in den Extrazellulärraum freigesetzt. Diese Spaltprodukte können dann Rezeptoren auf der gleichen Zelle (autokrine Aktivierung) oder auf benachbarten Zellen (parakrine Aktivierung) aktivieren und so diverse Signalkaskaden vermitteln. Da viele Rezeptoren ebenfalls von ADAMs prozessiert werden, wird neben der Signalerzeugung auch die Signalerkennung wesentlich gesteuert. Dies kann zum einen die Signalempfänglichkeit herabsetzen oder aber eine Aktivierung des Signalweges begünstigen. Ein Beispiel für eine Erkrankung, welche durch mangelnden Rezeptorabbau entsteht, ist das Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) - assoziierte periodische Syndrom. Der TNFR1 ist bei diesen Patienten mutiert und kann nur vermindert oder gar nicht proteolytisch herunterreguliert werden. Die folgende Akkumulation des Rezeptors führt zu einer erhöhten Empfänglichkeit für seinen Liganden TNF- α und so zu rekurreierenden Fieberschüben (McDermott *et al.* 1999; Blobel 2005). Im Falle des Interleukin-6-Rezeptors kann ebenfalls eine Signalsteigerung vorliegen. Der lösliche Rezeptor bleibt hier in der Lage seinen Liganden zu binden und kann dann als Rezeptor-Ligand-Komplex Zellen aktivieren, die den Rezeptor selbst nicht exprimieren. Dieser Vorgang wird als *trans-signalling* bezeichnet (Rose-John *et al.* 1993).

Der Signalweg des *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR) kann dagegen in seiner Signalantwort herabgesetzt werden (Swendeman *et al.* 2008).

Bemerkenswerterweise wurden in den letzten Jahren die ersten Patienten entdeckt, die über kein funktionelles ADAM17 verfügen. Die Symptomatik besteht in Läsionen an Haut, Haaren und Nägeln. Weitere Symptome sind Verdauungsstörungen, rezidivierende Infektionen und Herzmuskelentzündungen. Dies zeigt einerseits, wie wichtig ADAM17 für den gesamten Organismus ist. Andererseits legt die grundsätzliche Lebensfähigkeit der Menschen ohne ADAM17 einen Kompensationsmechanismus nahe (Blaydon *et al.* 2011; Bandsma *et al.* 2015). Tabelle 2 zeigt eine Auswahl von Erkrankungen, bei denen eine gesteigerte Expression von ADAM17 festgestellt werden konnte.

Tabelle 2: Mit ADAM17 assoziierte Krankheitsbilder

Entzündlich	Rheumatoide Arthritis	(Ohta <i>et al.</i> 2001)
	Multiple Sklerose	(Seifert <i>et al.</i> 2002)
	Psoriasis	(Kawaguchi <i>et al.</i> 2005)
	Morbus Crohn	(Cesaro <i>et al.</i> 2009)
Neoplastisch	Prostata	(Karan <i>et al.</i> 2003)
	Niere	(Roemer <i>et al.</i> 2004)
	Brust	(Lendeckel <i>et al.</i> 2005)
	Kolon	(Blanchot-Jossic <i>et al.</i> 2005)
	Lunge	(Zhou <i>et al.</i> 2006)
	Pankreas	(Ringel <i>et al.</i> 2006)

ADAMs könnten infolgedessen ein wichtiger potenzieller Angriffspunkt für mögliche Therapien sein. Allerdings gilt es zu beachten, dass ADAMs nicht nur pro-inflammatorische sondern auch regenerative Prozesse steuern (Seals & Courtneidge 2003). Breitspektrum-Metalloprotease-Inhibitoren haben seither in klinischen Studien versagt (Murumkar *et al.* 2010). Ein genaueres Verständnis ihrer Regulation ist folglich die Grundvoraussetzung, um sich ihre zentrale Rolle zu Nutze zu machen.

2.1.3 Regulation der Proteasen

Die Regulation der ADAMs ist Gegenstand aktueller Forschung und findet auf mehreren Stufen statt.

Schon auf Gen-Ebene während der Transkription finden die ersten Regulationsmechanismen statt. So kann die Expression von ADAM17 während einer inflammatorischen Antwort gesteigert werden (Hurtado *et al.* 2002). Für ADAM10 wurde gezeigt, dass alternatives Spleißen ebenfalls eine Rolle bei der Regulation spielt (Yavari *et al.* 1998).

Darüber hinaus liegen die Proteasen hinsichtlich ihrer Aktivität in zwei Zuständen vor. Einerseits befinden sie sich im Zustand der konstitutiven Aktivität, welche Zelltyp- und substratspezifisch eine gewisse Aktivität und somit Freisetzung der Ektodomänen der

Substrate über die Zeit entspricht. Andererseits ist es möglich, das *Shedding* durch zugefügte Stimulanzen zu induzieren.

Es kann zwischen physiologischen und unphysiologischen Stimulanzen unterschieden werden. Physiologische Stimulanzen sind Thrombin, Lysophosphatidsäure, EGF, Adenosintriphosphat (ATP) und TNF- α (Le Gall *et al.* 2010). Zu den in der Wissenschaft häufig eingesetzten unphysiologischen Stimulanzen zählt zum Beispiel der Phorbolster Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und das Calcium-Ionophor Ionomycin. Über welche Signalwege diese Stimulanzen wirken, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Proteinkinase C hat aber einen wesentlichen Einfluss auf die PMA-induzierte Aktivierung. Der durch Ionomycin hervorgerufene Ca^{2+} -Einstrom ins Zytoplasma induziert die Aktivität vieler ADAMs (Huovila *et al.* 2005; Horiuchi *et al.* 2007b). Dieser Einstrom von Ca^{2+} kann entweder von extrazellulär erfolgen oder durch die Entleerung von intrazellulären Speichern stattfinden. Den Einstrom aus dem Extrazellulärraum vermitteln Ionenkanäle, wie der ATP-abhängige P2X7 Rezeptor (Sommer *et al.* 2012; Pupovac *et al.* 2013; Bartlett *et al.* 2014). Aus intrazellulären Speichern wird Ca^{2+} häufig aufgrund der Aktivierung von Gq/11-gekoppelten Signalwegen freigesetzt, beispielsweise durch die Thrombin ausgelöste Protease-aktivierter Rezeptor-1 Aktivierung (Hirano & Kanaide 2002; Schulz *et al.* 2008).

Die durch die ADAM-Stimulanzen aktivierten intrazellulären Signalwege sind sehr vielfältig. Die Aktivierung von Kinasen und die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sind häufig mit einer vermehrten Reifung und Zelloberflächenexpression von ADAM17 assoziiert (Soond *et al.* 2005).

Für einige Mitglieder der EGF-Familie führt der Einsatz verschiedener Stimulanzen und die Aktivierung entsprechender Signalkaskaden zudem eine Substratspezifität herbei. Phorbolster und auch die Angiotensin II-induzierte EGF-Liganden Freisetzung steigerte die katalytische Aktivität von ADAM17 nicht. Die Stimulanzen führten vielmehr zu einer Aktivierung der Proteinkinase C- α und dem Proteinkinase C regulierten Mediator Protein Phosphatase 1 Inhibitor 14D wovon die TPA-stimulierte Freisetzung von TGF- α , HB-EGF und Amphiregulin durch ADAM17 in MDA-MB-231 Brustkrebszellen abhängig war. Dabei könnten die Signalwege ihren Einfluss auf die Substratfreisetzung direkt oder

indirekt über weitere Proteine geltend gemacht haben. Für die TPA-induzierte Freisetzung von Neuregulin war die Proteinkinase C-delta und die damit einhergehende Phosphorylierung des Serin286 in der zytoplasmatischen Domäne dieses Substrats von entscheidender Bedeutung, nicht aber die Proteinkinase C-alpha oder der Mediator Protein Phosphatase 1 Inhibitor 14D. Zusammenfassend zeigt die Studie, dass die Proteinkinase C-alpha, der Protein Phosphatase 1 Inhibitor 14D und die Proteinkinase C-delta die Freisetzung nur bestimmter ADAM17 Substrate beeinflusst, ohne die katalytische Aktivität der Protease zu verändern (Dang *et al.* 2013).

Viele weitere Kinasen sind an der Regulation von ADAM17 beteiligt. Intrazellulär bewirken sie häufig eine Phosphorylierung von ADAM17 an Threonin 735. Zu diesen Kinasen gehören unter anderem die *p38-Mitogenactivated Protein Kinase* (Killock & Ivetic 2010; Xu & Derynck 2010), die Protein Kinase G (Chanthaphavong *et al.* 2012) und die *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1* (Zhang *et al.* 2006). Jedoch scheint diese Phosphorylierung nicht der finale Schlüsselmechanismus für die Aktivierung von ADAM17 zu sein. Insbesondere weil mehrere Arbeiten zeigen, dass ADAM17 auch ohne die Zytoplasmatische-Domäne verschiedene Substrate schneiden kann (Reddy *et al.* 2000; Fan *et al.* 2003; Li & Fan 2004). Für lange Zeit war daher nicht klar, wie die verschiedenen Kinasen oder die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur finalen Aktivierung des ADAM vermittelten *Sheddings* beitragen.

Sommer und Kollegen ist es jedoch gelungen, den schlussendlich gemeinsamen Aktivierungsmechanismus von ADAM17 zu adressieren. Dabei ist das Zellmembranlipid Phosphatidylserin (PS) wesentlich beteiligt. Durch die Externalisierung des in seiner Gesamtheit einfach negativ geladenen PS wird vermutlich eine Interaktion mit der positiv geladenen Bindungsstelle von ADAM17 (625-RKGK-628) ermöglicht und die Protease final aktiviert. In der Studie korrelierte die Externalisierung von PS eng mit der Ektodomänen-Freisetzung unter Verwendung verschiedener ADAM17-Stimulanzen in verschiedenen Zelllinien. Lösliches PS verhinderte das *Shedding*, während lösliches Phosphatidylcholin (PC) keinen Effekt hatte. Dementsprechend band die isolierte MPD von ADAM17 an PS-Liposomen, nicht jedoch an PC-Liposomen (Sommer *et al.* 2016). Die CANDIS-Region, welche über eine amphipathische Helix verfügt, vermittelt zudem die Insertion von ADAM17 in die Plasmamembran. Dieser Vorgang stellt ebenfalls eine

Grundvoraussetzung für den *Shedding*-Prozess dar (Düsterhöft *et al.* 2015). Die Insertion der CANDIS-Region in die Plasmamembran und die Interaktion der positiv geladenen Bindungsstelle von ADAM17 und PS könnten sich synergistisch ergänzen.

Neben den oben genannten Mechanismen haben Reiß und Bhakdi mögliche weitere Regulationsmechanismen diskutiert. Die Plasmamembran mit ihren einzigartigen dynamischen Eigenschaften könnte ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Proteasen spielen. Die Anwesenheit einer proteolytisch aktiven Domäne an der Zelloberfläche gegenüber dem Vorhandensein von *Shedding* durch ADAMs sollte differenziert werden, da letzteres nur stattfindet, wenn sich die Protease und das Substrat in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dies könnte durch horizontale und vertikale Reorganisation der Nanoarchitektur der Plasmamembran erreicht werden. Die Neuorganisation der Nanodomäne könnte so eine Annäherung des Substrats und der Protease bewirken. Die Externalisierung von PS ist schlussendlich notwendig, damit das *Shedding* stattfinden kann (Sommer *et al.* 2016; Reiss & Bhakdi 2017).

Die Organisation der Plasmamembran in hochstrukturierte Kompartimente ist heute verbreitet anerkannt. Dadurch wird es Proteinen und Lipiden ermöglicht sich in spezifischen Regionen mit unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung zu organisieren (Maxfield 2002; Kusumi *et al.* 2011; Nicolson 2013). Eine der kleinsten Organisationseinheiten solcher spezifischen Regionen sind die so genannten Nanodomänen. Nanodomänen stellen eine Plattform für die temporäre Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen dar und vermitteln dadurch beispielsweise die Unterstützung von Zelladhäsion, Pathogen-Bindung und Zell-Zell-Interaktion von Immunzellen (Garcia-Parajo *et al.* 2014). Auch für die Interaktion zwischen ADAM17 und seiner Substrate auf der Zelloberfläche sollte berücksichtigt werden, dass diese möglicherweise ebenfalls wesentlich von der Formation von Nanodomänen abhängig sein könnte. Gut vorstellbar ist, dass das durch die Protease vermittelte *Shedding* besonders innerhalb solcher Nanodomänen stattfindet. Die Substratspezifität könnte dadurch ebenfalls wesentlich beeinflusst werden (Reiss & Bhakdi 2017).

Die PS-Externalisierung wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß zudem näher untersucht. Anoctamin 6 (ANO6), auch unter dem Namen TMEM16F bekannt, ist ein Protein, welches Ca^{2+} -abhängig PS externalisiert und eine Schlüsselrolle in der finalen

Aktivierung von ADAM17 innehalten könnte. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass eine ANO6 Überexpression in HEK293T Zellen zu einer verstärkten Ca^{2+} -abhängigen Phospholipid-Externalisierung führte, die von einer vermehrten Freisetzung von Amphiregulin (AREG) und TGF- α begleitet war. Dieser Effekt wurde nicht beobachtet, wenn die Zellen mit dem PKC-abhängigen ADAM17 Stimulus PMA stimuliert wurden. Die Transfektion einer konstitutiv aktiven Variante von ANO6 führte in Abwesenheit von jeglichen Stimulanzen zur spontanen PS-Externalisierung und einer vermehrten Freisetzung von ADAM17 Substraten. Durch die verwendeten Inhibitoren konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die durch ANO6 verstärkte Substratfreisetzung von einer Rekrutierung weiterer Metalloproteasen begleitet war. Die verminderte Expression von ANO6 durch siRNA führte zudem zu einer verminderten Substratfreisetzung. Die Scramblaseaktivität von ANO6 könnte somit eine wichtige Rolle für die Regulation des gesamten ADAM-Netzwerks spielen (Veit *et al.* 2018).

Für das Verständnis der Regulation der Proteasen ist nicht nur deren konstitutive und induzierbare Aktivität, sondern auch deren Blockierung in Versuchen ein wesentliches Hilfsmittel. Dazu werden sowohl physiologische als auch unphysiologische Inhibitoren herangezogen. *Tissue Inhibitor of Metalloproteases 3* ist ein physiologischer Inhibitor von ADAM17 (Amour *et al.* 1998). Ein klassischer synthetisch hergestellter Metalloprotease-Inhibitor ist Marimastat (MM) (Wisniewska *et al.* 2008).

Für die isolierte MPD von ADAM17 wurde gezeigt, dass die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) einen wesentlichen Einfluss auf die Konformation von ADAM17 hat. Die PDI bewirkt eine Isomerisierung der Thio-redoxinmotive (CxxC) in der Disintegrin- und der EGF-ähnlichen-Domäne, sodass die Protease in eine geschlossene Konformation, welche enzymatisch weniger aktiv ist, überführt wird. Diese Änderung der Konformation könnte auch *in vivo* wesentlich zur Regulation von ADAM17 beitragen (Düsterhöft *et al.* 2013). PMA wirkt dieser Inaktivierung entgegen. Durch PMA werden reaktive Substanzen aus den Mitochondrien freigesetzt, welche die PDI durch Oxidation inaktivieren (Willems *et al.* 2010). Dadurch könnte ADAM17 vermehrt in der offenen und aktiven Konformation vorliegen.

Auch der sekundäre Messenger *Ceramide 1-phosphate*, ein Produkt der Ceramidkinase, kann mit ADAM17 in Interaktion treten und seine Funktion durch einen bislang nicht geklärten Mechanismus inhibieren (Lamour *et al.* 2011).

Reifes ADAM17 setzt auf der Zelloberfläche die jeweiligen Substrate frei. Für ADAM10 und -17 wurde gezeigt, dass ein Großteil der Proteine auch in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist, dies entspricht teilweise der Verteilung der Substrate (Schlöndorff *et al.* 2000; Gutwein *et al.* 2003). Auch in intrazellulären Kompartimenten könnte *Shedding* stattfinden. Noch nicht endgültig geklärt ist, wie der Transport der Proteine zur Zelloberfläche reguliert wird (Skovronsky *et al.* 2000; Evans *et al.* 2011).

Ein wesentlicher Zwischenschritt, der entscheidend am Transport und damit der Regulation von ADAM17 beteiligt ist, konnte jedoch bereits geklärt werden. Dieser besteht in dem Export der Protease durch *inactive Rhomboids* (iRhoms) aus dem endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Ohne iRhom2, einem proteolytisch inaktiven Mitglied der iRhom-Familie, bleibt in Mäusen die Freisetzung von TNF- α aus. Dies führt die Arbeitsgruppe auf eine fehlende Translokation von ADAM17 und die zusätzlich fehlende Reifung der Protease durch Ausbleiben der Aktivierung durch die Furine zurück. Durch Immunpräzipitation konnte für die Interaktion zwischen iRhom2 und ADAM17 gezeigt werden, dass diese mit hoher Spezifität und wahrscheinlich direkt zwischen beiden Proteinen stattfindet. iRhom2 ist besonders in Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, von Bedeutung (Adrain *et al.* 2012). Ein anderes wichtiges Mitglied der iRhom-Familie ist iRhom1, welches entscheidend für den Transport von ADAM17 in Nicht-Immunzellen ist. Doppel-*Knockout*-Mäuse für iRhom1 und iRhom2 zeigen weder eine ADAM17 Reifung noch eine proteolytische Aktivität. Darüber hinaus zeigen sie einen schwerwiegenderen Phänotyp als ADAM17 *Knockout*-Mäuse (Christova *et al.* 2013; Li *et al.* 2015). Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe sprechen dafür, dass iRhom2 partiell auch an der Substratspezifität von ADAM17 beteiligt ist. iRhom2 murine embryonale *Knockout*-Fibroblasten verfügen zwar über reifes ADAM17, trotzdem kann unter PMA-stimulierten Bedingungen kein *Shedding* mancher Substrate, wie HB-EGF und Kit Ligand 2, beobachtet werden. Für andere Substrate, beispielsweise TGF- α , sind keine relevanten Veränderungen zu beobachten (Maretzky *et al.* 2013).

Neben den oben genannten Mechanismen ist das *Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein 2* (PACS-2) entscheidend an der Regulation von ADAM17 und damit des ErbB-Signallings beteiligt. ADAM17 aktiviert durch eine Freisetzung seiner Liganden von der Zelloberfläche den ErbB-Signalweg, welcher entscheidend für die epitheliale Entwicklung, das Wachstum und die Tumorprogression ist. Ein Genom weites siRNA-Screening lieferte entscheidende Hinweise. Der Verlust von PACS-2 führt zu einer verminderten Expression von ADAM17 und zu einer geringeren Freisetzung von ADAM17 Substraten ohne eine erkennbare Beeinträchtigung verwandter Proteasen. PACS-2 ist mit ADAM17 in frühen Endosomen kolokalisiert und ein PACS-2-Knockdown verringert das Recycling und die Stabilität von internalisiertem ADAM17. Daher erhält PACS-2 die ADAM17-Aktivität an der Zelloberfläche, indem es die Protease vor dem Abbau bewahrt. PACS-2 bindet häufig an saure Motive in seinen zu transportierenden Proteinen. Obwohl solch eine Sequenz in dem zytoplasmatischen Ende von ADAM17 nicht zu finden ist, zeigten verschiedene Immunoprecipitations-Experimente, dass ADAM17 und PACS-2 unter nicht stimulierten Bedingungen miteinander interagieren. Da PACS-2 seine zu transportierenden Proteine auch über andere Motive binden kann, lässt sich auf eine indirekte Interaktion von PACS-2 und ADAM17 schließen. Während eine Regulation sowohl für ADAM17 als auch dessen Substrat durch den ADAM17-Regulator iRhom2 naheliegend ist, gibt es keinerlei Hinweise, dass dies auch der Fall für PACS-2 sein könnte. (Dombernowsky *et al.* 2015).

Abschließend lässt sich festhalten, dass es sich um sehr komplexe Regulationsmechanismen von ADAM17 handelt und diese möglicherweise zelltyp- und stimulus-abhängig variieren könnten.

2.2 Die Plasmamembran

Die Plasmamembran dient zur Abgrenzung der einzelnen Zellen untereinander und macht das Überleben der Zelle erst möglich. Darüber hinaus erfüllt sie vielfältige Funktionen. Das Gleichgewicht zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum wird durch einen kontrollierten Stofftransport gewährleistet. Durch die verschiedenen mit der Plasmamembran assoziierten Strukturen können Signale aufgenommen, weitergeleitet oder auch ausgesendet werden. Die Interaktionen sowie die Bewegung von Zellen werden durch die Plasmamembran vermittelt und ermöglichen letztlich die Bildung von

Geweben und Organen. Die Zellmembran besteht aus einer etwa 5nm dicken Doppelschicht aus amphipathischen Lipiden. Die hydrophilen Kopfgruppen weisen zum Extra- und Intrazellulärraum, während die lipophilen Kohlenwasserstoffschwänze die innere hydrophobe Zone der Lipiddoppelschicht bilden. Den Lipiden ist es möglich, innerhalb der Membran zu diffundieren, dies wird auch als Fluidität der Biomembran bezeichnet. Singer und Nicolson beschreiben die Biomembran als Flüssig-Mosaik-Modell. Neben den verschiedenen Lipiden sind je nach Zell- und Membrantyp auch viele Proteine und Kohlenhydrate mit der Membran assoziiert, welche ebenfalls in der Membran beweglich sind (Singer & Nicolson 1972; van Meer *et al.* 2008; Nicolson 2013; Goñi 2014).

In der Plasmamembran sind verschiedene Lipidgruppen zu unterscheiden. Phospholipide sind hier von besonderer Relevanz. Sie werden anhand ihres Grundgerüsts in zwei weitere Gruppen unterteilt. Beide Gruppen sind amphipatisch aufgebaut. Phosphoglycerolipide bilden die erste Gruppe. Glycerin stellt ihr Grundgerüst dar. Das Glycerin ist am zweiten und dritten C-Atom mit je einer Fettsäure verestert. Am ersten C-Atom wird ein Alkohol mit einer Phosphodiesterbindung gebunden. Vier wichtige Membranlipide sind PC, auch Lecithin genannt, Phosphatidylethanolamin (PE), PS und Phosphatidylinositol. Phosphosphingolipide bilden die zweite Gruppe. Ceramide stellen ihr gemeinsames Grundgerüst dar. Ceramide sind aus Sphingosin aufgebaut, das an einer Aminogruppe mit einer Fettsäure amidartig verknüpft ist. Das mengenmäßig wichtigste Phosphosphingolipid ist das Spingomyelin. Von den Phosphosphingolipiden abgeleitet werden die Glycosphingolipide. Ganglioside sind beispielsweise Vertreter dieser Gruppe (Rothman & Lenard 1977; Higgins & Evans 1978; van Meer *et al.* 2008).

Die hydrophoben Bestandteile der Membran werden durch Van-der-Waals-Kräfte und durch den hydrophoben Effekt zusammengehalten. Sterik und Ladung der Kopfgruppen beeinflussen die Zusammensetzung der Zellmembran ebenfalls. Cholesterin ist ein weiterer wichtiger Membranbestandteil. Cholesterin kann auf die Fluidität der Membran, je nach grundlegender Organisation, entgegengesetzt wirken. So erhöht Cholesterin die Fluidität semikristalliner, eng gepackter Membranen. Flüssige Membranen mit einem hohen Gehalt an ungesättigten Lipiden werden hingegen verfestigt (Ohvo-Rekilä *et al.* 2002; van Meer *et al.* 2008; Nicolson 2013).

Spezielle Bereiche der Plasmamembran sind *Lipid Rafts*. Ceramide stellen in *Lipid Rafts* einen wichtigen Bestandteil dar und interagieren vordergründig mit Phospholipiden. Durch Verdrängung anderer Lipide wird die Plasmamembran umorganisiert. Proteine, die in *Lipid Rafts* verankert sind, unterliegen deren Bewegungen innerhalb der Plasmamembran. Da die ceramidreichen Domänen auch untereinander bestrebt sind, sich zusammen zu lagern, sammeln sich die von ihnen getragenen Proteine in *Clustern*. Dadurch könnten Signalwege entscheidend beeinflusst werden. Durch das Protein Caveolin können die *Lipid Rafts* weiter zu Caveolae umorganisiert werden. Strukturell handelt es sich um Einbuchtungen der Membran, die an endozytotischen und auch an signal-übertragenden Prozessen beteiligt sind (Simons & Ikonen 1997; Gulbins & Li 2006).

Die Bausteine der Zellmembran sind keineswegs symmetrisch in der inneren und äußeren Membranschicht verteilt. PC und SM finden sich verstärkt auf der extrazellulären Seite der Doppellipidschicht der Plasmamembran. PS und PE befinden sich hingegen vorwiegend auf der inneren Seite (Rothman & Lenard 1977; Higgins & Evans 1978).

Die Aufrechterhaltung dieser Asymmetrie hat wesentliche Bedeutung für die Funktion der Plasmamembran. Wird die Asymmetrie gestört, hat dies Auswirkungen auf die Aktivität der Zelle. Die Asymmetrie der Plasmamembran wird primär durch eine selektive Lipidsynthese auf der jeweiligen Membranseite aufgebaut. Durch den langsamen passiven Vorgang der Diffusion können Lipide innerhalb der Membran ihre Lokalisation verändern. Eine schnelle Translokation bewirken hingegen unter anderem Scramblasen und auch ATP-abhängige *Flippasen* und *Floppasen*. Diese können jeweils die Asymmetrie aufrechterhalten oder auch aufheben. *Flippasen* sind für PE und PS spezifische Transporter und transportieren die Lipide gegen ihren Konzentrationsgradienten auf die Innenseite der Membran. *Floppasen* sind unspezifische und etwa zehn Mal langsamere Transporter als *Flippasen*. Sie transportieren die Lipide auf die äußere Membranschicht. Scramblasen können Lipide hingegen zwischen beiden Seiten der Doppellipidschicht entlang ihres Konzentrationsgradienten translozieren. Dadurch können Scramblasen auch einen schnellen Aufbruch der Membranasymmetrie bewirken. Besonders effektiv ist dieser Vorgang, da manche Scramblasen durch die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert und die *Flippasen* gehemmt

werden (Bitbol *et al.* 1987; Daleke 2003, 2007; Balasubramanian *et al.* 2007; Bevers & Williamson 2010).

2.3 Die Rolle der Transmembrandomäne für das *Shedding*

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Funktion der Transmembrandomäne von ADAM17 und seiner Substrate. Lange wurde die Transmembrandomäne als schlicht membranverankernde Domäne angesehen, jedoch weisen einige neuere Veröffentlichungen auf eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Signalwegen hin.

Strukturell handelt es sich um eine etwa 21 Aminosäuren umfassende α -Helix. Fehlt ADAM17 diese Domäne, sodass es sich um ein lösliches Protein handelt, können keine membrangebundenen Substrate mehr prozessiert werden (Itai *et al.* 2001). Zudem wurde gezeigt, dass die reine Verankerung durch eine C-terminale Glycophosphatidylinositol-Verankerung der Protease auf der Zellmembran nicht ausreicht, um ein *Shedding* von TGF- α , TNF- α oder L-Selektin zu beobachten. Durch weitere Mutagenese-Versuche, in denen die Transmembrandomäne von ADAM17 durch verschiedene Transmembrandomänen von anderen Proteinen ausgetauscht wurde, ergaben sich Hinweise, dass die Aminosäuresequenz selbst eine wesentliche Rolle für die Substratspezifität aufweisen könnte. Die Freisetzung von TGF- α wurde durch die untersuchten ADAM17 Mutanten schwer beeinträchtigt, während die von TNF- α und L-Selektin unbeeinflusst blieb (Li *et al.* 2007). Andere Studien haben versucht die Rolle der Domänen für das PMA-stimulierte TGF- α *Shedding*, durch die Erzeugung von ADAM10 und -17 Chimären und deren Vergleich in *Shedding*-Experimenten in ADAM17^{-/-} Fibroblasten näher zu erklären. Sie beobachteten, dass das konstitutive und auch das PMA-stimulierte TGF- α *Shedding* durch Chimären, in denen die Transmembrandomäne und die Zytoplasmatische-Domäne von ADAM17 durch die entsprechenden Domänen von ADAM10 ersetzt wurden, dem des Wildtyp-ADAM17 (ADAM17 WT) ähnelten. Wurden Teile der Ektodomäne getauscht, konnte nur eine geringe, dem des ADAM10 ähnelnde, TGF- α Freisetzung beobachtet werden. Der Verlust der Zytoplasmatischen-Domäne von ADAM17 führte zu einer etwa fünfzigprozentigen Reduktion des *Sheddings* verglichen zum ADAM17 WT. Es wurde vermutet, dass bei einer PMA-Stimulation eine intakte Ektodomäne von ADAM17 benötigt wird. Die Transmembran- oder

Zytoplasmatischedomäne sei hingegen nicht relevant (Horiuchi *et al.* 2007b). Die schnelle und reversible Aktivierung von ADAM17 durch verschiedene physiologische Stimulanzen ist hingegen nicht ohne seine Transmembrandomäne möglich. Wird die Transmembrandomäne von ADAM17 durch die Transmembrandomäne des ADAM17 Substrats CD62L oder gegen die des ADAM10 Substrats Betacellulin ausgetauscht, reagieren diese Mutanten nicht mehr auf physiologische ADAM17-Stimulanzen (Le Gall *et al.* 2010). Neben den chimären Proteasen wurden Versuche zu chimären Substraten durchgeführt. Horiuchi und Kollegen haben das *Shedding* von TGF- α Chimären bezüglich der PMA-Stimulierbarkeit untersucht. Die Chimären bestanden jeweils aus TGF- α und verschiedenen Domänen von EGF oder Betacellulin. Diese wurden zusammen mit ADAM17 in ADAM17^{-/-} Fibroblasten koexprimiert. Dabei stellten die Arbeitsgruppe fest, dass vor allem die Schnittstelle von TGF- α entscheidend für dessen konstitutive und auch stimulierte Freisetzung durch ADAM17 ist. Li und Kollegen beobachteten, dass TGF- α , welches über die Transmembrandomäne von L-Selektin verfügt, von ADAM17 Chimären, die über die Transmembrandomäne des Prolaktin Rezeptors oder der des *platelet-derived growth factor* Rezeptors verfügten, freigesetzt werden konnte (Horiuchi *et al.* 2007b; Li *et al.* 2007). Diese Ergebnisse stellen die Rolle der Transmembrandomänen für das *Shedding* ansatzweise dar. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine möglicherweise innerhalb der Zellmembran stattfindende Interaktion von der Protease und seinem Substrat. Diese könnte von der Aminosäuresequenz selbst abhängig sein. Für Proteine, die unter anderem den Transport von ADAM17 regulieren, wurde zudem eine wichtige Rolle der beteiligten Transmembrandomänen gezeigt. Eine I387F Mutation in der ersten Transmembrandomäne von iRhom2 führte zu einer geringeren TNF- α Freisetzung in Makrophagen, während die Interleukin-6 Freisetzung unbeeinträchtigt blieb (Siggs *et al.* 2012). Eine Interaktion der ersten Transmembrandomäne von iRhom2 und der Transmembrandomäne von ADAM17 könnte für das *Shedding* von TNF- α wichtig sein. Die Punktmutation I387F von iRhom2 könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Deutlich wird das durch einen sehr ähnlichen Phänotyp von Mäusen mit der Punktmutation und dem vollständigen *Knockout* von iRhom2, wenn je parallel dazu ein iRhom1 *Knockout* vorliegt. iRhom2 soll nicht nur als Chaperon dem Export von ADAM17 aus dem endoplasmatischen Retikulum dienen, sondern auch die Regulation von ADAM17 auf der Zelloberfläche wesentlich beeinflussen. Um die Interaktion von iRhom2 und ADAM17

näher zu untersuchen hat die Arbeitsgruppe verschiedene ADAM17 Mutanten erzeugt und diese in ADAM17 murine embryonale *Knockout*-Fibroblasten retransfiziert. Dabei beobachteten sie, dass die verschiedenen Mutationen innerhalb der ADAM17 Transmembrandomäne sowohl für PMA-stimulierte als auch konstitutive Bedingungen teilweise positive und teilweise negative Auswirkungen auf das *Shedding* der untersuchten Substrate hatte. Insgesamt sprechen die Autoren der ADAM17 Transmembrandomäne und ihren einzelnen Aminosäuren eine wichtige Rolle für die Interaktion mit den verschiedenen iRhoms zu (Li *et al.* 2017).

