
Die Rolle von Scramblasen in der Aktivierung von ADAM10 und -17

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sinje Leitzke

Kiel, 2022

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Karina Reiß

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2022

Zum Druck genehmigt: 13.05.2022

Gez. Prof. Dr. Frank Kempken, Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	A
Abkürzungsverzeichnis.....	D
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Zellmembran.....	1
1.1.1 Aufbau.....	1
1.1.2 Die Asymmetrie der Zellmembran.....	2
1.1.3 Phosphatidylserin-Externalisierung im physiologischen Kontext.....	3
1.2 Scramblasen.....	4
1.2.1 Xkr-Familie.....	5
1.2.2 Anoctamin-/TMEM16-Familie.....	6
1.3 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen.....	9
1.3.1 Regulation und Aktivierung von ADAM10 und ADAM17.....	10
1.3.2 Physiologie und Pathophysiologie von ADAM10 und ADAM17.....	13
2 Zielsetzung.....	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Materialien.....	17
3.2 Chemikalien.....	17
3.3 Enzyme.....	19
3.4 Kits.....	20
3.5 Geräte.....	20
3.6 Antikörper.....	21
3.6.1 Primäre Antikörper.....	21
3.6.2 Sekundäre Antikörper.....	22
3.7 Plasmide.....	22
3.8 Software.....	23
3.9 Zelllinien.....	23
3.10 Kultivierung von Zellen.....	24
3.10.1 Zellzahlbestimmung.....	25
3.10.2 Kryokonservierung.....	25
3.10.3 Transiente Transfektion.....	26
3.10.4 Inhibition und Stimulation in Zellkulturexperimenten.....	26
3.11 Zellbiologische Methoden.....	27
3.11.1 Alkalischer Phosphatase Assay.....	27
3.11.2 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	28
3.11.3 Fluoreszenzfärbung.....	28

3.11.4	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen.....	29
3.12	Proteinbiochemische Methoden.....	29
3.12.1	Proteinextraktion aus Zellen	29
3.12.2	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	29
3.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
3.12.4	<i>Western Blot</i>	31
3.12.5	Immunologische Detektion	31
3.12.6	<i>Strippen</i> der PVDF-Membran	32
3.12.7	<i>Simple Western</i>	32
3.12.8	Biotinylierungsassay	32
3.13	Mikrobiologische Methoden	33
3.13.1	Kultivierung von Bakterien	33
3.13.2	Kryokonservierung	33
3.13.3	Transformation von Bakterien	34
3.14	Molekularbiologische Methoden	34
3.14.1	Plasmidpräparation	34
3.14.2	Isolation von mRNA.....	35
3.14.3	Quantifizierung von DNA und mRNA	35
3.14.4	Reverse Transkription.....	35
3.14.5	Oligonukleotide	35
3.14.6	<i>Real-Time PCR</i>	36
3.14.7	Klonierung eines ANO5-eGFP-Vektors	37
3.14.8	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.14.9	DNA-Sequenzierung	39
3.15	Statistik.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Der Einfluss von XKR8 auf das ADAM17-vermittelte Shedding.....	40
4.1.1	Nachweis von XKR8 auf der Zelloberfläche.....	41
4.1.2	Die Überexpression von XKR8 führt zu einer vermehrten Phosphatidylserin-Externalisierung.....	42
4.1.3	Das Shedding von TGF-alpha wird durch XKR8 erhöht	43
4.1.4	Mutationen der Phosphorylierungsstellen von XKR8 haben keinen Einfluss auf das Shedding von TGF-alpha und AREG.....	45
4.2	Der Einfluss von Anoctamin-6 auf das Shedding von CD137	48
4.2.1	Das Shedding von CD137 ist abhängig von externalisiertem PS	48
4.2.2	Anoctamin-6 reguliert das Shedding von CD137.....	50
4.3	Der Einfluss von Anoctaminen auf die Freisetzung von ADAM-Substraten.....	51

4.3.1	Stimulation mit Ionomycin führt zu verstärktem Shedding von ADAM-Substraten bei Überexpression von Anoctamin-4, Anoctamin-6 oder Anoctamin-9.....	52
4.3.2	Nachweis von überexprimiertem Anoctamin-4 und Anoctamin-9 auf der Zelloberfläche.....	57
4.3.3	Bei Überexpression von Anoctamin-4 oder Anoctamin-9 wird TGF-alpha von anderen Sheddases freigesetzt	59
4.3.4	Die Überexpression von Anoctamin-4 oder Anoctamin-9 führt zu erhöhtem Substrat-Shedding durch verstärkte Externalisierung von Phosphatidylserin.....	60
4.4	Funktionelle Relevanz der Expression von Anoctamin-4 oder Anoctamin-9.....	64
4.4.1	Überexpression von Anoctamin-4 oder Anoctamin-9 führt zu verstärkter Proliferation	65
4.4.2	Endogene Expression von Anoctamin-4 und Anoctamin-9 in verschiedenen Zelllinien	66
5	Diskussion	70
5.1	Einfluss von XKR8 auf das ADAM17-vermittelte Shedding ist unabhängig von PMA-Stimulation	70
5.2	Anoctamin-6 reguliert über Phosphatidylserin-Externalisierung die proteolytische Freisetzung von CD137.....	74
5.3	Anoctamin-4 und -9 beeinflussen Calcium-abhängig die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17	76
5.4	Überexpression von Anoctamin-4 und -9 führt zu konstitutiv erhöhter Freisetzung von AREG und gesteigerter Proliferation von Tumorzellen	80
6	Zusammenfassung	86
7	Summary	88
8	Literaturverzeichnis	I
9	Abbildungsverzeichnis	XVIII
10	Tabellenverzeichnis.....	XIX
11	Publikationen	XX
12	Danksagung.....	XXI
13	Erklärung.....	XXII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ABB	<i>Annexin binding buffer</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AKT	Serin/Threonin Kinase 1
ANO	Anoctamin
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> /Varianzanalyse
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AREG	Amphiregulin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> /Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	<i>Desoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> /Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GI	GI254023X
GW	GW280264X
IO	Ionomycin
LA	Lactadherin
MM	Marimastat
MPD	Membranproximale Domäne
MW	Mittelwert
OPS	O-phospho-L-Serin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein-Kinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
PS	Phosphatidylserin
R	Rezeptor
rpm	<i>rounds per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> /Standardfehler des Mittelwertes
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TMD	Transmembrandomäne
TMEM16	Transmembranprotein 16
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
ün	Über Nacht
Xkr	Xk related protein

1 EINLEITUNG

1.1 DIE ZELLMEMBRAN

Die Zellmembran dient grundlegend als Abgrenzung und Schutz des Zytosols zum extrazellulären Raum. Seit 1972 gilt die Annahme, dass die Zellmembran kein starres, unveränderliches Gebilde darstellt, sondern als lateral bewegliches „Flüssig-Mosaik-Modell“ beschrieben werden kann (Singer & Nicolson, 1972). Dieses Modell besagt, dass die Membran eine dynamische und wandelbare Struktur aufweist. Über ihre Abgrenzungs- und Schutzfunktion hinaus spielt die Zellmembran außerdem eine Rolle beim Transport von Molekülen, bei der Signalübertragung sowie bei Zell-Zell-Kontakten (Bevers & Williamson, 2016; Gerrit Van Meer et al., 2008).

1.1.1 AUFBAU

In allen eukaryotischen Zellen besteht die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht (Bretscher, 1972). Die Lipide selbst weisen einen amphipatischen Charakter auf, das heißt sie besitzen eine hydrophile Kopfgruppe, die nach außen zeigt, sowie einen hydrophoben, ins Membranzentrum gerichteten Teil. Mittlerweile sind eine Vielzahl an in der Membran vorkommenden Lipide bekannt, von denen die häufigsten Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) sind. Die Verteilung der genannten Lipide in der Membran ist asymmetrisch (Bangham, 1968; Bretscher, 1972; Verkleij et al., 1973). So kommen PE und PS hauptsächlich auf der dem Zytosol zugewandten Seite vor, während PC und Sphingomyelin die äußere Schicht der Membran bilden (Alberts & Lewis, 2013; Fahy et al., 2009; Gupta et al., 2016; Nelson, 1967; Seigneuret & Devaux, 1984; Spector & Yorek, 1985; Gerrit Van Meer et al., 2008; Verkleij et al., 1973). Phosphatidylserin besitzt als einziges eine negative Nettoladung und kann intrazellulär über elektrostatische Anziehung u.a. mit der Src-Kinase oder GTPasen interagieren (Alberts & Lewis, 2013; Kay & Fairn, 2019).

Die Zellmembran besteht neben den Lipiden zu etwa gleichen Teilen aus Proteinen. Hierbei lässt sich zwischen integralen und peripheren Proteinen unterscheiden. Integrale Proteine sind zum Beispiel Transmembranproteine oder solche, die kovalent an ein Lipid oder an ein anderes Protein in der Membran gebunden sind und so Bestandteil der Membran sind. Periphere Proteine hingegen sind auf der intra- oder extrazellulären Seite der Membran nicht kovalent gebunden (Alberts & Lewis, 2013; Fairbanks et al., 1971).

Ende der 1980er Jahre wurden inselartige Strukturen aus Lipiden, genannt *lipid rafts*, in der Membran entdeckt (Lisanti et al., 1988; G. van Meer et al., 1987). Durch die Verbesserung der hochauflösenden Mikroskopie konnten *lipid rafts* in den darauffolgenden Jahren genauer beschrieben werden. Heute versteht man unter dem Begriff mit Cholesterin und Sphingolipiden angereicherte dynamische Nanodomänen veränderlicher Größe. Die einzelnen, vorher frei beweglichen Moleküle, wie z.B. Rezeptoren oder andere Membranproteine, sind in einer Art flüssiger Plattform zusammengeschlossen und können sich nur noch als gesamtes Gebilde bewegen. Den *lipid rafts* wird unter anderem eine Bedeutung in der Signaltransduktion beigegeben und ihre Entdeckung verdeutlichte die große Dynamik und Funktionsvielfalt der Zellmembran (Pike, 2006; Simons & Gerl, 2010; Simons & Toomre, 2000; Varshney et al., 2016).

1.1.2 DIE ASYMMETRIE DER ZELLMEMBRAN

Im Grundzustand sind die Phospholipide asymmetrisch in der Zellmembran verteilt. Aufgrund ihres amphipathischen Aufbaus ist die eigenständige Transmembranbewegung der Lipide nur sehr langsam möglich und dauert mehrere Stunden bis Tage (Holthuis & Levine, 2005). Für die Verteilung der Lipide kommen in der Membran drei Arten von Lipidtransportern vor, die einen schnelleren Transport gewährleisten können: Flippasen und Floppasen, welche einen unidirektionalen Transport vermitteln sowie Scramblasen, welche bidirektionale Transporter darstellen (Abbildung 1).

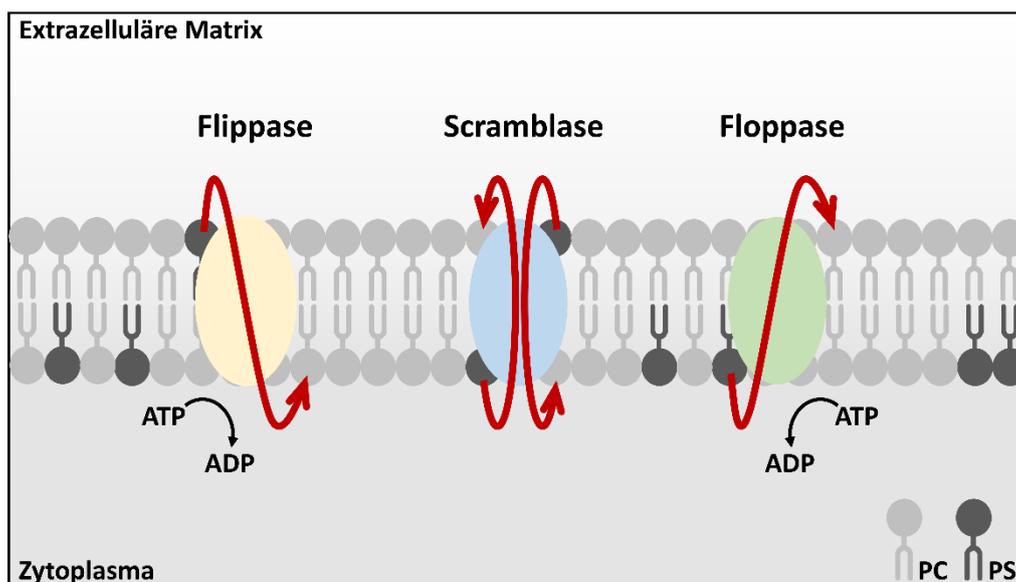


Abbildung 1: Regulation der Zellmembranasymmetrie über Lipidtransporter. Schematische Darstellung der Lipidtransporter in der Zellmembran. Flippasen (hellgelb) vermitteln unter Verbrauch von ATP den Transport von der extrazellulären auf die zytosolische Seite. Scramblasen (blau) sind energieunabhängige, bidirektionale Transporter. Floppasen (grün) vermitteln ATP-abhängig den Transport von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite. PC: Phosphatidylcholin, PS: Phosphatidylserin

Flippasen gehören in humanen Zellen zu den Typ4-ATPasen und transportieren Lipide von der extrazellulären Seite auf die zytosolische Seite unter Verbrauch von ATP. Floppasen sind ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter und wirken den Flippasen genau entgegen. Sie vermitteln ebenfalls ATP-abhängig den Transport von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite (Coleman et al., 2013; Shin & Takatsu, 2020). Scramblasen unterscheiden sich von den beiden anderen nicht nur durch den bidirektionalen Transport, sondern auch durch die Unabhängigkeit von ATP. Sie transportieren die Lipide in beide Richtungen entlang ihres Konzentrationsgradienten ohne den Verbrauch von Energie (Bever & Williamson, 2016; Kodigepalli et al., 2015).

Flippasen und Floppasen halten also die Asymmetrie der Zellmembran durch den Einsatz von Energie aufrecht, während der bidirektionale Transport entlang des Konzentrationsgradienten der Scramblasen die Zellmembranasymmetrie aufheben kann (Lenoir et al., 2021). Hierbei wird vor allem der Translokation von Phosphatidylserin (PS) eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion bei einer Vielzahl an physiologischen Prozessen zugeschrieben (Clarke et al., 2020).

1.1.3 PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG IM PHYSIOLOGISCHEN KONTEXT

Am bekanntesten ist die Rolle von oberflächenexponiertem PS in der frühen Phase der Apoptose, also beim regulierten Zelltod. Hierbei dient das irreversibel exponierte PS als „*Eat me*“-Signal für die Phagozyten, welches die Phagozytose der betroffenen Zellen zur Folge hat (Bratton et al., 1997; Fadok et al., 1992; Fadok et al., 2000; Martin et al., 1995; Schlegel & Williamson, 2001). Die Externalisierung von PS während der Apoptose kann durch die Scramblase XKR8 der Xkr (*Xk related protein*)-Familie vermittelt werden. XKR8 wird dabei durch die Caspasen -3 und -7 aktiviert (Mariño & Kroemer, 2013; Suzuki et al., 2013). PS ist zwar das am besten charakterisierte „*Eat me*“-Signal, es wird aber davon ausgegangen, dass noch eine Reihe weiterer Signalmoleküle für die Phagozytose eine Rolle spielen (Erwig & Henson, 2007). Ausschlaggebend ist außerdem auch die Menge an oberflächenexponiertem PS sowie die gleichzeitig erfolgende Ausschaltung der Flippasen durch Caspase-3 und -7 (Bratton et al., 1997; Frasch et al., 2000; Segawa et al., 2014; Segawa & Nagata, 2015).

Eine weitere wichtige Bedeutung hat die Exposition von PS bei der Blutkoagulation. Durch die PS-Externalisierung in der Membran von Blutplättchen entsteht eine Art Plattform, an die Ge-

rinnungsfaktoren binden können. Die Exposition von PS gilt als Schlüsselereignis für die Erzeugung von Thrombin, dem zentralen regulatorischen Molekül bei der Blutkoagulation, sodass schlussendlich der Wundverschluss erfolgt (Beveris et al., 1983; Lentz, 2003). Ausgelöst wird die PS-Externalisierung in diesem Prozess durch eine Aktivierung der Scramblase Anoctamin (ANO)-6 der Anoctamin-Familie. Eine ANO6-Defizienz führt zu einer Blutgerinnungsstörung, dem sogenannten Scott-Syndrom (Suzuki et al., 2010; H. Yang et al., 2012; Zwaal et al., 2004).

Sowohl während der Apoptose als auch in den Blutplättchen findet eine irreversible PS-Exposition statt (Shin & Takatsu, 2020). Weniger bekannt ist, dass PS jedoch auch reversibel und damit nur vorübergehend auf der Membranaußenseite exponiert werden kann. Solch eine transiente Exposition wurde zum Beispiel während der Myoblastenfusion bei der Bildung von primären Myotuben in der murinen Embryonalentwicklung beobachtet und die reversible PS-Externalisierung spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten (Abmayr & Pavlath, 2012; Beveris & Williamson, 2016; Shin & Takatsu, 2020). Über reversible oder irreversible PS-Exposition sind Scramblasen als Vermittler der Translokation somit an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt.

1.2 SCRAMBLASEN

Im Jahr 1996 gelang es zum ersten Mal ein Protein mit Scramblase-Aktivität aus roten Blutkörperchen zu isolieren, welches *phospholipid scramblase* (PLSCR) genannt wurde (Bassé et al., 1996; Zhou et al., 1997). Zur PLSCR-Familie gehören heute die fünf Mitglieder PLSCR1-5, deren Rolle bei der Regulation der PS-Exposition in der Vergangenheit allerdings kontrovers diskutiert wurde (Kodigepalli et al., 2015; Sivagnanam et al., 2017). Einerseits konnte für ein PLSCR1-Ortholog in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* eine Regulation der PS-Externalisation gezeigt werden (Hsu & Wu, 2010; Wang et al., 2007) und PLSCR1, -3 und -4 zeigten Scramblase-Aktivität bei Rekonstitutionsversuchen in Liposomen (Zhou et al., 1997). Auch wurde PLSCR1 sowie PLSCR3 eine Rolle während der Apoptose zugeschrieben (Sahu et al., 2007; Sivagnanam et al., 2017) und in Zellkulturversuchen wurde eine erhöhte PS-Exposition nach Transfektion mit PLSCR1 in Raji-Zellen beobachtet (Zhao et al., 1998). Andererseits war die PS-Exposition nach Transfektion mit PLSCR1 in weiteren Zelllinien nicht beeinflusst und PLSCR-defiziente Mäuse wiesen eine unveränderte PS-Externalisierung auf (Zhou et al., 2000, 2002).