Bei Untersuchungen zur Zusammensetzung von *Lipid Rafts* wurde festgestellt, dass die aromatischen Reste von Aminosäuren der Transmembrandomänen in eine direkte Interaktion mit Cholesterin treten können (Taïeb *et al.* 2004). Die Rolle der aromatischen Aminosäuren der Transmembrandomäne von ADAM17 wurde zuvor von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß untersucht. Bei der Beobachtung des TGF- α *Sheddings* wurde gezeigt, dass je mehr aromatische Reste zu denen des Alanins getauscht wurden, desto geringer war die Menge an freigesetzten TGF- α -Ektodomänen (Evers 2013).

Ein weiterer Mechanismus, welcher für die Protein-Interaktion innerhalb der Plasmamembran von Bedeutung ist, ist ein Helixbruch. Dieser kann zum Beispiel durch ein Prolin in der Peptid-Sequenz verursacht werden. Beschrieben wurde dieser Mechanismus für das *Shedding* eines membrangebundenen Substrats der *Site-2*-Protease (Ye *et al.* 2000). Die Rolle des Prolins in der ADAM17-Transmembrandomäne konnte durch vorherige Arbeit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß nicht endgültig benannt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass der Austausch zu Alanin die TGF- α -*Shedding*-Rate unter konstitutiven und unter PMA-stimulierten Bedingungen erhöht hat (Evers 2013).

Durch eine Interaktion der ADAM17 mit weiteren membrangebundenen Proteinen könnte eine Regulation stattfinden. So seien Mitglieder der Annexin-Protein Familie wichtig für das *Shedding* von *pro*-Amphiregulin durch ADAM17 (Nakayama *et al.* 2012).

Die Transmembrandomäne von ADAM17 spielt sehr wahrscheinlich eine wesentliche Rolle für das *Shedding* und den Lebenszyklus dieser Protease. An mehreren Stellen der

Transmembrandomäne könnte eine Interaktion oder ein regulatorischer Mechanismus stattfinden. Studiert man die Literatur zu Proteinen, deren Transmembrandomänen interagieren, findet man einige Interaktionsmechanismen, die auch für die hier untersuchte Protease von Bedeutung sein könnten und im Anschluss näher erläutert werden.

Berger und Kollegen beschreiben an mehreren Beispielen, wie die Interaktion von Transmembrandomänen einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation von diversen biologischen Funktionen hat. Vermittelt werden die Interaktionen zwischen Proteinen unter anderem durch Motive. Motive sind lineare Aminosäuresequenz-Abfolgen, die zu einer spezifischen Proteinstruktur führen. Diese spezifische Struktur ist häufig Voraussetzung für die Vermittlung funktioneller Gemeinsamkeiten, dabei kann es sich zum Beispiel um die Assoziation verschiedener nicht verwandter Proteine handeln. Um ein Konsensus-Motiv handelt es sich, wenn die Struktur und die Eigenschaften des Motives im Allgemeinen gleich sind, es aber nicht auf Grund der gleichen Aminosäuresequenz entsteht. Systematische Sequenz-Analysen sind häufig die Grundlage für die Entdeckung von Motiven. Dabei wird eine Vielzahl von Sequenzen parallel angeordnet und anhand verschiedener Parameter verglichen. Zudem können bereits gefundene Motive wichtige Anhaltspunkte für die Motivsuche liefern (Berger *et al.* 2009; Björkholm *et al.* 2014).

2009 veröffentlichten Berger und Kollegen zum Beispiel das entscheidende Motiv, welches für die Interaktion der Transmembran-Helices zweier Integrin-Subfamilien (β_1 und β_3) zuständig ist. Hier bildet eine günstige geometrische Anordnung die Grundlage für eine spezifische Interaktion. Die ebenfalls α -helikalen Transmembrandomänen sollen im Ruhezustand als Paar vorliegen und durch Störung der Interaktion aktiviert werden. Im aktivierten Zustand vermitteln sie Zelladhäsion. Nach Untersuchung der Transmembrandomänen konnte ein, in den Subfamilien konserviertes Aminosäure-Motiv, gefunden werden. Durch Ergebnisse von Mutationsversuchen und auf Grund des Vorhandenseins dieses Motivs in nicht verwandten Proteinen, spricht die Arbeitsgruppe dieser Domäne die Schlüsselrolle in der Regulation dieser Integrin Familien zu. Grundlage dieser Interaktion ist die Anordnung der einzelnen, sich in der Größe ergänzenden, Seitenketten der beiden Helix bildenden Aminosäuresequenzen. So treten sich

gegenüberliegenden Helices durch ein sich sterisch ergänzendes Klein-Groß-Motiv in Interaktion (Berger *et al.* 2009).

Eine andere Arbeitsgruppe, die sich auf die Analyse von Motiven spezialisiert hat, gliedert die Interaktionen zwischen *singlepass* Transmembrandomänen in zwei Klassen. Die erste Klasse sei für die Bildung von Multi-Proteinkomplexen zuständig und bewirke relativ statische, energetisch stabile Verbindungen. Die zweite Klasse diene durch Konformationsänderungen durch regulierbare, wechselnde Interaktionen der Signal-Transduktion. Dabei könnten sich die Proteine neu zusammenlagern, sich vertikal verschieben oder rotieren. Die statischen Verbindungen seien zudem wichtig für die korrekte Faltung und den Export aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die meisten einfach die Membran durchspannenden Proteine ordnen ihre Helices parallel an und können so in Interaktion treten. Die verschiedenen Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren bilden die Grundlage für die Proteininteraktionen und führen so auch zu den verschieden aufgebauten Motiven. Ein weiteres Beispiel für eine Interaktion, die auf Grund guter Sterik stattfindet, ist die, des Glycophorin A (GpA). Hierbei komplementiert das kleine Glycin (G) des GxxxG-Motivs durch Bildung einer kleinen Furche die Oberfläche einer zweiten Helix. Stabilisiert wird die Interaktion durch Van-der-Waals-Kräfte und durch schwache Wasserstoffbrückenbindungen. Durch die aromatische Aminosäure Phenylalanin kann die Stabilität des GxxxG-Motivs gesteigert werden. Außerdem ist es für andere Proteine, welche ebenfalls dieses Motiv tragen, möglich, dass die kleinen Aminosäuren Alanin und Serin ein oder beide Glycin Aminosäuren des Motivs ersetzen. Das Serin-Zipper-Motiv ist ebenfalls ein bekanntes Motiv. Serin ist dabei in den Kristallstrukturen der Transmembrandomänen so angeordnet, dass Serin in Abständen von sieben Aminosäuren die Interaktion bewirken kann. Für dieses Motiv ist es denkbar, dass es sowohl parallele als auch antiparallele Interaktionen bewirken kann. Ein Beispiel ist der Erythropoietin Rezeptor. Polare Aminosäuren können die bisher erläuterten Motive verstärken oder selbstständige Motive bilden. Eine Verstärkung wird zum Beispiel für das GxxxG-Motiv des GpAs vermutet. Für die Bildung des aktiven T-Zell-Rezeptor-Komplexes wurde hingegen gezeigt, dass die polaren Aminosäuren Cystein und Asparaginsäure die Assoziation durch die von ihnen geschaffenen polaren Verbindungen, also Cysteinbrücken und Netzwerke aus Wasserstoffbrückenbindungen, maßgeblich tragen.

Hierbei handelt es sich um eine energetisch besonders stabile Verbindung innerhalb der Zellmembran. Die Interaktion gleich aufgebauter Motive variiere abhängig von ihrer Umgebung. Das heißt, dass sich die Interaktion in einem wasserlöslichen Kompartiment anders abspiele als in der lipophilen Zellmembran. Die biologische Relevanz von motivbedingten Protein-Interaktionen ließe sich durch Mutationen innerhalb der Transmembrandomäne erkennen. Diese Mutationen ließen sich häufig mit Krankheitsbildern in Verbindung bringen. Die Protein-Protein-Interaktion auf Grundlage von Motiven und Motiv-bildenden Aminosäuren sei hier besonders dadurch bestätigt, dass häufig kleine oder polare Aminosäuren an diesen Mutationen beteiligt seien (Moore *et al.* 2008).

Einfach und mehrfach die Membran durchspannende Proteine können darüber hinaus mit den membranbildenden Phosphosphingolipiden in Interaktion treten. Eines der an den besten beschriebenen Beispielen ist das vesikuläre Transportprotein p24. Hierbei bildet das VxxTLxxIY-Motiv des Typ I Membranproteins die Grundlage für die Interaktion. Von diesem Motiv abgeleitet wurden viele weitere Proteine gefunden, die mit Phosphosphingolipiden interagieren, wie das GPI-*attachment* Protein, Tetraspanin 7 und der metabotrope Glutamatrezeptor 2. Die funktionellen Rollen dieser Interaktionen sind noch weitestgehend unbekannt. Dennoch wird vermutet, dass möglicherweise dadurch auf die Regulation und die Funktion dieser Proteine Einfluss genommen werden kann (Björkholm *et al.* 2014).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die meisten Interaktionen einen direkten Einfluss auf die Regulation der genannten Proteine haben. Wie zu Beginn dieses Kapitels erläutert, gibt es Studien, die der Transmembrandomäne von ADAM17 eine diesem Schemata ähnelnde Rolle zusprechen. Daher sollte die Transmembrandomäne von ADAM17 in dieser Arbeit näher untersucht werden.

3. FRAGESTELLUNG

ADAMs vermitteln die Proteolyse diverser Transmembranproteine und wirken so als entscheidende Mediatoren für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge. ADAM17 wurde ursprünglich als *Sheddase* für TNF- α bekannt. Heute steht fest, dass ADAM17 viele weitere Substrate prozessiert. Beispielsweise reguliert ADAM17 den bedeutenden Signalweg des EGFRs. Kommt es zu einer Fehlregulation dieses Signalweges führt dies zu schwerwiegenden pathologischen Prozessen, wie der Karzinogenese und der Tumorprogression. Der zentrale Mechanismus innerhalb dieses Signalweges ist die Freisetzung der sieben Liganden der EGF-Klasse durch ADAM17. Die Protease und die Mitglieder der EGF-Liganden werden als Transmembranproteine synthetisiert. ADAM17 prozessiert seine Liganden membran-nah. Durch die Freisetzung der Ektodomänen können diese para- und autokrin Signalkaskaden anstoßen. Neben den Wachstumsfaktoren zählen auch Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine und deren Rezeptoren zu den Substraten der Metalloprotease. Aus wissenschaftlicher, aber im Besonderen auch aus medizinischer Sicht, ist das Verständnis dieses Signalweges äußerst wichtig, da dies die Grundlage für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten darstellen kann. Von großem Interesse ist seit längerem, wie bei dieser Vielzahl an Liganden eine spezifische Freisetzung einzelner Substrate erreicht wird. Verschiedene Domänen der Protease werden für die spezifische Substraterkennung und -bindung verantwortlich gemacht. Unterschiedliche Forschergruppen haben eine essenzielle Rolle der Transmembrandomäne für die Substratfreisetzung gezeigt. Die Ergebnisse einer von Li und Kollegen 2007 veröffentlichten Mutagenese-Studie sprechen den einzelnen Aminosäuren dieser Domäne eine wesentliche Rolle zu.

Ziel dieser Arbeit war daher, die Transmembrandomänen von ADAM17 und seiner Liganden auf eine mögliche Interaktion hin näher zu untersuchen. Dafür wurde die Literatur zu Protein-Interaktionen innerhalb der Plasmamembran studiert. Durch die gewonnenen Erkenntnisse wurde systematisch untersucht, ob und wie ADAM17 mit seinen Substraten innerhalb der Zellmembran interagiert. Da Protein-Interaktionen meist durch Mutagenese-Studien näher untersucht werden, wurde diese Methode Grundlage dieser Arbeit. Die natürlich vorkommenden sowie die mutierten Proteasen und Substrate

wurden dann in Retransfektions-Experimenten hinsichtlich ihrer Aktivität und Expression untersucht. Neben *Western Blots* wurden auch immunzytochemische Methoden und durchflusszytometrische Analysen angewendet.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Absaugpumpe, <i>BVC professional</i>	Vacuubrand GmbH & Co. KG, DE
Analysewaage	Sartorius AG, DE
Analysewaage, <i>XS205 DualRange</i>	Mettler-Toledo GmbH, CH
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD, US
Brutschrank, <i>HERA cell 150</i>	Thermo Scientific Inc., US
Cellometer® Auto 1000	Nexcelom Bioscience LLC, US
Dispenser, <i>Multipette®plus</i>	Eppendorf AG, DE
Gefrierschrank -20 °C, <i>comfort</i>	Liebherr-International AG, CH
Gefrierschrank -80 °C, <i>Forma 9000 series</i>	Thermo Scientific Inc., US
Heizblock	Eppendorf AG, DE
Heizblock	HLC BioTech, DE
HP Scanjet G4050	Hewlett-Packard, US
Inkubator, <i>MaxQ™ 6000</i>	Thermo Scientific Inc., US
Inkubator, <i>Minitron</i>	INFORS HT AG, CH
Kippschüttler, <i>Roto-Shake Genie</i>	Scientific Industries Inc., US
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Olympus K.K., JP
Kühlschrank, <i>premium</i>	Liebherr-International AG, CH
Lichtmikroskop, <i>invers</i>	Helmut Hund GmbH, DE
Magnetrührer, <i>CB 162</i>	Stuart, US
<i>Microplate-Fluorometer, 96-well, Twinkle LB970</i>	Berthold Technologies GmbH & CO. KG, DE
<i>Microplate-Reader, 96-well, EL800™</i>	BioTek Instruments GmbH, DE
<i>Microplate-Reader, 96-well, FLx800™</i>	BioTek Instruments GmbH, DE
<i>Microplate-Reader, 96-well, Sunrise™</i>	Tecan Group Ltd., CH
Multi-Funktions 3D Rotator, <i>Grant bio PS-M3D</i>	Grant Instruments, UK
Multi- <i>Imagingsystem, Fusion FX7</i>	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
Multipipette, <i>Transferpette® S-12</i>	Brand GmbH & Co. KG, DE
NanoDrop 1000, <i>Spectralphotometer</i>	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE

Netzgerät EV222	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
Netzgerät EV231	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M/ ExW S	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
pH-Meter pH211	HANNA Instruments Deutschland GmbH, DE
Rolltisch, Stuart SRT6	Bibby Scientific Ltd, UK
Sterilwerkbank, <i>cytosafe</i> -N 2004	Faster GmbH, IT
Sterilwerkbank	Köttermann GmbH & Co. KG, DE
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega Corporation, US
Vortexer, <i>Lab dancer</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Vortexer, <i>Vortex genius 3</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Wasseraufbereitungsanlage, TKA <i>GenPure</i>	TKA part of Thermo Fisher Scientific Inc., US
Wasserbad, GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, DE
Zählkammer, Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5424</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, <i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge, Heraeus™ <i>Fresco</i> ™21	Thermo Scientific Inc., US
Zentrifuge, Heraeus™ <i>Multifuge</i> ™ X3R	Thermo Scientific Inc., US

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

1,10-Phenanthrolin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Accutase	PAA Laboratories GmbH, A
ADAM <i>fluorogenic substrate</i>	Enzo Life Sciences AG, DE
Amersham™ ECL Select™	GE Healthcare GmbH, US
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
BM <i>blue</i> Meerrettichperoxidase (HRP) Substrat	F. Hoffmann-La Roche AG, CH
Brij® 35, Polyoxyethylenlaurylether	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

Complete, Protease-Inhibitor-Mix	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
Diazabicyclooctane (DABCO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare GmbH, US
Gelatine	SERVA Electrophoresis GmbH, DE
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck KGaA, DE
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck KGaA, DE
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Mowiol® 4-88	Calbiochem part of Merck KGaA, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, DE
<i>para</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Penicillin/Streptomycin, 100x	Life Technologies Co., US
Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent	Life Technologies Co., US
Proteinmarker, <i>PageRuler™ Plus, Prestained</i>	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., DE
Rotiphorese® Gel 30, Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Saponin	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Schwefelsäure, 2N Maßlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Triton X100	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Trypanblau (0,5%ig)	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Trypsin-EDTA, 10x	Life Technologies Co., US
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
TurboFect™, Transfektionsreagenz	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., DE

Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE

4.1.3 Stimulanzen

Tabelle 5: Verwendete Stimulanzen

PMA	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
-----	----------------------------

4.1.4 Inhibitoren

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren

MM	R&D Systems, Inc., US
----	-----------------------

4.1.5 Primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper

Kaninchen, anti GAPDH, FL-335	Santa Cruz Biotechnology, Inc., US
Kaninchen, anti HA- <i>tag</i> , H6908	Sigma-Aldrich Co. LLC., DE
Kaninchen, K133 Immunsereum	Koch-Nolte, Hamburg, DE
Maus, anti β -Tubulin, Klon E7	DSHB, US
Ziege, anti Actin (I-19)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., US

Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper

Esel, anti Kaninchen Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Inc., US
Esel, anti Ziege HRP gekoppelt	Dinova GmbH & Co. KG, DE
Schaf, anti Maus HRP gekoppelt	Dinova GmbH & Co. KG, DE
Ziege, anti Kaninchen HRP gekoppelt	Dinova GmbH & Co. KG, DE

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

96- <i>well</i> -Platten (Flachboden)	Sarstedt AG & Co., DE
96- <i>well</i> -Platten (Schwarz)	Sarstedt AG & Co., DE
Autoklaven Beutel	Sarstedt AG & Co., DE
Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH, DE
Einkanalpipetten, Mehrkanalpipetten <i>Discovery comfort</i>	HTL lab solutions, PL
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA GmbH, DE

Gestopfte Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., DE
Glaskolben, 1000 ml, 300 ml	Schott AG, DE
Injektionsnadeln, Sterican	B. Braun Melsung AG, DE
Injektionsspritzen, <i>inject</i>	B. Braun Melsung AG, DE
Mikroschraubröhrchen, 2 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Objektträger	Menzel-Gläser GmbH, DE
Parafilm	American National Can Company, US
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Petrischale, Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Reaktionsgefäß, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Roti®-PVDF-Membran, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co., DE
Spritzenfilter, 0,45 µm Porengröße	Sarstedt AG & Co., DE
Stickstofftank	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, DE
<i>Whatman</i> -Papier, 1,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Zellkulturplatten, 12- <i>well</i>	Sarstedt AG & Co., DE
Zellkulturplatten, 24- <i>well</i>	Sarstedt AG & Co., DE
Zellkulturschalen, Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., DE

4.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen

ADAM10-Lyse-Puffer

TRIS	5 mM
<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>	1 mM
Saccharose	250 mM
Triton X100	1 %

ADAM-Assay-Puffer

Tris	25 mM
ZnCl ₂	2 µM
Brij 35	0,005 % (w/v)
pH 9	

AP-Lyse-Puffer

EDTA	1 mM
------	------

Triton X100	2,5 % (w/v)
1,10-Phenanthrolin	10 mM

AP-Puffer

NaCl	100 mM
TRIS	100 mM
MgCl ₂	20 mM
pH 9,5	
→ filtriert	

AP-Substratlösung

1x Tablette pNPP	2,5 mg
in AP-Puffer	2,5 ml

BCIP-NBT-Lösung

1x Tablette BCIP/ NBT	10 ml
-----------------------	-------

Blocking-Puffer

Milchpulver	5 % (w/v)
in TBST	

Blocking-Puffer für die Immunzytochemie

BSA	1 % (w/v)
Saponin	0,2 % (w/v)
in PBS	

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)^{+/+}

(Vollmedium)

FCS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
in DMEM	

Gelatine Lösung

Gelatine	0,25 % (w/v)
in Wasser (H ₂ O)	

Lysogeny Broth (LB) Medium

NaCl	10 g
Trypton/Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g

in 900ml Aqua dest. pH 7 → ad 1l Aqua dest.	
---	--

LB/ AMP-Platten

LB Medium	
Agar-Agar	1,5 % (w/v)
Ampicillin	0,1 mg/ml

Mowiol-Eindeckmedium

Glycerin	6 g
Mowiol	2,4 g
Aqua dest.	6 ml
TRIS-HCl, 0,2M	12 ml
pH 8,5	

Mowiol^{+/+}

Mowiol	1 ml
DABCO	100 µl
DAPI	1 µl

PFA-Lösung

Paraformaldehyd	3 % (w/v)
-----------------	-----------

Phosphat-Puffer (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH 7,4	

Reagent Diluent

BSA	1%
in PBS	
pH 7,4	
→ 0,2 µm filtriert	

Sammelgel 4,5 %

Aqua dest.	2,9 ml
Sammelgel-Puffer	1,25 ml

Acrylamid	0,835 ml
APS	30 μ l
Temed	15 μ l

Sammelgel-Puffer

TRIS	500 mM
SDS	0,4 %
pH 6,8	

SDS-Lauf-Puffer

TRIS	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	3,5 mM
pH 8,8	

SDS-Proben-Puffer 6x (reduzierend)

TRIS	750 mM
SDS	416 mM
EDTA	6 mM
DTT	120 mM
Glycerin	47,5 %
Bromphenolblau	0,25 %
pH 6,8	

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	2,0 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
D-Glucose	20 mM

Stripping-Puffer

TRIS	62,5 mM
SDS	70 mM
2-Mercaptoethanol	0,7 %
pH 6,7	

Tris-bufferd saline (TBS)

TRIS	20 mM
EDTA	1 mM
NaCl	140 mM
pH 7,4	

Tris-bufferd saline und Tween20 (TBST)

Tween20 in TBS	0,1 % (w/v)
-------------------	-------------

Transfektionsansatz pro well

DMEM	100 µl
ADAM-Plasmid	750 ng
AP-Plasmid	1000 ng
TurboFect™ (3 µl/ 1 µg Plasmid- Desoxyribonukleinsäure (DNA))	5,25 µl
→ vortexen	3 s
→ Inkubation	20 min

Transfer-Puffer

TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10 %
pH 8,2-8,4	

Trenngel 7,5 %

Aqua dest.	5,03 ml
Trenngel-Puffer	2,50 ml
Acrylamid	2,33 ml
APS	60 µl
Temed	30 µl

Trenngel 10 %

Aqua dest.	4,03 ml
Trenngel-Puffer	2,50 ml
Acrylamid	3,33 ml
APS	60 µl
Temed	30 µl

Trenngel-Puffer

TRIS	1500 mM
SDS	0,4 %
pH 8,8	

Western Blot-Lyse-Puffer

1,10-Phenanthrolin	10 mM
Complete Protease-Inhibitor-Mix in ADAM10-Lyse-Puffer	1 x

4.1.8 Zellkulturmedien**Tabelle 11: Verwendete Zellkulturmedien**

Biofreeze Einfriermedium	Biochrom GmbH, DE
DMEM	Life Technologies Co., US

ADAM10/17^{-/-}-doppel-Knockout-MeFs (Murine embryonale Fibroblasten)

Diese Fibroblasten entstammen konditionalen *Knockout*-Mäusen. Erzeugt wurden sie von den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Karina Reiß und Prof. Dr. Paul Saftig. Dazu wurden die in Literatur beschriebenen heterozygoten ADAM10^{+/-} defizienten Mäuse (Hartmann *et al.* 2002) mit durch *Gen-trapping* erzeugten heterozygoten ADAM17^{+/-} defizienten Mäusen verpaart. Die ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden von Mausembryonen des 9. Entwicklungstages gewonnen. Durch *Realtime*-PCR sowie *Western Blot*-Analysen wurde gezeigt, dass die Zellen der ADAM10/17^{-/-}-doppel-*Knockout*-Mäuse weder über ein funktionelles ADAM10 noch ADAM17 verfügen. Kultiviert werden die adhären wachsenden Zellen mit Vollmedium in Ø10 cm Schalen.

COS-7 Zellen

Die COS-7-Zellen sind Fibroblasten, welche aus der Niere der grünen Meerkatze (*Chlorocebus*) stammen. Sie sind mit dem *Simian Vacuolating Virus* 40 immortalisierte Abkömmlinge der CV-1-Zelllinie. Kultiviert werden die adhären wachsenden Zellen mit Vollmedium in Ø10 cm Schalen.

HeLa-Zellen

Hierbei handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebses. Diese in Zellkultur zuerst etablierte, permanente Zelllinie war mit dem humanen Papillomvirus 18 infiziert. Kultiviert werden die adhären wachsenden Zellen mit Vollmedium in Ø10 cm Schalen.

MeFs (Murine embryonale Fibroblasten)

Diese Fibroblasten entstammen Mäusen. Kultiviert werden die adhären wachsenden Zellen mit Vollmedium in Ø10 cm Schalen.

4.1.9 Plasmide

Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Bezug
mADAM17 WT	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel
mADAM17 E/A	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel
mADAM17 LGG	pcDNA3.1 (Invitrogen)	M. Munz
mADAM17 ALL	pcDNA3.1 (Invitrogen)	M. Munz
hAREG-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel
hAREG-AP-GVI	pAPtag5 (GenHunter)	M. Munz
HB-EGF-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel
TGF α -AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel
A17 TTKT	pcDNA3.1 (Invitrogen)	M. Schulte

4.1.10 Kits

Tabelle 13: Verwendete Kits

Bradford Protein Assay	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., DE
QuickChange® II Site-directed Mutagenesis	Agilnet, US
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., DE
PureYield™, Plasmid Midiprep System	Promega Corporation, US

4.1.11 Software

Tabelle 14: Verwendete Software

Adobe Photoshop CS4 Extended	Adobe Systems GmbH, US
Bio 1D v15.03b	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, US
FlowJo 10	FlowJo, LCC, US
Fusion v15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE
FV10-ASW 2.1 Viewer	Olympus K.K., JP
Gen5 1.11	BioTek Instruments GmbH, DE
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., US
Mendeley Desktop v1.11	Mendeley Ltd., UK
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2010	Microsoft Corp., US
peqStarProtocolEditor v1.02	PEQLEB Biotechnologie GmbH, DE
QuickChange® Primer Design (http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp)	Agilent, US

Für die Erstellung der Abbildungen 2 und 15 wurden PowerPoint-Vorlagen von Servier Medical Art zur Hilfe genommen (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Für die Abbildungen 4 und 5 wurde „*The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*“ (Kelley *et al.* 2015) verwendet. Das Modell von AREG wurde von *membranome.org* zur Verfügung gestellt (Lomize *et al.* 2017, 2018). Die Modelle von Abbildung 4 und 5 wurden mittels UCSF Chimera, entwickelt von der *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics* der *University of California, San Francisco*, mit Unterstützung von *NIH P41-GM103311*, weiterbearbeitet (Pettersen *et al.* 2004). Für die Analyse der Proteine wurde zudem *uniprot.org* verwendet (Bateman *et al.* 2017).

4.2 Methoden

4.2.1 Mutagenese

Mit Hilfe des QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kits wurden die Mutationen in die Ausgangsplasmide eingebracht.

Durch synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*Primer*) wurden die gewünschten Mutationen eingebracht. Die *Primer* trugen eine entsprechend veränderte Basensequenz, welche jeweils komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen einer doppelsträngigen Ausgangsplasmid-DNA war.

Durch eine im Thermozykler peqSTAR 96 universal durchgeführte Polymerase-Ketten Reaktion (PCR), in der die erzeugten *Prime* durch die *PfuUltra HF* DNA-Polymerase verlängert wurden, entstand eine Vielzahl an neu synthetisierten, die Mutation tragenden, Plasmiden. Die überzähligen Ausgangs-Plasmide, welche zunächst noch im PCR-Produkt vorlagen, wurden durch Inkubation mit 10 U der Endonuklease *Dpn I* bei 37 °C für 1 h verdaut. Dieser spezifische Verdau basiert darauf, dass diese Nuklease nur die durch Bakterien methylierte und hemimethylierte Ausgangsplasmid-DNA erkennt.

Pipettierschema für einen PCR-Ansatz

<i>Reaction buffer</i> (10 ×)	5 µl
Plasmid-DNA	50 ng
dNTP-Mix	1,5 µl
Oligonukleotid #1	125 ng
Oligonukleotid #2	125 ng
H ₂ O	Σ 50 µl
<i>ad. PfuUltra HF</i> DNA-Polymerase	1 µl

Tabelle 15: Schema der Mutagenese-PCR

Schritt		Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (Sekunden)
1	Denaturierung	1	95	30
2	Denaturierung	16-18*	95	30
	<i>Annealing</i>		55	60
	Elongation		68	60/ 1000 Basen

*Austausch einer Aminosäure 16 Zyklen/ Austausch mehrerer Aminosäuren 18 Zyklen

Von dem *Dpn I* behandelten PCR-Produkt wurde 1 µl zu 50 µl auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten *E. coli XL1 blue*-Zellen gegeben und 45 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 45 s auf 42 °C erwärmt, diesem Hitzeschock folgte eine fünfminütige Kühlung auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde der Ansatz bei 37 °C und 300 rpm für 1 h geschüttelt.

Das 5 min bei Raumtemperatur mit 2000 x g herunterzentrifugierte Pellet wurde nach dem Dekantieren auf LB/ AMP-Platten in der verbleibenden Flüssigkeit ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Die, am darauffolgenden Tag zu erkennenden, Kolonien der Klone wurden in einer 5 ml oder 200 ml Flüssigkultur über Nacht vermehrt. Die Flüssigkultur enthielt das Selektions-Antibiotikum. Zur langfristigen Lagerung der erzeugten Klone wurde darüber hinaus je ein Glycerol-Stamm angelegt. Für die Isolation der Plasmide wurde für die 5 ml Kultur nach Herstellerangaben das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* verwendet. Für die 200 ml Kultur wurde das *PureYield™, Plasmid Midiprep System* benutzt.

Durch Sequenzierung wurden die Klone mit der entsprechenden Mutation bestimmt. Zur Sequenzierung anhand der Didesoxymethode nach Sanger wurden 3 µl von 100 ng/µl Plasmid-DNA Lösung mit 1 µl 4,8 µM *Primer* dem *Institute of Clinical Molecular Biology* (IKMB), DE zugesandt. Die Analyse der durch das IKMB übermittelten Sequenzen wurde mit Hilfe des Clone Manager 9 durchgeführt.

4.2.1.1 Ausgangsplasmide

Für die Generierung der mADAM17-LGG-Mutante wurde das murine ADAM17 auf dem Vektor pcDNA3.1 verwendet. Dieses Ausgangsplasmid verfügt zusätzlich über eine neun Aminosäuren lange Hamagglutinin (HA)-Markierung, welche sich nach Expression C-terminal am ADAM17 befindet und zur Überprüfung der Expression mittels *Western Blot* verwendet wurde.

Die hAREG-AP-GVI-Mutante wurde mittels eines pAPtag5-Vektors generiert.

4.2.1.2 Verwendete Primer

Die verwendeten *Primer* für die Plasmid-Mutagenese wurden mit dem QuickChange® *Primer* Design von Agilent entworfen und von Sigma-Aldrich Co. LLC., DE bezogen.

Verwendete Oligonukleotide:

mADAM17-LGG

mADAM17_V678G_I682G_forw

5'-GCTGAAAGGAATCCAAAATCCCAAGGAGAAACCCAGAACAGACCCAACGAT-3'

mADAM17_V678G_I682G_rev

5'-ATCGTTGGGTCTGTTCTGGGTTTCTCCTTGGGATTTTGGATTCCTTTCAGC-3'

mADAM17_G674L_V678G_I682G_forw

5'-CAAGGAGAAACCCAGAACAGATAAAACGATGTTATCTGCCAGAACTTCC-3'

mADAM17_G674L_V678G_I682G_rev

5'-GGAAGTTTCTGGCAGATAACATCGTTTTATCTGTTCTGGGTTTCTCCTTG-3'

hAREG-AP-GVI

hAREG_A206V_S210I_forw

5'-CTGTGAGGATCACAGCAATCATAAAGGCAACTATGGCTGCTAATGCA-3'

hAREG_A206V_S210I_rev

5'-TGCATTAGCAGCCATAGTTGCCTTTATGATTGCTGTGATCCTCACAG-3'

hAREG_L202G_A206V_S210I_forw

5'-GGCAACTATGGCTGCTCCTGCAATTTTTGATAAACTACTGTCAATCATG-3'

hAREG_L202G_A206V_S210I_rev

5'-CATGATTGACAGTAGTTTATCAAAAATTGCAGGAGCAGCCATAGTTGCC-3'

Zur Sequenzierung wurden, je nach Vektor, weitere *Primer* verwendet.

pcDNA3.1

SeqpcDNA3.1-1

5'-CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC-3'

SeqpcDNA3.1BGHrev

5'-CTAGAAGGCACAGTCGAG-3'

pAPtag5

SeqpcDNA3.1BGHrev

5'-CTAGAAGGCACAGTCGAG-3'

SeqpAP-Tag5_AP_forw1

5'-GCAGGAGCAGACCTTCATAG-3'

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

Zur Lagerung der Plasmid-DNA produzierenden Bakterienkolonien wurden Glycerol-Stämme angelegt. Dazu wurden 850 µl einer Flüssigkultur mit 150 µl Glycerin versetzt, geschüttelt und bei -80 °C eingefroren.

4.2.3 Zellkultur

Alle verwendeten Lösungen und Materialien waren steril.

4.2.3.1 Passagieren von adhärennten Zellen

Sämtliche verwendete Zellen und Zelllinien wurden bei 37 °C in einem mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank kultiviert. Die Zellen waren in den 10 cm durchmessenden Zellkulturschalen von 10 ml Vollmedium bedeckt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert.

Zunächst wurde das bei 4 °C gelagerte Medium in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Der Zellkulturüberstand über den Zellen wurde abgesaugt und die lebenden Zellen, welche am Boden der Zellschale hafteten, mit 7,5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA lösten sich die Zellen je nach Zelllinie bei 37 °C Inkubation unterschiedlich schnell ab. Um die enzymatische Aktivität des Trypsins zu beenden, wurden 10 ml Vollmedium zugegeben. Nach einer Resuspension dieser Lösung wurden die Zellen entweder zur Subkultivierung oder für Stimulationsversuche verwendet. Zur Subkultivierung wurden je nach Proliferationsrate 100 bis 300 µl Zellsuspension in eine 10 ml Vollmedium beinhaltende Zellkulturschale gegeben. Für Stimulationsversuche wurden 12-Loch (*well*)-Zellkulturplatten mit 1 ml 0,25%iger Gelatine-Lösung pro *well* für

20 s beschichtet und direkt im Anschluss je nach Versuchsprotokoll 5×10^5 bis 15×10^5 lebende Zellen pro *well* ausgesät.

4.2.3.2 Zählen von Zellen

Das Auszählen von Zellen wurde mittels Cellometer® Auto 1000 nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, in Suspension gebracht und anschließend mit der Trypanblau-Lösung versetzt und 20 µl dieser gefärbten Suspension in eine Zählkammer gegeben.

4.2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Wurden die Zellen für mehrere Wochen nicht benötigt, sind diese bei -80 °C *kryokonserviert* worden. Dazu wurden die Zellen einer dicht bewachsenen Schale, wie oben beschrieben, abgelöst und in Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei $250 \times g$ pelletiert. Nach der Resuspension in 1 ml Biofreeze wurden die Zellen um 1 °C pro Minute bis auf -80 °C heruntergekühlt und gelagert. Beim Auftauen der Zellen wurden diese zuerst in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und dann in 10 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und $250 \times g$ pelletiert. Das Pellet wurde in Vollmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen überführt. Nach 24 h wurde ein Medienwechsel vorgenommen.

4.2.4 Shedding-Experimente mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Substraten

Um die verschiedenen ADAM-Proteasen hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität, Stimulierbarkeit und ihrer Substratspezifität zu vergleichen, wurden Alkalische Phosphatase (AP) -gekoppelte Substrate herangezogen und diese in zellkulturbasierten Überexpressionsversuchen mit den ADAM-Proteasen exprimiert.

4.2.4.1 Funktionsweise

Die Substrate, welche an ihrer extrazellulären Domäne mit dem Enzym AP fusioniert waren, wurden dafür zusammen mit den ADAM-Proteasen in eukaryotischen Zellen transfiziert.

Durch die Aktivität der AP wird das chromogene Substrat pNPP in *para*-Nitrophenyl umgesetzt. Dabei entsteht ein gelber Farbumschlag. Durch Bilden des Verhältnisses von der AP-Aktivität des Zellkulturüberstandes zu der AP-Aktivität im Zellysat, wurde ermittelt, wie viel Prozent des gesamten AP-Substrats von der Zelloberfläche freigesetzt wurde.

4.2.4.2 Transiente Transfektion

Das Aussäen der Zellen wurde als Zeitpunkt $t=0$ h festgelegt. Die Transfektion nach der Lipofektions-Methode fand nach $t=24$ h bei einer Konfluenz der adhärennten Zellen von 70-90 % statt. Für die 12-*well*-Zellkulturplatten wurde der oben aufgeführte Transfektionsansatz pro *well* auf 500 μ l DMEM ohne Zusätze (DMEM *only*) gegeben und bei $t=30$ h auf 1 ml Vollmedium pro *well* gewechselt.

4.2.4.3 Stimulation und Inhibition der Zellen

Nach $t=48$ h wurden die Zellen für die Stimulationsversuche verwendet. Direkt vor der Stimulation bzw. Inhibition wurde das Vollmedium der Zellen durch 400 μ l DMEM *only*, das auf 37 °C vorgewärmt war, ersetzt.

Der Inhibitor MM wurde in der Konzentration von 10 μ M 15 min vor Zugabe des Stimulus hinzugegeben. So wurde eine frühzeitige Inhibition der zu untersuchenden Proteine gewährleistet. Der Stimulus PMA wurde für 2 h in einer Konzentration von 300 ng/ml eingesetzt. Die Wirkung der Stimulation und der Inhibition wurde mittels entsprechender Kontrollen analysiert.

4.2.4.4 Auswertung

Ausgewertet wurde nach einer entsprechenden Inkubationszeit wie folgt:

Die Überstände wurden je in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C mit 10000 rpm für 5 min von etwaig vorhandenen Zelltrümmern per Zentrifugation getrennt. Die abzentrifugierten Überstände wurden in dreifachen Werten zu je 100 μ l auf eine 96-*well*-Platte (Flachboden) aufgetragen und bei 4 °C abgedeckt gelagert.

Zur Lyse der stimulierten Zellen wurde der AP-Lyse-Puffer verwendet. Pro *well* wurden 300 μ l Lyse-Puffer zugegeben und bei 4 °C für 30 min unter gelegentlichem Schwenken der Platten gelagert. Die lysierten Zellen wurden ebenfalls in 1,5 ml Reaktionsgefäße

überführt und bei 4 °C mit 10000 rpm für 5 min zentrifugiert. Von den abzentrifugierten Zelllysaten wurden je 10 µl der Extrakte mit 90 µl vorgelegtem AP-Puffer verdünnt und in dreifachen Werten parallel zu den zuvor aufgetragenen Überständen auf die 96-*well*-Platte gegeben.

Auf die so vorbereitete 96-*well*-Platte wurden mit der Mehrkanalpipette 100 µl AP-Substratlösung je *well* gegeben und anschließend bei 37 °C inkubiert. Ab dem Zeitpunkt der Substratzugabe wurde die Zunahme der Extinktion mit dem *Microplate-Reader*, 96-*well*, Sunrise™ bei 405 nm gemessen. Um Aussagen über die Spezifität des Prozesses treffen zu können, wurde zu kontinuierlichen Messzeitpunkten gemessen.

Die Rohdaten wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel ausgewertet. Die dreifachen Werte der Überstände und der Lysate wurden jeweils gemittelt, mit den Verdünnungsfaktoren multipliziert, um die ebenfalls gemittelten, entsprechenden Kontrollwerte korrigiert und der prozentuale Anteil von AP-Substrat im Zellkulturüberstand am Gesamt-AP-Substrat berechnet.

4.2.4.5 Alkalische Phosphatase-Gele

Das mutierte AP-Substrat hAREG-GVI wurde parallel zum Wildtyp-hAREG AP-Substrat in verschiedenen Zelllinien exprimiert. Um die Ergebnisse der *Shedding*-Experimente auf die Wechselwirkung von Substrat und Protease zurückzuführen, wurde durch AP-Gele die Expression der Substrate überprüft.

Für diese Versuche wurden ausschließlich die AP-Substrate transfiziert. Alle anderen Schritte entsprachen dem oben genannten Protokoll des *Shedding*-Experimentes (siehe Kapitel 4.2.4).

Von den stimulierten Zellen wurden 40 µl Zellkulturüberstand und 20 µl Lysat mit jeweils 6 x SDS-Proben-Puffer ohne DTT aufgetragen. Die Proteine durchliefen bei 50 V Spannung zunächst das 4,5%ige Sammelgel und anschließend das 7,5%ige Trenngel im PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S. Der vorgefärbte Proteinmarker, *PageRuler*™, gab Aufschluss über die Position der wandernden Proteine. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel zweimal 30 min mit einer 2,5%igen (v/v) Triton-Lösung gewaschen und vor der Färbung mit der BCIP-NBT-Lösung bei 37 °C für 10 min in AP-

Puffer äquilibriert. Nach einer adäquaten Färbung der Gele durch die Aktivität der in Zellkulturüberstand und Lysat vorhandenen Enzyme wurde das Gel gescannt.

4.2.5 Fluoreszenz-Peptid-Substrat-Assay

Um die unmutierten mit den mutierten ADAM-Proteasen hinsichtlich ihrer unbeeinträchtigten katalytischen Aktivität und ihrer vergleichbaren Oberflächen-Exprimierung zu untersuchen, wurden Versuche mit dem ADAM *fluorogenic substrate* durchgeführt.

4.2.5.1 Funktionsweise

Das Substrat ist wie folgt aufgebaut: Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Homophe-Arg-Ser-Lys(5-FAM)-NH₂. TFA (Dabcyl=4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoyl; FAM=carboxy-fluorescein). Der Fluoreszenz-Farbstoff *FAM* ist, solange das Substrat nicht geschnitten ist, mit der *Dabcyl*-Gruppe verbunden und so nicht anregbar. Durch die proteolytische Spaltung kann der Fluoreszenzfarbstoff mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt werden, wodurch eine Detektion des mit 530 nm abgestrahlten Lichtes möglich wird. Die Emission korreliert positiv mit der umgesetzten Substratmenge, welche wiederum die Aktivität und auch die Expression der Proteasen widerspiegelt.

4.2.5.2 Transfektion

Zum Zeitpunkt $t=0$ h wurden 5×10^5 COS-7 Zellen in eine 24-*well*-Zellkulturplatte auf 500 μ l Vollmedium, ohne sie zuvor mit Gelatine beschichtet zu haben, ausgesät. Transfiziert wurde zum Zeitpunkt $t=24$ h mit 0,25 μ g Plasmid und 0,5 μ l Turbofect in einem 50 μ l Ansatz auf 250 μ l DMEM. Bei $t=30$ h wurde das Medium wieder auf 500 μ l Vollmedium gewechselt.

4.2.5.3 Auswertung

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter Lichtschutz durchgeführt. Das Medium der Zellen wurde bei $t=48$ h auf 300 μ l DMEM *only* gewechselt. 2 h danach wurde mit der Inhibition begonnen. 10 μ M MM wurden 15 min vor Zugabe von 5 μ M ADAM *fluorogenic substrate* zugegeben. 3 h nach Substratzugabe wurde in doppelten Werten je 100 μ l Zellkulturüberstand auf eine schwarze 96-*well*-Platte gegeben und mit dem *Microplate*-

Reader, 96-well, FLx800™ nach oben genannten Angaben unter Zuhilfenahme der Software Gen5 1.11, gemessen.

4.2.6 Proteinbiochemische Methoden

Zur genaueren Analyse der *Shedding*-Experimente und der ADAM *fluorogenic* substrate-Versuchen wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Die Proben wurden von parallel transfizierten, unstimulierten und mindestens 30 min vor dem Ernten auf DMEM *only* gewechselten Zellen wie folgt gewonnen.

4.2.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Der *Western Blot*-Lyse-Puffer wurde direkt vor jeder Anwendung durch das Zusetzen des Komplexbildners Phenanthrolin und des Protease-Inhibitor-Mixes *Complete* zu ADAM10-Lyse-Puffer angesetzt. Zur Lyse von 12-*well*-Zellkulturschalen wurden nach Absaugen des Mediums je *well* 150 µl *Western Blot*-Lyse-Puffer pipettiert. Von den 24-*well*-Zellkulturschalen wurden je zwei *wells* mit 75 µl *Western Blot*-Lyse-Puffer versetzt und anschließend in dem im Folgenden beschriebenen Lyseprozess zusammengeführt.

Die mit Lyse-Puffer versehenen Zellen wurden für 30 min unter gelegentlichem Schwenken bei 4 °C inkubiert und anschließend dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Nach dem letzten Mal auftauen wurden die Zelllysate nach vorherigem Abschaben in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden dann bei 4 °C für 5 min und 10000 rpm zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt die Proteinkonzentration bestimmt.

4.2.6.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Der Proteingehalt der Lysate wurde nach Bradford ermittelt. Es wurde das Pierce™ 660 nm *Protein Assay Reagent* nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung der auf einer 96-*well*-Flachboden-Platte aufgetragenen Proben wurde mit dem *Microplate-Reader*, 96-well, EL800™ bei 595 nm durchgeführt. Es wurden Probenmengen zwischen 15 und 50 µg weiterverwendet.

Die Proben wurden mit SDS-Proben-Puffer versehen und für 5 min bei 95 °C und 800 rpm denaturiert. Die Menge an SDS-Proben-Puffer wurde anhand der Probe mit dem größten

Volumen für sämtliche Proben festgelegt. Die so vollständig vorbereiteten Proben wurden entweder bei -20 °C gelagert oder direkt zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiterverwendet.

4.2.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach dem Prinzip der diskontinuierlichen elektrophoretischen Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht durchgeführt. Es wurden die vertikalen Gelsysteme vom Typ PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M und ExW S verwendet. Das 10%ige Trenngel und das 4,5%ige Sammelgel wurden direkt vor dem Auftragen der Proben gegossen. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurde die Elektrophoresekammer mit SDS-Lauf-Puffer bis zur Markierung bzw. bis zum oberen Rand der Kammer, sodass Anode, Kathode und die Taschen des Sammelgels vollständig von Puffer bedeckt waren, befüllt. Nach Anlegen der Spannung wanderten die, durch den SDS-Proben-Puffer negativ geladenen Proteine aus den Sammelgeltaschen durch das Sammelgel selbst weiter durch das Trenngel in Richtung Anode. Neben den Proben durchliefen auch 6 µl des Proteinmarkers, *PageRuler™ Plus Prestained*, die 30-minütige, 75 V Spannung betragende Phase. Während dieser wurde eine kontinuierliche Lauffront geschaffen. Anhand des Markers wurde in der, sich direkt anschließenden Phase, bei 90 V Spannung für etwa 2 h der Fortschritt der Proteinauftrennung beurteilt und bei adäquater Auftrennung die Elektrophorese beendet.

4.2.6.4 Western Blot

Um die Proteine im weiteren Verlauf immunologisch detektieren zu können, wurden die Elektrophoresegele durch das Verfahren des *Tank-Blottings* auf eine PVDF-Membran mit 0,45 µm Porengröße übertragen. Dazu wurden die Gele entsprechend den allgemeinen Bedienungshinweisen für den PerfectBlue™ *Tank*-Elektroblotter Web S direkt weiterverwendet.

Die PVDF-Membran wurde in der Größe des Trenngels ausgeschnitten, beschriftet, in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden vier Filterpapiere pro Elektrophoresegel. Die Membran und das Gel wurden von

je zwei flankierenden Filterpapieren umhüllt. Um diesen Stapel in die *Blotting*-Kassette legen zu können, wurden zwei Fasermatten außen aufgelegt. Die so zusammengesetzte Kassette wurde mit der Membran zur Anode hin ausgerichtet in den mit Transferpuffer gefüllten Tank-*Blotter* eingeschoben. Der Transfer wurde bei 50 V, 85 mA und 150 W über Nacht durchgeführt.

4.2.6.5 Immunologische Protein-Detektion

Nachdem die Proteine von dem Elektrophoresegel mittels des Tank-*Blotting*-Verfahrens auf die PVDF-Membran übertragen wurden, konnte mit dem Prozedere für die immunologische Protein-Detektion begonnen werden.

Die Membran wurde nach der Entnahme aus dem *Blotter* kurz mit TBST gewaschen, um überschüssiges Methanol des Transferpuffers zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit *Blocking*-Puffer blockiert. Für die Antikörperfärbung wurden die Membranen in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur auf einem Rolltisch inkubiert. Der erste (primäre) Antikörper, welcher sich gegen das Zielprotein oder einen Teil dessen richtete, wirkte für 1 h in *Blocking*-Puffer ein. Dieser Erstantikörper-Exposition folgte eine dreimalige, jeweils zehnmütige Waschung mit TBST. Der zweite (sekundäre) Antikörper richtete sich gegen die Tierart, in der der erste Antikörper erzeugt wurde und war Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Er wirkte in TBST gelöst für 1 h ein. Die Membran wurde erneut dreimalig gewaschen und konnte dann direkt zur Proteindetektion herangezogen werden. Die Chemolumineszenzreaktion des Amersham™ ECL Select™ Luminols wurde durch die Meerrettichperoxidase katalysiert und mit Hilfe des Multi-*Imagingsystem*, Fusion FX7 detektiert.

Um weitere Proteine auf der PVDF-Membran zu markieren, wurden die zuvor gebundenen Antikörper entfernt. Dieser Vorgang wird auch *Strippen* genannt. Dazu wurde die zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran in *Stripping*-Puffer bei 60 °C für 30 min inkubiert. Die Membran wurde anschließend mehrmals in TBST gewaschen bis das Mercaptoethanol verdampft war. Nach erneutem Blockieren der Membran wurde wie zuvor beschrieben fortgefahren.

4.2.7 Immunzytochemie

Die Methode der Immunzytochemie wurde im Rahmen der Zellkulturtechnik zur Fluoreszenz-Markierung von Proteinen herangezogen. Dadurch ist es möglich, auf die zelluläre Lokalisation der Proteine zu schließen.

Es wurden 5×10^4 HeLa-Zellen in 12-*well*-Zellkulturplatten auf Deckgläsern zum Zeitpunkt $t=0$ h ausgesät.

Transfiziert wurde zum Zeitpunkt $t=24$ h nach dem oben beschriebenen Prinzip in einem finalen Volumen von 600 μl pro *well* für 6 h mit 0,5 μg ADAM-Plasmid-DNA. Die Färbung erfolgte bei $t=48$ h.

Das Färbeprotokoll wurde unter Lichtschutz durchgeführt. Die Zellen wurden für 15 min mit 3%iger PFA-Lösung fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach einer 45-minütigen Blockierung mit *Blocking*-Puffer für die Immunzytochemie wurden die Deckgläser mit dem ersten Antikörper markiert. Der erste Antikörper (Kaninchen, anti HA-*tag*

, H6908) wurde 1:200 in *Blocking*-Puffer für die Immunzytochemie verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der zweite fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, ein aus dem Esel gewonnener Anti-Kaninchen-Zweitantikörper, in *Blocking*-Puffer für Immunzytochemie mit einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt. Dieser Antikörper ist an den roten Farbstoff Alexa Flour 594 gekoppelt, um die Proteine sichtbar zu machen. Die Deckgläser wurden dreimal mit PBS und einmal mit H_2O gewaschen. Auf einen Objektträger wurden 10 μl Mowiol^{+/+} vorgelegt und die umgekehrten Deckgläser darauf platziert.

Die durch den fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markierten Proteine wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Zytometrie = Zell-Vermessung) beschreibt ein, in der Biologie und Medizin zur Anwendung kommendes, Verfahren, mit dem man sehr viele Zellen sehr genau auf verschiedenste Parameter in kürzester Zeit untersuchen kann. Nicht nur die

Größe und die Struktur der Zellen kann so beurteilt werden, sondern ebenfalls unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern das Vorhandensein von Zelloberflächenproteinen.

Das Aussäen (t=0 h) und die Transfektion (t=24 h) wurden auf gleiche Weise wie für die *Shedding*-Experimente durchgeführt. Das Färbeprotokoll (t=48 h) wurde bei 4 °C durchgeführt. Dabei wurden die ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeF-Zellen mit 150 µl Accutase pro *well* abgelöst. Die Reaktion wurde mit 500 µl PBS + 5 % FCS (v/v) beendet. Es wurden 2x10⁵ Zellen ausgezählt und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße in ein Volumen von 100 µl PBS + 1 % BSA überführt. Die mit ADAM17 WT oder mit der ADAM17 LGG Mutante transfiziert Zellen wurden entweder mit K133 Immuns serum (Kaninchen), entsprechend einer 1:100 Verdünnung, versetzt oder die Zellen ohne Immuns serum belassen und für jeweils 1 h bei 4 °C inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde der Färbeansatz auf 500 µl PBS + 1% BSA (v/v) aufgefüllt, resuspendiert und mit 200 x g für 5 min abzentrifugiert. Nach diesem einmaligen Waschen der Zellen wurden diese in 500 µl PBS + 1 % BSA (v/v) resuspendiert und für die Analyse im BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer herangezogen. Die Daten wurden mit der Software *FlowJo* ausgewertet.

4.2.9 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurde GraphPad Prism 5 herangezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und der positive Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Drei bis vier unabhängige Versuche wurden jeweils mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet.

5. ERGEBNISSE

5.1 Die Transmembrandomäne von ADAM17 und ihr potenzielles Substratbindemotiv

Im Jahr 2007 beschrieben Li et al. (siehe Kapitel 2.3), dass die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne entscheidend für das *Shedding* mancher Substrate von ADAM17 sein könnte. Dies ist von besonderer Bedeutung, da für ADAM17 schon mehr als 80 Substrate beschrieben worden sind und bisher noch kaum verstanden werden konnte, wodurch eine Substratspezifität zustande kommt. Zu den Substraten gehören eine Vielzahl an Zytokinen, Rezeptoren und Zell-Adhäsions-Molekülen (Arribas & Esselens 2009). Die Schnittstellen der Substrate tragen kein konserviertes Motiv. Als Gemeinsamkeit der verschiedenen Substratschnittstellen ist jedoch auffällig, dass diese sich sehr nah an der Plasmamembran befinden (Horiuchi 2013).

Die bisher bekannten Daten zur Rolle der Transmembrandomäne sprechen dafür, dass die Substraterkennung und -spezifität durchaus mit einer möglichen motivbedingten Assoziation von Protease und Substrat oder eines weiteren Hilfsproteins denkbar wären (Li et al. 2007, 2015; Le Gall et al. 2010; Nakayama et al. 2012). Die Transmembrandomäne von ADAM17 bildet eine α -helikale Sekundärstruktur (Itai et al. 2001). Die Aminosäuresequenz ist dabei schraubenförmig gewunden. Die Ganghöhe ist die kleinste Distanz zwischen zwei äquivalenten Punkten und beträgt bei einer solchen Schraube 0,54 nm. Auf eine Umdrehung entfallen etwa 3,6 Aminosäuren.

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Transmembrandomäne von ADAM17 auf die oben genannten möglichen Aspekte der Protein-Interaktion innerhalb der Zellmembran untersucht. Die Domänen-Struktur, im Besonderen aber die Transmembrandomäne von ADAM17, wurde unter zur Hilfenahme der webbasierten Software *InterPro: protein sequence analysis & classification* näher untersucht. Unter den von der Software vorhergesagten Domänen befand sich die Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren der Position 672 und 694. Anschließend wurde die Aminosäuresequenz der

Transmembrandomäne von ADAM17 von verschiedenen Spezies verglichen. Dazu wurde mit *Clustal Omega* (ehemalig *ClustalW*) ein Sequenz-*alignment* durchgeführt und die konservierten Bereiche ermittelt.

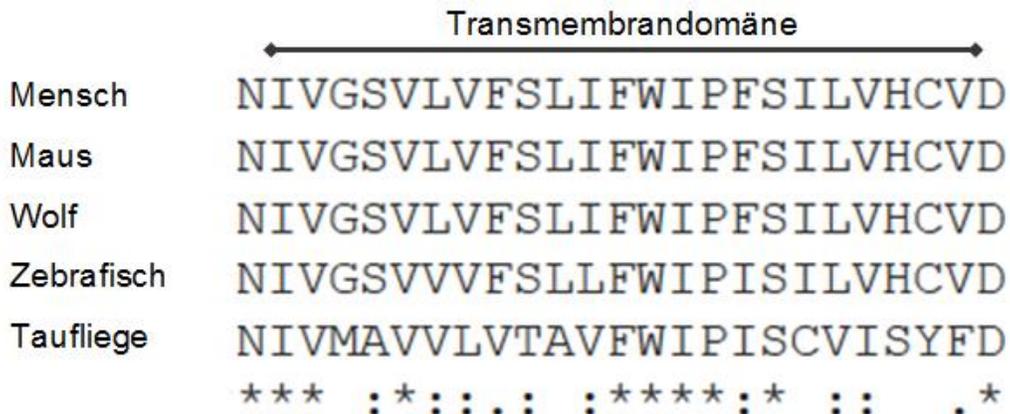


Abbildung 3: Sequenz-*alignment* von ADAM17 verschiedener Spezies

Der Mensch, die Maus und der Wolf verfügen über zu 100 % identisch aufgebauten Transmembrandomänen von ADAM17. (* stehen für 100 % Konservierung, : stehen für Konservierung zwischen Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften, . stehen für Konservierung zwischen Gruppen mit nur gering ähnlichen Eigenschaften von Aminosäuren).

Es stellte sich, wie in Abbildung 3 gezeigt, heraus, dass die hier untersuchten Säuger, Maus, Mensch und Wolf, in ihrer Transmembrandomäne über genau die gleiche Aminosäuresequenz verfügen und so als konserviert zu bezeichnen sind. Weiterhin stellt man fest, dass die Sequenz der Säuger auch ähnlich zu der des Zebrafisches ist. Im Vergleich zur Taufliede lässt sich eine Heterogenität feststellen. Für die Versuche wurden Plasmide verwendet, welche auf dem murinen Genom beruhen, da die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des humanen ADAM17 zu 100 % mit der murinen Transmembrandomäne übereinstimmt.

Wie oben erläutert, wäre eine Interaktion von der Protease und seinem Substrat in der Transmembrandomäne und eine damit verbundene Rolle für die spezifische Substraterkennung durchaus möglich. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Sequenzen der Proteasen und der Substrate direkt gegenübergestellt und auf die in der Literatur beschriebenen Motive hin analysiert.

Tabelle 16: Sequenz-alignment von ADAM17-Varianten und einer Auswahl an Substraten

Farblich blau markiert ist das potenzielle Motiv von ADAM17 WT (GVI-Motiv von A17 WT). Für dieses ist eine sterische Interaktion mit den rot markierten Aminosäuren der Substrate zu vermuten. Schwarz belassene Aminosäuren sollen Substrate kennzeichnen, welche auf Grund ihrer Sterik mit geringerer Wahrscheinlichkeit an einer solchen Interaktion beteiligt sein könnten. ADAM17 TTKT (T für TACE beziehungsweise (bzw.) ADAM17; K für Kuzbanian bzw. ADAM10) besteht hauptsächlich aus ADAM17, verfügt aber über die Transmembrandomäne von ADAM10, dem nächsten Verwandten von ADAM17. Die rot markierten Aminosäuren der ADAM17 LGG Variante sollen auf dessen sterische Modifikation, welche entgegengesetzt zu ADAM17 WT ist, hinweisen. Der grau hinterlegte Bereich soll die Plasmamembran darstellen. Der Extrazellulärraum befindet sich im Schema oben, der Intrazellulärraum unten.

A17 WT	AREG	HB-EGF	TNF- α	TGF- α	CXCL16	A17 TTKT	A17 LGG
F	S	T	L	S	R	F	F
L	S	Y	F	Q	T	L	L
A	L	D	L	K	S	A	A
D	S	H	S	K	A	D	D
N	K	T	L	Q	T	N	N
I 672	I	T	F	A	V	I	I
V	A	I	S	I	P	W	V
G	L	L	F	T	V	I	L
S	A	A	L	A	L	V	S
V	A	V	I	L	C	A	V
L	I	V	V	V	L	H	L
V	A	A	A	V	L	W	G
F	A	V	G	V	A	W	F
S	F	V	A	S	I	A	S
L	M	L	T	I	I	V	L
I	S	S	T	V	F	L	G
F	A	S	L	A	I	L	F
W	V	V	F	L	L	M	W
I	I	C	C	A	T	G	I
P	L	L	L	V	A	I	P
F	T	L	L	L	A	A	F
S	A	V	H	I	L	L	S
I	V	I	F	I	S	I	I
L	A	V	G	T	Y	M	L
V	V	G	V	C	V	L	V
H	I	L	I	V	L	M	H
C	T	L	G	L	C	C	C
V 694	V	M	P	I	K	V	V
D	Q	F	Q	H	R	D	D
K	L	R	R	C	R	K	K
K	R	Y	E	C	R	K	K
L	R	H	E	Q	G	L	L
D	Q	R	F	V	Q	D	D

Da die Rolle des einzelnen Prolins ⁶⁸⁶ und der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin ^{679, 683, 687} bereits untersucht wurden (siehe Kapitel 2.3), lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der anderen in der Literatur beschriebenen Motive.

Wirft man einen Blick auf die Lage der polaren Aminosäuren im Vergleich von ADAM17 zu seinen Substraten, kann man folgende Beobachtungen machen: innerhalb der Transmembrandomäne von ADAM17 sind die verschiedenen polaren Aminosäuren, wie Serin (S), Tryptophan (W) und Histidin (H), in der Sekundärstruktur nahezu gleichmäßig und fast genau übereinander angeordnet. Für die Substrate lässt sich festhalten, dass sich die polaren Aminosäuren verstärkt im mittleren bis C-terminalen Bereich der Transmembrandomänen befinden. Auffallend ist, dass die Proteine nahe der äußeren und der inneren Membrangrenze besonders viele geladene Aminosäuren aufweisen.