Besser erforscht sind zwei weitere Familien an Scramblasen. Die Xkr-Familie, welche primär durch ihre Funktion während der Apoptose bekannt ist, sowie die Familie der Anoctamine, auch Transmembranproteine 16 (TMEM16) genannt.

1.2.1 XKR-FAMILIE

Zur humanen Xkr-Familie gehören neun Mitglieder (XKR1-9). Für fast alle Mitglieder (außer XKR2) wurde eine Plasmamembranlokalisation nachgewiesen und für XKR4, XKR8 sowie XKR9 wurde eine Rolle bei der PS-Exposition während der Apoptose gezeigt (Kodigepalli et al., 2015; Suzuki et al., 2014). XKR8-defiziente Zellen wiesen keine Externalisierung von PS bei der Apoptose mehr auf, die PS-Exposition konnte aber durch (Re-)Transfektion mit XKR4, XKR8 oder XKR9 wiederhergestellt werden (Nagata et al., 2016; Suzuki et al., 2013; Suzuki et al., 2014). XKR4, -8 und -9 besitzen eine Domäne im C-Terminus, welche von Caspase-3 und Caspase-7 erkannt werden kann, sodass die Scramblasen beim programmierten Zelltod aktiviert werden (Suzuki et al., 2013; Suzuki et al., 2014). Darüber hinaus konnte kürzlich in murinen B-Lymphozyten gezeigt werden, dass XKR8 auch durch eine Kinase-vermittelte Phosphorylierungsreaktion aktiviert werden kann (Sakuragi et al., 2019). Über Massenspektrometrie wurden drei Phosphorylierungsstellen (Serin oder Threonin) in murinem XKR8 in der Nähe der Caspase-Schnittstellen entdeckt. Mutationen von Serin oder Threonin zu Alanin, welche die Phosphorylierung verhinderten, hoben hierbei die Scramblase-Aktivität von XKR8 auf. Phosphomimik-Mutationen der besagten Positionen machten XKR8 hingegen zu einer hyperaktiven, Kinase-unabhängigen Scramblase. Die Caspase-abhängige Scramblase-Aktivität von XKR8 war durch die Mutationen nicht beeinflusst, was darauf hindeutet, dass beide Funktionen getrennt reguliert werden (Sakuragi et al., 2019). Ein Alignment der XKR8-Sequenz aus verschiedenen Tierarten ergab, dass im C-Terminus eine hohe Konservierung ab den Caspase-Schnittstellen vorliegt. Mindestens eine der drei phosphorylierbaren Serin- oder Threonin-Resten konnte in verschiedenen Säugetieren gefunden werden. Humanes XKR8 besitzt 68,9 % Sequenzhomologie zu murinem XKR8, wird ubiquitär exprimiert und hat sechs Transmembrandomänen. Im Menschen kommen zwei der besagten phosphorylierbaren Positionen in XKR8 vor, über ihre Regulation und Funktion ist bislang noch nichts bekannt (Sakuragi et al., 2019, 2021; Suzuki et al., 2014; Suzuki et al., 2013).

1.2.2 ANOCTAMIN-/TMEM16-FAMILIE

Die Familie der Anoctamine umfasst die zehn strukturell verwandten Mitglieder Anoctamin-1 bis Anoctamin-10. Zuerst entdeckt wurde Anoctamin-1 als Calcium (Ca^{2+})-abhängiger Chlorid (Cl^-)-Kanal. Aufgrund der acht Transmembrandomänen (Octa = acht) sowie des Transports von Anionen entstand der Name Anoctamin (ANO) (Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008). Durch die Entdeckung von ANO6 wurde später jedoch deutlich, dass die Familie nicht nur aus Cl^- -Kanälen besteht, sondern einige Mitglieder Scramblasen sind (Suzuki et al., 2010). Auch wurden dem ANO-Homolog nhTMEM16 des Fadenpilzes *Nectria haematococca* anhand von Kristallstrukturanalysen zehn anstatt acht Transmembrandomänen zugeordnet (Brunner et al., 2014) und später wurden ebenfalls zehn Transmembrandomänen für murines ANO1 postuliert (Dang et al., 2017), weshalb teilweise der Name Transmembranprotein 16 (TMEM16) bevorzugt wird.

1.2.2.1 VORKOMMEN, FUNKTION UND REGULATION

Neben ANO1 wurde auch ANO2 als Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal identifiziert, beide weisen keine Scramblaseaktivität auf (Le et al., 2021). Den Mitgliedern ANO3, ANO4, ANO5, ANO7, ANO9 und ANO10 wurde zusätzlich zu ANO6 die Funktion als Scramblase zugeschrieben, wobei ANO6 diesbezüglich bislang am besten untersucht ist. ANO6 und ANO9 können darüber hinaus auch als Kation-Kanal fungieren (Falzone et al., 2018; Kalienkova et al., 2021; Suzuki et al., 2013). Die Funktion von ANO8 ist bislang am wenigsten untersucht und noch nicht aufgeklärt. Eine Übersicht über die primäre Funktion der verschiedenen ANOs sowie über ihre Expression in Geweben ist in Tabelle 1 aufgelistet. Während die Lokalisation von ANO1 und ANO2 in der Plasmamembran durch verschiedene Arbeitsgruppen bestätigt wurde, ist die zelluläre Lokalisation der meisten Mitglieder umstritten (Caputo et al., 2008; Duran et al., 2012; Jun et al., 2017; Reichhart et al., 2019; Schreiber et al., 2010; Schroeder et al., 2008; Suzuki et al., 2013; Tian et al., 2012).

Tabelle 1: Primäre Funktion der Anoctamine und ihre Gewebeexpression

Mitglied	Primäre Funktion	Expression	Referenzen
ANO1	Cl ⁻ -Kanal	Gastrointestinaltrakt, Atemwegs-epithel, Reproduktionstrakt	Kodigepalli et al., 2015; Suzuki et al., 2013
ANO2	Cl ⁻ -Kanal	Auge, olfaktorische Neuronen	Rasche et al., 2010; Suzuki et al., 2013
ANO3	Scramblase	Gehirn, endokrines Gewebe, Fettgewebe, männlicher Reproduktionstrakt	Suzuki et al., 2013
ANO4	Scramblase	Gehirn, Reproduktionstrakt, endokrines Gewebe	Suzuki et al., 2013
ANO5	Scramblase	Gehirn, Fett- und Muskelgewebe	Falzone et al., 2018; Gyobu et al., 2016; Whitlock et al., 2018
ANO6	Scramblase	Endokrines Gewebe, Gastrointestinaltrakt, Reproduktionstrakt	Suzuki et al., 2010
ANO7	Scramblase	Männlicher Reproduktionstrakt, Gastrointestinaltrakt	Schreiber et al., 2010; Suzuki et al., 2013
ANO8	unbekannt	Gastrointestinaltrakt, weiblicher Reproduktionstrakt, Immunsystem	Suzuki et al., 2013
ANO9	Scramblase	Gastrointestinaltrakt, männlicher Reproduktionstrakt	Suzuki et al., 2013
ANO10	Scramblase	Gehirn, endokrines Gewebe, Gastrointestinaltrakt, Reproduktionstrakt, Immunsystem	Bushell et al., 2019; Petkovic et al., 2020

Alle Mitglieder der Anoctamin-Familie werden durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert. Die Ca²⁺-Bindestelle befindet sich innerhalb der Membran und ist hoch konserviert, was darauf hinweist, dass auch der Aktivierungs-Mechanismus sowohl von Kanälen als auch von Scramblasen innerhalb der Familie ähnlich ist (Kalienkova et al., 2021). Die Bindung von Ca²⁺ induziert eine Konformationsänderung von ANO-Homodimeren und Untersuchungen der Scramblase nhTMEM16 des Fadenpilzes *Nectria haematococca* ergaben, dass sich eine Art hydrophiler Hohlraum bildet, durch den die Lipide transportiert werden können (Brunner et al., 2014). Einen strukturellen Unterschied zwischen den Kanälen und den Scramblasen stellt die sogenannte Scrambling-Domäne dar. Diese wurde 2015 erstmalig in ANO6 identifiziert und befindet sich zwischen den Transmembrandomänen vier und fünf. Ein

Austausch dieses Bereiches in ANO1 durch die Scrambling-Domäne von ANO6 verlieh dieser ANO1-6-1-Chimäre eine Scramblase-Funktion (Yu et al., 2015).

Bei der Identifizierung von ANO6 wurde ebenfalls eine hyperaktive ANO6-Mutante, die eine Punktmutation enthielt, entdeckt. Diese erwies sich als hypersensitiv gegenüber Ca^{2+} , was zu konstitutiver PS-Exposition führt (Abbildung 2) (Suzuki et al., 2010; Veit et al., 2018).

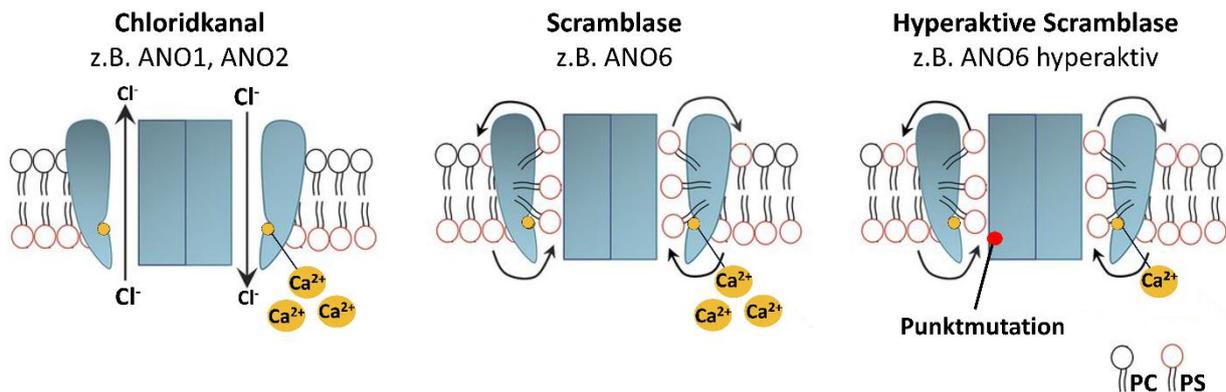


Abbildung 2: Übersicht über die Funktionen der ANOs. ANO1 und ANO2 sind prototypische Cl^- -Kanäle, die je nach intrazellulärer Cl^- -Konzentration einen Anionenstrom in beide Richtungen vermitteln können (links). Andere ANOs, wie z.B. ANO6, sind Scramblasen, welche die Externalisierung von PS vermitteln können (mitte). Beide werden durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert. Für ANO6 ist eine hyperaktive Mutante bekannt, welche aufgrund einer Punktmutation (roter Punkt) hypersensitiv gegenüber Ca^{2+} ist, wodurch es zu einer konstitutiven PS-Exposition kommt (rechts) (modifiziert nach Benarroch, 2017).

1.2.2.2 DIE ROLLE DER ANOS BEI ERKRANKUNGEN

Die meisten ANOs wurden im pathophysiologischen Kontext bislang nur lückenhaft untersucht. Trotz allem steht eine hohe Expression von ANOs oder deren Fehlfunktion bereits in Verbindung mit diversen Erkrankungen. Wie bereits erwähnt, führt eine Mutation von ANO6 zum Scott-Syndrom, einer Blutgerinnungsstörung (Castoldi et al., 2011; Suzuki et al., 2010). Eine Mutation von ANO3 führt zu zervikaler Dystonie, einer neurologischen Bewegungsstörung (Charlesworth et al., 2012), eine Mutation von ANO5 resultiert in Muskeldystrophien sowie Knochenfrakturen (Mizuta et al., 2007) und eine Mutation von ANO10 löst eine weitere Bewegungsstörung, die zerebelläre Ataxie, aus (Balreira et al., 2014). Für ANO1 wurde ein Zusammenhang mit einer Vielzahl an Tumorerkrankungen berichtet und es wurde gezeigt, dass die Hemmung von ANO1 die Proliferation und Migration von Krebszellen verringert. Eine hohe Expression von ANO1 wird unter anderem mit einer schlechten Prognose in Brustkrebs, Kopf-Hals-Tumoren sowie mit Bauspeicheldrüsenkrebs in Verbindung gebracht (Kunzelmann et al.,

2019). In Myelin-Läsionen von an Multipler Sklerose erkrankten Menschen wurde eine verstärkte Expression von ANO4 festgestellt. Darüber hinaus wurde ANO4 mit Hirnerkrankungen wie Alzheimer und Schizophrenie sowie mit Brustkrebs assoziiert (Reichhart et al., 2021). Auch weiteren ANOs wird eine Rolle bei Krebserkrankungen zugeschrieben. So steht ANO5 in Verbindung mit Darm- und Schilddrüsenkrebs, für ANO7 wurde ein Zusammenhang mit Prostatakrebs beobachtet und es spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs (Kaikkonen et al., 2018; Li et al., 2015; Marx et al., 2021). ANO9 ist mit Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs assoziiert (Jun et al., 2017; Li et al., 2015). Bei genaueren Untersuchungen von Bauchspeicheldrüsenzellen wurde beobachtet, dass ANO9 über Beeinflussung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) die Tumorentstehung fördert (Jun et al., 2017). Da die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 die Hauptsheddasen von EGFR-Liganden sind und ebenfalls mit der Tumorentstehung assoziiert werden (Blobel, 2005; Fischer et al., 2003; Schmidt et al., 2018), lässt sich ein Zusammenhang zwischen ANOs, Tumorerkrankungen und ADAMs vermuten.

1.3 DISINTEGRIN-ÄHNLICHE METALLOPROTEASEN

Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen (ADAMs) sind Typ-1-Transmembranproteine, die den Zink-abhängigen Proteasen der Klasse der Metzinkine angehören (Edwards et al., 2008). Die Metzinkine teilen sich weiter in Serralysine, Astacine, Adamlysine und Matrix-Metalloproteasen auf. Die ADAMs gehören zusammen mit den ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteases with a thrombospondin motif*) und den SVMPS (*snake venom metalloproteases*) zu den Adamlysinen (Bode et al., 1993; Huxley-Jones et al., 2007). Im Menschen sind bis heute 21 Gene für ADAMs bekannt, von denen 13 proteolytische Aktivität aufweisen. Dies sind ADAM1, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 21, 28, 30, 33, denn nur diese weisen das konservierte Zink-bindende Motiv HExxHxxGxxH im aktiven Zentrum auf (Bode et al., 1993; Edwards et al., 2008; Moss & Lambert, 2002). Während die proteolytisch inaktiven ADAMs unter anderem Zell-Zell-Interaktionen über die Disintegrin-Domäne vermitteln, setzen die proteolytisch aktiven ADAMs andere Transmembranproteine frei, was als Shedding bezeichnet wird und ein irreversibler Prozess ist (Blobel, 2005; Saftig & Reiss, 2011). Am bekanntesten unter den proteolytisch aktiven ADAMs sind ADAM10 und ADAM17, welche sich in ihrer Domänenstruktur von den „typischen“ proteolytisch aktiven ADAMs abheben. Die „typischen“ ADAMs weisen vom N-Terminus ausgehend eine Prodomäne, eine Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-

Domäne, gefolgt von einer Cysteinreichen und einer EGF-ähnlichen Domäne, die Transmembrandomäne und die zytosolische Domäne auf (Seals & Courtneidge, 2003). Bis zur Cysteinreichen Domäne unterscheidet sich ADAM10 nicht von den „typischen“ ADAMs. Danach folgt aber die *Stalk*-Domäne anstelle der EGF-ähnlichen Domäne. Bei ADAM17 sind ein Teil der Disintegrin-Domäne und die gesamte Cysteinreiche durch die Membranproximale Domäne sowie die EGF-ähnliche Domäne durch CANDIS (*conserved ADAM-seventeen dynamic interaction sequence*) ersetzt (Düsterhöft et al., 2015; Lorenzen et al., 2012; Takeda, 2016). Danach endet die Struktur von ADAM10/17 mit der Transmembrandomäne und der zytosolischen Domäne am C-Terminus (Abbildung 3).

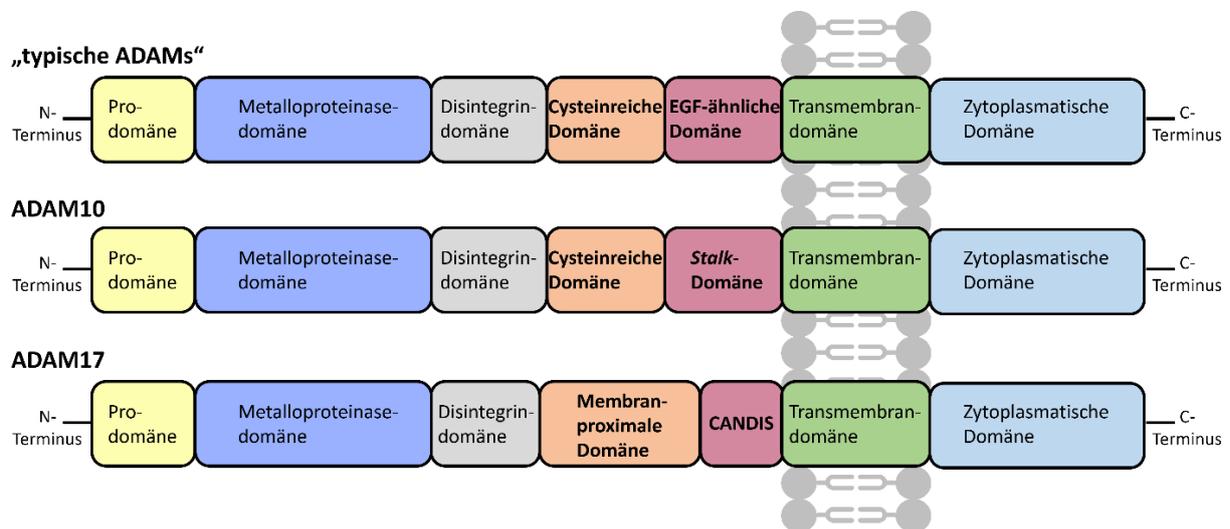


Abbildung 3: Domänenstruktur „typischer“ ADAMs im Vergleich zu ADAM10 und ADAM17. Katalytisch aktive, „typische“ ADAMs sind Typ-1-Transmembranproteine und bestehen angefangen am N-Terminus aus einer Pro-domäne, einer Metalloprotease-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cysteinreichen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, der Transmembrandomäne und der zytosolischen Domäne. ADAM10 besitzt anstelle der EGF-ähnlichen Domäne die *Stalk*-Domäne. Statt der Cysteinreichen und der EGF-ähnlichen Domäne besitzt ADAM17 eine membranproximale Domäne, auf die CANDIS (*conserved ADAM-seventeen dynamic interaction sequence*) folgt (nach Arribas & Esselens, 2009; Moss & Lambert, 2002).

1.3.1 REGULATION UND AKTIVIERUNG VON ADAM10 UND ADAM17

Als Transmembranproteine werden ADAM10/17 am Endoplasmatischen Retikulum als Proform synthetisiert und von dort gelangen sie zur weiteren Maturation in den Golgi-Apparat. Hier findet unter anderem die Abspaltung der Prodomäne durch Furin und weitere Pro-Proteinkonvertasen statt, was sich als essentiell für die katalytische Aktivität der Proteasen dargestellt hat (Endres et al., 2003; Gonzales et al., 2004). Für ihre Shedding-Funktion müssen die Proteasen dann weiter bis auf die Zelloberfläche transportiert werden. Die Expression und

Funktion von ADAM10 wird durch Bindung an Tetraspanine reguliert, welche auch den Transport auf die Zelloberfläche vermitteln (Lambrecht et al., 2018; Prox et al., 2012; Seipold et al., 2017). Maturation und Transport von ADAM17 werden hingegen von iRhom1 oder iRhom2, welche mit dem zytosolischen Ende interagieren, kontrolliert (Cavadas et al., 2017; Li et al., 2015). Die Regulation der Sheddase-Aktivität von ADAM10 und ADAM17 auf der Zelloberfläche kann durch mehrere Faktoren bestimmt werden. Zunächst scheint eine gewisse räumliche Nähe zwischen der Protease sowie dem Substrat nötig zu sein, damit eine proteolytische Freisetzung der Ektodomäne des Substrats, also der Prozess des Sheddings durch ADAM10/17, stattfinden kann (Murphy, 2009). Dies legt nahe, dass Nanodomänen in der Zellmembran einen regulatorischen Einfluss nehmen. Hierbei könnten auch iRhoms und Tetraspanine erneut eine Rolle spielen, indem sie die Lokalisation der Proteasen in der Zellmembran zum Substrat sowie die Substraterkennung beeinflussen (Gutiérrez-López et al., 2011).

Interessanterweise besitzen ADAM10/17 kein bekanntes Substraterkennungs-Motiv, an dem vorausgesagt werden könnte, welche Substrate geschnitten werden können. Auch scheinen verschiedene Domänen an dem Prozess beteiligt zu sein (Reddy et al., 2000; Smith et al., 2002; White, 2003). Bekannt ist lediglich, dass alle Substrate mit der Zellmembran assoziiert sind und bislang keine löslichen Substrate gefunden wurden. Auch findet das Shedding der Substrate stets im juxtamembranen Bereich statt (Reiss & Saftig, 2009). Dies führte über die Jahre zu einer sehr langen und komplexen Liste an Substraten, darunter Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle (Lambrecht et al., 2018; Reiss & Saftig, 2009). Einige Substrate werden dabei spezifisch von nur einer Protease freigesetzt, während auch Substrate bekannt sind, die von verschiedenen Proteasen gesheddet werden können. Darüber hinaus wurden kompensatorische Effekte zwischen ADAM10 und ADAM17 beobachtet, was darauf hindeutet, dass hier weniger eine Spezifität, sondern vielmehr eine Präferenz für einige Substrate vorliegt (Saftig & Reiss, 2011). Aufgrund der Vielfalt an Substraten ist die Regulierung der Shedding-Aktivität umso wichtiger.

Früher wurde davon ausgegangen, dass ADAM10/17 über die zytoplasmatische Domäne reguliert werden. Heute weiß man hingegen, dass diese keine Rolle spielt, aber dass die Externalisierung von PS ein bedeutender Faktor in der Aktivierung von ADAM10/17 ist (Le Gall et al., 2010; Maretzky et al., 2015; Sommer et al., 2016). Für beide Sheddasen wurde nachgewiesen, dass ANO6 durch seine Scramblase-Aktivität und die damit verbundene PS-Externalisierung einen Einfluss auf die proteolytische Aktivität ausübt (Bleibaum et al., 2019; Sommer

et al., 2016; Veit et al., 2018). Das positiv geladene RKxK-Motiv in der membranproximalen Domäne von ADAM17 interagiert mit dem negativ geladenen PS, worüber die Sheddase in ihre aktive Konformation gelangt (Sommer et al., 2016). Bei ADAM10 befindet sich analog dazu ein positiv geladenes Motiv in der *Stalk*-Domäne, wodurch hier die Bindung an oberflächenexponiertes PS erfolgen kann (Bleibaum et al., 2019).

Das Shedding durch ADAM10/17 kann konstitutiv erfolgen oder aber durch eine Reihe an Stimulantien induziert werden und ist dabei unter anderem abhängig von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der Protein-Kinase C (PKC) und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Saftig & Reiss, 2011). Physiologische Stimuli sind z.B. Wachstumsfaktoren sowie Zytokine und auch unphysiologische Stimuli wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) oder das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (IO) erhöhen die proteolytische Aktivität von ADAM10/17 (Huovila et al., 2005; Sommer et al., 2016). Ionomycin erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, was wiederum ANO6 aktiviert, wodurch es zur Externalisierung von PS kommt (Veit et al., 2018). Ob für diesen Mechanismus auch andere Scramblasen der Anoctamin-Familie relevant sind, ist noch nicht bekannt. PMA aktiviert die PKC und auch hier kommt es zu einer PS-Externalisierung (Nguyen et al., 2011; Sommer et al., 2016). Dass die PKC dabei direkt mit dem PS interagiert, wurde spekuliert (Orr & Newton, 1992; Verdaguer et al., 1999), aber denkbar wäre auch die Involvierung einer Scramblase, wie z.B. XKR8, für die Vermittlung der PS-Exposition (Abbildung 4).

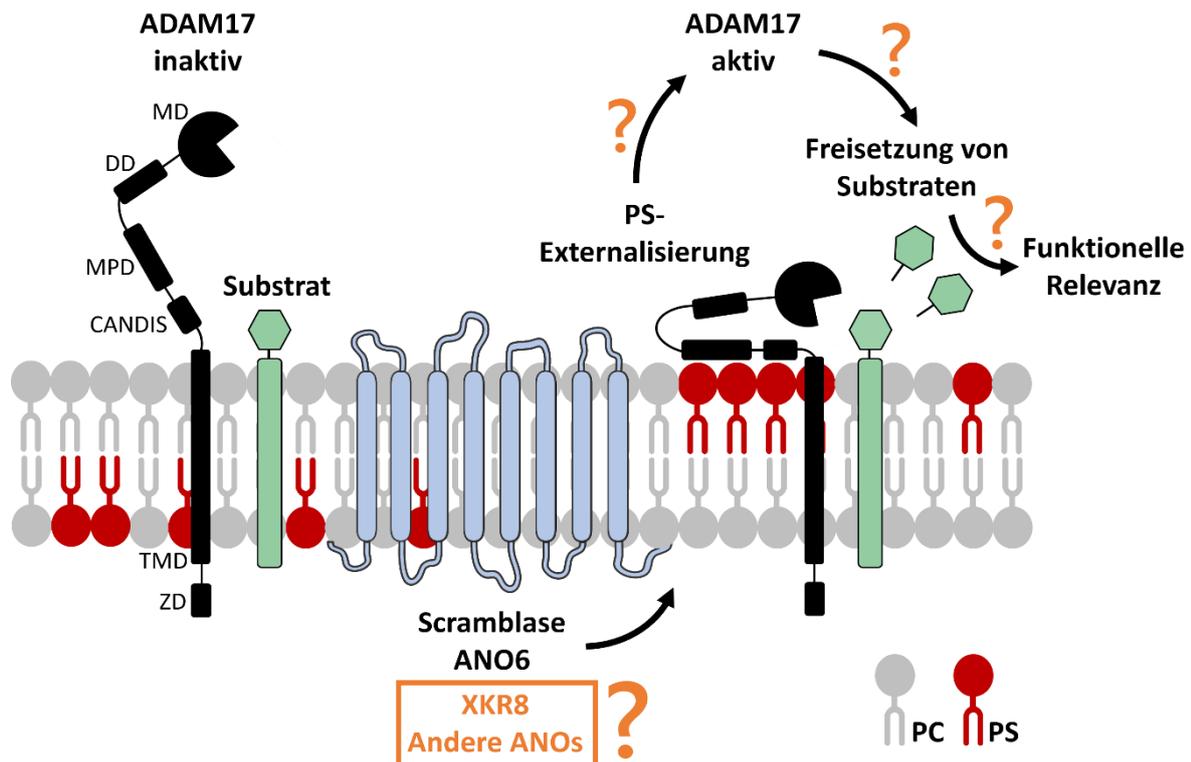


Abbildung 4: Regulation der Substratfreisetzung durch Scramblasen am Beispiel von ADAM17. In der inaktiven Konformation von ADAM17 (links) findet keine Substratfreisetzung statt. Durch einen extrazellulären Stimulus, der eine Scramblase, wie z.B. ANO6, aktiviert, kommt es zur Externalisierung von PS. Dann kann die MPD von ADAM17 mit dem PS interagieren, sodass die Sheddase sich in ihrer aktiven Konformation befindet (rechts) und Substrate an der Zelloberfläche freisetzen kann. Nicht bekannt ist, ob andere Scramblasen, wie z.B. andere ANOs oder XKR8, ebenfalls eine Externalisierung von PS vermitteln können, welche dann in einer Aktivierung von ADAM10/17 und der Freisetzung von Substraten resultiert (in orange dargestellt).

1.3.2 PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE VON ADAM10 UND ADAM17

Aufgrund der großen Vielzahl an Substraten sind ADAM10 und ADAM17 in diverse physiologische sowie pathophysiologische Prozesse involviert. Durch die proteolytische Freisetzung von Adhäsionsmolekülen spielt primär ADAM10 eine Rolle für Zell-Zell-Kontakte, bei der Signaltransduktion sowie bei der embryonalen Entwicklung. Bekannte Substrate sind hier N-Cadherin, E-Cadherin oder Notch (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005; Schulz et al., 2008). Am Beispiel von Notch zeigt sich außerdem, dass Shedding auch zur Aktivierung von Rezeptoren führen kann: Durch Abspaltung der Ektodomäne des Notch-Rezeptors wird ein weiterer proteolytischer Prozess initiiert, genannt Intramembranproteolyse (Brown et al., 2000; Hartmann et al., 2002). Eine Störung des ADAM10-Notch-Signalwegs hat fatale Folgen für die Embryonalentwicklung. ADAM10-defiziente Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Notch-defiziente Mäuse und sterben pränatal bereits nach wenigen Tagen (Krebs et al., 2000).

Eine gesteigerte Expression von ADAM10 in Kombination mit einem verstärkten Notch-Signalweg wurde außerdem in Krebsstammzellen beobachtet (Espinoza et al., 2013; Giancotti, 2013; Roca & Adams, 2007).

ADAM17 wurde ursprünglich als *tumor-necrosis factor alpha (TNF α) converting enzyme* (TACE) entdeckt, welches das proinflammatorische Zytokin TNF α während einer Immunantwort freisetzt (Black et al., 1997; Moss et al., 1997; Müllberg et al., 2000). Dadurch steht ADAM17 unter anderem in Verbindung mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Saftig & Reiss, 2011). Schnell wurden aber weitere Substrate identifiziert und so sind heute mehr als 80 bekannt (Zunke & Rose-John, 2017). Eine essentielle Rolle von ADAM17 in Entwicklungsprozessen wurde durch ein ADAM17-defizientes Mausmodell deutlich, welches nicht lebensfähig war (Peschon et al., 1998).

Darüber hinaus ist ADAM17 auch für das Shedding von *tumor necrosis factor receptors* (TNF-Rezeptoren) verantwortlich. Die Rezeptor-Familie enthält zum einen Zelltod-induzierende Rezeptoren mit einer sogenannten Todesdomäne, welche Teil des Caspase-8-induzierten Zelltods ist. Zum anderen gibt es Mitglieder ohne Todesdomäne, welche mit TNFR-assoziierten Faktoren interagieren können (Boldin et al., 1996). Zur zweiten Gruppe gehört unter anderem CD137, welches erstmals auf aktivierten T-Lymphozyten beschrieben wurde (Schwarz et al., 1993). TNF-Rezeptoren und ihre Liganden sind Transmembranproteine, welche jeweils sowohl in membranständiger als auch in löslicher Form vorliegen (Hehlgans & Pfeffer, 2005; Remouchamps et al., 2011). Erhöhte Spiegel an löslichem CD137 wurden im Serum autoimmunerkrankter Patienten und in vielen Tumoren gefunden (Dimberg et al., 2006; Furtner et al., 2005). Die lösliche Form von CD137 wurde lange Zeit als *Splicing*-Variante beschrieben, aber neue Erkenntnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass CD137 auch durch proteolytisches Shedding von sowohl ADAM10 als auch ADAM17 freigesetzt werden kann und auch funktionell aktiv ist (Seidel et al., 2021). Zusammen mit der Entdeckung von ANO6 als ADAM10/17-regulierende Scramblase ist ein regulatorischer Zusammenhang zwischen ADAM-Aktivierung durch ANO6 und daraus resultierendem Shedding von CD137 denkbar.

Des Weiteren sind ADAM10/17 die Hauptsheddasen der Liganden des EGFR, welche eine Funktion bei unterschiedlichen Zellprozessen, u.a. Wundheilung, Angiogenese und Proliferation, haben (Le Gall et al., 2009; Sahin et al., 2004). ADAM17 sheddet hauptsächlich TGF α (*transfor-*

ming growth factor alpha), HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), Epi-regulin (EREG) und Amphiregulin (AREG), während ADAM10 für die Freisetzung von EGF (*epidermal growth factor*) und Betacellulin (BTC) verantwortlich ist (Blobel, 2005; Sahin et al., 2004; Sahin & Blobel, 2007).

Der EGFR gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren und spielt eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen, aber auch in Tumorerkrankungen. Durch Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie des Zellwachstums kann eine gesteigerte Expression oder Aktivität des EGFR zu unkontrolliertem Zellwachstum führen (Blobel, 2005; Gschwind et al., 2004). Eine vermehrte Expression der ADAMs wurde ebenfalls mit einer Progression verschiedener Krebsarten durch die gesteigerte Freisetzung der EGFR-Liganden in Verbindung gebracht (Fischer et al., 2003; Schmidt et al., 2018).

Eine genauere Untersuchung der Verbindung zwischen ADAMs und Scramblasen könnte das Verständnis diverser pathologischer Prozesse, mit denen die Proteasen assoziiert werden, verbessern. Viele Scramblasen spielen eine Rolle bei Tumorerkrankungen und ADAM10/17 sind an einer Reihe entzündlicher sowie tumorfördernder Vorgänge beteiligt (Kunzelmann et al., 2019; Saftig & Reiss, 2011). Die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von Scramblasen und der Regulation von Proteasen könnte nicht nur neue Erkenntnisse für den regulatorischen Einfluss der Zellmembran liefern, sondern stellt auch im Hinblick auf die Vielzahl an Krankheiten, dessen Diagnose und Behandlung davon profitieren könnten, ein spannendes Forschungsfeld dar.

2 ZIELSETZUNG

Die Lipide in der Zellmembran sind im Grundzustand der Zelle asymmetrisch verteilt. Die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) gilt als Schlüsselmechanismus für die Shedding-Aktivität der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 und kann durch Scramblasen vermittelt werden. Die beiden bekanntesten Familien von Scramblasen sind die Ca^{2+} -abhängigen Anoctamine sowie die Caspase-abhängige Xkr-Familie. Für ein Mitglied der Xkr-Familie, namentlich XKR8, wurde kürzlich bekannt, dass es in murinen Zellen auch durch eine Phosphorylierungsreaktion aktiviert werden kann.

Zu den Substraten von ADAM10/17 zählen u.a. EGFR-Liganden sowie TNF-Rezeptoren. Als Vermittler der PS-Externalisierung hat Anoctamin-6 einen regulatorischen Einfluss auf das Shedding von EGFR-Liganden. Eine Aktivierung der Protein-Kinase C resultiert ebenfalls in einer Externalisierung von PS, ob hier auch eine Scramblase involviert ist, ist noch nicht bekannt. Sowohl der EGFR als auch die Familie der Anoctamine sowie ADAM10 und -17 werden mit einer Vielzahl an Tumorerkrankungen assoziiert, weshalb Erkenntnisse zu deren gesamter Regulation von besonderer Bedeutung sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von ADAM10/17 und ihrer Substrate durch die Aktivität von Scramblasen genauer zu verstehen.