Unter den polaren Aminosäuren der Protease befinden sich drei Serine ^{675, 680, 688}, die möglicherweise auch hier für Protein-Interaktionen verantwortlich sein könnten. Eine mögliche Beteiligung des Serin-Zipper-Motivs (siehe Kapitel 2.3) an der Substraterkennung ist im Prinzip für jedes Substrat denkbar, sofern es selbst über ein entsprechend positioniertes Serin verfügt. Diese Bedingung erfüllt eine Vielzahl von Substraten, beispielsweise AREG, HB-EGF, TNF- α und TGF- α . Andererseits gibt es aber auch Substrate, die nicht ein einziges Serin in ihrer Transmembrandomäne tragen, beispielsweise TNFR2 und APP.

Ein Vergleich zwischen ADAM17 und seinen Substraten zeigt ein mögliches Motiv hinsichtlich sterisch bedingter Assoziationen, wie sie zum Beispiel bei den Integrin-Subfamilien (β_1 und β_3) stattfindet. Zu finden sind bei einigen Substraten an den entsprechenden Positionen gleiche und gleichartige Aminosäuren, die die Aminosäureseitenketten in der konservierten Sequenz von ADAM17 in Bezug auf ihre Größe sterisch ergänzen könnten. Glycin, Alanin und Serin werden hinsichtlich ihrer Seitenketten als winzige und Threonin als kleine Aminosäuren bezeichnet. Diesen liegen theoretisch in den jeweiligen Sequenzen große oder auch im Verhältnis zu ihnen als groß zu bezeichnende Aminosäuren gegenüber. Zu den großen Aminosäuren gehören unter anderem Valin, Isoleucin, Leucin und Phenylalanin. Diese Anordnung der Aminosäuren ist für etwa die Hälfte der in Augenschein genommenen Substrate zu finden. Dies legt die

Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein potenziell für die Substraterkennung oder Bindung zuständiges spezifisches Motiv handeln könnte. Die Aminosäuren Glycin₆₇₄, Valin₆₇₈ und Isoleucin₆₈₂ von ADAM17 (GVI-Motiv von ADAM17 WT) könnten an der Bildung dieses möglichen Motives beteiligt sein. Die Interaktion dieses Motivs könnte in sehr ähnlicher Weise wie die für die Integrine beschriebene Interaktion ablaufen. Dabei sind drei Aminosäure-Paare der gegenüberliegenden Helices hauptverantwortlich für die Interaktion. Ihre Anordnung an den Positionen n (n = die erste am Motiv beteiligte Aminosäure), $n+4$ und $n+8$ lässt sich auch für ADAM17 und einige seiner Substrate feststellen. Weiterhin wären die Aminosäuren, welche für diese Helix-Assoziation innerhalb der Zellmembran zuständig sein könnten, bis auf die mögliche Beteiligung von Phenylalanin, exakt die gleichen, wie sie für die Integrine beschrieben worden sind. Betrachtet man beispielsweise das Substrat AREG stehen die Aminosäuren Leucin, Alanin und Serin (LAS-Motiv von AREG) dem GVI-Motiv von ADAM17 WT unmittelbar gegenüber. Zur Veranschaulichung wurden die Modelle in den Abbildungen 4 und 5 mit Hilfe von *Phyre2*, *UCSF Chimera* und *Membranome* erzeugt. In Abbildung 4 ist dargestellt, wie eine günstige geometrische Anordnung zwischen ADAM17 WT mit seinem GVI-Motiv und AREG mit seinem LAS-Motiv zustande kommt. Dem gegenüber zeigt die Abbildung 5, wie ADAM17 LGG das LAS-Motiv von HB-EGF aufgrund seines veränderten Motivs sterisch weniger gut ergänzt.

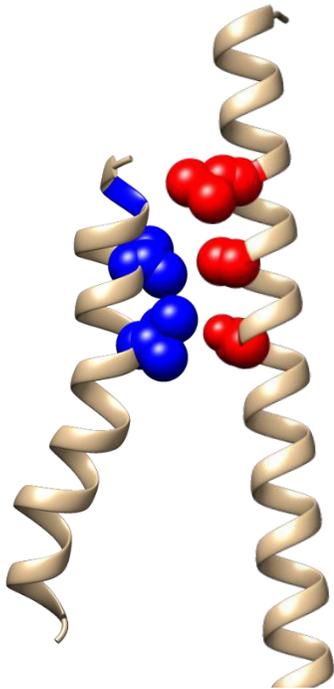


Abbildung 4: Schematisches *Alignment* der Transmembrandomänen von ADAM17 WT und Amphiregulin

Farblich blau markiert ist das potenzielle Motiv von ADAM17 WT, für das eine sterische Interaktion mit den rot markierten Aminosäuren von Amphiregulin (AREG) zu vermuten ist. Die weiteren Seitenketten sind zur Veranschaulichung in Abbildung 4 und 5 jeweils nicht dargestellt.

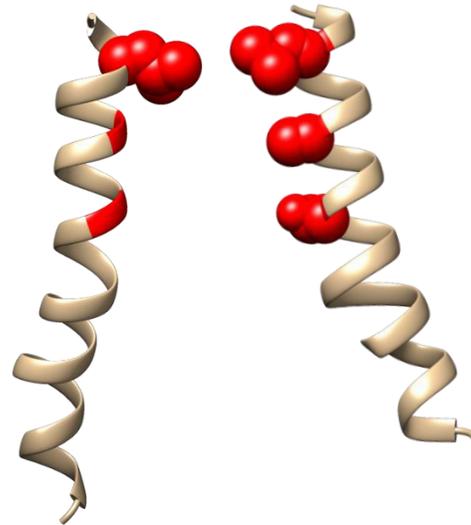


Abbildung 5: Schematisches *Alignment* der Transmembrandomänen von ADAM17 LGG und HB-EGF

Links ist das veränderte Motiv von ADAM17 LGG. Dieses verhält sich bei genauerer Betrachtung sterisch antiproportional gegenüber dem von ADAM17 WT. Aufgrund gestörter räumlicher Interaktion von ADAM17 LGG und HB-EGF, hier auf der rechten Seite abgebildet, könnte dessen Freisetzung geringer ausfallen.

Auf Grund der hohen Konservierung dieses potenziellen für die Substratbindung wichtigen GVI-Motivs von ADAM17 zwischen den verschiedenen Spezies und der damit verbundenen Einteilung der Substrate in verschiedene Gruppen, wurde der Fokus auf die Untersuchung dieses Sachverhalts gelegt.

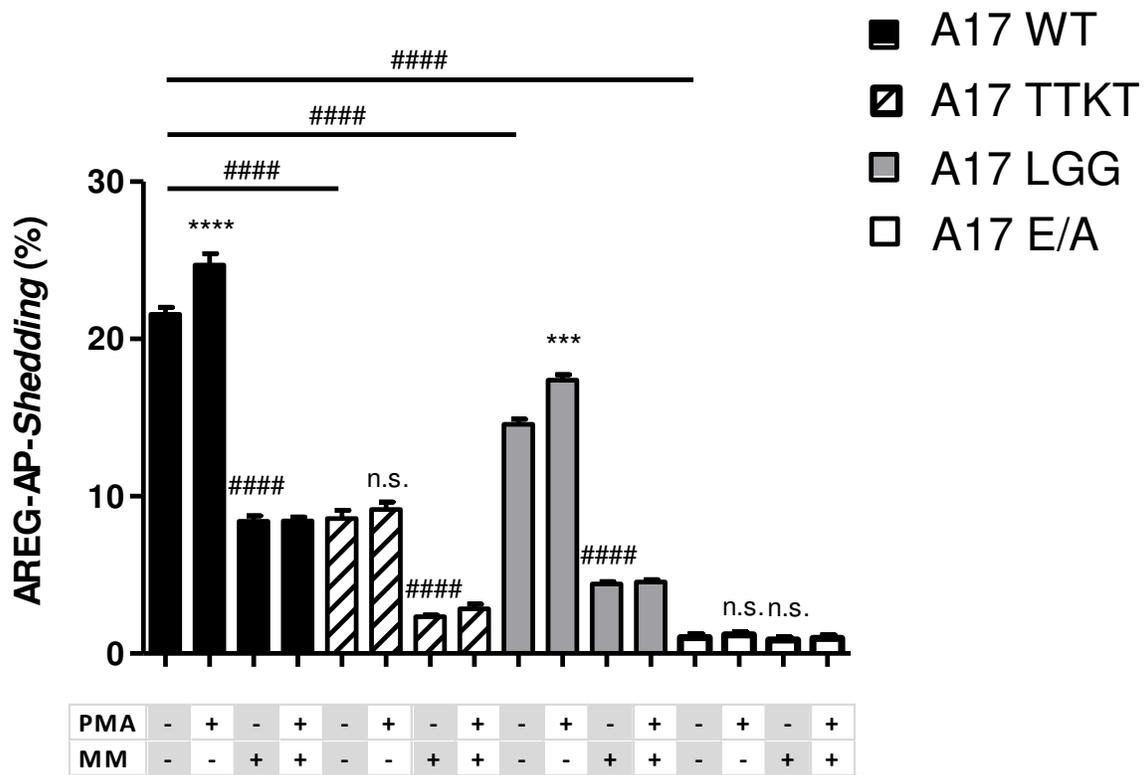
5.2 Mutationen der ADAM17-Transmembrandomäne haben Einfluss auf das Substrat-*Shedding*

Um zu untersuchen, welchen Einfluss dieses GVI-Motiv (winzig-groß-groß-Motiv) von ADAM17 WT auf die Substraterkennung hat, wurde eine Mutagenese-Studie durchgeführt. Zur Beurteilung, inwieweit die Interaktion auf Sterik beruht, wurden die

Basen des für ADAM17 WT codierenden Plasmids entsprechend ausgetauscht, um für Aminosäuren mit entgegengesetzter Größe, also von großer Aminosäure zur kleiner Aminosäure und vice versa, aber ansonsten möglichst ähnlichen Eigenschaften zu codieren. Das Ergebnis einer zweistufigen Mutagenese mit dem *QuickChange® II Site-directed Mutagenesis-Kit* war die Mutante mit dem zu ADAM17 WT sterisch entgegengesetztem LGG-Motiv (groß-winzig-winzig-Motiv). ADAM17 WT und die ADAM17 LGG Mutante wurden nachfolgend hinsichtlich des *Sheddings* verglichen.

Um die Funktion der Transmembrandomäne für die Substraterkennung durch ADAM17 näher zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst wurde die Aktivität des sterisch veränderten ADAM17 LGG (A17 LGG) im Vergleich zu ADAM17, welches die Transmembrandomäne von ADAM10 (A17 TTKT) trägt, untersucht. ADAM17 WT (A17 WT) und das inaktive ADAM17 E/A (A17 E/A) wurden dazu ebenfalls in ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs retransfiziert. Die Versuche wurden mit dem Substrat AREG-AP, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, durchgeführt.

A



B

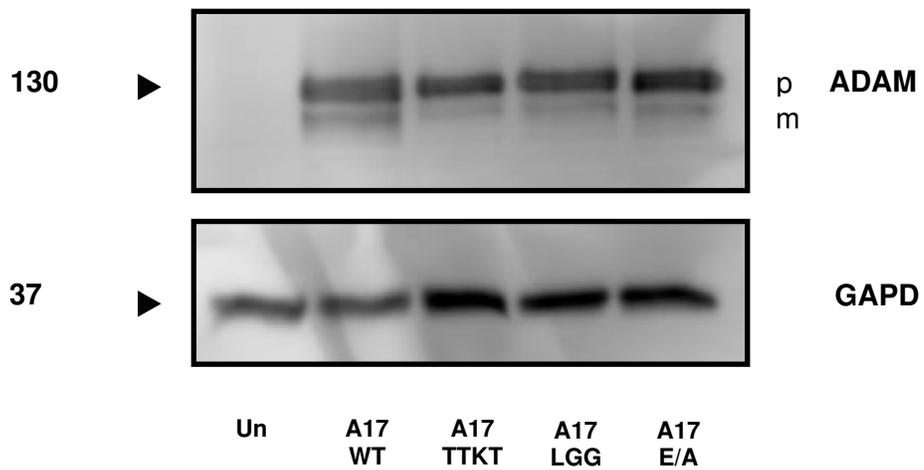


Abbildung 6: Aktivitätstest von A17 WT, A17 TTKT, A17 LGG und A17 E/A

A ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeF-Zellen wurden entweder mit ADAM17 WT (A17 WT), mit einem ADAM17 bei dem die Transmembrandomänen gegen die von ADAM10 ausgetauscht wurde (A17 TTKT), der ADAM17 Transmembran-Mutante (A17 LGG) oder mit inaktivem ADAM17 (A17 E/A) jeweils mit AREG-Alkalische Phosphatase (AREG-AP) transient kotransfiziert. Nach 24 h wurden die zu untersuchenden Zellen entweder 2 h ohne Stimulus belassen oder mit 300 ng/ml PMA stimuliert oder gleichzeitig oder auch nur mit 10 µM Marimastat (MM) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Prozentual abgebildet ist das Verhältnis der Aktivität der AP im Zellkulturüberstand zur Gesamtaktivität nach Korrektur der Rohdaten um die Messwerte der untransfizierten Zellen. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# p ≤ 0,05; **/## p ≤ 0,01; ***/### p ≤ 0,001; ****/#### p ≤ 0,0001; n.s. nicht signifikant.

B Abbildung eines exemplarischen *Western Blots*, durch den die Proteinexpression der verschiedenen Proteasen gezeigt wird. Die ADAMs wurden über ihren HA-tag angefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH angefärbt. p = ADAM17 Proform; m = reifes ADAM17; unt. = untransfizierte Kontrolle, Kilodalton = kDa.

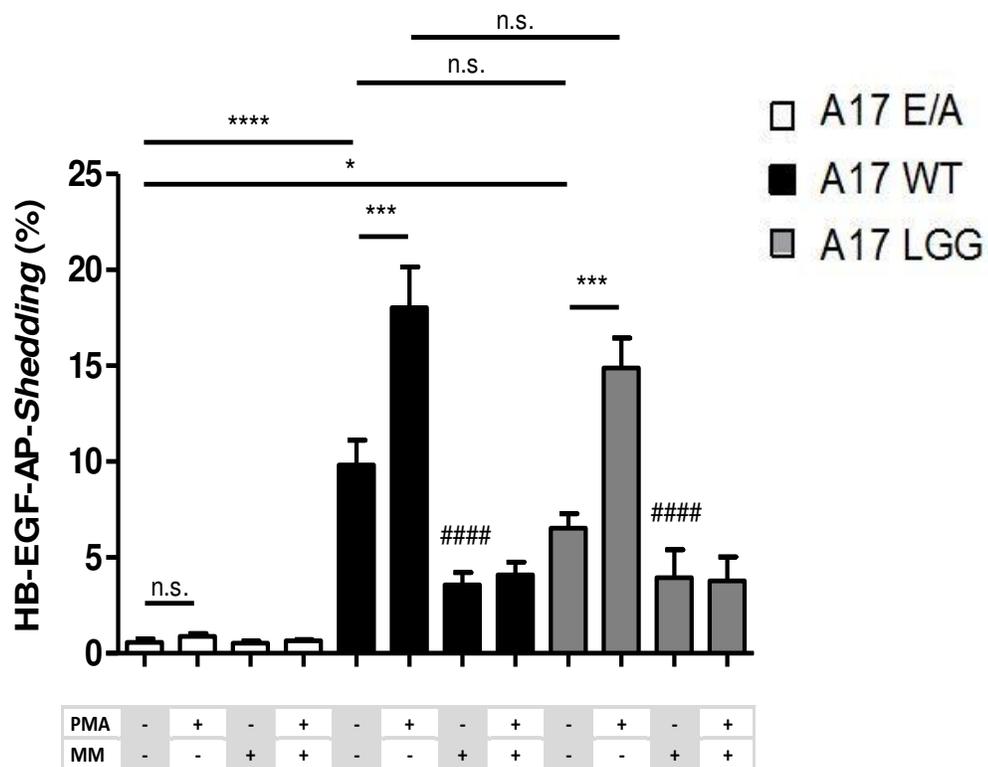
Die Abbildung 6, A zeigt, dass durch A17 TTKT im Vergleich zu A17 WT signifikant weniger AREG freigesetzt wurde. Während sich diese Reduktion für A17 TTKT auf etwa zwei Drittel belief, war für A17 LGG ebenfalls eine signifikante Reduktion des *Sheddings* zu beobachten, die allerdings unter Berücksichtigung der absoluten Zahlen sehr genau zwischen dem Level von ADAM17 TTKT und ADAM17 WT lag. Als Negativkontrolle diente das inaktive ADAM17 E/A. Das ADAM17 E/A bedingte *Shedding* betrug nur wenige Prozent und war ebenfalls signifikant reduziert im Vergleich zu A17 WT. Durch die Stimulation mit PMA konnte das *Shedding* von ADAM17 WT und ADAM17 LGG signifikant im Vergleich zu dem konstitutiven *Shedding* gesteigert werden. Für A17 TTKT und ADAM17 E/A konnte keine signifikante Stimulation durch PMA beobachtet werden. Durch den Breitband-Metalloprotease-Inhibitor MM konnte für A17 WT, A17 TTKT und A17 LGG im Vergleich zu den mit PMA-stimulierten Proben jeweils eine signifikante Reduktion der AREG-*Shedding* beobachtet werden. Für A17 E/A ist dies nicht der Fall. Abbildung 6, B stellt einen repräsentativen *Western Blot* dar. Die Proteinexpression der ADAM17 Varianten stellte sich als sehr ähnlich dar. Die Doppelbande welche auf Höhe von ADAM17 zu beobachten ist, sprach für ein Vorhandensein von der Proform und reifem ADAM17 (Sahin *et al.* 2004). Die Proteasen wurden durch ihren HA-tag wie in Kapitel 1 beschrieben angefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH angefärbt.

5.3 Vergleich des ADAM-vermittelten *Sheddings* für potenziell Motiv-assoziierte und nicht-Motiv-assoziierte Substrate

Um die Beteiligung der auf Sterik beruhenden Interaktion von Substrat und Protease näher zu untersuchen, wurden weitere *Shedding*-Experimente mit verschiedenen AP-gekoppelten Substraten in ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs durchgeführt.

HB-EGF ist in Anbetracht seiner Aminosäuren-Anordnung der Transmembrandomäne ein weiteres Substrat, für das die Interaktion innerhalb der Transmembrandomäne eine entscheidende Rolle für das *Shedding* spielen könnte. Dementsprechend wurde HB-EGF-AP wie zuvor AREG-AP mit den verschiedenen ADAM17-Varianten in ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs retransfiziert und auf ihre konstitutive und stimulierte Aktivität hin untersucht.

A



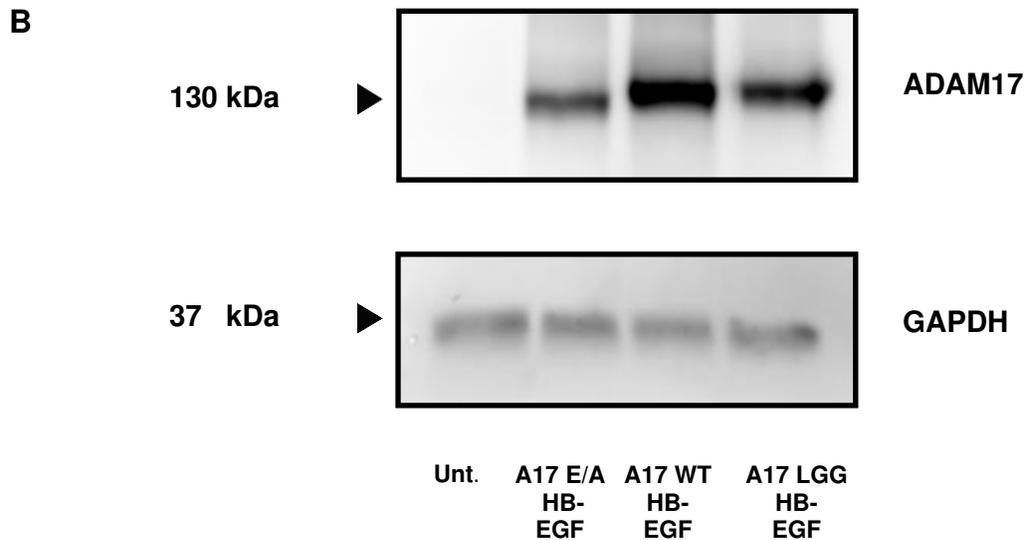


Abbildung 7: Einfluss des ADAM17 GVI-Motivs auf das *Shedding* von HB-EGF

A ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeF-Zellen wurden mit HB-EGF-AP transient transfiziert. Parallel dazu wurde entweder ein inaktives ADAM17 (A17 E/A), ein ADAM17 WT (A17 WT) oder das in der Transmembrandomäne mutierte ADAM17 (A17 LGG) mit *TurboFect*TM Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht. Nach 24 h wurden die Zellen entweder 2 h ohne Stimulus belassen, mit 300 ng/ml PMA stimuliert oder mit 10 µM MM behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. Prozentual abgebildet ist das Verhältnis der Aktivität der AP im Zellkulturüberstand zur Gesamtaktivität nach Korrektur der Rohdaten um die Messwerte der untransfizierten Zellen. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des HB-EGF-AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# p ≤ 0,05; **/## p ≤ 0,01; ***/### p ≤ 0,001; ****/#### p ≤ 0,0001; n.s. nicht signifikant.

B Abbildung eines exemplarischen *Western Blots*, durch den die Proteinexpression der verschiedenen Proteasen gezeigt wird. Die ADAMs wurden über ihren HA-tag angefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH angefärbt. Unt. = untransfizierte Kontrolle.

Abbildung 7, A bildet das signifikant erhöhte *Shedding* von HB-EGF-AP durch A17 WT und auch A17 LGG im Vergleich zum inaktiven A17 E/A ab. Für die PMA-stimulierten Proben war für A17 E/A keine Stimulation zu beobachten. Für A17 WT und A17 LGG hingegen zeigte sich eine signifikante Zunahme des *Sheddings*. MM führte bei den Proben mit A17 WT und A17 LGG zu einer signifikanten Reduktion der HB-EGF-Freisetzung. Es konnte keine, wie für das AREG-AP beobachtete, signifikante Reduktion des *Sheddings* zwischen A17 WT und A17 LGG unter konstitutiven und auch nicht unter PMA-stimulierten Bedingungen festgestellt werden. Abbildung 7, B stellt einen *Western Blot* dar. Die Proteinexpression der ADAM17 Varianten stellte sich ungleichmäßig dar, diese wurden durch einen HA-tag angefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH angefärbt.

Die in diesem Versuch geringer ausgefallene HB-EGF Freisetzung durch A17 LGG im Vergleich zu A17 WT könnte an Hand des *Western Blots* auf eine entsprechend geringere Expression der A17 LGG Variante zurückzuführen sein.

Neben AREG und HB-EGF wurde das Substrat TGF- α untersucht. TGF- α zählt zu den Substraten, welche auf Grund der Aminosäuren der Transmembrandomäne weniger wahrscheinlich an einer Interaktion in der Plasmamembran beteiligt sein könnten.

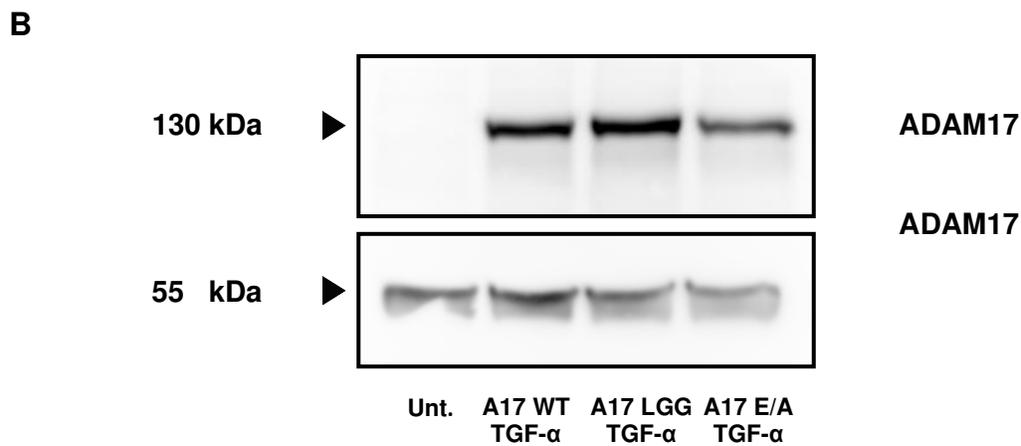
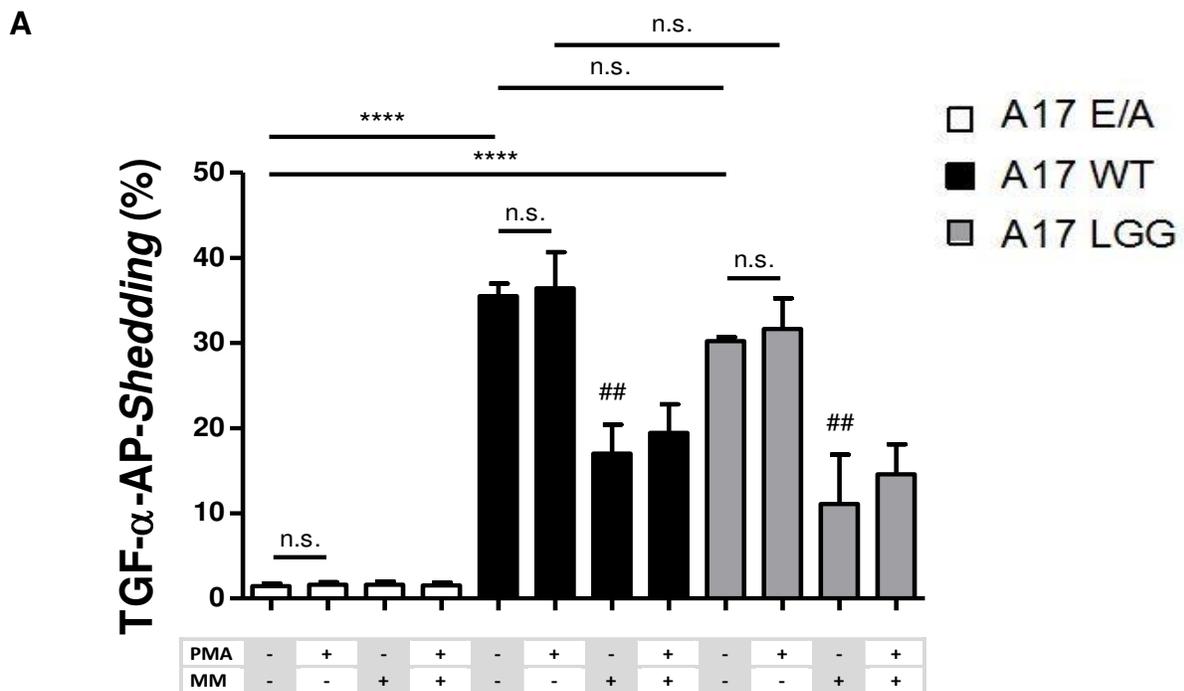


Abbildung 8: Einfluss des ADAM17 GVI-Motivs auf das *Shedding* von TGF- α

A zeigt ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeF-Zellen, welche mit TGF- α -AP transient transfiziert wurden. Parallel dazu wurde entweder ein inaktives ADAM17 (A17 E/A), ein ADAM17 WT (A17 WT) oder das in der Transmembrandomäne sterisch veränderte ADAM17 (A17 LGG) mit *TurboFect*TM Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht. Nach 24 h wurden die zu untersuchenden Zellen entweder 2 h ohne Stimulus belassen, mit 300 ng/ml PMA stimuliert oder mit 10 μ M MM behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Prozentual abgebildet ist das Verhältnis der Aktivität der AP im Zellkulturüberstand zur Gesamtaktivität nach Korrektur der Rohdaten um die Messwerte der untransfizierten Zellen. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des TGF- α -AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# p \leq 0,05; **/## p \leq 0,01; ***/### p \leq 0,001; ****/#### p \leq 0,0001; n.s. nicht signifikant.

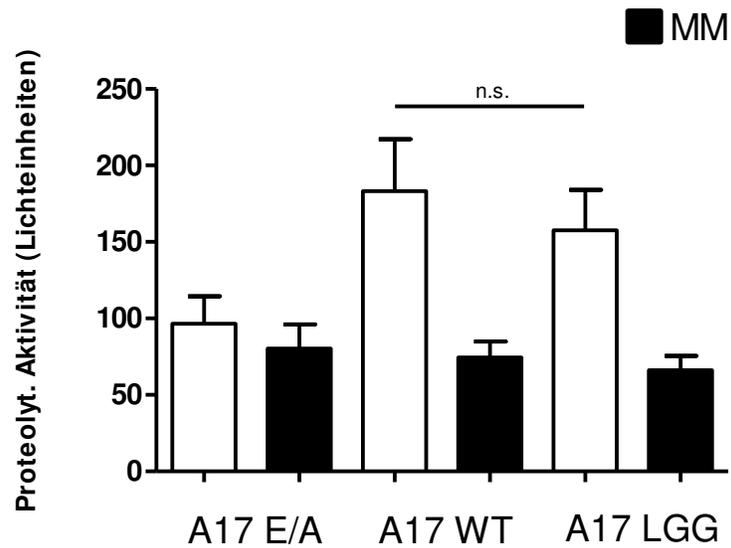
B bildet exemplarisch einen *Western Blot* ab, durch den die gleichmäßige Proteinexpression der verschiedenen Proteasen kontrolliert wurde. Die ADAMs wurden über ihren HA-tag angefärbt. Als Ladekontrolle wurde Beta-Tubulin angefärbt. Unt. = untransfizierte Kontrolle.

In der Abbildung 8, A stellt ein signifikant gesteigertes *Shedding* durch A17 WT und durch A17 LGG im Vergleich zu A17 E/A dar. PMA führte weder bei A17 E/A, A17 WT noch bei A17 LGG zu einer signifikanten Zunahme des TGF- α *Sheddings*. Der Unterschied in der Freisetzung der TGF- α Ektodomänen durch A17 WT und A17 LGG war sowohl unter konstitutiven als auch unter PMA-stimulierten Bedingungen statistisch nicht signifikant. Abbildung 8, B stellt ein ähnliches Expressionsmuster für A17 WT und A17 LGG dar. A17 E/A scheint minimal schwächer exprimiert worden zu sein.

5.4 Untersuchung der proteolytischen Aktivität und der Proteinexpression von Chimären und ADAM17 WT

Um auszuschließen, dass die in den vorherigen Experimenten festgestellten Unterschiede im *Shedding* durch eine geringere Expression bzw. eine geringere katalytische Aktivität der A17 LGG-Mutante zustande gekommen waren, wurden die Proteasen, wie im Kapitel 4.2.5 beschrieben, in vier unabhängigen Versuchen im Fluoreszenz-Peptid-Substrat-Assay untersucht.