Hierfür sollte zunächst der Einfluss von XKR8 auf das ADAM17-vermittelte Shedding untersucht werden. Des Weiteren sollte die Frage beantwortet werden, ob Anoctamin-6 über die Exposition von PS die proteolytische Freisetzung weiterer ADAM10/17-Substrate beeinflusst. Außerdem sollte ermittelt werden, ob andere Anoctamine die Shedding-Aktivität von ADAM10 und/oder ADAM17 durch die Externalisierung von PS regulieren können und schlussendlich sollte geprüft werden, welche funktionelle Relevanz sich aus dem Zusammenspiel von Anoctaminen und ADAM10/17 beobachten lässt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALEN

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

μ -slide 8-Well	ibidi, DE
μ -slide Rack	ibidi, DE
Drigalski-Spatel, Delta™ Disposable Cell Spreader	Heathrow Scientific, US
Einfrierbehälter, Nalgene Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, US
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA, DE
Gene Pulser Cuvette	Bio-Rad Laboratories, DE
Lumox® Zellkulturplatten (96-Well)	Sarstedt, DE
Mikro-Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt, DE
Mikrotiterplatten, flacher Boden, ELISA (96-Well)	Greiner Bio One, DE
Pasteurpipetten	Carl Roth, DE
PCR-Reaktionsgefäß Multiply®- μ Strip (200 μ l)	Sarstedt, DE
Petrischalen	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen (20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen mit Filter (20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, DE
Reaktionsgefäß DNA LoBind (1,5 ml)	Eppendorf, DE
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, DE
Roti®-PVDF-Membran (0,45 μ m)	Carl Roth, DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, DE
Whatman®-Filterpapier (1,5 mm)	Carl Roth, DE
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Sarstedt, DE
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt, DE
Zellschaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt, DE
Zellzählkammern, SD100	Nexcelom Bioscience, US
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, DE

3.2 CHEMIKALIEN

Tabelle 3: Chemikalien

1,10-Phenanthrolin	Carl Roth, DE
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, DE
Accutase	Merck Millipore, DE
Acetat	Carl Roth, DE
Adenosinriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, US
Agar-Agar	Carl Roth, DE
Agarose	Carl Roth, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, DE
Ampicillin	Carl Roth, DE

Annexin V – Alexa Fluor™ 488/568	Thermo Fisher Scientific, US
Biofreeze Einfriermedium	Biochrom, DE
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, US
Bromphenolblau	Carl Roth, DE
BSA-Standard	Fermentas, DE
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth, DE
cOmplete™, Protease-Inhibitor-Mix	Roche, CH
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, DE
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	PEQLAB Biotechnologie, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, DE
DNA-Ladepuffer, 6x Loading Dye	Fermentas, DE
DNA-Marker, Generuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentas, DE
DNA-Marker, Generuler™ 100 bp DNA ladder	Fermentas, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l)	Thermo Fisher Scientific, US
ECL™ Select Western Blotting Detection Reagenzien	GE Healthcare, US
Essigsäure	Carl Roth, DE
Ethidiumbromid	Carl Roth, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, DE
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, US
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, US
GI254023X (GI)	Tocris Bioscience, UK
Gibco™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, US
Gibco™ Sterile Distilled Water	Thermo Fisher Scientific, US
Glukose	Carl Roth, DE
Glycerin	Carl Roth, DE
GW280264X (GW)	AOBIOUS, USA
Hefeextrakt	Carl Roth, DE
HEPES	Carl Roth, DE
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, US
Ionomycin (IO), freie Säure	Merck Millipore, DE
Isopropanol	Carl Roth, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, DE
Laktadherin, bovine	Haematologic Technologies, UK
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Millipore, DE
Magnesiumhydroxid (Mg(OH) ₂)	Merck Millipore, DE
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck Millipore, DE

Marimastat (MM)	Tocris Bioscience, UK
Melittin (Mel)	Hergestellt von J. Andrä (FZ Borstel, DE)
Methanol	Carl Roth, DE
Milchpulver	Carl Roth, DE
<i>Mounting Medium</i>	Ibidi, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, DE
O-Phospho-L-Serin (OPS)	Sigma-Aldrich, US
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Millipore, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S), 100x	PAA Laboratories, US
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, US
Phosphatase-Substrat	Sigma-Aldrich, US
PhosSTOP™, Phosphatase-Inhibitor-Mix	Roche, CH
Pierce™ 660nm-Reagenz	Thermo Fisher Scientific, US
Proteinmarker, <i>Prestained Protein Marker</i>	New England Biolabs, US
Rotiphorese Gel 30 % (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	Carl Roth, DE
Saccharose	Carl Roth, DE
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth, DE
Schwefelsäure, 2 N	Carl Roth, DE
Streptavidin- <i>horseradish peroxidase</i>	Sigma-Aldrich, US
Tetramethylbenzin (BM Blue POD Substrat)	Roche, CH
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, DE
Triton X-100	Carl Roth, DE
Trpyton/Pepton aus Casein	Carl Roth, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, US
Trypsin-EDTA, 10x	PAA Laboratories, US
Turbofect	Thermo Fisher Scientific, US
Tween20	Carl Roth, DE

3.3 ENZYME

Tabelle 4: Enzyme

<i>FastDigest KpnI</i>	Thermo Fisher Scientific, US
<i>FastDigest XhoI</i>	Thermo Fisher Scientific, US
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, US
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, US

3.4 KITS

Tabelle 5: Kits

CD137-ELISA DuoSet (human)	R&D Systems, US
AREG-ELISA DuoSet (human)	R&D Systems, US
<i>GeneJet Gel Extraction Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, US
JESS Separation Module, 25 capillary cartridges, 12-230 kDa	Protein Simple, US
Nucleo-Spin RNA Kit	Macherey-Nagel, DE
<i>Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, US
Plasmid Maxi-Prep	Roche, CH
PrimeScript™ RT Master Mix Kit	Takara Bio Inc, JP
SYBR Green Premix Taq II	Takara Bio Inc, JP
QuikChange® II Site-directed Mutagenesis XL	Agilent, US

3.5 GERÄTE

Tabelle 6: Geräte

-80 °C Gefrierschrank Forma 900	Thermo Fisher Scientific, US
Absaug-Pumpe, BVC <i>professional</i>	Vacuubrand, DE
Agarose Gelkammer	Bio-Rad, US
Analysenwaage S-603	Denver Instruments, US
Analysenwaage XS205	Mettler Toledo, US
Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, US
Einkanalpipetten	Brand, DE
Einkanalpipetten	Abimed, DE
Fluoreszenzmikroskop Axiovert A1	Zeiss, DE
Fluoreszenzmikroskop ECHO <i>Revolve</i>	ECHO, USA
Heizblock, <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, DE
Infinite® M Plex	Tecan Trading, CH
JESS <i>Simple Western System</i>	Protein Simple, US
Lichtmikroskop, invers	Helmut Hund, DE
Magnetrührer CB162	Bibby Scientific, UK
Mehrkanalpipette	Abimed, DE
Mikrowelle	Samsung, KR
<i>Multi-Imagingsystem Fusion FX7</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
Multiscan SkyHigh Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, US
<i>PCR UV Workstation</i>	Analytik Jena, DE
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	PEQLAB Biotechnologie, DE
PerfectBlue™ <i>Tank-Elektroblotter Web S</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
pH-Meter ph211	Hanna Instruments, IT
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, US

Rollentisch, RS-TR10	Phoenix Instruments, DE
Sonifizierer	Bandelin electronic, DE
Spannungsgeber EV231	PEQLAB Biotechnologie, DE
Spannungsgeber, PAC 300	Bio-Rad Laboratories, DE
Spektrophotometer, Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie, DE
Sterilwerkbank	Köttermann, DE
Stickstoff Lagertank	Cryotherm, DE
<i>Thermocycler, Peqstar 96 Universal Gradient</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
Überkopfschüttler, MACS Mix	Miltenyi Biotec, DE
UV-Transilluminator <i>UVP Gel Solo Gel Documentation System</i>	Analytik Jena, DE
Vortexer, <i>Vortex Genie</i>	IKA, DE
Wärmeschrank	Memmert, DE
Wasserbad GFL1004	GFL, DE
Zellzählgerät, Cellometer® Auto 1000	Nexcelom Bioscience, US
Zentrifuge 5417R, Festwinkelrotor F45-30-11	Eppendorf, DE
Zentrifuge 5424, Festwinkelrotor F45-24-11	Eppendorf, DE
Zentrifuge 5810R, Ausschwingrotor A-4-62	Eppendorf, DE
Zentrifuge, Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, US

3.6 ANTIKÖRPER

3.6.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Immunisierte Spezies	Verdünnung <i>Western Blot</i>	Verdünnung <i>Simple Western</i>
EGFR, D38B1	Cell Signaling Technology, US	Kaninchen	1:1000	1:30
AKT, C67E7	Cell Signaling Technology, US	Kaninchen	1:1000	1:20
GAPDH, 6C5cc	Novus Biologicals, US	Maus	-	1:30
GFP, 7.1 und 13.1	Roche, CH	Maus	1:2000	1:100
mCherry	Bio-Techne, US	Kaninchen	1:1000	1:30
ANO1	Novus Biologicals, US	Kaninchen	-	1:10
ANO4	Aviva Systems Biology, US	Kaninchen	-	1:10
ANO5	Abcam, UK	Kaninchen	-	1:10
ANO6	OriGene Technologies, US	Kaninchen	-	1:10
ANO7	OriGene Technologies, US	Kaninchen	-	1:10
ANO9	LSBio, US	Kaninchen	-	1:10
ANO10	LSBio, US	Kaninchen	-	1:10

3.6.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Immunisierte Spezies	Gekoppelt mit	Verdünnung WB
Anti-Kaninchen	Jackson Immuno-research, US	Ziege	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000
Anti-Maus	Jackson Immuno-research, US	Schaf	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000
Anti-Maus	Protein Simple, US	-	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:50
Anti-Maus	Novus Biologicals, US	-	<i>Near-Infrared</i>	1:50
Anti-Kaninchen	Protein Simple, US	-	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:50
Anti-Kaninchen	Novus Biologicals, US	-	<i>Near-Infrared</i>	1:500

3.7 PLASMIDE

Tabelle 9: Plasmide

Name	Vektor	Herkunft
Anoctamin-1-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-4-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-5-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-6-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-7-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-9-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-10-V5/his	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-1-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-4-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-5-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	In dieser Arbeit generiert
Anoctamin-6-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-6-D408G-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	AG Reiß, Martin Veit (Kiel, DE)
Anoctamin-7-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-9-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-10-eGFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-6-mCherry	pReceiver M55	GeneCopoeia, US
Anoctamin-6-D408G-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Martin Veit (Kiel, DE)
GFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
mCherry	pReceiver M55	GeneCopoeia, US
AREG-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York, US)
TGF α -AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York, US)
BTC-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York, US)
CD137-tGFP	pCMV6-AC-GFP	OriGene, US

XKR8-mCherry	pReceiver M55	GeneCopoeia, US
XKR8-SA-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Maria Sperrhacker (Kiel, DE)
XKR8-TA-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Maria Sperrhacker (Kiel, DE)
XKR8-ST2A-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Maria Sperrhacker (Kiel, DE)
XKR8-SD-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Maria Sperrhacker (Kiel, DE)
XKR8-TD-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Maria Sperrhacker (Kiel, DE)
XKR8-ST2D-mCherry	pReceiver M55 (GeneCopoeia)	AG Reiß, Maria Sperrhacker (Kiel, DE)

3.8 SOFTWARE

Tabelle 10: Software

Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft, US
ImageJ 1.53e	National Institutes of Health, US
Genome Compiler (Version 2.2.88)	Twist Bioscience; US
Adobe Photoshop CS4 (Version 11.0)	Adobe Systems, US
Mendeley Desktop (Version 1.19.2)	Mendeley, UK
Olympus Fluoview 10 (Version 4.2)	Olympus, JP
QuantStudio Software	ThermoFisher, US
Compass for SW	Protein Simple, US
GraphPad Prism 9 (Version 9.0.2)	GraphPad Software, US

3.9 ZELLINIEN

HEK293T

HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney*) wurden ursprünglich aus humanen embryonalen Nierenzellen generiert und anschließend mit dem Simian-Virus 40 transformiert. Die adhären wachsenden Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusätzen (DMEM +/-) subkultiviert.

HT-29

HT-29-Zellen wurden aus einem primären kolorektalen Adenokarzinom 2. Grades einer 44-jährigen kaukasischen Frau gewonnen und weisen epitheliale Eigenschaften auf. Es handelt sich um adhären Zellen, die in DMEM +/- kultiviert wurden.

HeLa

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um epitheliale Zellen, die aus einem Zervix-Adenokarzinom der 31-jährigen Patientin Henrietta Lacks isoliert wurden. Es war die erste etablierte menschliche Zelllinie. Es sind adhären wachsende Zellen, die in DMEM +/- kultiviert wurden.

Für ein Experiment wurden zusätzlich die in Tabelle 11 aufgelisteten Zelllinien verwendet.

Tabelle 11: Zusätzliche verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Gewebe
HaCaT	Immortalisierte Keratinocytenzelllinie	Haut
A431	Isoliert aus epidermoidem Karzinom	
A375	Melanomzelllinie	
WM-115	Melanomzelllinie	
HeLa	Isoliert aus Zervixkarzinom	Gebärmutter oder Brust
A2780	Isoliert aus Eierstockkarzinom	
Igrov-1	Isoliert aus Eierstockkarzinom	
MCF-7	Brustkrebszelllinie	
Panc1	Isoliert aus Pankreaskarzinom	Pankreas
Panc89	Isoliert aus Pankreaskarzinom	
Colo357	Isoliert aus Pankreaskarzinom	
BxPC3	Isoliert aus Pankreaskarzinom	
HT29	Isoliert aus kolorektalem Adenokarzinom	Darm
CaCo2	Isoliert aus kolorektalem Adenokarzinom	
HepG2	Leberkarzinom-Zelllinie	Leber
HL60	Promyeloide Zellen einer Leukämiepatientin	Blut
Jurkat	Immortalisierte T-Lymphozyten eines Leukämiepatienten	

3.10 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank. Sämtliche verwendete Lösungen, Medien und Materialien waren steril und alle Arbeiten wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) mit 10 ml DMEM ++ kultiviert. Vor dem Gebrauch wurde das Medium in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Zellkulturmedium (DMEM ++)	DMEM	89 % (v/v)
	<i>High Glucose</i>	
	FCS	10 % (v/v)
	P/S	1 % (v/v)

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor sie über mehrere Minuten mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert wurden. Durch die proteolytische Aktivität des Trypsins lösen sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Ein Abstoppen der Proteolyse erfolgte durch Zugabe von 5 ml DMEM +/- . Nach der Resuspension der Zellen mit Hilfe des zugegebenen Mediums wurden sie durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf neuen Zellkulturschalen subkultiviert.

3.10.1 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Zu Beginn jedes Versuches innerhalb einer Experimentreihe wurde die gleiche definierte Anzahl an Zellen ausgesät. Hierzu wurden die Zellen nach erfolgter Ablösung durch Trypsin oder Accutase und Abstoppen mit DMEM +/- in ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. 25 µl der Zellsuspension wurden mit 25 µl 0,4 % (w/v) Trypanblau-Lösung vermischt und mit dem Zellszahlgerät Cellometer Auto1000 gezählt. Durch die Verwendung von Trypanblau können lebende von toten Zellen unterschieden werden, da der Farbstoff die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann. Somit werden nur tote Zellen angefärbt, in die der Farbstoff durch die zerstörte Membran eindringen kann. Die Ermittlung der Zellmenge für die Aussaat erfolgte anhand der Lebendzellzahl.

3.10.2 KRYOKONSERVIERUNG

Kryokonservierung diente zur langfristigen Lagerung der eukaryotischen Zellen. Diese wurden nach dem Ablösen von der Zellkulturschale in ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt und bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (Bio-freeze) aufgenommen und in einem Schraubdeckelröhrchen in einem Einfrierbehälter für 48 h bei -80 °C gelagert. Der Einfrierbehälter war mit Isopropanol gefüllt, wodurch eine gleichmäßige Abkühlung von -1 °C/min der Zellen gewährleistet wurde. Anschließend wurden die Zellen bei -196 °C in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum erneuten Kultivieren der Zellen wurden diese nach der Entnahme aus dem Stickstofftank schnellstmöglich in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium mit Zusätzen überführt und auf einer Zellkulturschale kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums.

3.10.3 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Die Transfektion von HEK293T-Zellen erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80 % mit Hilfe des Transfektionsreagenzes TurboFect™. Hierfür wurden die Zellen 24 h vorher in 12- oder 6-Well-Platten ausgesät. Anschließend wurde das alte Medium durch 1 ml frisches DMEM+/+ ersetzt. Das Pipettierschema für einfache sowie doppelte Transfektionsansätze ist in Tabelle 12 aufgeführt. Jeder Ansatz wurde in DMEM -/- (ohne Zusätze) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen für Experimente weiterverwendet.

Tabelle 12: Pipettierschema für Transfektionsansätze

	DMEM -/-	Plasmid	TurboFect™
Einfachtransfektion	100 µl	1000 ng ANO4/ANO9	2 µl
Einfachtransfektion	100 µl	500 ng CD137	1,5 µl
Einfachtransfektion (10 cm-Schale, Biotinylierung)	100 µl	6000 ng ANO4/ANO9	12 µl
Doppeltransfektion	100 µl	500 ng CD137 + 500 ng ANO6	3 µl
Doppeltransfektion (12-well, AP-Assay)	100 µl	500 ng AP-Substrat + 300 ng ANO-Plasmid	1,6 µl
Doppeltransfektion (12-well, AP-Assay)	100 µl	500 ng AP-Substrat + 500 ng XKR8	2 µl

3.10.4 INHIBITION UND STIMULATION IN ZELLKULTUREXPERIMENTEN

Die Inkubation der Zellen mit Inhibitoren und/oder Stimulanzen erfolgte stets in DMEM -/-. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass Antibiotika oder Wachstumsfaktoren im FCS keinen Einfluss nehmen. Bei einer gemeinsamen Verwendung von Inhibitor und Stimulanz wurde der Inhibitor 15 min im Voraus auf die Zellen gegeben. Je nach Versuchsreihe wurden die Zellen gegebenenfalls vorher mit einem Expressionsvektor transfiziert. Nachfolgend sind die verwendeten Inhibitoren und Stimulanzen in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Stimulanzen und Inhibitoren

	Bezeichnung	Verwendung	Eingesetzte Konzentration
Inhibitoren	Marimastat (MM)	Breitband-Metalloprotease-Inhibitor	10 µM
	GI254023X (GI)	ADAM10-Inhibitor	3 µM
	GW208264X (GW)	ADAM10/17-Inhibitor	3 µM
	Lactadherin (LA)	Spezifischer PS-Inhibitor	1 µM; 2 µM
	O-phospho-L-Serin (OPS)	Kompetitiver Inhibitor für oberflächenexponiertes PS	10 mM; 20 mM; 30 mM

Stimulanzen	Ionomycin (IO)	Kalzium-Ionophor	1 μ M
	PMA	Protein-Kinase C-Aktivator	300 ng/ml

3.11 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.11.1 ALKALISCHER PHOSPHATASE ASSAY

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von ADAM10 und -17 wurden spezifische Substrate beider Proteasen, die in ihrer extrazellulären Domäne an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt waren, eingesetzt. Diese wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden je nach Experiment in 400 μ l DMEM -/- mit dem jeweiligen Inhibitor bzw. Stimulanz inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in der Well-Platte mit 300 μ l Lysepuffer versetzt und für 30 min auf dem Plattenschüttler lysiert.

Lysepuffer	EDTA	1 mM
	1,10-Phenantrolin	10 mM
	Triton X-100	2,5 % (v/v)

Die Überstände sowie die Zelllysate wurden dann bei 15.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Von den Überständen wurden je 100 μ l, von den Zelllysaten je 10 μ l in eine 96-Well-Platte übertragen. Die Lysate wurden anschließend mit 90 μ l AP-Puffer verdünnt.

Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer pH 9,5	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	20 mM
	TRIS	100 mM

Nachfolgend wurden 100 μ l einer 1 mg/ml AP-Substratlösung zu allen Proben auf der 96-Well-Platte gegeben. Das Enzym setzt das Substrat um, wodurch ein Farbumschlag erfolgt. Dieser kann durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer bestimmt werden. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde dann im Überstand und im Zelllysate photometrisch detektiert und daraus das Shedding berechnet. Es wurde in Dreifachwerten gemessen.

3.11.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Der *Sandwich*-ELISA wurde verwendet, um spezifische Proteine in einer Probe nachzuweisen. Es wurden spezielle *high-binding* 96-Well-Platten genutzt, in denen die Bindung des nachzuweisenden Proteins zunächst an einen immobilisierten Antikörper (*Capture*-Antikörper) und anschließend die Bindung eines zweiten, an Biotin gekoppelten Antikörpers (*Detection*-Antikörper) erfolgte. Nachfolgend wurden die Proben mit Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP) inkubiert. Durch die Zugabe eines chromogenen Peroxidase-Substrates (Tetramethylbenzin), dessen Umsetzung im direkten Verhältnis zur Menge des gesuchten Proteins steht, erfolgte die Quantifizierung. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Als Referenz wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Jede Probe wurde in Doppelwerten bestimmt. In dieser Arbeit wurden DuoSet ELISAs der Firma R&D nach Herstellerangaben verwendet.

3.11.3 FLUORESZENZFÄRBUNG

Fluoreszenzfärbungen dienten in dieser Arbeit dem Nachweis von auf der Oberfläche der Zellmembran exponiertem Phosphatidylserin. Hierfür wurde Annexin V verwendet, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 568 gekoppelt war. Annexin V besitzt eine hohe Affinität an PS zu binden und kann gleichzeitig die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen, sodass nur auf der Oberfläche exponiertes PS angefärbt wird. Zum Anfärben der Zellkerne wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst33342 eingesetzt.

Die Zellen wurden auf *ibiTreat* μ -slide Polymerplatten ausgesät, angefärbt und mikroskopisch untersucht. Für die Färbung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Annexin V (1:50) und Hoechst (1:1000) in 1x ABB für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweifach mit 1x ABB gewaschen.

10x Annexin <i>Binding</i> <i>Buffer</i> (ABB)	HEPES	0,1 M
	NaCl	1,4 M
	CaCl ₂	25 mM

Im Anschluss wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit einer 3 % (v/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert. Dann wurden sie zweimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und abschließend mit *ibidi mounting medium* bedeckt. Das Medium verhindert das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen und stabilisiert die gefärbten Zellen für

die Lagerung. Die Visualisierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop von Zeiss mit einem 63x/100x Plan-Apochromat Öl-Objektiv.

3.11.4 QUANTIFIZIERUNG VON FLUORESCENZSIGNALEN

Die Analyse von Bildaufnahmen wurde mit dem Programm ImageJ Version 1.53 durchgeführt. Hierbei wurde die Fläche der Fluoreszenzsignale der Annexin V-Färbung sowie die Zellzahl anhand der mit Hoechst33342 angefärbten Zellkerne bestimmt. Die beiden Werte wurden dann miteinander korreliert, um eine Aussage zur Veränderung des Fluoreszenzsignals (hier exponentiertes PS) in Relation zur entsprechenden Kontrolle treffen zu können.

3.12 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.12.1 PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN

Die Proteinextraktion aus Zellen war erforderlich, um Proteine mittels *Western Blot* oder *Simple Western* zu analysieren. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen in einer 6-Well-Platte mit 150 µl Lysepuffer versetzt. Zur mechanischen Lyse wurden die Zellen in drei Zyklen bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut.

Lysepuffer	TRIS	5 mM
	EGTA	1 mM
	Saccharose	250 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
	1,10-Phenanthrolin	10 mM
	<i>cOmplete</i> TM , Protease-Inhibitor-Mix	1 x
	<i>PhosSTOP</i> TM , Phosphatase-Inhibitor-Mix	1 x

Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und das Zelllysate in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 15.000 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.12.2 QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES

Für die Quantifizierung des Proteingehaltes in den Zelllysaten wurde der *Pierce 660 nm Protein Assay* genutzt. Je 100 µl 660 nm-Reagenz und 6 µl Zelllysate wurden in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Danach wurde die Absorption des gebildeten Protein-Farbstoff-Komplexes bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Anhand eines zuvor ermittelten Proteinstandards konnte dann der Proteingehalt der Lysate errechnet werden.

3.12.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Mittels SDS-PAGE (*sodiumdodecylsulfate polyacrylamidgel electrophoresis*) wurden Proteine und deren Gemische basierend auf ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde nach dem von Laemmli (1970) beschriebenen Verfahren mit einem diskontinuierlichen Gelsystem gearbeitet. Dieses besteht aus einem Sammelgel und einem darauffolgenden Trenngel, welche unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen und pH-Werte aufweisen. Die Proben wurden in 6x SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 5 min aufgeköcht. Bei der Untersuchung von Proteinen der Familie der Anoctamine wurden die Proben mit dem Puffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nicht geköcht. Puffer und Gele wurden wie folgt verwendet:

6x SDS-Probenpuffer pH 6,8	TRIS	0,75 M
	SDS	12 % (w/v)
	Glycerin	6,54 M
	EDTA	6 mM
	DTT	120 mM
	Bromphenolblau	0,15 % (w/v)
Sammelgelpuffer pH 6,8	TRIS	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Trenngelpuffer pH 8,8	TRIS	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Sammelgel 4,5 %	Sammelgelpuffer	2,5 ml
	Acrylamid	1,7 ml
	H ₂ O	5,8 ml
	APS	60 µl
	TEMED	30 µl
Trenngel 10 %	Trenngelpuffer	2,5 ml
	Acrylamid	3,3 ml
	H ₂ O	4,0 ml
	APS	60 µl
	TEMED	30 µl

Die Gele wurden in einem vertikalen Gelsystem (PeqLab) hergestellt. Nach vollständiger Polymerisation der Gele wurden diese in einer Elektrophorese-Apparatur platziert, die dann mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt wurde. Die Taschen wurden mit Puffer gespült und anschließend mit den aufbereiteten Proben beladen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA und max. 150 V.

1x SDS-Laufpuffer pH 8,8 – 8,9	TRIS	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

3.12.4 WESTERN BLOT

Für den Transfer der durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (0,45 µm) wurde das *tank blot*-Verfahren genutzt. Diesen Transfer bezeichnet man als *Western Blotting*. Zunächst wurde die Membran mit Methanol aktiviert und nachfolgend zusammen mit *Whatman*-Filterpapieren in Transferpuffer äquilibriert.

1x Transferpuffer pH 8,2 – 8,4	TRIS	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 % (v/v)

Zwei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Gel und zwei weitere Filterpapiere wurden geschichtet und nach Herstellervorgaben in die mit Transferpuffer gefüllte Apparatur gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 2 h bei 150 mV.

3.12.5 IMMUNOLOGISCHE DETEKTION

Nach erfolgtem Transfer auf die Membran wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Hierfür wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit einer 5 % Milchpulverlösung in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 5 % Milchpulverlösung. Konzentration und Inkubationsdauer richteten sich nach den Herstellerangaben. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und mit einem *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten sekundärem Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die

Membran dann nochmals dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen wurde erfolgte die Detektion mit *ECL Select Western Blotting Detection Reagent* nach Herstellerangaben und der *Fusion FX7* Chemilumineszenzkamera.

1x TRIS-buffered saline with Tween20 (TBS-T) pH 8,2 – 8,4	TRIS	20 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	140 mM
	Tween20	0,1 % (v/v)

3.12.6 STRIPPEN DER PVDF-MEMBRAN

Um verschiedene Proteine auf derselben Membran zu detektieren, müssen zuvor verwendete Antikörper, die an der Membran haften, wieder entfernt werden. Dies erfolgte durch die Inkubation mit 20 ml *Stripping* Puffer für 30 min bei 65 °C. Nachfolgend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und erneut für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulverlösung inkubiert. Anschließend konnte die Membran mit weiteren entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern, wie bereits beschrieben, inkubiert werden.

<i>Stripping</i> Puffer pH 6,7	TRIS	60 mM
	SDS	2 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	100 mM

3.12.7 SIMPLE WESTERN

Unter *Simple Western*TM versteht man ein vollautomatisiertes *Western Blot*-System. Hierbei läuft jede Probe in einer eigenen, mit SDS-Gel gefüllten, Kapillare. *Simple Western*TM wurde nach Herstellerangaben des JESSTM (Protein Simple) verwendet. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der integrierten *Compass*-Software.

3.12.8 BIOTINYLIERUNGSASSAY

Der Biotinylierungsassay wurde verwendet, um Proteine selektiv auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Biotin ist ein kleines wasserlösliches Protein, welches von einer Vielzahl an Makromolekülen gebunden werden kann. Durch die geringe Größe des Biotins werden die biologischen und chemischen Eigenschaften der Makromoleküle durch die Bindung kaum beeinträchtigt. Der Assay basiert auf dem Einsatz eines zellimpermeablen, spaltbaren Reagenzes (Sulfo-NHS-SS-Biotin), welches aufgrund der negativen Ladung die Zellmembran nicht über-

winden kann. Nach erfolgter Behandlung werden die Zellen lysiert und das biotinylierte Protein wird durch Präzipitation mit Avidin-konjugierten Agarosekügelchen isoliert. In dieser Arbeit wurde mit dem Pierce *Cell Surface Protein Isolation Kit* der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben gearbeitet. Im Anschluss wurden die Proben im *Simple Western™* analysiert. Als positive Kontrolle wurde ein Antikörper gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) verwendet, welcher als Zelloberflächenprotein bei erfolgreich durchgeführtem Assay sowohl oberflächlich als auch im Lysat nachweisbar sein sollte. Ein Antikörper gegen die AKT Serin/Threonin Kinase 1 (AKT) diente als negative Kontrolle zum Ausschluss intrazellulärer Proteine.

3.13 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.13.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

Für die Amplifikation von Expressionsvektoren wurde in dieser Arbeit mit dem *Escherichia (E.) coli*-Stamm XL10-Gold (Tet^RΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F⁺ proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]) gearbeitet. Durch Transformation wurden Plasmide in *E. coli* eingebracht, welche dann in Form von extrachromosomalen zirkulären Plasmiden vervielfältigt werden. Die Plasmide enthielten eine Antibiotikaresistenzkassette, sodass eine Selektion erfolgreich transformierter Bakterien über die Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zum Medium erreicht werden konnte. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte entweder in flüssigem Luria-Bertani (LB)-Medium bei ständiger Rotation von 200 rpm oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C.

Luria-Bertani (LB)-Medium pH 7	NaCl	10 g/l
	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l

LB-Agar pH 7	LB-Medium	
	Agar-Agar	15 g/l

3.13.2 KRYOKONSERVIERUNG

Für eine langfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden die Bakterien zunächst in 10 ml LB-Medium üN bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Am

nächsten Tag wurden sie bei 500 xg für 5 min abzentrifugiert und das entstandene Pellet wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Bakterien wurden in Einfrierröhrchen bei -80 °C gelagert.

Einfriermedium	LB-Medium	85 % (v/v)
	Glycerin	15 % (v/v)

3.13.3 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Die Transformation erfolgte mit chemisch kompetenten *E. coli*. Diese wurden aufgetaut und für 1 h auf Eis zusammen mit 1 µl des zu transformierenden Plasmids inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Transformationsansatz für 40 s bei 42 °C erhitzt und nochmal für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden dem Ansatz 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz auf mit 100 µg/ml Ampicillin versetzten LB-Platten ausgestrichen und üN bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Zur Subkultivierung einzelner Bakterienklone wurden diese von der Platte gepickt und in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin üN bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

<i>Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)-Medium pH 7,5</i>	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	20 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glukose	20 mM

3.14 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.14.1 PLASMIDPRÄPARATION

Zur Plasmidpräparation wurden entsprechende Klone der XL10-Gold-Stämme in je 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin üN bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Präparation mit dem *Maxi-Plasmid-Prep Kit* nach Angaben der Herstellerfirma Roche.

3.14.2 ISOLATION VON MRNA

Für die Isolation von mRNA aus Zellen wurde das *Nucleo-Spin RNA Kit* nach Angaben der Herstellerfirma Firma Macherey-Nagel verwendet. Während des gesamten Prozesses wurden ausschließlich gestopfte RNase-freie Spitzen und sterile Reagenzgefäße verwendet.

3.14.3 QUANTIFIZIERUNG VON DNA UND MRNA

Die DNA- oder mRNA-Konzentration von Lösungen wurde mittels *Multiscan SkyHigh* bestimmt. Das Gerät misst die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie bei 280 nm. Anhand der Absorption bei 260 nm wird die DNA-Konzentration ermittelt. Durch das Verhältnis der gemessenen Absorptionen bei 260 nm und 280 nm wird die Reinheit einer Probe bestimmt.

3.14.4 REVERSE TRANSKRIPTION

Isolierte mRNA wurde mittels reverser Transkription mit dem *PrimeScript™ RT Master Mix Kit* der Firma Takara zu cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 0,5 µg RNA mit 2 µl des 5x *PrimeScript™ RT Master Mixes* und H₂O (*ad* 10 µl) zusammen pipettiert. Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 15 min und die Inaktivierung des Enzyms bei 85 °C für 5 s im Thermocycler *peqSTAR 96 universal*. Für die gesamten Arbeitsschritte wurden RNase-freie Spitzen und sterile Reagenzgefäße verwendet.

3.14.5 OLIGONUKLEOTIDE

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden mit der Software *SnapGene* entworfen. Dabei wurde beachtet, dass die Primer einen GC-Gehalt von 50-60 % aufweisen und ihre Schmelztemperatur bei 55-65 °C liegt. Außerdem wurden die Primer Intron-überspannend gewählt, um eventuell noch vorhandene genomische DNA von der Amplifikation auszuschließen. Die gesamten verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich hergestellt und sind nachfolgend aufgelistet (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Name	Sequenz
<i>hANO4</i>	<i>hANO4_for</i>	5'-AGCCAAGTCAGTAAAGAAGTCTTGC-3'
	<i>hANO4_rev</i>	5'-CAGCCTCATGAATGGACAG-3'
<i>hANO9</i>	<i>hANO9_for</i>	5'-CATCCTCTTTGAGCACGTG-3'
	<i>hANO9_rev</i>	5'-TGTTCTTCACCGACTGAGG-3'
<i>hHPRT</i>	<i>hHPRT_for</i>	5'-TGGCGTCGTGATTAGTGATG-3'
	<i>hHPRT_rev</i>	5'-TCTCGAGCAAGACGTTTCAGT-3'
<i>hB2M</i>	<i>hB2M_for</i>	5'-ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA-3'
	<i>hB2M_rev</i>	5'-GGCATCTTCAAACCTCCATG-3'

3.14.6 REAL-TIME PCR

Die *Real-Time* PCR wurde zur Untersuchung der mRNA-Expression eines Zielgens in Zellen verwendet. Zur Erhöhung der Spezifität wurde mit der *touchdown*-Variante gearbeitet, bei der die *annealing*-Temperatur in den ersten Zyklen höher als die Optimaltemperatur gewählt wird. Dabei entstehen spezifische Produkte, welche in den folgenden Zyklen weiter amplifiziert werden. Für die Real-Time PCR wurde *SYBR premix EX Taq II-Mix* (Takara) mit dem Farbstoff *SYBR Green I* verwendet. Der Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA, wobei ein Fluoreszenzsignal emittiert wird und sich darüber die Menge der amplifizierten cDNA quantitativ bestimmen lässt. Die Spezifität der amplifizierten DNA-Fragmente wurde anhand der Schmelzkurven überprüft. Die Expression des Zielgens wurde mit einem internen Standard, dem sogenannten *Housekeeping*-Gen, verglichen. Die Expression eines *Housekeeping*-Gens in der Zelle ist unabhängig vom Zellstadium und äußeren Einflüssen.

Ein 10 µl Standard-Ansatz wurde wie folgt zusammen pipettiert:

10 µl <i>Real-Time</i> PCR-Ansatz	<i>SYBR premix Ex Taq II-Mix</i>	5,2 µl
	cDNA	1 µl (10 ng/µl)
	<i>forward</i> Primer	0,5 µl (2,5 µM)
	<i>reverse</i> Primer	0,5 µl (2,5 µM)
	H ₂ O	2,8 µl

Die *Real-Time* PCR wurde mit dem in Tabelle 15 aufgelisteten Programm im QuantStudio 3 durchgeführt. Dabei erfolgte jede Messung in Doppelwerten. Bei der Auswertung wurde die zugehörige *QuantStudio™ Design & Analysis Software* verwendet. Die weitere Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (*cycle threshold*):

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{housekeeping-Gen})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{stimulierte Probe}) - \Delta\text{Ct} (\text{unbehandelte Kontrolle})$$

$$\text{x-fache Veränderung} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Tabelle 15: Verwendetes Programm für die *Real-Time* PCR

	Schritt	Temperatur, Zeit
	Initiale Denaturierung	95 °C, 30 s
6 Zyklen	Denaturierung	95 °C, 5 s
	<i>annealing</i>	66 °C, (-1 °C/Zyklus), 30 s
40 Zyklen	Denaturierung	95 °C, 15 s
	<i>annealing</i>	60 °C, 30 s

Schmelzkurve	Denaturierung	66 °C → 95 °C (0,3 °C/s)
	Finale Denaturierung	95 °C, 15 s

3.14.7 KLONIERUNG EINES ANO5-eGFP-VEKTORS

Um einen Vektor zu generieren, welcher zu einer Expression von ANO5 mit einem fusionierten eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) führt, wurden als Ausgangsvektoren V5/his-fusioniertes ANO5 (pcDNA3.1-hANO5-V5/his, zur Verfügung gestellt von K. Kunzelmann, Regensburg, DE) und ein eGFP Leervektor (pcDNA3.1-eGFP) verwendet (Abbildung 5). Zunächst wurden beide Ausgangsvektoren mittels Restriktionsverdau an den Schnittstellen *XhoI* und *KpnI* geschnitten. Das entstandene DNA-Fragment von ANO5 (= Insert) wurde mit dem *GeneJet Gel Extraction Kit* aus einem Agarosegel extrahiert. UV-Intensität und Bestrahlungsdauer wurden hierbei möglichst gering gehalten. Das DNA-Fragment, welches das eGFP enthielt (=Vektor), wurde mit dem *GeneJet PCR Purification Kit* aus einem Restriktionsansatz aufgereinigt. Die Aufreinigungen wurden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Ligation von Vektor und Insert zu pcDNA3.1-hANO5-eGFP mit Hilfe der *T4 DNA Ligase* nach Herstellerprotokoll. Dabei wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt. Es gilt:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kbp Insert}}{\text{kbp Vektor}} \times \text{Verhältnis von} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng Insert}$$

Das neu entstandene Plasmid wurde zur Vervielfältigung wie in 3.13.3 beschrieben in *E. coli* transformiert. Anhand einer Sequenzierung wurde die Basensequenz kontrolliert. Da sich das eGFP nicht im *open reading frame* (ORF) befand, wurde eine Mutagenese mit Hilfe des *Quikchange II Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Agilent Technologies angeschlossen. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte eine erneute Überprüfung durch Sequenzierung.