A



B

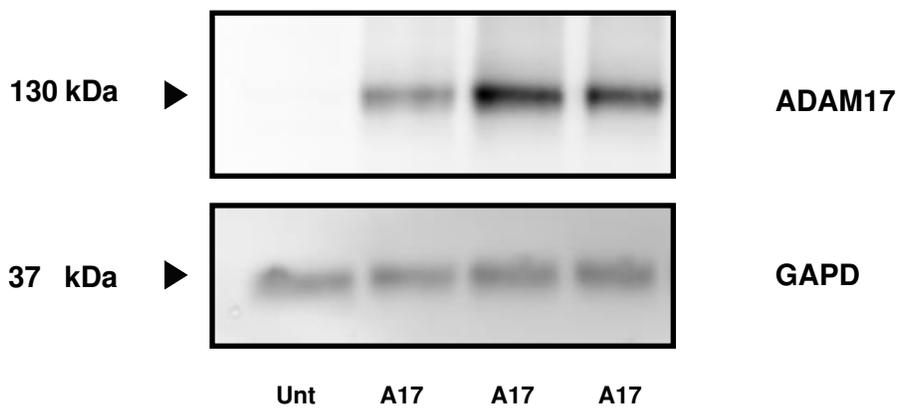


Abbildung 9: Aktivitätstest von ADAM17 E/A, ADAM17 WT und ADAM17 LGG

A COS-7 Zellen wurden mit inaktivem ADAM17 E/A (A17 E/A), dem normal aktiven ADAM17 WT (A17 WT) und dem in der Transmembrandomäne mutierten ADAM17 LGG (A17 LGG) transient transfiziert. Nach 24 h wurden 5 μ M ADAM *fluorogenic substrate* für 3 h zugegeben. Der Breitband-Metalloprotease-Inhibitor MM wurde 15 min vor Substratzugabe in einer Konzentration von 10 μ M zu den Zellen gegeben. Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. n.s. nicht signifikant.

B Abbildung eines exemplarischen *Western Blots*, durch den die Proteinexpression der verschiedenen Proteasen gezeigt wird. Die ADAMs wurden über ihren HA-tag angefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH angefärbt. Unt. = untransfizierte Kontrolle.

In Abbildung 9, A ist zu sehen, dass es keinen signifikanten Unterschied in dem ADAM *fluorogenic substrate Shedding* zwischen ADAM17 WT und der Transmembran-Mutante ADAM17 LGG gab. Dass diese Aktivität auf die retransfizierten ADAMs zurückzuführen war, wurde durch das niedrige konstitutive *Shedding* durch ADAM17 E/A deutlich. Dass diese Ergebnisse nicht durch eine unterschiedliche Proteinexpression zustande kamen, wurde durch den *Western Blot* in Abbildung 9, B exemplarisch gezeigt. ADAM17 WT wurde gering stärker exprimiert als die in der Transmembrandomäne sterisch veränderte A17 LGG-Protease. Diese stärkere Expression könnte die etwas höher gemessene proteolytische Aktivität von ADAM 17 WT im Vergleich zum ADAM17 LGG teilweise erklären. ADAM17 E/A wurde hier einmalig im *Western Blot* schwach dargestellt.

Neben den Untersuchungen durch das Fluoreszenz-Peptid-Substrat Assay wurde die Immunzytochemie zur Kontrolle der Proteinexpression herangezogen. Dazu wurde wie in Kapitel 4.2.7 beschrieben, vorgegangen. Mittels des konfokalen Fluoreszenzmikroskops konnten die Proteine und die DNA dargestellt werden.

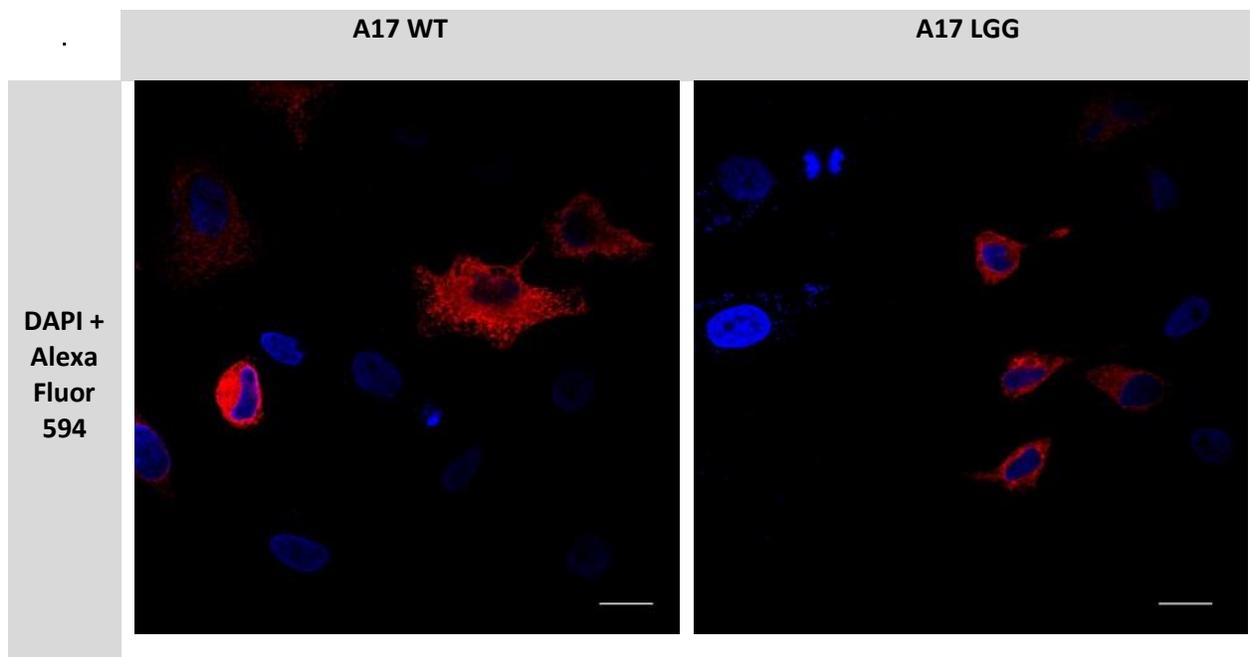


Abbildung 10: Gleichmäßige Expression von ADAM17 WT und ADAM17 LGG in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in 12-*well*-Zellkulturplatten auf Deckgläsern ausgesät und nach 24 h mit ADAM17 WT oder mit ADAM17 LGG transfiziert. Unter Lichtschutz wurde nach weiteren 24 h die Färbung durchgeführt. Der erste Antikörper (Kaninchen, anti HA-tag, H6908) wurde 1:200 verdünnt angewendet. Der aus dem Esel gewonnene Anti-Kaninchen-Zweitantikörper, welcher an den Farbstoff Alexa Flour 594 (rot) gekoppelt ist, wurde in der Verdünnung 1:800 eingesetzt. Nach der Eindeckung mit Mowiol^{+/+} wurden die Zellen mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Der weiße Balken entspricht 20 μm .

Sowohl ADAM17 WT als auch ADAM17 LGG wurden rot angefärbt und waren von den Zellen ubiquitär exprimiert. Die etwas unterschiedliche Morphologie der Zellen könnte auf die zweidimensionale Darstellung zurückzuführen sein. Die Zellkerne und die darin gelegene DNA wurde mit DAPI in blau markiert.

Um die Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche, wo sie vermutlich hauptsächlich aktiv sind, näher zu untersuchen, wurde die Durchflusszytometrie zur Hilfe genommen. Es wurden 15×10^4 ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeF-Zellen in 12-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und, wie in Kapitel 4.2.8 beschrieben, nach 24 h mit ADAM17 WT und ADAM17 LGG retransfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 150 μl Accutase pro *well* abgelöst und die Reaktion mit 500 μl PBS + 5 % FCS (v/v) abgestoppt. Es wurden 2×10^5 Zellen ausgezählt und in einem Volumen von 100 μl PBS + 1 % BSA überführt. Dazu wurde entweder K133 Immunsereum (Kaninchen) entsprechend einer 1:100 Verdünnung gegeben oder die Zellen ohne Immunsereum belassen und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen wurden diese in 500 μl PBS + 1 % BSA (v/v) resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihrer Oberflächenexpression von ADAM17 WT und ADAM17 LGG untersucht.

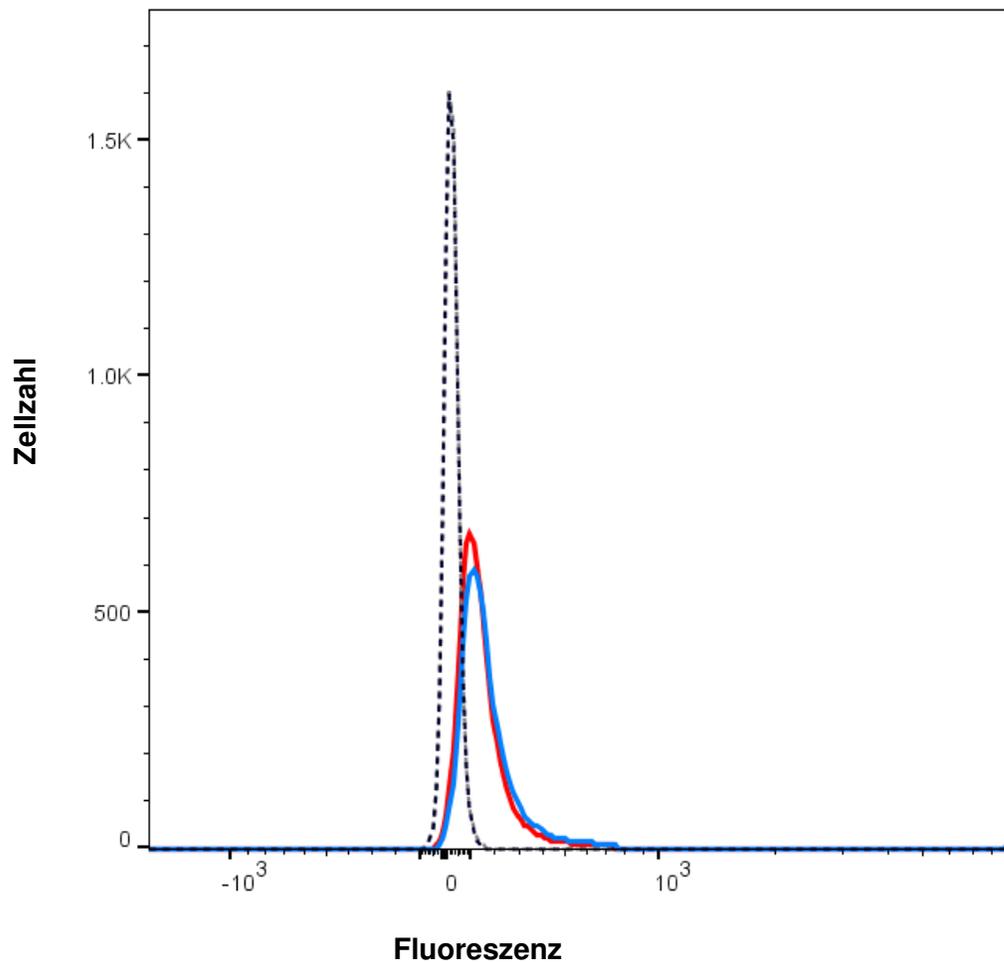


Abbildung 11: Retransfiziertes ADAM17 WT und auch ADAM17 LGG sind in vergleichbarem Maße auf der Zelloberfläche von ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren

Die grau gestrichelte Linie stellt A17 LGG und die schwarz gestrichelte Line A17 WT jeweils ohne Färbung dar. Die blaue Kurve zeigt mit K133 Immunserum angefärbtes A17 WT und die rote Kurve mit K133 Immunserum angefärbtes A17 LGG.

Durch die Einbringung von Mutationen in ADAM17 wäre es denkbar, dass dessen Transport zur Zelloberfläche beeinträchtigt werden könnte. Dadurch könnte sekundär das Aktivitätsmuster verändert werden. Die Durchflusszytometrie zeigte, dass der Transport der A17 LGG-Variante zur Zelloberfläche im Vergleich zur A17 WT-Protease sehr ähnlich war.

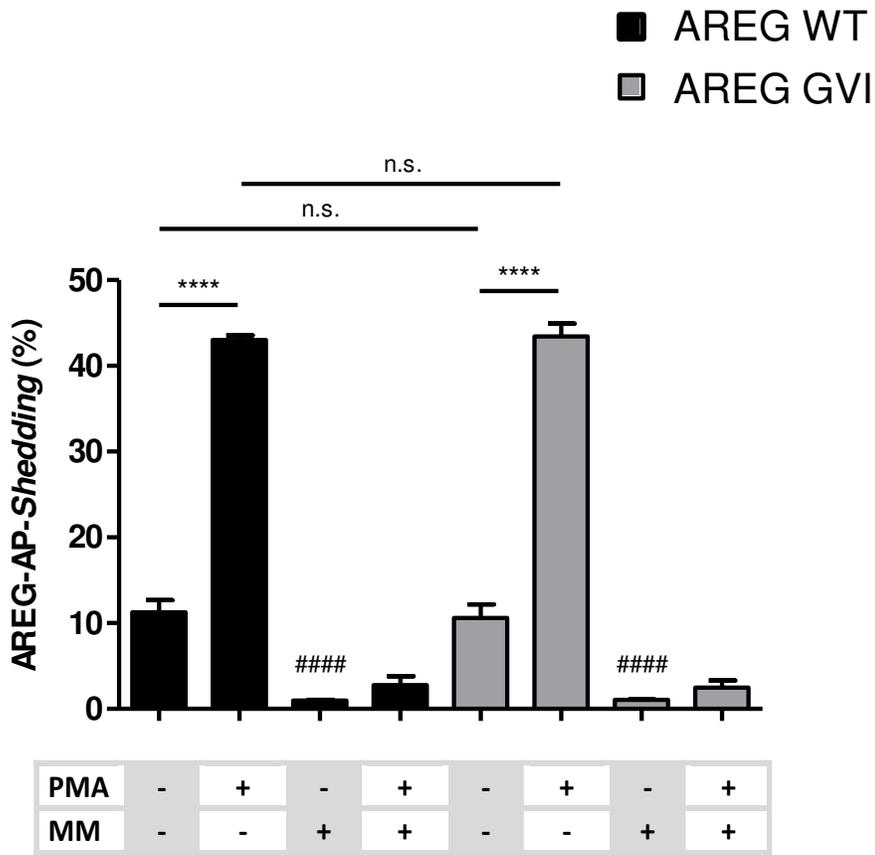
Anzumerken ist, dass eine Isotyp-Kontrolle mit IgG-Antikörpern noch parallel hätte durchgeführt werden müssen. Die Methode der Biotinylierung wäre eine weitere Möglichkeit gewesen, um die Oberflächenexpression der verschiedenen ADAM17-Varianten zu untersuchen.

5.5 Die Transmembrandomäne von Amphiregulin und ihre Rolle für die Substratinteraktion

Auf Grund des signifikant reduzierten *AREG-Sheddings* durch die ADAM17 LGG-Transmembran-Mutante stellte sich die Frage, ob sich diese Reduktion auch dann einstellen würde, wenn das Interaktionsmotiv innerhalb der Transmembrandomäne des Substrats verändert werden würde. Dazu wurde AREG mit dem *QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kit* nach den oben genannten Angaben und unter Verwendung der entsprechenden *Primer* sterisch verändert. Das LAS-Motiv von AREG (AREG WT), welches das GVI-Motiv von A17 WT hypothetisch sterisch ergänzt, wurde durch Mutagenese zum GVI-Motiv (AREG GVI). Dadurch sollte die potenzielle Interaktion von Substrat und Protease in der Plasmamembran gestört werden und das *Shedding* abnehmen.

Zunächst wurden AREG WT und AREG GVI in *Shedding*-Experimenten in COS-7 Zellen näher untersucht.

A



B

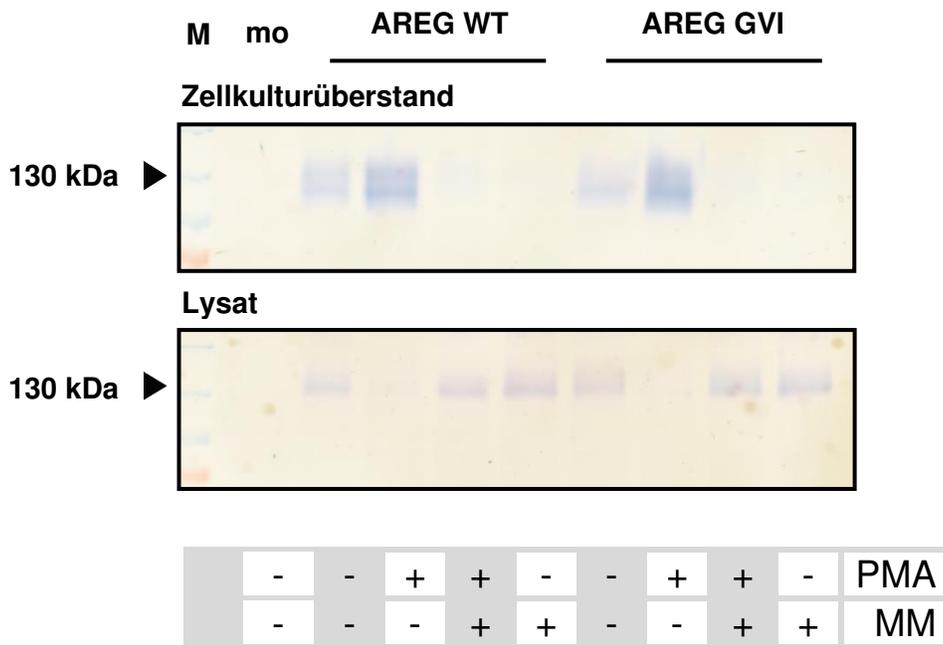


Abbildung 12: *Shedding*-Experimente mit Wildtyp- und in der Transmembrandomäne mutiertem Amphiregulin in COS-7 Zellen

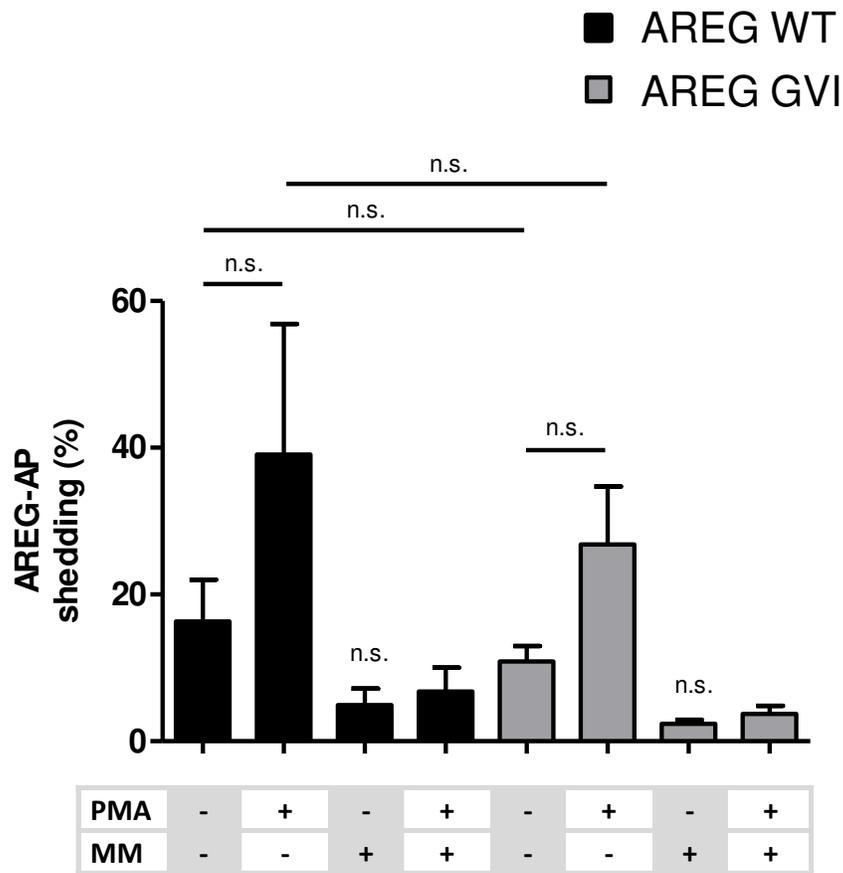
A Das Wildtyp-AREG-AP Plasmid (AREG WT) oder das in der Transmembrandomäne mutierte AREG-AP Plasmid (AREG GVI) wurden in COS-7 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde das konstitutive, das mit 300 ng/ml PMA-stimulierte und das mit 10 μ M MM inhibierte *Shedding* für einen Zeitraum von 2 h untersucht. Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$; n.s. nicht signifikant.

B zeigt exemplarisch ein AP-Gel. Die erste Spur des Gels ist der Marker (M), die zweite Spur die Negativkontrolle (mo) und die anderen Spuren stellen die Expression der beiden Substrate im Zellkulturüberstand und im Zelllysate dar. Das Versuchsprotokoll ist in Kapitel 4.2.4 erläutert.

Abbildung 12, A zeigt keinerlei Unterschiede im AREG-*Shedding* in COS-7 Zellen durch AREG WT und durch das in der Transmembrandomäne veränderten AREG GVI. Dies war am gleichmäßigen konstitutiven *Shedding* und auch an der jeweils durch PMA signifikant gesteigerten und durch MM im Verhältnis dazu signifikant reduzierten AREG-Freisetzung zu sehen.

AP-Gele wurden zur Kontrolle der Proteinexpression herangezogen. Abbildung 12, B zeigt exemplarisch, dass das mutierte AREG GVI sehr ähnlich in der Proteinexpression zum AREG WT war. Das *Shedding* von AREG GVI war unter konstitutiven, stimulierten und auch inhibierten Bedingungen sehr ähnlich zum AREG WT. Da die funktionellen *Shedding*-Experimente hier keinerlei Unterschiede zeigten, es aber durch die vorherigen Versuche klar war, dass das untersuchte AREG im Besonderen durch murines ADAM17 prozessiert wurde, wurden diese Versuche mit MeFs wiederholt.

A



B

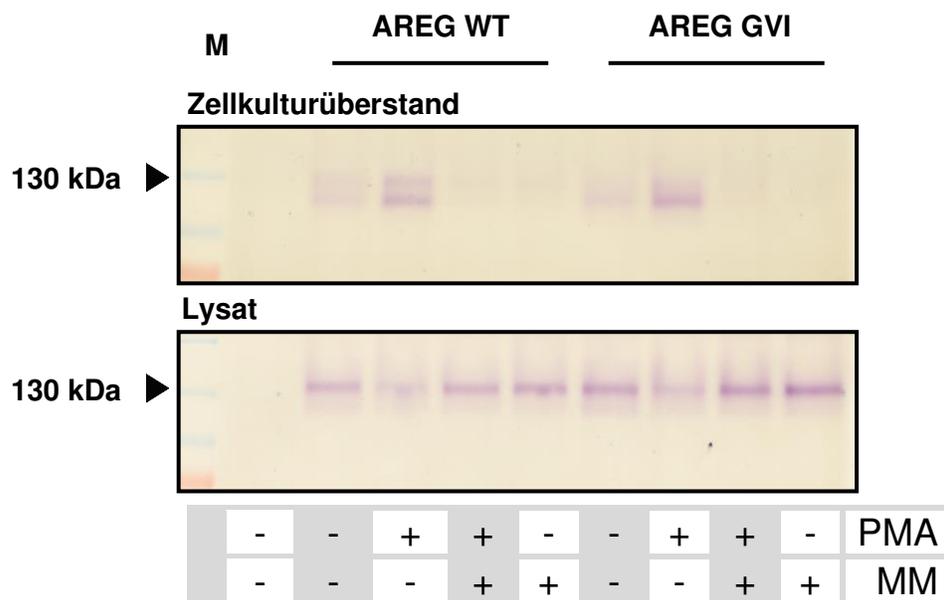


Abbildung 13: *Shedding*-Experimente mit Wildtyp- und in der Transmembrandomäne mutierten Amphiregulin in MeFs

A Wildtyp-AREG-AP Plasmid (AREG WT) oder das in der Transmembrandomäne mutierte AREG-AP Plasmid (AREG GVI) wurden in MeF-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde das konstitutive, das mit 300 ng/ml PMA-stimulierte und das mit 10 μ M MM inhibierte *Shedding* für einen Zeitraum von 2 h untersucht. Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$; n.s. nicht signifikant.

B zeigt exemplarisch ein AP-Gel. Die erste Spur des Gels ist der Marker (M), die zweite Spur die Negativkontrolle (mo) und die anderen Spuren stellen die Expression der beiden Substrate dar. Das Versuchsprotokoll ist in Kapitel 4.2.4 erläutert.

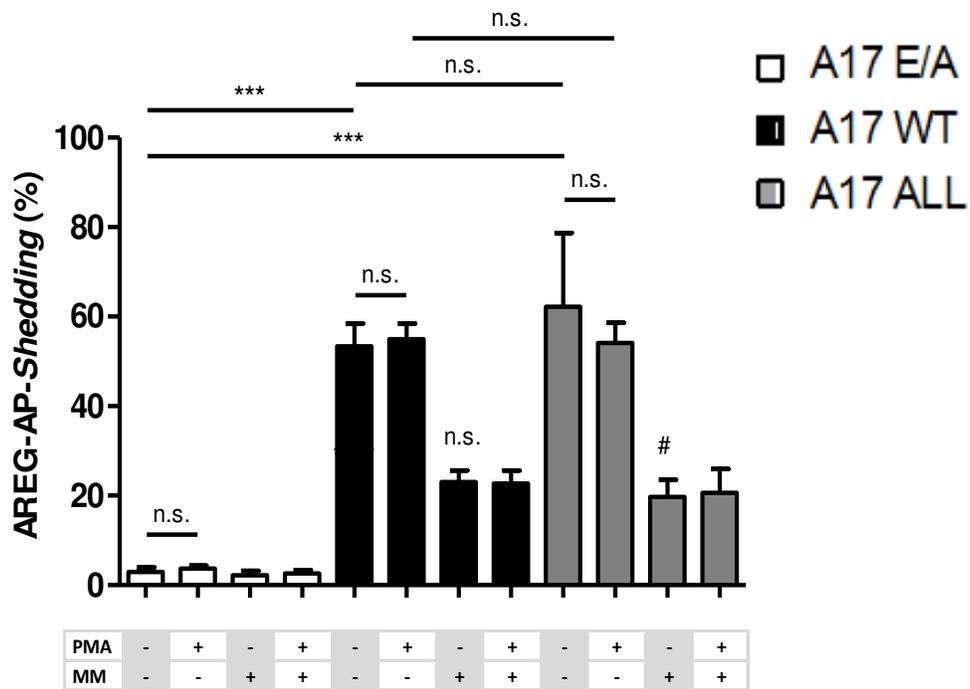
Abbildung 13, A zeigt ein deutliches, jedoch nicht signifikant reduziertes AREG-*Shedding* durch das in der Transmembrandomäne veränderte AREG GVI-Substrat im Vergleich zum Wildtyp-Substrat. Dies betraf sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte *Shedding*. MM konnte das *Shedding* für beide Substrat-Varianten deutlich im Vergleich zu den mit PMA-stimulierten Proben reduzieren. Das in Abbildung 13, B dargestellte AP-Gel zeigt eine Abnahme für die konstitutive und auch für die mit PMA-stimulierte Freisetzung von AREG GVI im Vergleich zum AREG WT im Zellkulturüberstand. Unter inhibierten Bedingungen war im Zellysat von AREG GVI im Vergleich zu AREG WT mehr AREG-AP zu sehen. Entsprechend ist im Zellkulturüberstand das Gegenteil zu sehen. Die Proteinexpression der beiden Substrate war gleichmäßig.

5.6 Das artifizielle Konsensus-Motiv der Transmembrandomäne von ADAM17

Abschließend wurde eine weitere Mutante erzeugt, um das Studiendesign und die Rolle des konservierten GVI-Motivs (winzig-groß-groß-Motiv) zu prüfen. Das Plasmid, welches für das sterisch dem Wildtyp-ähnliche Protein codierte, wurde durch einen Austausch der entsprechenden Basen durch eine zweistufige Mutagenese mit dem *QuickChange® II Site-directed Mutagenesis-Kit* erzeugt. Das ursprüngliche GVI-Motiv (winzig-groß-groß-Motiv) von ADAM17 WT wurde dann durch das Motiv ALL (winzig-groß-groß-Motiv) in

ADAM17 ALL ersetzt. Bei dieser Mutagenese wurden die Aminosäuren vom ADMA17 WT durch Aminosäuren mit nahezu gleicher Grundstruktur und damit verbundenen sehr ähnlichen sterischen Charakteristika ersetzt. Es handelte sich dabei also um ein Konsensus-Motiv. ADAM17 ALL und ADAM17 WT wurden in *Shedding*-Experimenten mit dem Substrat AREG verglichen.

A



B

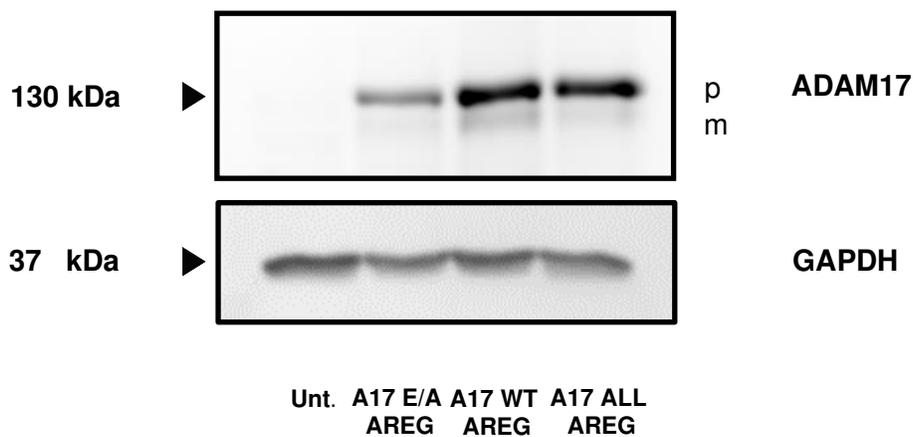


Abbildung 14: Das Motiv der ADAM17 Transmembrandomäne ist als Konsensus-Motiv zu bezeichnen

A stellt ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeF-Zellen dar, welche mit AREG-AP transient transfiziert wurden. Parallel dazu wurde entweder ein inaktives ADAM17 (A17 E/A), ein ADAM17 WT (A17 WT) oder das in der Transmembrandomäne sterisch veränderte ADAM17 (A17 ALL) mit *TurboFect*TM Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht. Nach 24 h wurden die zu untersuchenden Zellen entweder 2 h ohne Stimulus belassen, mit 300 ng/ml PMA stimuliert oder mit 10 μM MM behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Prozentual abgebildet ist das Verhältnis der Aktivität der AP im Zellkulturüberstand zu der Gesamtaktivität nach Korrektur der Rohdaten um die Messwerte der untransfizierten Zellen. Die Versuche wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Post-hoc-Test* ausgewertet. Sterne kennzeichnen eine signifikante Zunahme des AREG-AP-*Sheddings*, Rauten kennzeichnen eine signifikante Inhibition in Bezug auf den zugehörigen Stimulus. */# p ≤ 0,05; **/## p ≤ 0,01; ***/### p ≤ 0,001; ****/#### p ≤ 0,0001; n.s. nicht signifikant.

B bildet exemplarisch einen *Western Blot* ab, durch den die Proteinexpression der verschiedenen Proteasen kontrolliert wurde. Die ADAMs wurden über ihren HA-tag angefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH angefärbt. p= unreifes ADAM17, m= reifes ADAM17; Unt. = untransfizierte Kontrolle.

Abbildung 14 stellt die unter konstitutiven Bedingungen signifikant gesteigerte AREG-Freisetzung durch A17 WT und A17 ALL im Vergleich zu A17 E/A dar. Darüber hinaus zeigt diese Abbildung das etwa im gleichen Ausmaß stattfindende *Shedding* durch A17 WT und A17 ALL unter konstitutiven Bedingungen. Die PMA-Stimulation hatte hier auf beide Proteasen keinen Effekt. Das *Shedding* wurde durch MM für die A17 WT und auch A17 ALL zu mehr als 50 % inhibiert. Das diese Ergebnisse nicht durch eine unterschiedliche Proteinexpression zustande gekommen sind, wurde durch den *Western Blot* in Abbildung 14, B exemplarisch gezeigt. A17 WT und auch die A17 ALL-Protease stellten sich in dem *Western Blot* in einem sehr ähnlichen Expressionsmuster dar.