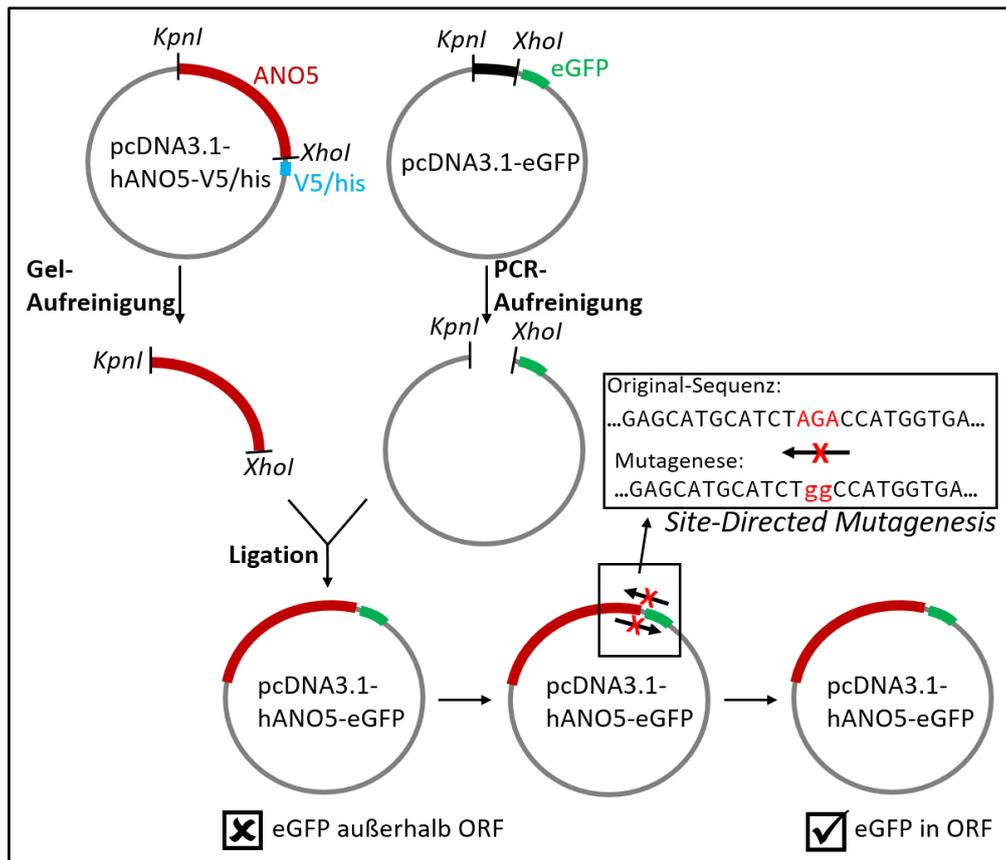


Abbildung 5: Strategie zur Klonierung und Mutation eines ANO5-eGFP-Überexpressionsvektors. ANO5 wurde aus dem bestehenden Vektor ausgeschritten und in das Plasmid pcDNA3.1-eGFP eingebracht.

3.14.8 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurden 2,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer gegeben und so lange erwärmt, bis sich eine homogene Lösung bildete. Nachfolgend wurden 5 µl *GelRed* der Firma Biotium pro 100 ml Lösung zugesetzt und vermischt. Zur Polymerisation wurde die Lösung in eine horizontale Gelkammer (Bio-Rad) gegeben. Nach Aushärtung des Gels wurde 1x TAE-Puffer als Laufpuffer in die Gelkammer gegeben. Die Proben wurden mit 6x *Loading Dye Purple* Ladepuffer versetzt und in je eine Tasche des Gels überführt. Zusätzlich wurde *Gene Ruler 100 bp Ladder* als Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 1-2 h. Die Dokumentation des Gels erfolgte mit dem UV-Transilluminators *UVP Gel Solo Gel Documentation System* der Firma Analytik Jena.

10x TAE-Puffer pH 8	TRIS	400 mM
	Acetat	200 mM
	EDTA	10 mM

3.14.9 DNA-SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten, PCR-Produkten oder Expressionsvektoren wurde mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) durch die Firma Genewiz durchgeführt.

3.15 STATISTIK

Die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit erfolgte mit dem Programm *Prism Software* Version 9. Wurden zwei oder weniger unabhängige Experimente durchgeführt, so wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Ab drei unabhängig durchgeführten Experimenten wurde der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) genannt. Die einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) einschließlich eines Post-Hoc-Tests wurde nach Bonferroni oder Holm-Sidak durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich angesehen. Zur Darstellung von Signifikanzunterschieden wurde bei einer Erhöhung ein Stern (*) und bei einer Reduktion eine Raute (#) als Kennzeichnungssymbol gewählt. Nicht signifikante Unterschiede wurden mit ns gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

Das ADAM10/17-vermittelte Shedding stellt einen Schlüsselmechanismus in der Regulation vieler Entwicklungsprozesse und zellulärer Funktionen dar. Eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von ADAM10/17 spielt die Translokation des negativ geladenen Phosphatidylserins (PS) auf die Zelloberfläche (Bleibaum et al., 2019; Sommer et al., 2016). Die reversible Translokation von PS wird sowohl durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als auch durch Phorbolester wie PMA gefördert und kann bidirektional durch sogenannte Scramblasen erfolgen. Im Menschen wurden bislang zwei Familien von Scramblasen hauptsächlich untersucht, die Xkr-Familie und die Anoctamine (ANOs). Da die veränderte Aktivität von sowohl Scramblasen als auch ADAMs mit einer Vielzahl an Immunerkrankungen sowie der Tumorentwicklung in Verbindung gebracht wird (Kunzelmann et al., 2019; Reiss & Saftig, 2009; Saftig & Reiss, 2011), sind Untersuchungen zu ihrer Regulation und funktionellen Relevanz von besonderer Bedeutung.

4.1 DER EINFLUSS VON XKR8 AUF DAS ADAM17-VERMITTELTE SHEDDING

XKR8 ist eines von neun Mitgliedern der XKR-Familie. Es wurde bislang als eine Caspase-abhängige Scramblase beschrieben, die die PS-Externalisierung während der Apoptose vermittelt (Mariño & Kroemer, 2013; Sivagnanam et al., 2017). Darüber hinaus wurde in murinen B-Lymphozyten kürzlich gezeigt, dass XKR8 auch durch eine Phosphorylierungsreaktion aktivierbar ist (Sakuragi et al., 2019). Das Substrat-Shedding von ADAM17 kann durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert werden (Groth et al., 2016; Le Gall et al., 2010; Lorenzen et al., 2016). PMA führt zu einer Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) und zu einer Externalisierung von PS (Nguyen et al., 2011; Sommer et al., 2016). Ob die PKC hierbei direkt mit PS interagiert oder ob die PS-Externalisierung durch z.B. eine Scramblase wie XKR8 vermittelt wird, ist noch nicht hinreichend bekannt.

Für die Untersuchungen, ob XKR8 einen regulatorischen Einfluss auf ADAM17 ausübt, wurden in dieser Arbeit HEK293T-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für XKR8 kodiert. Der Vektor hatte am N-terminalen Ende ein mCherry-Tag, sodass die Transfektion anhand des roten mCherry-Signals im Fluoreszenzmikroskop oder mit *Simple Western* mit einem Antikörper, der gegen mCherry gerichtet war, überprüft werden konnte. Als mock-Kontrolle diente ein mCherry-Leervektor.

4.1.1 NACHWEIS VON XKR8 AUF DER ZELLOBERFLÄCHE

Zunächst sollte die zelluläre Lokalisation des transient transfizierten XKR8 untersucht werden. Damit XKR8 durch PS-Exposition einen Einfluss auf das ADAM17-vermittelte Shedding ausüben könnte, müsste es in der Plasmamembran vorliegen. Um dies zu untersuchen, wurde eine Oberflächenbiotinylierung mit transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt. Da der Vektor für ein an mCherry gekoppeltes XKR8 kodierte, konnte die Transfektion vorab anhand des mCherry-Signals (rot) im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden (Abbildung 6A). Bei der Oberflächenbiotinylierung kommt ein zellimpermeables Reagenz zum Einsatz, welches aufgrund der negativen Ladung die Zellmembran nicht überwinden kann und lediglich Proteine auf der Oberfläche markiert. So können Proteine selektiv auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde eine *Simple Western* Analyse angeschlossen (Abbildung 6B). Dabei wurde sowohl das aus unbiotinylierten Zellen gewonnene Zelllysats als auch die biotinylierte Fraktion aufgetragen. Als positive Kontrolle wurde ein Antikörper gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) verwendet, von dem bekannt ist, dass dieser auf der Zelloberfläche vorliegt. AKT Serin/Threonin Kinase 1 (AKT) ist ein intrazelluläres Protein und diente bei der Detektion als negative Kontrolle.

Die Ergebnisse der *Simple Western* Analyse des Zelllysats bestätigten die im Fluoreszenzmikroskop beobachtete erfolgreiche Transfektion von XKR8. XKR8 besitzt eine errechnete Größe von 45 kDa. Zusammen mit dem gekoppelten mCherry (30 kDa) ergibt sich eine Größe von 75 kDa für das Gesamtprotein. Eine entsprechende Bande konnte mittels eines Antikörpers gegen mCherry im Lysat der XKR8-Probe detektiert werden. Die erfolgreiche Durchführung des Biotinylierungsassays lässt sich durch Betrachtung der Bande für EGFR bestätigen. EGFR besitzt eine errechnete Größe von 175 kDa und eine entsprechende Bande konnte wie erwartet sowohl im Zelllysats als auch in den biotinylierten Proben detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Markierung von Oberflächenproteinen gelungen ist. Darüber hinaus konnte in der biotinylierten Fraktion eine Bande bei ca. 75 kDa nach Transfektion mit XKR8 nachgewiesen werden. Da das intrazelluläre Protein AKT nur im Zelllysats, jedoch nicht in den biotinylierten Proben detektiert wurde, war sichergestellt, dass keine intrazellulären Proteine versehentlich markiert wurden. Dies bedeutet, dass XKR8 bei Überexpression erfolgreich auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte.

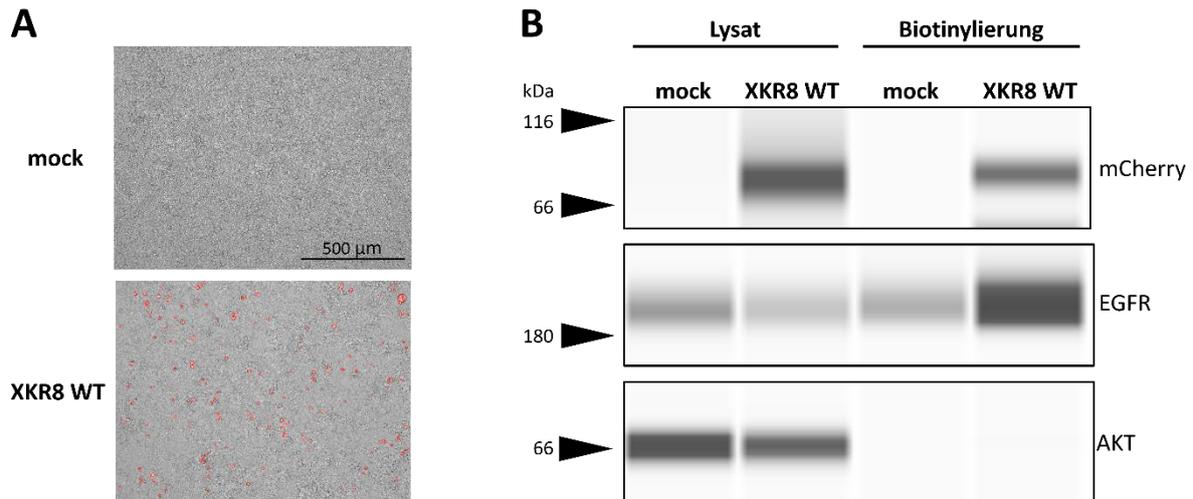


Abbildung 6: Oberflächenbiotinylierung von XKR8 in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit XKR8-mCherry oder einem mock-Vektor transfiziert (48 h). Eine optische Transfektionskontrolle erfolgte durch das Fluoreszenzsignal von mCherry (rot) (A). Zur Untersuchung der Lokalisation von XKR8 wurde eine Oberflächenbiotinylierung und eine anschließende Analyse im *Simple Western* durchgeführt (B). Hierbei wurde sowohl Gesamtzelllysat als auch die biotinylierte Fraktion aufgetragen. Als Kontrolle für Zellmembranproteine diente EGFR, AKT diente als Kontrolle für im Zytosol lokalisierte Proteine.

4.1.2 DIE ÜBEREXPRESSION VON XKR8 FÜHRT ZU EINER VERMEHRTEN PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG

Durch die nachgewiesene Lokalisation von XKR8 in der Plasmamembran nach Überexpression in HEK293T-Zellen ist es denkbar, dass XKR8 eine Rolle bei der PS-Externalisierung unter PMA-Stimulation und damit bei der Aktivierung von ADAM17 spielt. Um dies zu prüfen, wurden HEK293T-Zellen wieder mit einem Vektor, welcher für XKR8-mCherry kodierte, transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 30 min mit PMA stimuliert und anschließend mit Annexin V-AF488 gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Annexin V bindet mit hoher Affinität an PS und kann gleichzeitig die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen, sodass nur auf der Oberfläche exponiertes PS angefärbt wird.

Die Stimulation der Zellen mit PMA führte zu einer verstärkten Externalisierung von PS im Vergleich mit den jeweiligen unbehandelten Zellen. Bei Überexpression von XKR8 war augenscheinlich sowohl das konstitutiv exponierte PS als auch die PS-Exposition nach Stimulation verglichen zur mock-Kontrolle erhöht (Abbildung 7A). Eine quantitative Auswertung bestätigte diese Tendenz (Abbildung 7B).

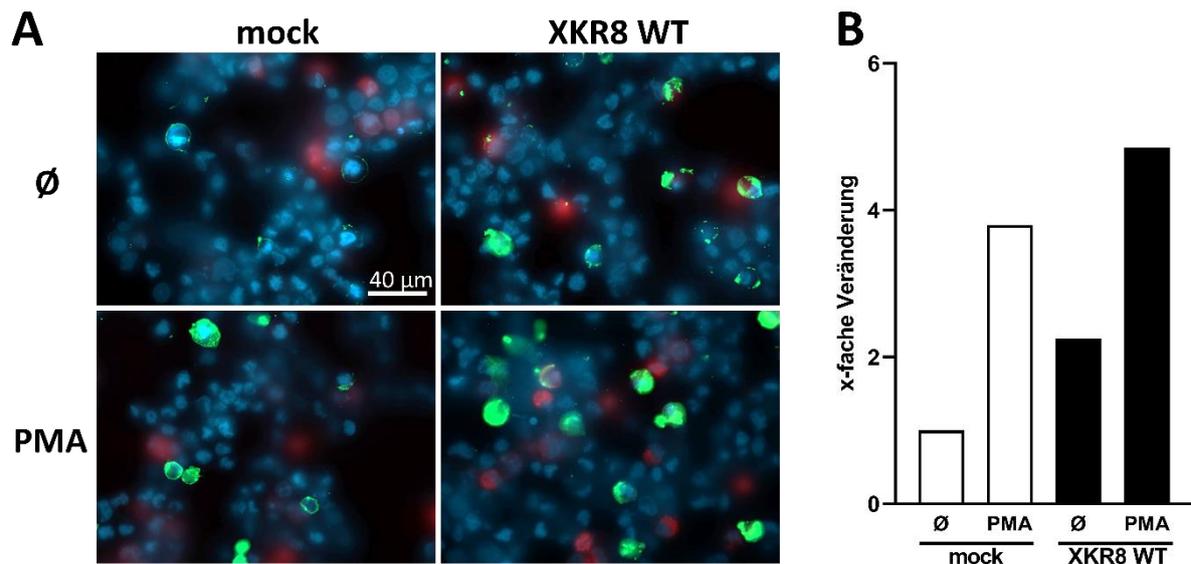


Abbildung 7: In Anwesenheit von XKR8 ist die PS-Externalisierung erhöht. HEK293T-Zellen wurden mit XKR8-mCherry oder einem mock-Vektor transfiziert (48 h) und anschließend 30 min mit PMA (100 ng/ml) behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen mit Annexin V-AF488 (grün) angefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 angefärbt (blau). Der Maßstab beträgt 40 μ m. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen (A). Für eine Quantifizierung der PS-Externalisierung wurden die Fläche der Fluoreszenzsignale der Annexin V-Färbung sowie die Zellzahl anhand der angefärbten Zellkerne bestimmt. Die beiden Werte wurden ins Verhältnis gesetzt und auf die unbehandelte mock-Kontrolle normiert (x-fache Veränderung) (B). Ø: unstimuliert

4.1.3 DAS SHEDDING VON TGF-ALPHA WIRD DURCH XKR8 ERHÖHT

Aufgrund der vorangegangenen Beobachtungen, dass XKR8 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte und die Externalisierung von PS in Gegenwart von XKR8 erhöht war, ist ein regulatorischer Zusammenhang mit ADAM17 denkbar. Um zu überprüfen, ob XKR8 bei PMA-Stimulation einen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM17 hat, wurden in dieser Arbeit HEK293T-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für XKR8-mCherry kodierte. Zusätzlich erfolgte die Transfektion mit einem der ADAM17-Substrate TGF-alpha ($TGF\alpha$) oder Amphiregulin (AREG). Die verwendeten Substrate waren extrazellulär mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt, die in den Überstand freigesetzt wird, wenn die Substrate von der Zelloberfläche abgespaltet werden. Die transfizierten Zellen wurden für 30 min mit PMA in An- oder Abwesenheit verschiedener Inhibitoren stimuliert. Durch den Einsatz von Inhibitoren kann beurteilt werden, welche Proteasen an der Substratfreisetzung beteiligt sind und welchen Anteil sie daran haben. Marimastat (MM) ist ein Breitband-Metalloprotease-Inhibitor, GI inhibiert präferenziell ADAM10 und GW inhibiert sowohl ADAM10 als auch

ADAM17 (Ludwig et al., 2005). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde dann im Überstand und im Zelllysat photometrisch detektiert und daraus das prozentuale Shedding berechnet (Abbildung 8).

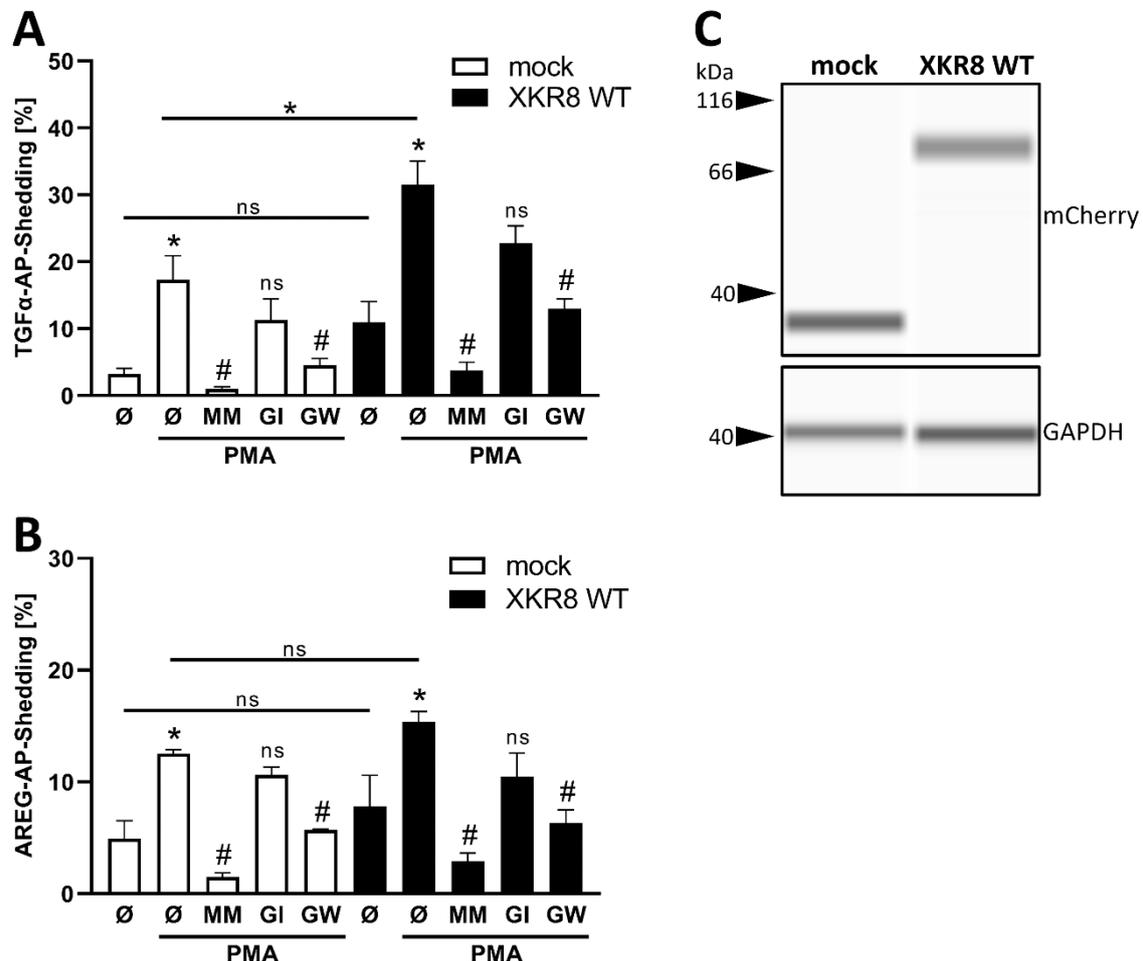


Abbildung 8: XKR8 erhöht die Freisetzung von TGFα. HEK293T-Zellen wurden mit XKR8 Wildtyp (WT)-mCherry oder mock (mCherry-Leervektor) sowie einem der Substrate TGFα-AP (A) oder AREG-AP (B) transfiziert (48 h). Die Stimulation mit PMA (100 ng/ml) erfolgte für 30 min in An- oder Abwesenheit der gekennzeichneten Inhibitoren, Ø: unstimuliert. Die Inhibitoren MM (10 µM), GI (3 µM) und GW (3 µM) wurden 15 min vor der Stimulation mit PMA zu den Zellen gegeben. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysat (Shedding [%]). Eine Kontrolle der erfolgreichen Transfektion erfolgte mit *Simple Western* (C). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen nur mit PMA behandelten Probe, ns kennzeichnet einen nicht signifikanten Unterschied. (n=3; */# P < 0,05; MW ± SEM)

Für beide Substrate führte die Stimulation mit PMA zu einer erhöhten Freisetzung sowohl in der Kontrolle als auch in den XKR8-transfizierten Zellen. Die PMA-induzierte Freisetzung von TGFα war in XKR8-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 8A), während die Freisetzung von AREG unbeeinflusst blieb (Abbildung 8B). Beim Einsatz der Inhibitoren zeigte sich für beide Substrate in den XKR8-transfizierten Zellen das

gleiche Bild wie bei der Kontrolle. Während MM und GW das Shedding der ADAM17-Substrate TGF α und AREG signifikant reduzierten, führte der ADAM10-Inhibitor GI erwartungsgemäß zu keiner signifikanten Reduktion. Die erfolgreiche Transfektion von XKR8-mCherry und dem mock-Vektor (mCherry) wurde mit *Simple Western* kontrolliert (Abbildung 8C). Eine entsprechende Bande bei 30 kDa konnte in der mock-Kontrolle detektiert werden. Eine Bande konnte ebenfalls für XKR8-mCherry bei 75 kDa detektiert werden, welche nicht in der mock-Kontrolle auftauchte. Als Ladenkontrolle diente hierbei ein Antikörper gegen GAPDH, welcher in den mock- sowie in den XKR8-transfizierten Zellen ein ähnliches Signal zeigte.

4.1.4 MUTATIONEN DER PHOSPHORYLIERUNGSTELLEN VON XKR8 HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DAS SHEDDING VON TGF-ALPHA UND AREG

Sakuragi et al. fanden mittels Massenspektrometrie drei Phosphorylierungsstellen in murinem XKR8. Mutationen, welche die Phosphorylierung von Serin oder Threonin an diesen Stellen verhinderten, blockierten jegliche Scramblase-Aktivität von XKR8 (nachfolgend hier Δ Phospho genannt). Phosphomimik-Mutationen hingegen brachten hyperaktive XKR8-Mutanten hervor. Im Menschen kommen zwei phosphorylierbare Positionen in XKR8 vor (Sakuragi et al., 2019). Entsprechend dieser Beobachtungen wurden in dieser Arbeitsgruppe humane XKR8-Mutanten durch Maria Sperrhacke generiert (Abbildung 9A). Dabei wurde Serin (S) an Position 362 bzw. Threonin (T) an Position 375 bei den Δ Phospho-Mutanten in Alanin (A) umgewandelt und bei den Phosphomimik-Mutanten in Asparaginsäure (D). Es können jeweils nur eine der beiden Positionen 362 und 375 (SA, TA, SD, TD) oder beide Phosphorylierungsstellen mutiert sein (ST2A oder ST2D). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Mutationen der Phosphorylierungsstellen auf das PMA-vermittelte Shedding von TGF α -AP und AREG-AP haben, wurden HEK293T-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für den XKR8 Wildtyp (WT) oder für die entsprechende Mutante kodierte, sowie mit einem der ADAM17-Substrate TGF α oder AREG. Die Transfektion der verwendeten XKR8-mCherry-Vektoren wurde im Fluoreszenzmikroskop anhand des roten mCherry-Signals überprüft. Als mock-Kontrolle wurde ein mCherry-Leervektor eingesetzt.

Eine Stimulation mit PMA resultierte in einer erhöhten Freisetzung von TGF α und AREG in den mock- und WT-transfizierten Zellen. Auch bei Transfektion aller XKR8-Mutanten führte PMA-Stimulation in jedem Fall zu einem erhöhten Shedding beider Substrate. Wie im Kapitel zuvor

beobachtet, führte der Einsatz von PMA zu einer signifikant erhöhten TGF α -Freisetzung in den XKR8 WT-transfizierten Zellen im Vergleich zur mock-Kontrolle, nicht aber von AREG. Für beide Substrate zeigte sich allerdings, dass weder die Transfektion mit den Δ Phospho-Mutanten noch die Phosphomimik-Mutationen eine Auswirkung auf das PMA-induzierte Substratshedding im Vergleich zum WT hatten. Alle Mutanten verhielten sich vergleichbar zum WT (Abbildung 9B,C). Somit scheinen die ausgewählten potentiellen Phosphorylierungsstellen keine Rolle für die Funktion von XKR8 zu haben. Eine weitere Analyse anderer potentieller Phosphorylierungsstellen in humanem XKR8 wären zwar interessant, allerdings auch sehr zeitintensiv und konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Die Transfektion wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als negative Kontrollen wurden untransfizierte Zellen sowie Zellen, die mit einem pcDNA-Vektor transfiziert wurden, der nicht an ein mCherry gekoppelt war, verwendet. Erwartungsgemäß war hier in beiden Fällen kein rotes mCherry-Signal detektierbar. Für alle in den Assays verwendeten Zellen konnte eine rote Färbung der Zellen gezeigt werden, welche in der Häufigkeit vergleichbar war. Dies bestätigt die erfolgte Transfektion der mCherry-gekoppelten Vektoren (Abbildung 9D).

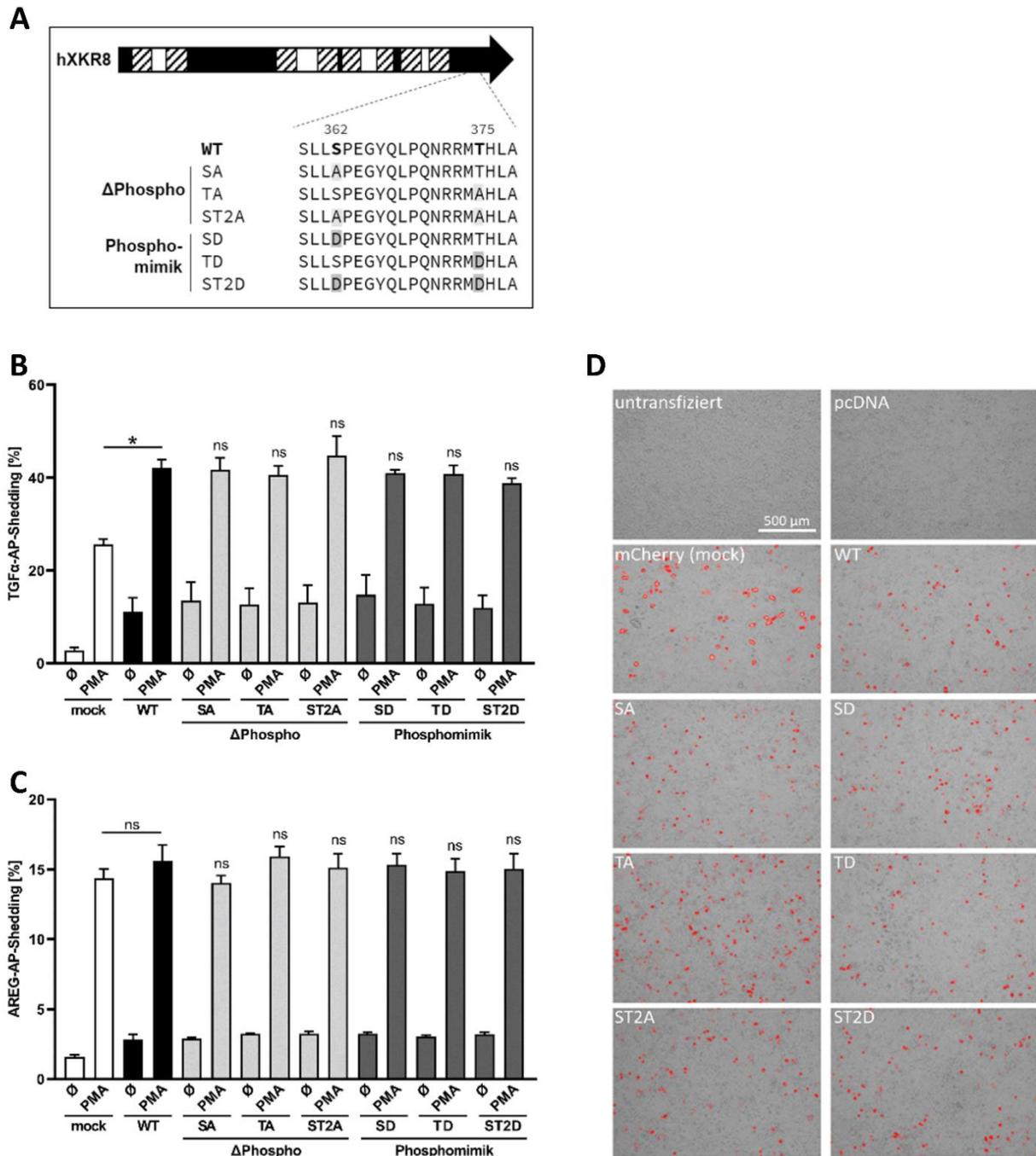


Abbildung 9: Überexpression von ΔPhospho- oder Phosphomimik-Mutanten von XKR8 zeigt keine veränderte Shedding-Aktivität verglichen zum Wildtyp. Übersicht der Phosphorylierungsstellen von humanem XKR8 (hXKR8) (A). Transmembranregionen sind gestreift dargestellt, intrazelluläre schwarz, extrazelluläre weiß. Die Phosphorylierungsstellen an Position 362 und 375 der Mutanten sind grau hinterlegt. HEK293T-Zellen wurden mit XKR8 WT-mCherry oder entsprechenden Mutanten oder mCherry (mock) sowie einem der Substrate TGFα-AP (B) oder AREG-AP (C) transfiziert (48 h). Die Stimulation mit PMA (100 ng/ml) erfolgte für 30 min. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysat (Shedding [%]). Die Transfektion wurde anhand des mCherry-Signals (rot) mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Der Maßstab beträgt 500 μm (D). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die mock-Kontrolle, ns steht für nicht signifikant bezogen auf den stimulierten WT. (n=3; * P < 0,05; MW ± SEM)

4.2 DER EINFLUSS VON ANOCTAMIN-6 AUF DAS SHEDDING VON CD137

ANO6 ist die bislang am besten charakterisierte Ca^{2+} -abhängige Scramblase. In unserer Arbeitsgruppe konnte bestätigt werden, dass ANO6 nach Überexpression in HEK293T-Zellen die Externalisierung von PS erhöht und einen regulatorischen Einfluss auf das Shedding der Substrate Betacellulin, $\text{TGF}\alpha$ und Amphiregulin durch ADAM10 und ADAM17 hat (Bleibaum et al., 2019; Veit et al., 2018).

CD137 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und kommt sowohl membranständig als auch in löslicher Form, die bislang als *Splicing*-Variante beschrieben wurde, vor. Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass es sich bei der löslichen Form jedoch auch um das Produkt proteolytischen Sheddings durch ADAM10/17 handelt (Seidel et al., 2021).

Aus diesen vorangegangenen Erkenntnissen ergab sich die Frage, ob ANO6 einen Einfluss auf das ADAM10/17-vermittelte Shedding von CD137 haben könnte. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293T- sowie HT29-Zellen mit einem Vektor transfiziert, welcher für CD137 kodierte oder zusätzlich mit einem Vektor, der für ANO6 kodierte. Die Zusammenhänge wurden dann in Inhibitions- und Stimulationsexperimenten mittels CD137-ELISA überprüft.

4.2.1 DAS SHEDDING VON CD137 IST ABHÄNGIG VON EXTERNALISIERTEM PS

Um zu überprüfen, ob das Shedding von CD137 abhängig von oberflächenexponiertem PS ist, wurden HEK293T- und HT29-Zellen nach Transfektion mit CD137 mit Ionomycin (IO) stimuliert und in An- oder Abwesenheit verschiedener Inhibitoren inkubiert. Durch die Behandlung mit Ionomycin, welches ein Ca^{2+} -Ionophor ist und den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle bewirkt, wird ANO6 aktiviert und es kommt zur PS-Externalisierung. Der Inhibitor O-Phospho-L-Serin (OPS) ist die negativ geladene, lösliche Kopfgruppe von Phosphatidylserin. Es bindet kompetitiv an die Aminosäuren von ADAM10 und ADAM17, welche für die Interaktion mit exponiertem PS verantwortlich sind, wodurch dieser Vorgang blockiert wird. Lactadherin (LA) bindet spezifisch an oberflächenexponiertes PS und blockiert so die Bindung von PS und ADAM10/17 (Abbildung 10).

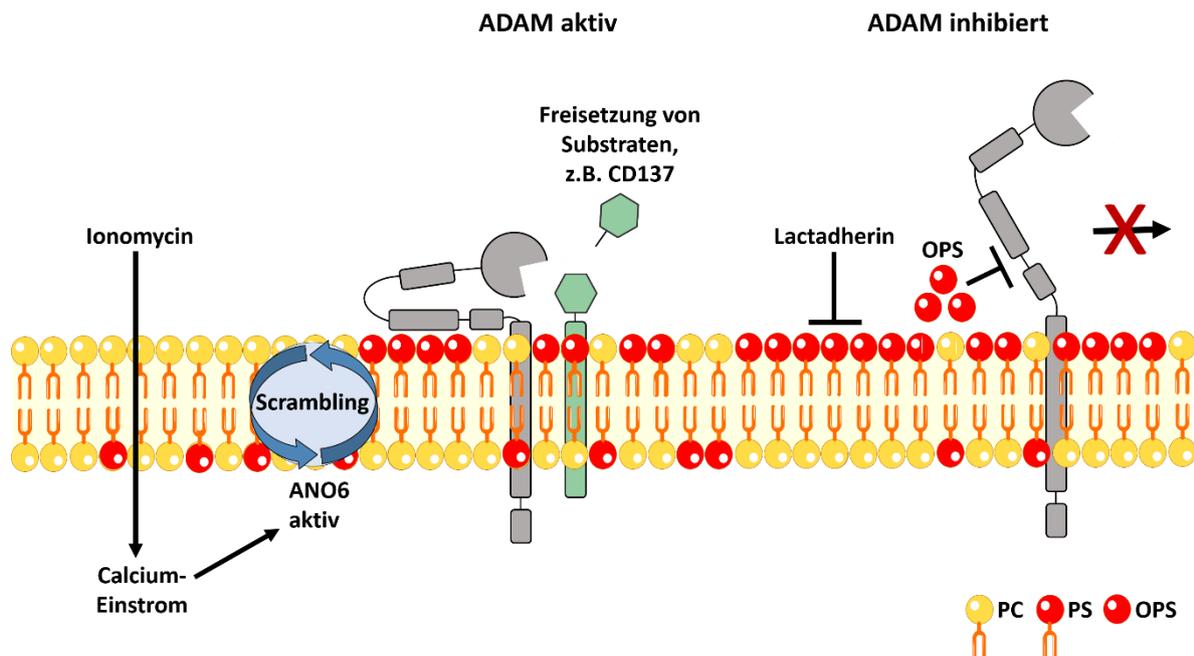


Abbildung 10: Aktivierung und Inhibition von ADAM10/17-vermitteltem Shedding. Stimulation mit Ionomycin führt zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Die Aktivierung von ANO6 führt zur Externalisierung von Phosphatidylserin (PS), wodurch eine Interaktion von ADAM10/17 mit PS stattfinden kann und Substrate, wie CD137, von der Oberfläche gescheddet werden können. Durch den Einsatz der Inhibitoren Lactadherin und O-Phospho-L-Serin (OPS) wird die Interaktion zwischen ADAM10/17 und PS blockiert.