6. DISKUSSION

Bei den ADAMs handelt es sich um eine Klasse von Enzymen, die in vielen Organismen von entscheidender Bedeutung sind. Kommt es zu einer Fehlregulation der ADAM vermittelten Signalwege, können pathologische Prozesse wie die Onkogenese, die Metastasierung und inflammatorische Prozesse resultieren (Arribas & Esselens 2009; Chalaris *et al.* 2010). ADAM10 ist im Besonderen für die Freisetzung von Betacellulin und EGF verantwortlich. ADAM17 wird als die wichtige *Sheddase* für Epiregulin, TGF- α , AREG und HB-EGF angesehen (Sahin *et al.* 2004). Die Proteasen verfügen aber noch über eine Vielzahl an weiteren Substraten (Hartmann *et al.* 2002; Weskamp *et al.* 2006; Arribas & Esselens 2009; Kuhn *et al.* 2010; Scheller *et al.* 2011). Mäusen, denen ADAM17 fehlt, sterben vor der Geburt und ähneln Mäusen, denen entweder TGF- α (Mann *et al.* 1993), HB-EGF (Iwamoto *et al.* 2003; Jackson *et al.* 2003) oder der EGF-Rezeptor fehlt (Miettinen *et al.* 1995; Sibia & Wagner 1995; Threadgill *et al.* 1995; Peschon *et al.* 1998).

Die ADAM17 vermittelte Proteolyse stellt einen unumkehrbaren Prozess dar, welcher die molekulare Grundlage für die Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren oder ihrer Rezeptoren von der Zelloberfläche bildet. Es stellt sich daher die zentrale Frage, wie eine Substratspezifität zustande kommt. Dazu muss verstanden werden, wie ADAM17 seine Substrate spezifisch erkennt und welche Strukturen von ADAM17 bzw. dessen Substrats dafür verantwortlich sind. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß und auch andere Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass die Transmembrandomäne hierfür von entscheidender Bedeutung sein könnte. Beispielsweise wird in einer Studie von Li und Kollegen gezeigt, dass die Aminosäuresequenz der ADAM17 Transmembrandomäne eine zentrale Rolle für die Substraterkennung einnimmt.

Zudem ist bekannt, dass die schnelle und posttranslationale Aktivierung von ADAM17 und die damit verbundene EGFR-Liganden Freisetzung nicht ohne dessen Transmembrandomäne stattfinden kann (Le Gall *et al.* 2010). Dies könnte zudem auf eine mögliche Regulation der Protease durch noch unbekannte membrangebundene Proteine hinweisen (siehe Kapitel 2.1.3).

Durch die Identifikation der spezifischen Substratbindestellen könnten neue, gezieltere und nebenwirkungsärmere Behandlungsmethoden geschaffen werden.

Als Ziel dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welcher Weise die Transmembrandomäne von ADAM17 bzw. die Transmembrandomänen seiner Substrate wichtig für die Regulation des *Shedding*-Prozesses sind.

6.1 Die Transmembrandomäne von ADAM17 und ihre Rolle für die Substraterkennung

Zuerst wurde die Transmembrandomäne von ADAM17 und die von bekannten ADAM17 Substraten auf mögliche wichtige Bereiche, welche eine Interaktion innerhalb der Transmembrandomäne bewirken könnten, untersucht. Dabei wurde nach bereits identifizierten Schemata für Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Plasmamembran gesucht und mit den Sequenzen der Substrate und der Protease verglichen. Ein bedeutendes Schema beruht auf dem von Berger und Kollegen beschriebenen Modell der Interaktion zweier Intergin-Subfamilien. Eine günstige geometrische Anordnung der Aminosäuren der Transmembrandomänen bildet dabei die Grundlage für die auf einer günstigen Sterik beruhenden Interaktion. Entscheidend beteiligt sind dabei drei Aminosäuren-Paare, welche die molekulare Grundlage für eine komplementäre Anordnung der interagierenden Helices bilden. Dies führt durch die Anordnung und die Eigenschaften der Aminosäuren zur Entstehung eines konservierten Motivs. Hinsichtlich ihrer Anordnung steht fest, dass die Positionierung an den Stellen n (n sei die erste am Motiv beteiligte Aminosäure), $n+4$ und $n+8$ wesentlich für das Motiv ist. Bezüglich der Eigenschaften der Aminosäuren lässt sich festhalten, dass besonders deren Sterik von Bedeutung ist. Im Einzelnen heißt das, dass sich die gegenüberliegenden Aminosäuren-Paare in den Helices der interagierenden Proteine hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Struktur in einem als klein-groß-Motiv zu bezeichnendem Schema ergänzen (Berger *et al.* 2009). Nach ausführlichen Analysen erschien es möglich, dass dieses Motiv in einer ähnlichen Form auch einen Beitrag an der spezifischen Interaktion von ADAM17 und einigen von dessen Substraten leisten könnte. Die Interaktion, welche hier auf dem konservierten GVI-Motiv (winzig-groß-groß-Motiv) von ADAM17 WT und den dazu komplementär angeordneten Aminosäuren seiner Substrate beruhen könnte, sollte durch

Mutagenese zum sterisch entgegengesetzten LGG-Motiv (groß-winzig-winzig-Motiv) verändert werden. Die dadurch entstehenden Auswirkungen auf die Substrat-Freisetzung sollten in verschiedenen Versuchen erfasst werden.

In den ersten Versuchen kamen ADAM10/17^{-/-}-doppel-*Knockout*-MeFs zum Einsatz. Diese *Knockout*-Zellen lieferten eine ideale Grundlage für Überexpressionsversuche von AP-gekoppelten Substraten von ADAM17 in Verbindung mit verschiedenen ADAM17-Chimären. Die Verwendung dieser Zellen war unter anderem daher wichtig, weil für Fibroblasten, welchen nur ADAM17 aber kein ADAM10 fehlt, gezeigt werden konnte, dass auch durch ADAM10 ADAM17 spezifische Substrate freigesetzt werden können (Le Gall *et al.* 2009). Durch Verwendung dieser ADAM10/17^{-/-}-doppel-*Knockout*-Zellen kann also ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf ADAM10 zurück zu führen sind.

Das zuerst untersuchte Substrat war AREG. AREG wurde mit den verschiedenen ADAM17 Chimären in ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs transfiziert. Abbildung 6 zeigt das unterschiedliche AREG-*Shedding* durch ADAM17 WT, ADAM17 TTKT, ADAM17 LGG und ADAM17 E/A. Zunächst war festzustellen, dass das *Shedding* durch ADAM17 TTKT, welches über die Transmembrandomäne von ADAM10 verfügte, unter konstitutiven Bedingungen im Vergleich zu ADAM17 WT signifikant reduziert war. Höchst bemerkenswert ist, dass dies ebenfalls für ADAM17 LGG zu beobachten war, obwohl in dessen Transmembrandomäne nur drei Aminosäuren ausgetauscht wurden. Unter Berücksichtigung der absoluten Zahlen war diese Reduktion durch ADAM17 LGG jedoch geringer als die durch ADAM17 TTKT. Die Stimulation durch PMA führte zu einer signifikanten Zunahme des *Sheddings* durch ADAM17 WT und ADAM17 LGG. Dies konnte jedoch nicht durch ADAM17 TTKT beobachtet werden. Das könnte dafürsprechen, dass die Transmembrandomäne von ADAM17 wichtig für das durch PMA-stimulierte *Shedding* sein könnte. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den von Le Gall und Kollegen gemachten Beobachtungen, dass die Transmembrandomäne von ADAM17 für dessen schnelle posttranslationale Aktivierung essenziell ist (Le Gall *et al.* 2010). Die signifikant geringere Aktivität von ADAM17 E/A im Vergleich zur ADAM17 WT spricht dafür, dass die gemachten Beobachtungen auf die Retransfektion der Proteasen zurückzuführen sind.

In dieser Arbeit fiel das PMA-stimulierte *Shedding* für die verschiedenen Proteasen und Substrate teils unterschiedlich stark aus. Hierfür gibt es derzeit keine eindeutige Erklärung. Zudem ist die Literatur widersprüchlich. Während einige Studien darauf hindeuten, dass weder die Transmembran- noch die Zytoplasmatische Domäne für das mit PMA-stimulierte *Shedding* von ADAM17 notwendig seien (Doedens *et al.* 2003; Horiuchi *et al.* 2007b), gibt es andere Studien, welche mit den hier gewonnenen Ergebnissen übereinstimmen und für eine Rolle der Transmembrandomäne von ADAM17 beim PMA-induzierte *Shedding* sprechen (Le Gall *et al.* 2010).

AREG ist ein entscheidender Wachstumsfaktor, der für die Entstehung der Gangsysteme der Brustdrüsen säugender Lebewesen verantwortlich ist (Luetkeke *et al.* 1999). Um den EGFR aktivieren zu können, muss AREG durch ADAM17 freigesetzt werden (Sternlicht *et al.* 2005). Dreifach-*Knockout*-Mäuse, denen ADAM9, -12 und -15 fehlt, sind in der Lage ihren Nachwuchs zu säugen. Daraus schließt die Arbeitsgruppe, dass ADAM17 die einzige physiologische *Sheddase* für AREG ist. Darüber hinaus schlussfolgern sie, dass ADAM17 unabhängig von anderen ADAMs reguliert werden (Sternlicht & Sunnarborg 2008). Bei menschlichem Mammakarzinom kann häufig eine Hochregulation von ADAM17, AREG, TGF- α und des EGFRs beobachtet werden. Eine erhöhte Expression von TGF- α und der EGFRs ist tendenziell mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit beim Mammakarzinom verbunden (Lejeune *et al.* 1993; Umekita *et al.* 2000; Lin *et al.* 2001; Borrell-Pagès *et al.* 2003; Desruisseau *et al.* 2004; Lendeckel *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu führt die erhöhte Expression von AREG zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit. Beim EGFR-abhängigen Brustkrebses könnte sich trotzdem die Inhibition von ADAM17 als nützlich erweisen (Kenny & Bissell 2007).

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, könnte ein Teil der Erklärung für das unterschiedliche AREG-*Shedding* durch die ADAM17 Chimären in den einzelnen Aminosäuresequenzen der verschiedenen Transmembrandomänen selbst liegen. Vergleicht man die Transmembrandomänen von der Protease und seinem Substrat, stellt man fest, dass AREG zu den Substraten zählt, welche auf Grund der Aminosäuresequenz vermutlich durch eine sterische Ergänzung der ADAM17-Transmembrandomäne mit dieser in Interaktion treten könnten. Dadurch könnte die Prozessierung durch ADAM17 begünstigt werden. Dies ist höchstwahrscheinlich für ADAM17 LGG auf Grund seiner

gegensätzlichen Sterik weniger gut möglich. Die geringere Freisetzung von AREG durch ADAM17 LGG könnte dadurch erklärt werden. Die gleichmäßige Proteinexpression von der Proform und dem reifen ADAM17 wurde durch *Western Blots* verifiziert. Dies spricht dafür, dass die Beobachtungen nicht auf eine unterschiedliche Proteinexpression zurückzuführen sind.

Die folgenden *Shedding*-Experimente wurden mit dem Substrat HB-EGF durchgeführt. Bei diesem Substrat handelt es sich, wie auch bei AREG, um ein Substrat, welches auf Grund seiner Aminosäuresequenz theoretisch mit ADAM17 WT in Interaktion treten könnte. Für das *Shedding* von HB-EGF beobachtet man allerdings keine signifikante Veränderung im Vergleich von ADAM17 WT und ADAM17 LGG. Dies betraf sowohl das konstitutive als auch das PMA-stimulierte *Shedding*. Lediglich eine leichte Reduktion des *Sheddings* durch ADAM17 LGG war im Vergleich zu ADAM17 WT zu beobachten. Sehr eindrücklich war hier jedoch die für ADAM17 WT und auch für ADAM17 LGG signifikante Zunahme des *Sheddings* unter PMA-Stimulation.

Lösliches HB-EGF ist für die Migration von Keratinozyten und für die Wundheilung der Haut von entscheidender Bedeutung. Durch einen Metalloprotease-Inhibitor, der die Freisetzung von EGFR-Liganden verhindert, wird die Zellmigration und die Wundheilung *in vitro* und *in vivo* verhindert (Tokumaru *et al.* 2000). Darüber hinaus ist HB-EGF bedeutend für die Entwicklung des Herzens (Jackson *et al.* 2003; Yamazaki *et al.* 2003). In einem Maus-Modell zur Untersuchung der Myokardhypertrophie konnte gezeigt werden, dass diese durch den Einsatz von Metalloprotease-Inhibitoren verhindert werden kann (Asakura *et al.* 2002). Neben ADAM17 sind ADAM9, -10 und -12 an der Prozessierung von HB-EGF beteiligt (Sahin *et al.* 2004). Es wäre deshalb durchaus möglich, dass bei diesen Versuchen ADAM9 und -12 einen kompensatorischen Einfluss auf die Freisetzung von HB-EGF hatten. Neben diesen möglicherweise ebenfalls beteiligten ADAMs könnten auch eine Reihe an Hilfsproteinen hier eine Rolle für das *Shedding* haben. Für die Freisetzung von HB-EGF durch ADAM10 spielt deren Interaktion mit Tetraspanin CD9 eine wichtige Rolle (Yan *et al.* 2002). Die *N-arginine dibasic convertase* verstärkt die Freisetzung von HB-EGF durch ADAM17 (Nishi *et al.* 2006). Die Proteinexpression der ADAM17 Chimären in Verbindung mit dem Substrat HB-EGF stellte sich zudem als nicht gleichmäßig dar (siehe Abbildung 7, B). ADAM17 LGG war hier

geringer exprimiert als ADAM17 WT. Dies könnte mitverantwortlich für die geringere HB-EGF Freisetzung durch ADAM17 LGG gewesen sein.

Anschließend wurde das Substrat TGF- α in *Shedding*-Experimenten untersucht. Auf Grund der Sequenzanalysen handelt es sich bei TGF- α um ein Substrat, welches vermutlich unabhängig vom GVI-Motiv von ADAM17 prozessiert wird. Diese Vermutung wurde durch die Ergebnisse der *Shedding*-Experimente bestätigt. Weder für die konstitutive als auch für die mit PMA-stimulierten Bedingungen konnte eine signifikante Änderung des *Sheddings* im Vergleich von ADAM17 WT und ADAM17 LGG beobachtet werden. Die Proteinexpression stellte sich im *Western Blot* gleichmäßig dar.

TGF- α spielt eine wesentliche Rolle bei der neuronalen Proliferation, Migration und Differenzierung in geschädigten Hirnregionen von erwachsenen Ratten. Sowohl für akute Traumen als auch neurodegenerative Erkrankungen könnte sich daraus ein therapeutischer Nutzen ergeben (Fallon *et al.* 2000). Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermitteln über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Freisetzung von TGF- α durch ADAM17. ATP stimuliert diese ADAM17-abhängige TGF- α Freisetzung in MeFs durch vermehrte ROS Produktion (Myers *et al.* 2009).

Das für HB-EGF und TGF- α beobachtete nicht signifikante, aber gleichmäßige, generell etwas verringerte *Shedding* durch ADAM17 LGG im Vergleich zu ADAM17 WT spiegelt sich auch in den Ergebnissen, welche in Kapitel 5.4 abgebildet sind, wider. Das Fluoreszenz-Peptid-Substrat-Assay zeigte keine signifikanten Unterschiede im *Shedding* des künstlichen Substrats durch ADAM17 WT im Vergleich zu ADAM17 LGG. Zusammenfassend ergab sich das Bild, in dem die ADAM17 LGG-Mutante eine etwas geringere proteolytische Aktivität im Vergleich zu ADAM17 WT besitzt. Der *Western Blot* zum Fluoreszenz-Peptid-Substrat-Assay relativierte dies aber, da er eine etwas geringere Proteinexpression von ADAM17 LGG im Vergleich zu ADAM17 WT zeigte. Das signifikant reduzierte AREG-*Shedding* durch ADAM17 LGG könnte allerdings durchaus auf eine gestörte Protein-Interaktion innerhalb der Plasmamembran zurückführbar sein. Daran angeschlossen stellt sich die Frage, weshalb für das Substrat HB-EGF, welches nach den Analysen in Kapitel 5.1 vollständig mit dem offensichtlichen Interaktionsmotiv von AREG übereinstimmt, keine signifikante Reduktion des ADAM17 LGG-bedingten

Sheddings im Vergleich zu ADAM17 WT zu beobachten war. Ein möglicher Erklärungsansatz wurde schon unter in Kapitel 2.3 geliefert. Bei der Zellmembran und den mit ihr assoziierten Molekülen und Proteinen handelt es sich um ein Flüssig-Mosaik-Modell. Die einzelnen Bestandteile der Plasmamembran können sich beispielsweise neu zusammenlagern, vertikal verschieben oder rotieren. Dadurch ist auch die Funktion der Zellmembran variabel (Singer & Nicolson 1972). Für das Substrat HB-EGF wäre es also durchaus denkbar, dass die gemachten Beobachtungen auf diese zuvor beschriebenen Prozesse zurückzuführen sein könnten.

Ebenfalls gilt zu bedenken, dass es bis heute noch nicht möglich ist, präzise Vorhersagen über die Auswirkungen von eingebrachten Mutationen in Proteine zu treffen. Werden einzelne oder wenige Aminosäuren verändert, die darüber hinaus ähnliche Eigenschaften tragen, wird zumeist von einem grundsätzlich ähnlichen Aufbau der auf die Primärstruktur folgenden Strukturen ausgegangen. Dies gilt sehr wahrscheinlich auch für ADAM17 LGG. Wird diese Mutante mit *InterPro: protein sequence analysis & classification* analysiert, so bildet ihre Transmembrandomäne in der Vorhersage ebenfalls eine α -helikale Struktur analog zu ADAM17 WT.

Bezüglich der Faltung von Transmembranproteinen lässt sich festhalten, dass diese nach Motiv-verändernden Mutationen weit weniger beeinträchtigt sein dürfte als bei wasserlöslichen Proteinen. Dies hat unter anderem damit zu tun, dass die Helices schon vor der eigentlichen Proteinfaltung vorgeformt sind. Darüber hinaus wird die Faltung durch die Insertion des Proteins in die Membran maßgeblich gesteuert und die Abnahme der Entropie während der Faltung für Helices, welche größtenteils aus Aminosäuren mit kleinen Seitenketten bestehen, wie Glycin und Alanin, sehr klein ist (Senes *et al.* 2004).

Es bietet sich ebenfalls an, auf durch andere Proteine gewonnene Erkenntnisse zurückzugreifen, um die Folgen von eingebrachten Mutationen besser abschätzen zu können. Durch einen Mutationsversuch konnte zum Beispiel die Struktur der Laktosepermease gelöst werden. Dabei wurde durch die Mutation eines GxxxC-Motivs zu einem GxxxG-Motiv, entsprechend dem des GpAs, die Grundlage für die Analyse geschaffen. Die Chimäre verhielt sich für die Kristallographie weit besser als das Wildtyp-Protein, da es immer noch Substrate binden konnte, es temperaturstabiler war und keine

Aggregate bildete. In diesem Fall erschien es, als würde die Mutation den Transport des Proteins beeinträchtigen und das Protein in einer Konformation halten. Dementsprechend wurde der Einbringung dieses Glycins hier eine stabilisierende Rolle für die Interaktion beigemessen und auf die besonders nützliche Rolle in Bezug auf Kristallisationsversuche hingewiesen (Senes *et al.* 2004). Man sollte an dieser Stelle auch zu bedenken geben, dass durch die Einbringung einer Mutation in einem komplexen Interaktions-Netzwerk von Proteinen möglicherweise manche Interaktionen gestört werden, während andere gefördert werden könnten.

Mit Bezug zu ADAM17 LGG stellt sich die Frage, ob diese Protease wie die Laktosepermease auch durch die Einbringung von Glycinen in dessen Transport gehemmt wurde und dadurch die veränderte Aktivität zustande kam. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen dieser Arbeit nicht bestätigt. Zwar zeigte sich eine generell etwas verminderte Aktivität von ADAM17 LGG im Vergleich zu ADAM17 WT, die signifikanten Unterschiede bezüglich des *Sheddings* von AREG und die Ergebnisse des Fluoreszenz-Peptid-Substrat-Assays stehen diesem jedoch gegenüber. Auch die Ergebnisse der Immunzytochemie und der Durchflusszytometrie sprechen für einen unbeeinträchtigten Transport der Protease.

Eine mögliche Konformationsänderung im Juxtamembranbereich der ADAM17 LGG-Mutante, welche durch Mutagenese der Transmembrandomäne bedingt sein könnte, sollte ebenfalls bedacht werden. Diese Konformationsänderung könnte Einfluss auf die Substraterkennung haben und die unterschiedlichen Ergebnisse für AREG und HB-EGF zum Teil erklären. Die Interaktion von noch unbekanntem Hilfsproteinen könnte ebenfalls gestört sein.

Um eine Aussage bezüglich der Verlässlichkeit des gewählten Studiendesigns und der Bedeutung des konservierten GVI-Motivs (winzig-groß-groß-Motiv) treffen zu können, wurde eine weitere ADAM17 Chimäre, ADAM17 ALL (winzig-groß-groß-Motiv), erzeugt. Diese Chimäre kodiert für ein Protein, bei dem die Aminosäuren des ursprünglichen GVI-Motivs durch die sehr ähnlichen Aminosäuren des ALL-Motivs ersetzt sind. Die *Shedding*-Experimente zeigten dementsprechend keine signifikante Veränderung für die Freisetzung von AREG bei dem Vergleich von ADAM17 WT und ADAM17 ALL. Dies

betraff sowohl die konstitutiven als auch mit PMA-stimulierten Bedingungen. Dies spricht für ein sehr ähnliches Verhalten von ADAM17 WT und der ADAM17 ALL Chimäre. Damit wurde demonstriert, dass die Transkription, die Translation und der Proteintransport durch die hier eingebrachte Mutation nicht wesentlich beeinflusst sein sollte.

Die Ergebnisse, die in dieser und ähnlichen Arbeiten gewonnen wurden, könnten letztlich entscheidende Hinweise liefern, um das ADAM-vermittelte *Shedding* vollständig zu verstehen. Falls sich die wesentliche Rolle der Transmembrandomäne bewahrheiten sollte, könnte darin ein therapeutischer Nutzen liegen.

Beispielsweise gibt es Peptide, die die Transmembrandomäne des T-Zell-Rezeptors nachbilden und dadurch die Funktion der T-Zellen inhibieren (Manolios *et al.* 1997; Quintana *et al.* 2007). Für die Interaktion der α IIb und der β_3 Integrine kann die Interaktion ebenfalls gestört werden, womit eine spezifische Aktivierung einhergeht. Dazu wurden entsprechende Peptide von Wildtyp-Integrinen verwendet (Yin *et al.* 2006). Es wurde auch ein Algorithmus entwickelt, mit dem die Peptide mit einer größeren Affinität und Spezifität entworfen werden können, um dann spezifisch die Interaktion von Transmembrandomänen zu beeinflussen (Yin *et al.* 2007). Die Krankheits-assoziierten Mutationen in *singlepass* Transmembrandomänen, die bereits beschrieben wurden, verdeutlichen den immensen Stellenwert jeder einzelnen Aminosäure in einer Transmembrandomäne. Erkrankungen, wie die hereditäre sensomotorische Neuropathie (Shy *et al.* 2004), die hypertrophe Kardiomyopathie im Mausmodell (Ohsawa *et al.* 2004), die Achondroplasie und das Multiple Myelom, können beispielsweise die Folge einer solchen Mutation sein (Moore *et al.* 2008). In der Literatur wurde für ADAM17 keine solche Krankheits-assoziierte Mutation beschrieben (Stand 09/2019).

Sollte sich die Rolle der Interaktion zwischen der Transmembrandomäne von ADAM17 und seiner Substrate bestätigen, könnte man in Analogie zu den oben genannten Beispielen eine therapeutische Anwendung entwickeln. Es wäre denkbar, spezifisch die Interaktion von ADAM17 mit einem einzelnen Substrat durch von außen zugefügte Peptide zu inhibieren und so die Freisetzung des Substrates zu blockieren. Eine spezifische Blockierung eines Substrats in pathologischen Prozessen wäre eine sinnvolle Herangehensweise, da Breitband-Metalloprotease-Inhibitoren seither in klinischen

Studien versagt haben. Dies lässt sich unter anderem auf die vielfältigen und auch regenerativen Funktionen von Metalloproteasen zurückführen (Murumkar *et al.* 2010).

Für die Therapie von Autoimmunerkrankungen stellt TNF- α einen sehr wichtigen Angriffspunkt dar. Medikamente, die sich gegen TNF- α richten, werden beispielsweise erfolgreich für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt (Taylor & Feldmann 2009). Durch ihre Fähigkeit, die Entzündungsprozesse auf mehreren Ebenen anzugreifen, wurden die TNF- α Blocker zu sehr wertvollen Werkzeugen, um die durch die Entzündungsprozesse hervorgerufene Gewebeschädigung zu verhindern und eine Regeneration zu ermöglichen. Unglücklicherweise gibt es auch hier Nebenwirkungen. Hierzu gehören beispielsweise ein erhöhtes Risiko für Infektionen, aber auch das neue Auftreten weiterer Autoimmunerkrankungen (Gardam *et al.* 2003; Ramos-Casals *et al.* 2007). Die Häufigkeit solcher Nebenwirkungen kann möglicherweise durch die isolierte Inhibition der TNF/TNFR1 Achse und einer Nichtbeeinflussung des häufig nützlichen TNF/TNFR2 Signalweges reduziert werden. Diese Ansatzweise könnte vielversprechend für die Behandlung weiterer Erkrankungen sein (Kontoyiannis *et al.* 1999).

Während die essenzielle Rolle der Transmembrandomäne von ADAM17 in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, wird auch für die Transmembrandomäne von ADAM10 eine Rolle für die Substraterkennung vermutet (Li *et al.* 2007; Le Gall *et al.* 2010). So sei das durch Ionomycin stimulierte *Shedding* von Betacellulin von der Transmembrandomäne von ADAM10 abhängig (Maretzky *et al.* 2015).

Demgegenüber postulieren andere Arbeitsgruppen, dass die Substraterkennung auch durch andere Proteinbereiche moduliert werden könnte. Aufgrund der Auflösung der Konformation der Kristallstruktur der ADAM-homologen Schlangengiftprotease VAP1 wird vermutet, dass die hypervariable Region der C-förmigen Konformation der ADAM17 Ektodomäne, welche gegenüber dem aktiven Zentrum liegt, für die Substraterkennung zuständig sein könnte (Takeda *et al.* 2006). Allerdings handelt es sich bei der Schlangengift-Protease um ein sekretiertes Protein und der Einfluss einer zusätzlich vorhandenen Transmembrandomäne und Zytoplasmatischen-Domäne wird nicht berücksichtigt.

Auch für die Schnittstelle einiger ADAM Substrate selbst wird eine Funktion für die Substraterkennung diskutiert. Die Spezifität dieser Erkennung ist aber durch den variablen Aufbau der Schnittstellen der einzelnen Substrate und ihrer Toleranz gegenüber Mutationen ebenfalls eher fraglich (Huovila *et al.* 2005).

Für einige wenige Substrate wurden genauere Ergebnisse gewonnen. Die CANDIS-Region von ADAM17 soll für die Substraterkennung von Typ 1 Transmembranproteinen, wie dem Interleukin-6-Rezeptor und dem Interleukin-1-Rezeptor II, zuständig sein (Düsterhöft *et al.* 2014).

Das *Shedding* könnte zudem wesentlich durch die Lokalisation von Substrat und Protease in den verschiedenen Kompartimenten einer jeweiligen Zelle reguliert werden. Für ADAM17 und über die Hälfte seiner Substrate wurde gezeigt, dass die reife Form der Protease verstärkt in *Lipid Rafts* gefunden wird (Tellier *et al.* 2006). Für die Regulation vieler ADAM-Substrate, beispielweise APP (Kojro *et al.* 2001), *Cluster of differentiation* (CD) 30 (von Tresckow *et al.* 2004), Interleukin-6-Rezeptor (Matthews *et al.* 2003) und L-Selektin (Walev *et al.* 2000), wurde gezeigt, dass die Lokalisation innerhalb dieser Cholesterol und Sphingolipid reichen Mikrodomänen essentiell für deren Freisetzung ist.

Hinsichtlich der Lokalisation von ADAM17 muss darüber hinaus ein weiterer Sachverhalt mit einbezogen werden. Wesentlich für den Transport und die Regulation von ADAM17 vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat sind die iRhoms (siehe Kapitel 2.1.3). Durch Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus wahrscheinlich auf einer direkten Interaktion zwischen iRhom2 und ADAM17 beruht. Verschiedene Studien haben eine wesentliche Rolle der ersten Transmembrandomäne von iRhom2 für das *Shedding* von ADAM17 gezeigt. Es wurde eine Punktmutation entdeckt, die wesentlich für das *Shedding* mancher Substrate ist (Siggs *et al.* 2012). Li und Kollegen beobachteten für das konstitutive *Shedding* der von ihnen untersuchten Substrate Kit Ligand 2, Epiregulin und TGF- α in MeFs keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen in denen der Wildtyp von iRhom2 oder die I387F Mutante exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu beobachteten sie wesentliche Unterschiede nach PMA Stimulation. Kit Ligand 2 und Epiregulin konnten durch die iRhom2 I387F Mutante nicht mehr vermehrt freigesetzt werden, während TGF- α unbeeinträchtigt blieb. Zudem hatten

sie versucht durch das Einbringen von Punktmutationen in die Transmembrandomäne von ADAM17 eine spezifische Bindestelle für iRhom 2 zu finden (Li *et al.* 2017). Eine wichtige Rolle der Transmembrandomäne von ADAM17 und der ersten Transmembrandomäne von iRhom2 ist somit sehr wahrscheinlich auch wenn noch weitere Versuche gemacht werden müssen, um die Interaktion vollständig zu verstehen. Für die, von Li und Kollegen gemachten, Beobachtungen in ADAM17 murine embryonale *Knockout*-Fibroblasten muss beachtet werden, dass eine Beteiligung von ADAM10 nicht auszuschließen ist, da die von ihnen verwendeten Zellen nur einen ADAM17 *Knockout* aufwiesen (Le Gall *et al.* 2009).

Dementsprechend könnte spekuliert werden, dass die in dieser Arbeit erzeugten ADAM17 Varianten im Vergleich zum ADAM17 WT in verändertem Maße transportiert werden. Durch die *Western Blots* konnte jedoch eine sehr ähnliche Menge an reifem ADAM17 WT im Vergleich zu ADAM17 LGG festgestellt werden. Daher ist ein veränderter Transport der Proteasen unwahrscheinlich. Wäre der Transport der ADAM17 LGG Variante beeinträchtigt, so läge es nahe, dass für alle getesteten Substrate eine ähnliche Reduktion zu erwarten gewesen wäre. Dies konnte nicht beobachtet werden.

Es wurden zwei weitere Methoden herangezogen, um die Frage bezüglich der Lokalisation und des Transports der hier untersuchten ADAMs genauer beantworten zu können. Die erste Methode mit der die Expression, Lokalisation und der Transport der verschiedenen ADAM17 Varianten näher untersucht werden sollte, war die Immunzytochemie. Dabei wurden die Proteasen überexprimiert und durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper in Hela-Zellen mithilfe ihres HA-tags markiert. Die Proteasen stellten sich durch den Anti-Kaninchen-Zweitantikörper, welcher an den Farbstoff Alexa Flour 594 gekoppelt war, rot dar. Die Färbung mit DAPI führte zu einer Blaufärbung der DNA der Zellkerne. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde eine gleichmäßige und ubiquitäre Expression von ADAM17 WT und auch von ADAM17 LGG in den Hela-Zellen beobachtet. Dies spricht für einen wahrscheinlich ungestörten Proteintransport und eine intakte Lokalisation der verschiedenen Proteasen. Folglich sind die Ergebnisse, in denen es zu einer unterschiedlichen Freisetzung der Ektodomänen durch die verschiedenen Proteasen kam, sehr wahrscheinlich auf eine direkte Rolle der Transmembrandomäne für den *Shedding*-Prozess zurückzuführen.

Um die Enzymexpression auf der Zelloberfläche näher bestimmen zu können, wurde die Durchflusszytometrie zur Hilfe genommen. Es wurden ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs mit ADAM17 WT oder ADAM17 LGG retransfiziert und mit K133 Immunsereum markiert oder auch ohne Färbung belassen. Das Durchflusszytometer zeigte eine sehr ähnliche Oberflächenexpression von ADAM17 WT und ADAM17 LGG. Dies spricht ebenfalls für eine sehr geringe Beeinträchtigung des Transports des in der Transmembrandomäne veränderten ADAM17 LGGs im Vergleich zu ADAM17 WT. Folglich bestärkt auch dieser Versuch eine wesentliche Rolle der Transmembrandomäne für die Substratspezifität von ADAM17.

6.2 Die Transmembrandomäne von Amphiregulin und ihre mögliche Rolle für die Substraterkennung

AREG ist einer der sieben Liganden der EGF-Familie. Wie alle Mitglieder dieser Familie wird AREG als transmembran-gebundenes Vorläuferprotein hergestellt. Die Ektodomänen der aktiven Wachstumsfaktoren werden unter anderem durch die ADAMs durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Für viele pathologische Prozesse wurde eine erhöhte Freisetzung von EGFR-Liganden beobachtet, weshalb eine therapeutisch steuernde Freisetzung der Liganden erstrebenswert wäre (Schneider & Wolf 2008).

Um zu testen, ob die für ADAM17 LGG beobachtete reduzierte *Shedding*-Rate ebenfalls durch eine Mutation des Substrats zu erreichen wäre, wurde das Motiv des Substrats entsprechend verändert. Das für das ursprüngliche LAS-Motiv (groß-winzig-winzig-Motiv/ AREG WT) codierende Plasmid von AREG wurde dementsprechend durch eine zweistufige Mutagenese in ein GVI-Motiv (winzig-groß-groß-Motiv/ AREG GVI) umgewandelt.

COS-7 Zellen sind einfach zu transfizieren und exprimieren endogenes ADAM17 (Grobe *et al.* 2015). Daher wurden COS-7 Zellen hier als alternative Zelllinie herangezogen, um die Hypothese noch umfassender zu überprüfen. In den Experimenten mit den COS-7 Zellen war kein Unterschied zwischen dem *Shedding* von AREG WT und AREG GVI zu beobachten. Gleichzeitig wurde eine gleichmäßige Gesamtproteinexpression beobachtet.

Dieser Versuch wurde mit Wildtyp-MeF-Zellen wiederholt. In Wildtyp-MeF-Zellen war dagegen eine deutliche Reduktion des *Sheddings* der AREG GVI Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Substrat festzustellen. Wodurch die geringere *Shedding*-Rate für das mutierte AREG in den Wildtyp-MeF-Zellen im Vergleich zu den COS-7 Zellen aber tatsächlich zustande kam, kann hier nur vermutet werden. Die Homologie der Sequenz von ADAM17 in COS-7 Zellen ist im Vergleich zu der Sequenz des murinen ADAM17 mit insgesamt 91,7 % durch das *BLAST Tool* von *uniprot.org* zu bestimmen, während die Transmembrandomäne auch hier zu 100 % übereinstimmt. Im Vergleich mit der Sequenz des humanen ADAM17 ist insgesamt sogar eine 99,8%ige Homologie festzustellen. Die von unterschiedlichen Spezies stammenden Zelllinien könnten über einen etwas unterschiedlich regulierten *Shedding*-Prozess verfügen. Eine möglicherweise gestörte Protein-Interaktion innerhalb der Plasmamembran wäre für die verwendeten MeF-Zellen naheliegend. Es könnte sich um eine Störung einer direkten oder aber auch einer indirekten Interaktion handeln. Die indirekte Interaktion könnte durch weitere Hilfsproteine stattfinden, welche in COS-7 Zellen möglicherweise nicht vorkommen oder eine untergeordnete Rolle spielen könnten.

Nakayama und Kollegen sprechen den Annexin-Proteinen, ANXA2, A8 und A9, eine wichtige Rolle in einer frühen *Shedding*-Phase für die transiente Interaktion von *pro*-AREG und reifem ADAM17 auf der Zelloberfläche zu. In ihren Aktivitätstests mittels AP-Assays wurden menschliche Fibrosarkom HT1080 Zellen verwendet. Durch eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von ANXA2 konnte gezeigt werden, dass es nach TPA-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der *pro*-AREG Freisetzung kam. Dem gegenüber kam es zu einer signifikanten Verminderung der Freisetzung, wenn ANXA8 und A9 herunterreguliert wurden. Ohne TPA-Stimulation waren keine signifikanten Änderungen in der Freisetzung von AREG zu beobachten. Die EGF-ähnliche-Domäne von AREG wird für die Interaktion mit den Annexinen verantwortlich gemacht. Für ADAM17 konnte jedoch noch keine Bindestelle für die Interaktion mit den Annexinen gefunden werden. Neben AREG beschreibt die Arbeitsgruppe ebenfalls eine Rolle für die Freisetzung von weiteren Substraten, wie TGF- α und HB-EGF (Nakayama *et al.* 2012). Die Rolle des in der hier vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionsmotiv könnte jedoch unter physiologischen Bedingungen von größerer Bedeutung sein als die Rolle der

Annexin-Proteine. Dies wird zum Beispiel daran deutlich, dass das *AREG-Shedding* bereits unter konstitutiven Bedingungen durch ADAM17 LGG signifikant reduziert ist.

Die Mutation, welche in AREG eingebracht wurde, könnte auf verschiedene Weisen einen Beitrag zu den gemachten Beobachtungen leisten. Aufgrund der, in der Literatur beschriebenen Interaktion in der membrannahen EGF-ähnlichen-Domäne von AREG und den Annexinen, lässt sich spekulieren, dass die in AREG eingebrachte Mutation diese Interaktion beeinträchtigt. Nicht auszuschließen ist, dass eine Interaktion der Transmembrandomänen vor, nach oder aber auch während der temporären Verbindung von AREG, Annexin und ADAM17 für das *Shedding* ebenfalls von Bedeutung sein könnte. Eine Möglichkeit, welche für die Interaktion von ADAM17, AREG und den Annexin-Proteinen in Betracht gezogen werden muss ist die Formation einer Nanodomäne innerhalb der Plasmamembran (Maxfield 2002; Kusumi *et al.* 2011; Nicolson 2013; Garcia-Parajo *et al.* 2014; Reiss & Bhakdi 2017). Durch die Mutation könnte es ADAM17 LGG im Vergleich zu ADAM17 WT nicht mehr so gut möglich sein, sich in diese wichtige Organisationsstruktur der Zellmembran zu integrieren. Das verminderte *AREG Shedding* könnte teilweise darauf zurückzuführen sein. In Zukunft könnten die Nanodomänen mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie näher untersucht werden. Die Rolle der Annexine ist noch längst nicht ausreichend studiert, um eine vollständige Antwort auf die tatsächlichen Vorgänge während des *Shedding*-Prozesses zu finden. Um eine genauere Aussage bezüglich der hier untersuchten AREG GVI Mutante in Bezug zu den möglicherweise das *Shedding* von AREG mitregulierenden Annexinen treffen zu können, müsste – äquivalent zu den von Nakayama durchgeführten AP-Assays – die hier verwendete AREG GVI Mutante untersucht werden.

6.3 Das artifizielle Konsensus-Motiv von ADAM17 ALL weist vergleichbare Eigenschaften auf wie ADAM17 WT

Das potenzielle Motiv in ADAM17 WT, das für die Substraterkennung wichtig sein könnte, wurde zudem durch Erzeugung der ADAM17 ALL Protease untersucht. ADAM17 ALL verfügt über das Motiv ALL (winzig-groß-groß-Motiv), dieses ersetzt das ursprüngliche GVI-Motiv (winzig-groß-groß-Motiv) von ADAM17 WT in Form eines Konsensus-Motivs. Die Aminosäuren von ADMA17 WT werden in der Mutante durch Aminosäuren mit nahezu

gleicher Grundstruktur und damit verbundenen sehr ähnlichen sterischen Charakteristika ersetzt. Für die entsprechenden Versuche wurden ADAM10/17^{-/-}-dKo-MeFs eingesetzt. ADAM17 ALL und ADAM17 WT wurden in *Shedding*-Experimenten mit dem Substrat AREG verglichen. Sollten sich keine veränderte *Shedding*-Aktivitäten durch die modifizierte Aminosäuresequenz von ADAM17 ALL beim AREG-*Shedding* beobachten lassen, würde dies auf ein gutes Studiendesign und auf eine Bestärkung der Hypothese der sterisch bedingten Protein-Interaktion aufgrund des vermuteten Konsensus-Motivs hinweisen.

Die Abbildung 14 bildet drei unabhängigen Versuche, in denen jeweils A17 E/A, A17 WT und A17 ALL parallel untersucht wurden, ab. Das *Shedding* von ADAM17 WT und auch von ADAM17 ALL war unter konstitutiven Bedingungen jeweils signifikant höher als das durch die proteolytisch inaktive ADAM17 E/A Variante. Die Beobachtungen sind also auf die Transfektion der entsprechenden Plasmide zurückzuführen. Die Absolutwerte des *Sheddings* von ADAM17 WT und ADAM17 ALL unterschieden sich unter konstitutiven Bedingungen nicht signifikant. Die PMA-Stimulation zeigte hier für keine der Proteasen signifikante Effekte auf das *Shedding*. Sowohl für ADAM17 WT als auch ADAM17 ALL war nach Zugabe von MM ein 50%iges geringeres *Shedding*-Verhältnis zu beobachten. Die Expression der Proteasen stellte sich im *Western Blot* sehr ähnlich dar. Diese Ergebnisse sprechen für die Identifikation eines Konsensus-Motivs in der Transmembrandomäne von ADAM17. Darüber hinaus sprechen sie für ein verlässliches Studiendesign.

Andere Veröffentlichungen zeigen, dass trotz der Tatsache, dass viele Proteine über eine Vielzahl an möglichen Interaktions-Motiven verfügen, diese nur selten an einer Dimerisierung beteiligt sind. Daraus ergibt sich, dass der spezifische strukturelle Kontext zwar einen wichtigen Beitrag zur Dimerisierung von Proteinen mit Motiv-assoziaton liefere, sie aber keinesfalls vollständig die Interaktionen zwischen Transmembran-Helices erklären könnten. Dementsprechend gilt, dass Sequenzänderungen die Protein-Protein-Interaktion und die Protein-Lipid-Interaktion beeinflussen könnten. So sei das einfache Muster des Sequenz-Motivs zu vereinfachend für die sehr komplexen und noch wenig verstandenen Interaktionen. Sequenz-Motive garantieren nicht zwingend eine Interaktion und Sequenzen, denen kein Motiv beigemessen wird, könnten ebenfalls Interaktionen

vermitteln. Die Lösung liege, wie bereits bei den wasserlöslichen Proteinen demonstriert, in detaillierten Strukturanalysen in Verbindung mit algorithmischen Ansätzen (Li *et al.* 2012). Auch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei der Protein-Interaktion zwischen der Protease und seinem Substrat um ein sehr komplexes und längst nicht vollständig entschlüsseltes System handelt. Vollständige Strukturanalysen von ADAM17 und seiner Substrate werden in Zukunft sicher einen wesentlichen Beitrag für die Entschlüsselung der Substratspezifität leisten können. In zukünftigen Experimenten könnten die anderen Protease-Domänen von ADAM17 auf mögliche Interaktionen hin näher untersucht werden. Auch die Rolle von zusätzlichen Proteinen und eine damit in Verbindung stehende Formation von Nanodomänen sollte mit einbezogen werden. Unterschiedliche Signalwege die über den gleichen finalen Schlüsselmechanismus, die PS-Externalisierung, ADAM17 aktivieren, müssen zudem vollständig aufgeklärt werden.

6.4 Modell des ADAM17-vermittelten *Sheddings*

Die finale Aktivierung von ADAM17 und die spezifische Freisetzung einzelner ADAM17 Substrate ist Gegenstand aktueller Forschung. Die zuvor beschriebene Literatur und die Beobachtungen dieser Arbeit führen zu folgendem vereinfachten Modell der ADAM17 Aktivierung. Dieses ist in Abbildung 15 dargestellt.

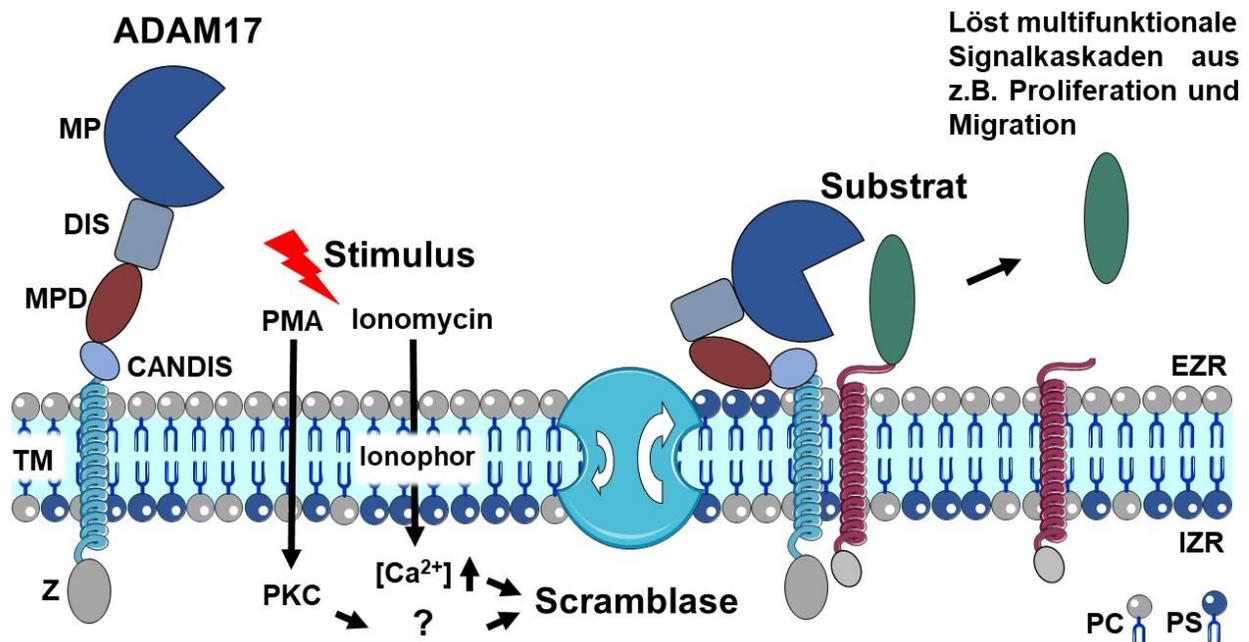


Abbildung 15: Modell des ADAM17-vermittelten *Sheddings*

Stimulanzen, wie PMA und Ionomycin, führen über unterschiedliche Mechanismen zur finalen Aktivierung des ADAM17 *Shedding*. Während die Proteinkinase C (PKC) und weitere noch nicht endgültig aufgeklärte Mechanismen für PMA von entscheidender Bedeutung für die ADAM17 *Shedding* Aktivierung sind, führt das Ionophor Ionomycin vermutlich durch einen Ca^{2+} Einstrom zu einer ADAM17 Aktivierung (Huovila *et al.* 2005; Horiuchi *et al.* 2007b). Ca^{2+} -abhängige Scramblasen können daraufhin PS von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite translozieren und ADAM17 so final aktivieren (Veit *et al.* 2018). Das in seiner Gesamtladung einfach negativ geladene PS führt zu einer elektrostatischen Interaktion mit dem positiv geladenen Motiv der MPD von ADAM17 (Sommer *et al.* 2016). Das Substrat wird membran-nah von ADAM17 geschnitten und bewirkt anschließend die Aktivierung weiterer Signalkaskaden, die zum Beispiel zu Proliferation oder Migration führen (Reiss & Saftig 2009). Für das *Shedding* des Substrats AREG ist eine mögliche Interaktion von dessen Transmembrandomäne und der ADAM17 Transmembrandomäne von entscheidender Bedeutung. Dies könnte, wie im Schema gezeigt, durch eine direkte Interaktion oder durch eine indirekte Interaktion durch ein Beteiligung weiterer Proteine und Bildung einer Nanodomäne (nicht dargestellt) vermittelt werden.

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

7. ZUSAMMENFASSUNG

ADAM17 ist eine wichtige Protease, die bei vielen physiologischen und auch pathophysiologischen Prozessen involviert ist. ADAM17 ist für die unumkehrbare Freisetzung von über 80 transmembrangebundenen Substraten verantwortlich, dazu zählen unter anderem TNF- α , die EGFR-Liganden und auch deren Rezeptoren. Fehlregulationen in Signalwegen von ADAM17 stehen in Verbindung mit entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen. Bezüglich der Regulation der Protease ist es von großem Interesse, wie eine Substratspezifität zustande kommt. Die Transmembrandomäne von ADAM17 könnte eine wichtige Rolle spielen. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Beitrag der Transmembrandomäne von ADAM17 für die spezifische Substraterkennung näher zu untersuchen.

Die Transmembrandomäne von ADAM17 und die seiner Substrate wurden in dieser Arbeit nach Analyse eines möglichen Interaktionsmotivs näher untersucht. Das auf Sterik beruhende potenzielle Interaktionsmotiv von ADAM17 wurde durch eine Mutagenese des GVI-Motivs zu einem sterisch entgegengesetzten Motiv verändert. Die daraus hervorgegangene ADAM17 LGG Variante führte zu einer signifikant verminderten Freisetzung des Substrats AREG im Vergleich zu ADAM17 WT. Durch den Austausch der gesamten Transmembrandomäne von ADAM17 zu der von ADAM10 kam es zu einer etwa doppelt so starken Reduktion der AREG Freisetzung im Vergleich zur ADAM17 LGG Variante. Für die anderen untersuchten Substrate, HB-EGF und TGF- α , waren keine signifikanten Effekte im Vergleich der konstitutiven Substratfreisetzung zu beobachten. Die Expression, Lokalisation und Reifung von ADAM17 LGG stellte sich in *Western Blots*, der Immunzytochemie und der Durchflusszytometrie nicht wesentlich beeinträchtigt dar.

Für AREG bestätigte sich, dass die Transmembrandomäne beim *Shedding* eine entscheidende Rolle besitzen könnte. Für HB-EGF konnte dies wider Erwarten nicht gezeigt werden und für TGF- α hatte es, wie erwartet, keine Auswirkung. Die veränderte Freisetzung von AREG könnte sowohl auf eine Störung einer direkten als auch einer indirekten Protein-Interaktion zurück zu führen sein.

Die Rolle des identifizierten Motivs konnte ebenfalls durch Mutagenese des Substrats AREG unter zur Hilfenahme von MeF-Zellen bestätigt werden. In COS-7 Zellen waren jedoch keine Unterschiede zu beobachten.

Durch Erzeugung einer ADAM17 ALL Variante konnte gezeigt werden, dass das identifizierte Motiv ein Konsensus-Motiv ist.

Diese Arbeit bestätigt die essenzielle Rolle der Transmembrandomäne von ADAM17 für die Substraterkennung. Die Rolle eines für AREG wichtigen Interaktionsmotivs konnte ebenfalls näher untersucht werden. Jedoch wird die spezifische Substraterkennung insgesamt sehr wahrscheinlich von vielen weiteren Faktoren mitbestimmt.

8. SUMMARY

ADAM17 is an important protease, being involved in many physiological and pathophysiological processes. ADAM17 is responsible for the irreversible release of more than 80 transmembrane bound precursor proteins, for instance TNF- α , the ligands of the EGFR pathway as well as their receptors. The defective regulation in the ADAM17 signalling pathway is connected to inflammatory and neoplastic diseases. Concerning the regulation of the protease it is of high interest how substrate selectivity is achieved. The transmembrane domain of ADAM17 could play a major role. The aim of this thesis was therefore to analyse the contribution of the transmembrane domain of ADAM17 for the specific substrate recognition in more detail.

The transmembrane domain of ADAM17 and its substrates were analysed after the identification of a potential interaction site. This potentially identified motif of ADAM17 which relies on good steric was mutated from the GVI-motif to a sterically opposing motif. Hence, the resulting ADAM17 LGG variant led to a significant reduced release of the substrate AREG in comparison to wild type ADAM17. The exchange of the whole transmembrane domain from ADAM17 to the transmembrane domain of ADAM10 led to an approximately two times stronger decrease of the release of AREG in comparison to the ADAM17 LGG variant. With regard to the other substrates tested in this thesis, HB-EGF and TGF- α , no significant effects were observed for the constitutive substrate release. The expression, localization and maturation of ADAM17 LGG were not impaired in western blots, immunocytochemistry and flowcytometrie.

For AREG the suspected role of its transmembrane domain could be confirmed. For HB-EGF however, it could not be demonstrated as expected. For TGF- α no effect was observed as expected. The altered release of AREG could be explained through a disruption of a direct or an indirect protein interaction.

The role of the identified motif could also be demonstrated through the mutation of AREG using MeF cells. However, using COS-7 cells no differences were to observe.

The generation of the ADAM17 ALL variant indicates the identified motif as a consensus motif.

This thesis confirms the essential role of the transmembrane domain of ADAM17 for substrate recognition and highlights the role of a potential interaction motif for AREG. However, it can be speculated that substrate recognition could be dependent on further other factors.

9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Zn ²⁺ -abhängigen Metalloproteasen der Metzinkinfamilie	2
Abbildung 2: Die Domänenstruktur von ADAM17	3
Abbildung 3: Sequenz- <i>alignment</i> von ADAM17 verschiedener Spezies	51
Abbildung 4: Schematisches <i>Alignment</i> der Transmembrandomänen von ADAM17 WT und Amphiregulin	55
Abbildung 5: Schematisches <i>Alignment</i> der Transmembrandomänen von ADAM17 LGG und HB-EGF.....	55
Abbildung 6: Aktivitätstest von A17 WT, A17 TTKT, A17 LGG und A17 E/A.....	58
Abbildung 7: Einfluss des ADAM17 GVI-Motivs auf das <i>Shedding</i> von HB-EGF	60
Abbildung 8: Einfluss des ADAM17 GVI-Motivs auf das <i>Shedding</i> von TGF- α	62
Abbildung 9: Aktivitätstest von ADAM17 E/A, ADAM17 WT und ADAM17 LGG	63
Abbildung 10: Gleichmäßige Expression von ADAM17 WT und ADAM17 LGG in HeLa-Zellen.	65
Abbildung 11: Retransfiziertes ADAM17 WT und auch ADAM17 LGG sind in vergleichbarem Maße auf der Zelloberfläche von ADAM10/17 ^{-/-} -dKo-MeFs mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren	66
Abbildung 12: <i>Shedding</i> -Experimente mit Wildtyp- und in der Transmembrandomäne mutiertem Amphiregulin in COS-7 Zellen	69
Abbildung 13: <i>Shedding</i> -Experimente mit Wildtyp- und in der Transmembrandomäne mutierten Amphiregulin in MeFs.....	71
Abbildung 14: Das Motiv der ADAM17 Transmembrandomäne ist als Konsensus-Motiv zu bezeichnen.....	73
Abbildung 15: Modell des ADAM17-vermittelten <i>Sheddings</i>	91
Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen.....	III
Tabelle 2: Mit ADAM17 assoziierte Krankheitsbilder	8
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	25
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	26
Tabelle 5: Verwendete Stimulanzien	28
Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren	28
Tabelle 7: Verwendete Primäre Antikörper	28
Tabelle 8: Verwendete Sekundäre Antikörper	28
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 11: Verwendete Zellkulturmedien.....	34
Tabelle 12: Verwendete Plasmide	35
Tabelle 13: Verwendete Kits.....	35
Tabelle 14: Verwendete Software.....	36
Tabelle 15: Schema der Mutagenese-PCR	37
Tabelle 16: Sequenz- <i>alignment</i> von ADAM17-Varianten und einer Auswahl an Substraten	52

10. LITERATURVERZEICHNIS

- Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N., Freeman, M. (2012). Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE, *Science*, 335(6065), 225–8, doi: 10.1126/science.1214400
- Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knäuper, V., Docherty, A. J. ., Murphy, G. (1998). TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3, *FEBS Lett.*, 435(1), 39–44, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01031-X
- Arribas, J., Esselens, C. (2009). ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases, *Curr. Pharm. Des.*, 15, 0–0, doi: 10.2174/138161209788682398
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., Higashiyama, S. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy, *Nat. Med.*, 8(1), 35–40, doi: 10.1038/nm0102-35
- Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B., Schroit, A. J. (2007). Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis., *J. Biol. Chem.*, 282(25), 18357–64, doi: 10.1074/jbc.M700202200
- Bandsma, R. H. J., van Goor, H., Yourshaw, M., Horlings, R. K., Jonkman, M. F., Schölvinck, E. H., Karrenbeld, A., Scheenstra, R., Kömhoff, M., Rump, P., Koopman-Keemink, Y., Nelson, S. F., Escher, J. C., Cutz, E., Martín, M. G. (2015). Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction., *Hum. Pathol.*, 46(6), 923–8, doi: 10.1016/j.humpath.2015.02.010
- Bartlett, R., Stokes, L., Sluyter, R. (2014). The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease, (66), 638–675, doi: <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., Bely, B., Bingley, M., Bonilla, C., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-AJee, H., Cowley, A., Da Silva, A., De Giorgi, M., Dogan, T., Fazzini, F., Castro, L. G., Figueira, L., Garmiri, P., Georghiou, G., Gonzalez, D., Hatton-Ellis, E., Li, W., Liu, W., Lopez, R., Luo, J., Lussi, Y., MacDougall, A., Nightingale, A., Palka, B., Pichler, K., Poggioli, D., Pundir, S., Pureza, L., Qi, G., Rosanoff, S., Saidi, R., Sawford, T., Shypitsyna, A., Speretta, E., Turner, E., Tyagi, N., Volynkin, V., Wardell, T., Warner, K., Watkins, X., Zaru, R., Zellner, H., Xenarios, I., Bougueleret, L., Bridge, A., Poux, S., Redaschi, N., Aimo, L., ArgoudPuy, G., Auchincloss, A., Axelsen, K., Bansal, P., Baratin, D., Blatter, M. C., Boeckmann, B., Bolleman, J., Boutet, E., Breuza, L., Casal-Casas, C., De Castro, E., Coudert, E., Cucho, B., Doche, M., Dornevil, D., Duvaud, S., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gasteiger, E., Gehant, S., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Jungo, F., Keller, G., Lara, V., Lemercier, P., Lieberherr, D., Lombardot, T., Martin, X., Masson, P., Morgat, A., Neto, T., Noupikel, N., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Pozzato, M., Pruess, M., Rivoire, C., Roichert, B., Schneider, M., Sigrist, C., Sonesson, K., Staehli, S., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Verbregue, L., Veuthey, A. L., Wu, C. H., Arighi, C. N., Arminski, L., Chen, C., Chen, Y., Garavelli, J. S., Huang, H., Laiho, K., McGarvey, P., Natale, D. A., Ross, K., Vinayaka, C. R., Wang, Q., Wang, Y., Yeh, L. S., Zhang, J. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*Oxford University Press, 45(D1), D158–D169, doi: 10.1093/nar/gkw1099
- Berger, B. W., Kulp, D. W., Span, L. M., DeGrado, J. L., Billings, P. C., Senes, A., Bennett, J. S., DeGrado, W. F. (2009). Consensus motif for integrin transmembrane helix association, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(2), 703–8, doi: 10.1073/pnas.0910873107
- Bevers, E. M., Williamson, P. L. (2010). Phospholipid scramblase: an update, *FEBS Lett.*Federation of European Biochemical Societies, 584(13), 2724–30, doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.020

- Bitbol, M., Fellmann, P., Zachowski, A., Devaux, P. F. (1987). Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 904, 268–282, doi: 10.1016/0005-2736(87)90376-2
- Björkholm, P., Ernst, A. M., Hacke, M., Wieland, F., Brügger, B., von Heijne, G. (2014). Identification of novel sphingolipid-binding motifs in mammalian membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* Elsevier, 1838(8), 2066–2070, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2014.04.026
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells, *Nature*, 385(6618), 729–33, doi: 10.1038/385729a0
- Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., Bach-Ngohou, K., Paineau, J., Denis, M. G., Labois, C. L., Mosnier, J.-F. (2005). Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells, *J. Pathol.* John Wiley & Sons, Ltd., 207(2), 156–163, doi: 10.1002/path.1814
- Blaydon, D. C., Biancheri, P., Di, W. L., Plagnol, V., Cabral, R. M., Brooke, M. A., van Heel, D. A., Ruschendorf, F., Toynbee, M., Walne, A., O'Toole, E. A., Martin, J. E., Lindley, K., Vulliamy, T., Abrams, D. J., MacDonald, T. T., Harper, J. I., Kelsell, D. P. (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion, *N Engl J Med*, 365(16), 1502–1508, doi: 10.1056/NEJMoa1100721
- Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(1), 32–43, doi: 10.1038/nrm1548
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X., Stöckler, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins,” *FEBS Lett.*, 331(1–2), 134–140, doi: 10.1016/0014-5793(93)80312-I
- Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., Arribas, J. (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors, *EMBO J.*, 22(5), 1114–1124, doi: 10.1093/emboj/cdg111
- Caescu, C. I., Jeschke, G. R., Turk, B. E. (2010). Active site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10, 424(1), 79–88, doi: 10.1042/BJ20090549.Active
- Cesaro, A., Abakar-Mahamat, A., Brest, P., Lassalle, S., Selva, E., Filippi, J., Hebuterne, X., Hugot, J.-P., Doglio, A., Galland, F., Naquet, P., Vouret-Craviari, V., Mograbi, B., Hofman, P. M. (2009). Differential expression and regulation of ADAM17 and TIMP3 in acute inflamed intestinal epithelia, *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, 296(6), G1332–G1343, doi: 10.1152/ajpgi.90641.2008
- 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., Häslner, R., Becker, C., Neurath, M. F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J., Rose-John, S. (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice, *J. Exp. Med.*, 207(8), 1617–24, doi: 10.1084/jem.20092366
- Chanthaphavong, R. S., Loughran, P. A., Lee, T. Y. S., Scott, M. J., Billiar, T. R. (2012). A role for cGMP in inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-induced tumor necrosis factor (TNF) α -converting Enzyme (TACE/ADAM17) activation, translocation, and TNF receptor 1 (TNFR1) shedding in hepatocytes, 287(43), 35887–35898, doi: 10.1074/jbc.M112.365171
- Christova, Y., Adrain, C., Bambrough, P., Ibrahim, A., Freeman, M. (2013). Mammalian iRhoms have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation, *EMBO Rep.* Nature Publishing Group, 14(10), 884–90, doi: 10.1038/embor.2013.128

- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry, *J. Lipid Res.*, 44(2), 233–242, doi: 10.1194/jlr.R200019-JLR200
- Daleke, D. L. (2007). Phospholipid flippases, *J. Biol. Chem.*, 282(2), 821–5, doi: 10.1074/jbc.R600035200
- Dang, M., Armbruster, N., Miller, M. A., Cermeno, E., Hartmann, M., Bell, G. W., Root, D. E., Lauffenburger, D. A., Lodish, H. F., Herrlich, A. (2013). Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(24), 9776–9781, doi: 10.1073/pnas.1307478110
- Desruisseau, S., Romain, S., Berthois, Y., Martin, P.-M., Giusti, C., Palmari, J. (2004). Clinical relevance of amphiregulin and VEGF in primary breast cancers, *Int. J. Cancer*, 111(5), 733–740, doi: 10.1002/ijc.20312
- Doedens, J. R., Mahimkar, R. M., Black, R. A. (2003). TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Academic Press, 308(2), 331–338, doi: 10.1016/S0006-291X(03)01381-0
- Dombrowsky, S. L., Samsøe-Petersen, J., Petersen, C. H., Instrell, R., Hedegaard, A.-M. B., Thomas, L., Atkins, K. M., Auclair, S., Albrechtsen, R., Mygind, K. J., Fröhlich, C., Howell, M., Parker, P., Thomas, G., Kveiborg, M. (2015). The sorting protein PACS-2 promotes ErbB signalling by regulating recycling of the metalloproteinase ADAM17, *Nat. Commun.*, 6, 7518, doi: 10.1038/ncomms8518
- Düsterhöft, S., Höbel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G. H., Chalaris, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Lorenzen, I., Grötzinger, J. (2014). A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor, (289), 16336–16348, doi: 10.1074/jbc.M114.557322
- Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C.-W., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Grötzinger, J., Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase, *J. Am. Chem. Soc.*, 135(15), 5776–5781, doi: 10.1021/ja400340u
- Düsterhöft, S., Michalek, M., Kordowski, F., Oldefest, M., Sommer, A., Röseler, J., Reiss, K., Grötzinger, J., Lorenzen, I. (2015). Extracellular juxtamembrane segment of ADAM17 interacts with membranes and is essential for its shedding activity, *Biochemistry*, 54(38), 5791–5801, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00497
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., Pennington, C. J. (2009). The ADAM metalloproteinases, *Mol. Aspects Med.* Elsevier Ltd, 29(5), 258–289, doi: 10.1016/j.mam.2008.08.001
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., Postina, R. (2003). Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation, *Eur. J. Biochem.*, 270(11), 2386–93, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755693>
- Evans, J. P. (2001). Fertilin β and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization, *Bioessays*, 23(7), 628–39, doi: 10.1002/bies.1088
- Evans, S. F., Irmady, K., Ostrow, K., Kim, T., Nykjaer, A., Saftig, P., Blobel, C., Hempstead, B. L. (2011). Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation, *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(34), 29556–67, doi: 10.1074/jbc.M111.219675
- Evers, A. (2013). Transaktivierung des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen (ADAMs), doi: urn:nbn:de:gbv:8-diss-121942, Med. Diss., Kiel

- Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Opole, R., Baratta, J., Korc, M., Endo, T. L., Duong, A., Nguyen, G., Karkehabadhi, M., Twardzik, D., Patel, S., Loughlin, S. (2000). In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(26), 14686–14691, doi: 10.1073/pnas.97.26.14686
- Fan, H., Turck, C. W., 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(20), 18617–27, doi: 10.1074/jbc.M300331200
- Garcia-Parajo, M. F., Cambi, A., Torreno-Pina, J. A., Thompson, N., Jacobsen, K. (2014). Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization, *J. Cell Sci.*, 127, 4995–5005, doi: 10.1242/jcs.146340
- Gardam, M. A., Keystone, E. C., Menzies, R., Manners, S., Skamene, E., Long, R. (2003). Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management, *Lancet Infect. Dis.*, 3(3), 148–155, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099%2803%2900545-0>
- Gomis-Rüth, F. X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases, *Mol. Biotechnol.*, 24(2), 157–202, doi: 10.1385/MB:24:2:157
- Goñi, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the singer-nicolson model, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* Elsevier B.V., 1838(6), 1467–1476, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.006
- Grobe, N., Di Fulvio, M., Kashkari, N., Chodavarapu, H., Somineni, H. K., Singh, R., Elased, K. M. (2015). Functional and molecular evidence for expression of the renin angiotensin system and ADAM17-mediated ACE2 shedding in COS7 cells, *Am. J. Physiol. Physiol.*, 308(9), C767–C777, doi: 10.1152/ajpcell.00247.2014
- Gulbins, E., Li, P. L. (2006). Physiological and pathophysiological aspects of ceramide, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 290(1), R11-26, doi: 10.1152/ajpregu.00416.2005.
- Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., Altevogt, D. P. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles, *FASEB J.*, 17(2), 292–294, doi: 10.1096/fj.02-0430fje
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts, *Hum. Mol. Genet.*, 11(21), 2615–24, doi: 10.1093/hmg/11.21.2615
- Higgins, B. J. A., Evans, W. H. (1978). Transverse organization of phospholipids across the bilayer of plasma-membrane subfractions of rat hepatocytes, *Biochem. J.*, 174, 563–567, doi: 10.1042/bj1740563
- Hirano, K., Kanaide, H. (2002). Role of protease-activated receptors in the vascular system, *J. Atheroscler. Thromb.*, 10(4), doi: <https://doi.org/10.5551/jat.10.211>
- Horiuchi, K. (2013). A brief history of tumor necrosis factor α -converting enzyme: an overview of ectodomain shedding, *Keio J. Med.*, 62(1), 29–36, doi: <https://doi.org/10.2302/kjm.2012-0003-RE>
- Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y., Blobel, C. P. (2007a). Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock, *J. Immunol.*, 179(5), 2686–9, doi: 10.4049/jimmunol.179.5.2686
- Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C. P. (2007b). Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx, *Mol. Biol. Cell*, 18, 176–188, doi: 10.1091/mbc.E06

- Huovila, A.-P. J., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases, *Trends Biochem. Sci.*, 30(7), 413–22, doi: 10.1016/j.tibs.2005.05.006
- Hurtado, O., Lizasoain, I., Ferna, P., Alberto, A., Leza, J. C., Lorenzo, P., Moro, A. (2002). TACE/ADAM17 – TNF- α pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen – glucose deprivation or glutamate, *Blood*, 22(5), 576–585, doi: 10.1097/00004647-200205000-00009
- Huxley-Jones, J., Clarke, T.-K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D. L., Boot-Handford, R. P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*, *BMC Evol. Biol.*, 7, 63, doi: 10.1186/1471-2148-7-63
- Itai, T., Tanaka, M., Nagata, S. (2001). Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF- α -converting enzyme, but not its truncated soluble form, *Eur. J. Biochem.*, 268(7), 2074–82, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02085.x>
- Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M., Mekada, E. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(6), 3221–3226, doi: 10.1073/pnas.0537588100
- Jackson, L. F., Qiu, T. H., Sunnarborg, S. W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., Lee, D. C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling, *EMBO J.*, 22(11), 2704–16, doi: 10.1093/emboj/cdg264
- Karan, D., Lin, F., Bryan, M., Ringel, J., Moniaux, N., Lin, M.-F., Batra, S. (2003). Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas, *Int. J. Oncol.*, doi: 10.3892/ijo.23.5.1365
- Kawaguchi, M., Mitsuhashi, Y., Kondo, S. (2005). Overexpression of tumour necrosis factor- α -converting enzyme in psoriasis, *Br. J. Dermatol.* Blackwell Science Ltd, 152(5), 915–919, doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06440.x
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group, 10(6), 845–858, doi: 10.1038/nprot.2015-053
- Kenny, P. A., Bissell, M. J. (2007). Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer, *J. Clin. Invest.*, 117(2), 337–345, doi: 10.1172/JCI29518
- Killock, D. J., Ivetic, A. (2010). The cytoplasmic domains of TNF α -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding, 304, 293–304, doi: 10.1042/BJ20091611
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(10), 5815–5820, doi: 10.1073/pnas.081612998
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Immunity*, 10(3), 387–398, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80038-2
- Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons, *EMBO J.* European Molecular Biology Organization, 29(17), 3020–32, doi: 10.1038/emboj.2010.167
- Kusumi, A., Suzuki, K. G. N., Kasai, R. S., Ritchie, K., Fujiwara, T. K., Bragg, L. (2011). Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane, *Trends Biochem. Sci.* Elsevier Ltd, 36(11), 604–615, doi: 10.1016/j.tibs.2011.08.001

- Lamour, N. F., Wijesinghe, D. S., Mietla, J. A., Ward, K. E., Stahelin, R. V., Chalfant, C. E. (2011). Ceramide kinase regulates the production of tumor necrosis factor α (TNF α) via Inhibition of TNF α -converting Enzyme *, 286(50), 42808–42817, doi: 10.1074/jbc.M111.310169
- Le Gall, S. M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., Blobel, C. P. (2009). ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha, *Mol. Biol. Cell*, 20(6), 1785–94, doi: 10.1091/mbc.E08-11-1135
- Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D. a, Niu, X.-D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., Blobel, C. P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site, *J. Cell Sci.*, 123(Pt 22), 3913–22, doi: 10.1242/jcs.069997
- Lejeune, S., Leek, R., Horak, E., Plowman, G., Greenall, M., Harris, A. L. (1993). Amphiregulin, epidermal growth factor receptor, and estrogen receptor expression in human primary breast cancer, *Cancer Res.*, 53(15), 3597–3602
- Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H., Röcken, C. (2005). Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 131(1), 41–48, doi: 10.1007/s00432-004-0619-y
- Leonard, J. D., Lin, F., 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(Pt 3), 797–805, doi: 10.1042/BJ20041727
- Li, E., Wimley, W. C., Hristova, K. (2012). Transmembrane helix dimerization: beyond the search for sequence motifs, *Biochim. Biophys. Acta* Elsevier, 1818(2), 183–93, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.08.031
- Li, X., 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(26), 27365–75, doi: 10.1074/jbc.M401690200
- Li, X., Maretzky, T., Perez-aguilar, J. M., Monette, S., Weskamp, G., Gall, S. Le, Beutler, B., Weinstein, H., Blobel, C. P. (2017). Structural modeling defines transmembrane residues in ADAM17 that are crucial for Rhbdf2 – ADAM17-dependent proteolysis, 868–878, doi: 10.1242/jcs.196436
- Li, X., Maretzky, T., Weskamp, G., Monette, S., Qing, X., Issuree, P. D. A., Crawford, H. C., Mcllwain, D. R., Mak, T. W., Salmon, J. E., Blobel, C. P. (2015). iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112(19), 6080–5, doi: 10.1073/pnas.1505649112
- Li, X., Pérez, L., Pan, Z., Fan, H. (2007). The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding., *Cell Res.* Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 17(12), 985–98, doi: 10.1038/cr.2007.98
- Lin, M., De Roquancourt, A., Bertheau, P., Chevret, S., Millot, G., Sastre-Garau, X., Espié, M., Marty, M., Janin, A., Calvo, F. (2001). Expression of amphiregulin and epidermal growth factor receptor in human breast cancer: Analysis of autocrine and stromal-epithelial interactions, *J. Pathol.*, 194(4), 413–419, doi: 10.1002/path.902
- Lomize, A. L., Hage, J. M., Pogozeva, I. D. (2018). Membranome 2.0: Database for proteome-wide profiling of bitopic proteins and their dimers, *Bioinformatics*, 34(6), 1061–1062, doi: 10.1093/bioinformatics/btx720
- Lomize, A. L., Lomize, M. A., Krolicki, S. R., Pogozeva, I. D. (2017). Membranome: a database for proteome-wide analysis of single-pass membrane proteins, *Nucleic Acids Res.*, 45(D1), D250–D255, doi: 10.1093/nar/gkw712

- Lorenzen, I., Lokau, J., Düsterhöft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Grötzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II, *FEBS Lett.*, 586(8), 1093–100, doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.012
- Luetke, N. C., Qiu, T. H., Fenton, S. E., Troyer, K. L., Riedel, R. F., Chang, A., Lee, D. C. (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development, *Development*, 126(12), 2739–2750
- Mann, G. B., Fowler, K. J., Gabriel, A., Nice, E. C., Williams, R. L., Dunn, A. R. (1993). Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation, *Cell*, 73(2), 249–61, doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90227-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90227-H)
- Manolios, N., Collier, S., Taylor, J., Poliard, J., Harrison, L. C., Bender, V. (1997). T-cell antigen receptor transmembrane peptides modulate T-cell function and T cell-mediated disease, *Nat. Publ. Gr.*, 3(1), 3–7, doi: <https://doi.org/10.1038/nm0197-84>
- Maretzky, T., Evers, A., Le Gall, S., Alabi, R. O., Speck, N., Reiss, K., Blobel, C. P. (2015). The Cytoplasmic Domain of A Disintegrin and Metalloproteinase 10 (ADAM10) Regulates its Constitutive Activity but is Dispensable for Stimulated ADAM10-dependent Shedding, *J. Biol. Chem.*, 10, jbc.M114.603753, doi: 10.1074/jbc.M114.603753
- Maretzky, T., McIlwain, D. R., Issuree, P. D. A., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P. A., Mak, T. W., Blobel, C. P. (2013). iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(28), 11433–8, doi: 10.1073/pnas.1302553110
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J., Rose-John, S. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE), *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(40), 38829–39, doi: 10.1074/jbc.M210584200
- Maxfield, F. R. (2002). Plasma membrane microdomains, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14(4), 483–487, doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00351-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00351-4)
- McDermott, M. F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E. M., Ogunkolade, B. W., Centola, M., Mansfield, E., Gadina, M., Karenko, L., Pettersson, T., McCarthy, J., Frucht, D. M., Aringer, M., Torosyan, Y., Teppo, A.-M., Wilson, M., Karaarslan, H. M., Wan, Y., Todd, I., Wood, G., Schlimgen, R., Kumarajeewa, T. R., Cooper, S. M., Vella, J. P., Amos, C. I., Mulley, J., Quane, K. A., Molloy, M. G., Ranki, A., Powell, R. J., Hitman, G. A., O'Shea, J. J., Kastner, D. L. (1999). Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF Receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes, *Cell*, 97(1), 133–144, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80721-7
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor, *Nature*, 376(6538), 337–341, doi: 10.1038/376337a0
- 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., 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(43), 30563–70, doi: 10.1074/jbc.274.43.30563
- Moore, D. T., Berger, B. W., DeGrado, W. F. (2008). Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs, *Structure*, 16(7), 991–1001, doi: 10.1016/j.str.2008.05.007

- Murumkar, P. R., DasGupta, S., Chandani, S. R., Giridhar, R., Yadav, M. R. (2010). Novel TACE inhibitors in drug discovery: a review of patented compounds, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 20(1), 31–57, doi: 10.1517/13543770903465157
- Myers, T. J., Brennaman, L. H., Stevenson, M., Higashiyama, S., Russell, W. E., Lee, D. C., Sunnarborg, S. W. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor-shedding, *Mol. Biol. Cell*, 20(24), 5236–5249, doi: 10.1091/mbc.E08-12-1256
- Nakayama, H., Fukuda, S., Inoue, H., Nishida-Fukuda, H., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Higashiyama, S. (2012). Cell surface annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin, *Mol. Biol. Cell*, 23(10), 1964–75, doi: 10.1091/mbc.E11-08-0683
- Nicolson, G. L. (2013). The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* Elsevier B.V., 1838(6), 1451–1466, doi: 10.1016/j.bbmem.2013.10.019
- Nishi, E., Hiraoka, Y., Yoshida, K., Okawa, K., Kita, T. (2006). Nardilysin enhances ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor through activation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme, *J. Biol. Chem.*, 281(41), 31164–31172, doi: 10.1074/jbc.M601316200
- Ohsawa, Y., Toko, H., Katsura, M., Morimoto, K., Yamada, H., Ichikawa, Y., Murakami, T., Ohkuma, S., Komuro, I., Sunada, Y. (2004). Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in association with increased endothelial nitric oxide synthase activity, 13(2), 151–157, doi: 10.1093/hmg/ddh014
- Ohta, S., Harigai, M., Tanaka, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Fukasawa, C., Hara, M., Kamatani, N. (2001). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) converting enzyme contributes to production of TNF- α in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.*, 28(8), Available at: <http://www.jrheum.org/content/28/8/1756>
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Peter Slotte, J. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes, *Prog. Lipid Res.*, 41(1), 66–97, doi: 10.1016/S0163-7827(01)00020-0
- Pérez, L., Kerrigan, J. E., Li, X., Fan, H. (2007). Substitution of methionine 435 with leucine, isoleucine, and serine in tumor necrosis factor α converting enzyme inactivates ectodomain shedding activity, *Biochem. Cell Biol.*, 85(1), 141–9, doi: 10.1139/o06-179
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development, *Science*, 282(5392), 1281–4, doi: 10.1126/science.282.5392.1281
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, 25(13), 1605–1612, doi: 10.1002/jcc.20084
- Pupovac, A., Foster, C. M., Sluyter, R. (2013). Human P2X7 receptor activation induces the rapid shedding of CXCL16, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 432(4), 626–631, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.134
- Quintana, F. J., Gerber, D., Bloch, I., Cohen, I. R., Shai, Y. (2007). A structurally altered D , L-amino acid TCR α transmembrane peptide interacts with the TCR α and inhibits T-cell activation in vitro and in an animal model, *Biochemistry*, 2317–2325, doi: 10.1021/bi061849g
- Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., Muñoz, S., Soria, N., Galiana, D., Bertolaccini, L., Cuadrado, M.-J., Khamashta, M. A. (2007). Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies, *Medicine (Baltimore)*, 86(4), 242–251, doi: 10.1097/MD.0b013e3181441a68

- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., Black, R. A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme, *J. Biol. Chem.*, 275(19), 14608–14, doi: 10.1074/jbc.275.19.14608
- Reiss, K., Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: penultimate regulator of ADAM sheddase function, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* Elsevier, 1864(11), 2082–2087, doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.006
- Reiss, K., Saftig, P. (2009). The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20(2), 126–137, doi: 10.1016/j.semcd.2008.11.002
- Ringel, Jörg, Jesnowski, R., Moniaux, N., Lüttges, J., Ringel, Jens, Choudhury, A., Batra, S. K., Klöppel, G., Löhr, M. (2006). Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor- α converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Res*, 66(18), 9045–53, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3287
- Roemer, A., Schwettmann, L., Jung, M., Stephan, C., Roigas, J., Kristiansen, G., Loening, S. A., Lichtinghagen, R., Jung, K. (2004). The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers?, *J. Urol.* Elsevier, 172(6), 2162–2166, doi: 10.1097/01.JU.0000144602.01322.49
- Rose-John, S., Schooltink, H., Schmitz-Van De Leur, H., Müllberg, J., Heinrich, P. C., Graeve, L. (1993). Intracellular retention of interleukin-6 abrogates signaling, *J. Biol. Chem.*, 268(29), 22084–22091
- Rothman, J., Lenard, J. (1977). Membrane asymmetry, *Science*, 195(4280), 743–753, doi: 10.1126/science.402030
- Saftig, P., Lichtenthaler, S. F. (2015). The alpha secretase ADAM10: a metalloprotease with multiple functions in the brain, *Prog. Neurobiol.* Elsevier Ltd, 135, 1–20, doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.10.003
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C. P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands, *J. Cell Biol.*, 164(5), 769–79, doi: 10.1083/jcb.200307137
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., Rose-John, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration, *Trends Immunol.*, 32(8), 380–387, doi: 10.1016/j.it.2011.05.005
- Schlöndorff, J., Becherer, J. D., Blobel, C. P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE), *Biochem. J.*, 347 Pt 1, 131–8, doi: 10.1042/bj3470131
- Schneider, M. R., Wolf, E. (2008). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance, *J. Cell. Physiol.*, 218, 460–466, doi: 10.1002/jcp.21635
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C. P., Saftig, P., Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.169805
- Seals, D. F., Courtneidge, S. a (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.*, 17(1), 7–30, doi: 10.1101/gad.1039703
- Seifert, T., Kieseier, B. C., Ropele, S., Strasser-Fuchs, S., Quehenberger, F., Fazekas, F., Hartung, H. P. (2002). TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, 8(January), 447–451, doi: 10.1191/1352458502ms830oa
- Senes, A., Engel, D. E., DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14(4), 465–79, doi: 10.1016/j.sbi.2004.07.007

- Shy, M. E., Jani, A., Krajewski, K., Grandis, M., Lewis, R. A., Li, J., Shy, R. R., Balsamo, J., Lilien, J., Garbern, J. Y., Kamholz, J. (2004). Phenotypic clustering in MPZ mutations, 127(2), doi: 10.1093/brain/awh048
- Sibilia, M., Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor, *Science*, 269(5221), 234–8, doi: 10.1126/science.7618085
- Siggs, O. M., Xiao, N., Wang, Y., Shi, H., Tomisato, W., Li, X., Xia, Y., Beutler, B. (2012). iRhom2 is required for the secretion of mouse TNF α , 119(24), 5769–5772, doi: 10.1182/blood-2012-03-417949.
- Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes, 569–572, doi: 10.1038/42408
- Singer, S. j., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175, 720–731, doi: 10.1126/science.175.4023.720
- Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W., Lee, V. M.-Y. (2000). Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network, doi: 10.1074/jbc.275.4.2568
- Sommer, A., Fries, A., Cornelsen, I., Speck, N., Koch-Nolte, F., Gimpl, G., Andrä, J., Bhakdi, S., Reiss, K. (2012). Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation, *J. Biol. Chem.*, 287(28), 23678–23689, doi: 10.1074/jbc.M112.362756
- Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., Maretzky, T., Evers, A., Andrä, J., Düsterhöft, S., Michalek, M., Lorenzen, I., Somasundaram, P., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Kunzelmann, K., Heinbockel, L., Nehls, C., Gutschmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S., Reiss, K. (2016). Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function, *Nat. Commun.*, 7(May), 11523, doi: 10.1038/ncomms11523
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. H., Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking, *J. Cell Sci.*, 2, doi: 10.1242/jcs.02357
- Stawikowska, R., Cudic, M., Giulianotti, M., Houghten, R. A., Fields, G. B., Minond, D. (2013). Activity of ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) is regulated by its noncatalytic domains and secondary structure of its substrates., *J. Biol. Chem.*, 288(31), 22871–9, doi: 10.1074/jbc.M113.462267
- Sternlicht, M. D., Sunnarborg, S. W. (2008). The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 13(2), 181–94, doi: 10.1007/s10911-008-9084-6
- Sternlicht, M. D., Sunnarborg, S. W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D. C., Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin, *Development*, 132(17), 3923–33, doi: 10.1242/dev.01966
- Stone, A. L., Kroeger, M., Sang, Q. X. (1999). Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review), *J. Protein Chem.*, 18(4), 447–65, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1020692710029>
- Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Deutsch, U., Scherle, P., Hooper, A., Rafii, S., Blobel, C. P. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling, *Circ. Res.*, 103(9), 916–8, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184416
- Taïeb, N., Yahi, N., Fantini, J. (2004). Rafts and related glycosphingolipid-enriched microdomains in the intestinal epithelium: bacterial targets linked to nutrient absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(6), 779–94, doi: 10.1016/j.addr.2003.09.007

- Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20(2), 146–152, doi: 10.1016/j.semcd.2008.07.009
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold, *EMBO J.*, 25(11), 2388–96, doi: 10.1038/sj.emboj.7601131
- Taylor, P. C., Feldmann, M. (2009). Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.* Nature Publishing Group, 5(10), 578–582, doi: 10.1038/nrrheum.2009.181
- Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G., Peiretti, F. (2006). The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts, *Exp. Cell Res.*, 312(20), 3969–3980, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.08.027
- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype, *Science*, 269(5221), 230–4, doi: 10.1126/science.7618084
- Tokumaru, S., Higashiyama, S., Endo, T., Nakagawa, T., Miyagawa, J. I., Yamamori, K., Hanakawa, Y., Ohmoto, H., Yoshino, K., Shirakata, Y., Matsuzawa, Y., Hashimoto, K., Taniguchi, N. (2000). Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing, *J. Cell Biol.*, 151(2), 209–20, doi: 10.1083/jcb.151.2.209
- Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., Yoshida, H. (2000). Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α predicts worse prognosis in breast-cancer patients, *Int. J. Cancer*, 89(6), 484–487, doi: 10.1002/1097-0215(20001120)89:6<484::AID-IJC3>3.0.CO;2-S
- van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9(2), 112–124, doi: 10.1038/nrm2330
- Van Wart, H. E., Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(14), 5578–82, doi: 10.1073/pnas.87.14.5578
- Veit, M., Koyro, K. I., Ahrens, B., Bleibaum, F., Munz, M., Rövekamp, H., Andrä, J., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Sommer, A., Bhakdi, S., Reiss, K. (2018). Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* Elsevier, 1865(11), 1598–1610, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.011
- von Tresckow, B., Kallen, K.-J., von Strandmann, E. P., Borchmann, P., Lange, H., Engert, A., Hansen, H. P. (2004). Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30, *J. Immunol.*, 172(7), 4324–31, doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4324
- Walev, I., Tappe, D., Gulbins, E., Bhakdi, S. (2000). Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase, *J. Leukoc. Biol.*, 68(6), 865–72, doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.68.6.865>
- Weskamp, G., Ford, J. W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A. J. P., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., Sehara-Fujisawa, A., Black, R. A., Ludwig, A., Becherer, J. D., Conrad, D. H., Blobel, C. P. (2006). ADAM10 is a principal “shedase” of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23, *Nat. Immunol.*, 7(12), 1293–1298, doi: 10.1038/ni1399
- Willems, S. H., Tape, C. J., Stanley, P. L., Taylor, N. A., Mills, I. G., Neal, D. E., McCafferty, J., Murphy, G. (2010). Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17, *Biochem. J.* Portland Press Limited, 428(3), 439–50, doi: 10.1042/BJ20100179

- Wisniewska, M., Goettig, P., Maskos, K., Belouski, E., Winters, D., Hecht, R., Black, R., Bode, W. (2008). Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 Complex, *J. Mol. Biol.* Academic Press, 381(5), 1307–1319, doi: 10.1016/J.JMB.2008.06.088
- Wolfsberg, T. G., White, J. M. (1996). ADAMs in fertilization and development, *Dev. Biol.*, 180(2), 389–401, doi: 10.1006/dbio.1996.0313
- Xu, P., Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation, 37(4), 551–566, doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.034.Direct
- Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., Mekada, E. (2003). Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities, *J. Cell Biol.*, 163(3), 469–475, doi: 10.1083/jcb.200307035
- Yan, Y., Shirakabe, K., Werb, Z. (2002). The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors, *J. Cell Biol.* The Rockefeller University Press, 158(2), 221–6, doi: 10.1083/jcb.200112026
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M., Xu, T. (1998). Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia, *Hum. Mol. Genet.*, 7(7), 1161–7, doi: 10.1093/hmg/7.7.1161
- Ye, J., Davé, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (2000). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by Site-2 protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(10), 5123–5128, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5123>
- Yin, H., Litvinov, R. I., Vilaire, G., Zhu, H., Li, W., Caputo, G. A., Moore, D. T., Lear, J. D., Weisel, J. W., Degrado, W. F., Bennett, J. S. (2006). Activation of platelet $\alpha\text{IIb}\beta_3$ by an exogenous peptide corresponding to the transmembrane domain of αIIb , *J. Biol. Chem.*, 281(48), 36732–36741, doi: 10.1074/jbc.M605877200
- Yin, H., Slusky, J. S., Berger, B. W., Walters, R. S., Vilaire, G., Litvinov, R. I., Lear, J. D., Caputo, G. A., Bennett, J. S., Degrado, W. F. (2007). Computational design of peptides that target transmembrane helices, *Science*, 2007(March), 1817–1823, doi: 10.1126/science.1136782
- Zelová, H., Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances, *Inflamm. Res.*, 62(7), 641–651, doi: 10.1007/s00011-013-0633-0
- Zhang, Q., Thomas, S. M., Wai, V., Lui, Y., Xi, S., Siegfried, J. M., Fan, H., Smithgall, T. E., Mills, G. B., 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(18), 6901–6906, doi: 10.1073/pnas.0509719103
- Zhou, B.-B. S., 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., Scherle, P. A. (2006). Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer, *Cancer Cell.*, 10(1), 39–50, doi: 10.1016/j.ccr.2006.05.024

11. PUBLIKATIONEN

- Veit, M., Koyro, K.I., Ahrens, B., Bleibaum, F., **Munz, M.**, Rövekamp, H., Andrä, J., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Sommer, A., Bhakdi, S., Reiss, K., 2018. **Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function.** *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 1598–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.011>
- Abstract einer Posterpräsentation auf der ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung) in Wien (10.03.-12.03.2016)

Abstract:

Insights in the substrate-specificity of ADAM17, the main EGFR-ligand sheddase

M. Munz, K. Koyro, M. Sperrhacker, A. Sommer and K. Reiss

Department of Dermatology and Allergology, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel, 24105 Kiel, Germany

A Disintegrin And Metalloproteinase 17 (ADAM17) is the most important sheddase of epidermal growth factor receptor (EGFR)-ligands. The protease releases, inter alia, tumor growth-factor-alpha and amphiregulin. Therefore, this enzyme is a key regulator of epithelial homeostasis, migration and proliferation. Accordingly, lack of ADAM17 in mice results in embryonic lethality accompanied by severe skin defects. Recently, first human patients were described suffering from a loss-of-function mutation in the *ADAM17* gene leading to resembling epithelial defects. Dysregulation of ADAM17 is linked to diverse cutaneous diseases and disturbed epidermal barrier function. The aim of this work was to deepen the understanding of the shedding event, in particular with regard to the domain structure of ADAM17. One aspect of the ADAM-dependent substrate cleavage is that both, enzyme and substrate, need to be in close proximity. Analyzing the structure of ADAM17 and its substrates, a potential role of their transmembrane-domains can be postulated. To find out, whether there is a potential protein-interaction site within the transmembrane region, we used mutagenesis studies and analyzed the release of different EGFR-ligands. Indeed, we identified a potential interaction motif for some substrates. However, our data indicate that there is not one common motif for all substrates. Instead, we propose that the ADAM17 transmembrane region contributes to the recognition of specific substrates such as amphiregulin, while other domains might be responsible for the binding of other EGFR-ligands. Increased knowledge about the substrate selectivity of ADAM17 could lead to deeper insights into epithelial diseases caused by dysregulation of this important protease.

12. ERKLÄRUNG

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

Ort, Datum

Unterschrift

13. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Karina Reiß für die Möglichkeit in ihrer Gruppe zu arbeiten und die dabei erhaltene großartige Anleitung und Unterstützung bedanken.

Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Joachim Grötzinger als Vertreter der Integrated Research Training Group (IRTG) und Dr. Christine Desel als Coordinator der IRTG.

Ich bin Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly dankbar dafür offizieller Betreuer gewesen zu sein.

Dem SFB877 bzw. der IRTG danke ich für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung.

Anselm Sommer, Björn Ahrens, Joscha Büch, Felix Kordowski, Nancy Speck, Florian Bleibaum danke ich für die tolle Zeit im Labor und darüber hinaus.

Besonderer Dank gilt Maria Sperrhacke für die exzellente Einarbeitung und Betreuung.

Bei Katharina Koyro möchte ich mich für die wundervolle gemeinsame Zeit bedanken.

Meiner Familie danke ich in besonderem Maße für ihre Unterstützung und Liebe.