Die Überstände sowie die Zelllysate wurden mittels ELISA auf CD137 untersucht und die detektierten Mengen ins Verhältnis gesetzt. Hierdurch ergab sich der Anteil des in den Überstand freigesetzten CD137. Die x-fache Veränderung wurde berechnet und auf die unbehandelte Kontrolle normiert (Abbildung 11).

Die erhöhte Freisetzung von CD137 bei Stimulation mit IO wurde in beiden Zelllinien durch den Einsatz von OPS konzentrationsabhängig reduziert. Damit einhergehend inhibierte auch LA die Freisetzung von CD137 in den Überstand. Somit war das Shedding von CD137 in HEK293T- (Abbildung 11A) und HT29- (Abbildung 11B) Zellen abhängig von oberflächenexponiertem PS. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ANO6 durch die Erhöhung der PS-Externalisierung einen Einfluss auf das Shedding von CD137 haben könnte und dies sollte weiter untersucht werden.

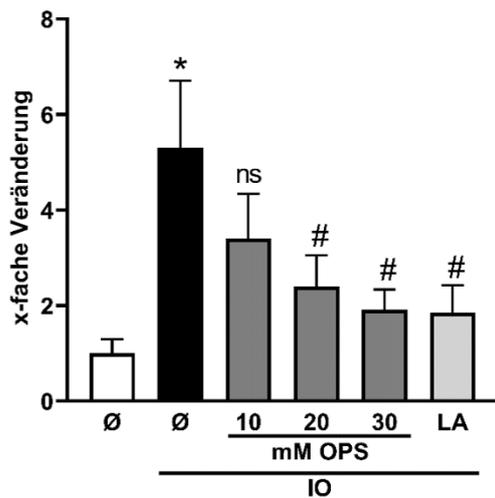
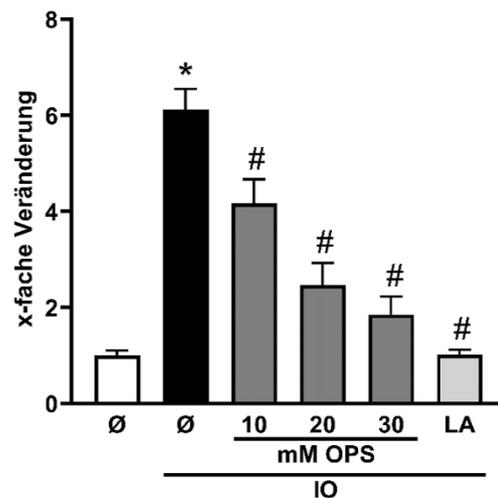
A HEK293T**B HT29**

Abbildung 11: Freisetzung von CD137 wird über oberflächenexponiertes PS vermittelt. CD137-tGFP-transfizierte HEK293T-Zellen (A) oder HT29-Zellen (B) wurden auf die Menge an CD137 im Überstand im Verhältnis zur Gesamtmenge an CD137 im ELISA untersucht. Die Stimulation mit IO (1 μ M) erfolgte für 30 min in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren OPS (10 mM, 20 mM, 30 mM) oder LA (2 μ M), Ø: unstimuliert. Die Inhibitoren wurden 15 min vor der Stimulation mit IO zu den Zellen gegeben. Die x-fache Veränderung wurde auf die mock-Kontrolle normiert. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen nur mit IO behandelten Kontrolle, ns steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zu der nur mit IO behandelten Kontrolle. (n=5 (A); n=4 (B); */# P < 0,05; MW \pm SEM)

4.2.2 ANOCTAMIN-6 REGULIERT DAS SHEDDING VON CD137

Die Beobachtung, dass die Freisetzung von CD137 abhängig von oberflächenexponiertem PS ist, legt nahe, dass ANO6 hierbei eine regulatorische Funktion aufweisen könnte. Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (wie bei Behandlung mit IO) aktiviert ANO6, wodurch eine Translokation von PS auf die Zelloberfläche stattfindet. Um zu ermitteln, ob ANO6 das Shedding von CD137 beeinflusst, wurden HEK293T- und HT29-Zellen mit CD137 sowie ANO6 oder einer hyperaktiven Mutante von ANO6 doppeltransfiziert. Die hyperaktive ANO6-Mutante weist eine Punktmutation auf, welche mit einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität einhergeht (Veit et al., 2018). Dadurch findet eine konstitutive PS-Externalisierung statt, ohne dass ein Stimulus benötigt wird. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IO stimuliert und anschließend im CD137-ELISA entsprechend 4.2.1 untersucht (Abbildung 12).

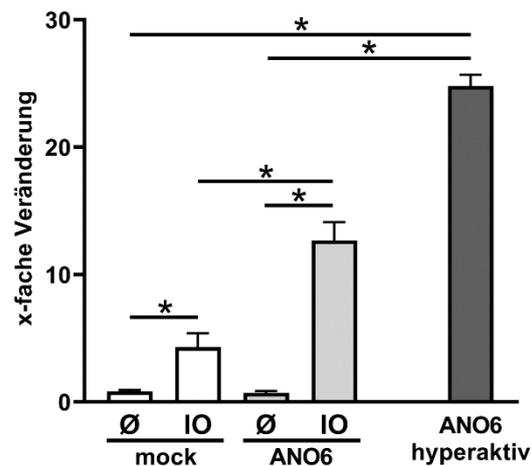
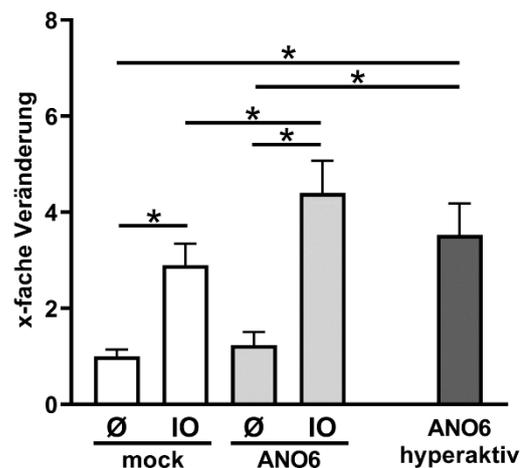
A HEK293T**B HT29**

Abbildung 12: ANO6 ist an der Regulation der Freisetzung von CD137 beteiligt. HEK293T-Zellen (A) oder HT29-Zellen (B) wurden mit CD137-tGFP sowie ANO6-mCherry, ANO6 hyperaktiv-mCherry oder mCherry transfiziert (48 h). Die Menge an CD137 im Überstand wurde im Verhältnis zur Gesamtmenge an CD137 im ELISA untersucht. Die Stimulation mit IO (1 μ M) erfolgte für 30 min, Ø: unstimuliert. Die x-fache Veränderung wurde auf die mock-Kontrolle normiert. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg. (n=3 (A); n=5 (B); */# P < 0,05; MW \pm SEM)

Die Überexpression von ANO6 hatte keinen Einfluss auf die konstitutive Freisetzung von CD137 in HEK293T- oder HT29-Zellen. Nach Stimulation mit IO war die Freisetzung jedoch signifikant erhöht zur mock-Kontrolle. Transfektion der Zellen mit der hyperaktiven ANO6-Mutante führte zu einer deutlichen Erhöhung des CD137-Sheddings in Abwesenheit jeglicher Stimuli verglichen mit der Kontrolle sowie den ANO6-transfizierten Zellen. In HEK293T-Zellen überstieg die konstitutive CD137-Freisetzung bei Transfektion mit der hyperaktiven Mutante sogar bei Weitem die detektierte Freisetzung nach Stimulation mit IO in der Kontrolle und nach ANO6-Transfektion (Abbildung 12A).

4.3 DER EINFLUSS VON ANOCTAMINEN AUF DIE FREISETZUNG VON ADAM-SUBSTRATEN

Zur Familie der humanen Anoctamine gehören neben ANO6 neun weitere Mitglieder (ANO1, ANO2, ANO3, ANO4, ANO5, ANO7, ANO8, ANO9, ANO10). Während ANO1 und ANO2 als Ca²⁺-aktivierte Chloridkanäle beschrieben wurden, wurde für ANO3, ANO4, ANO5, ANO6, ANO7, ANO9 und ANO10 eine Scramblase-Aktivität nachgewiesen, wobei ANO3 vorrangig Phosphatidylcholin transportiert (Kalienkova et al., 2021; Suzuki et al., 2013). Die Funktion von ANO8 ist bislang ungeklärt. Da bereits gezeigt wurde, dass ANO6 in der Lage ist die Shedding-

Aktivität von ADAM10/17 zu beeinflussen, kam die Vermutung auf, dass andere Anoctamine eine ähnliche Funktion aufweisen könnten.

Um den Einfluss verschiedener Anoctamine auf das Metalloprotease-vermittelte Shedding zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit HEK293T-Zellen mit einem Vektor transfiziert, welcher für eines der Anoctamine ANO1, ANO4, ANO5, ANO6, ANO7, ANO9 oder ANO10 kodierte. ANO6 diente hierbei als positive, ANO1 als negative Kontrolle. ANO4, ANO5, ANO7, ANO9 und ANO10 sollten hinsichtlich ihres potentiellen Einflusses auf das Shedding untersucht werden. Alle Vektoren hatten am C-terminalen Ende einen V5/His-Marker oder ein eGFP. Eine Transfektionskontrolle wurde mittels *Simple Western*-Analyse oder per Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Ein pcDNA-Leervektor diente als mock-Kontrolle. Der Einfluss der verschiedenen Anoctamine auf das Metalloproteasen-vermittelte Shedding wurde anschließend in Inhibitions- und Stimulationsexperimenten untersucht.

4.3.1 STIMULATION MIT IONOMYCIN FÜHRT ZU VERSTÄRKTEM SHEDDING VON ADAM-SUBSTRATEN BEI ÜBEREXPRESSION VON ANOCTAMIN-4, ANOCTAMIN-6 ODER ANOCTAMIN-9

Um den Einfluss verschiedener Anoctamine auf das Shedding von ADAM-Substraten zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit einem der ANOs sowie entweder mit dem ADAM10-Substrat Betacellulin (BTC) oder einem der ADAM17-Substrate Amphiregulin (AREG) oder TGF-alpha (TGF α) kotransfiziert. Die Transfektion wurde mittels *Simple Western* überprüft. Die verwendeten Substrate waren extrazellulär mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt. Die transfizierten Zellen wurden für 30 min mit 1 μ M IO stimuliert und damit ein Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle induziert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde dann im Überstand und im Zelllysat photometrisch detektiert und daraus das Shedding berechnet.

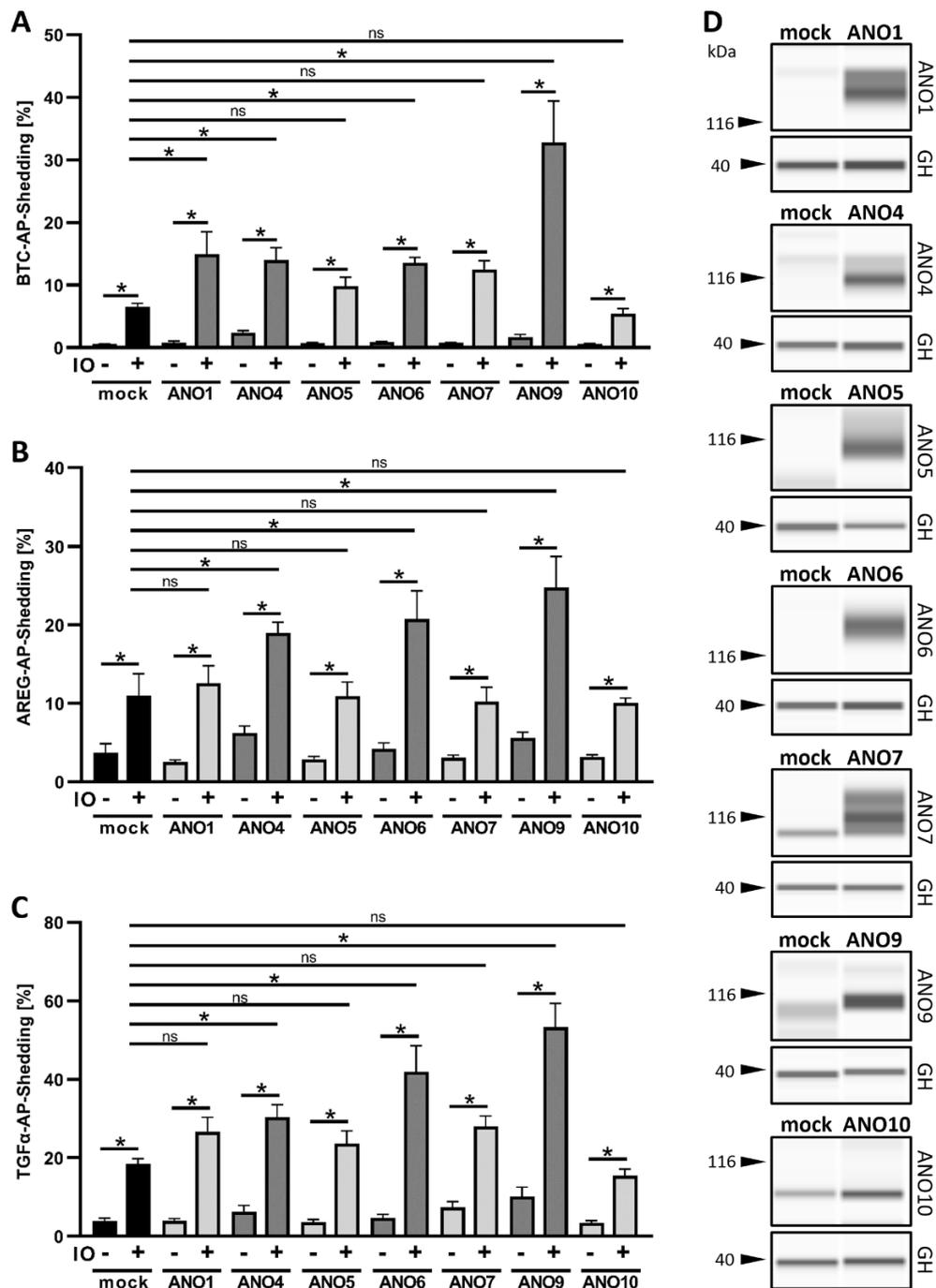


Abbildung 13: ANO4, ANO6 und ANO9 erhöhen Calcium-abhängig die Freisetzung von BTC, AREG und TGFα. HEK293T-Zellen wurden mit einem jeweiligen ANO-Plasmid oder einem mock-Vektor sowie einem der Substrate BTC-AP (A), AREG-AP (B) oder TGFα-AP (C) transfiziert (48 h) und mittels AP-Assay untersucht. Die Stimulation mit IO (1 μM) erfolgte für 30 min. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysat (Shedding [%]). Die Transfektion wurde mittels *Simple Western* überprüft (D). GAPDH diente hierbei als Ladekontrolle. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg, ns steht für ein nicht signifikantes Verhältnis. (n=6; */# P < 0,05; MW ± SEM)

Der Einsatz von IO erhöhte die Freisetzung von BTC, AREG und TGFα sowohl in der mock-Kontrolle als auch in allen ANO-transfizierten Zellen verglichen mit den unbehandelten Proben. Darüber hinaus führte die Stimulation mit IO wie erwartet zu einem erhöhten

Shedding aller drei Substrate bei einer Transfektion mit ANO6 im Vergleich zur mock-Kontrolle. Eine verstärkte Freisetzung von BTC wurde ebenfalls bei einer Transfektion mit ANO1, ANO4 oder ANO9 beobachtet (Abbildung 13A). ANO9 überstieg hierbei die Effekte von ANO6 noch bei Weitem. Das Shedding von AREG und TGF α war nach Stimulation neben ANO6 auch bei Transfektion mit ANO4 oder ANO9 erhöht (Abbildung 13B,C). Auch hier wies ANO9 die stärksten Effekte auf.

Die erfolgreiche Transfektion der Plasmide wurde mittels *Simple Western* bestätigt (Abbildung 13D). Die Größe des V5-/His-Markers beträgt 4 kDa. Summiert mit dem errechneten Molekulargewicht der ANOs ergaben sich die erwarteten Größen (ANO1: 118 kDa, ANO4: 115 kDa, ANO5: 111 kDa, ANO6: 109 kDa, ANO7: 109 kDa, ANO9: 94 kDa, ANO10: 80 kDa). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die jeweils gegen eines der sieben untersuchten ANOs gerichtet waren, konnte für alle eine Bande detektiert werden. Für ANO1, ANO4, ANO5, ANO6 und ANO9 wurde in der mock-Kontrolle keine entsprechende Bande detektiert. Für ANO7 sowie ANO10 ist in der Kontrolle eine schwächere Bande zu erkennen, welche vermutlich das endogen exprimierte Protein darstellt. GAPDH wurde jeweils als Ladekontrolle verwendet und wies jeweils zwischen mock- und ANO-transfizierten Zellen ein vergleichbares Signal auf, sodass bestätigt war, dass in den Proben gleich viel Protein aufgetragen wurde.

Nachdem ein Einfluss einiger ANOs auf das Shedding von ADAM10/17 bei IO-Stimulation detektiert wurde, sollte durch die anschließende Verwendung von PMA als Stimulus überprüft werden, ob dieser Einfluss tatsächlich Ca²⁺-abhängig auftritt. PMA kann genutzt werden, um die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung zu aktivieren (Groth et al., 2016; Le Gall et al., 2010; Lorenzen et al., 2016). Hierbei kommt es zur PS-Externalisierung, die einer Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) zugrunde liegt (Nguyen et al., 2011; Sommer et al., 2016). Da dieser Mechanismus nicht mit einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration einhergeht, wurde erwartet, dass eine Überexpression der ANOs keinen Einfluss auf die Stimulation von ADAM17 mit PMA hat. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden HEK293T-Zellen mit einem der ANOs sowie einem der ADAM17-Substrate AREG-AP oder TGF α -AP doppeltransfiziert und nach 30-minütiger Stimulation mit PMA (300 ng/ml) im AP-Assay analysiert.

Für beide Substrate führte die Stimulation mit PMA zu einer erhöhten Freisetzung sowohl in der Kontrolle als auch in den ANO-transfizierten Zellen verglichen mit den unbehandelten

Zellen. Die Überexpression von ANOs führte aber in keinem Fall zu verstärktem Shedding und trat vergleichbar zur mock-Kontrolle auf. Somit bestätigte sich, dass eine Überexpression von ANOs bei PMA-Stimulation keinen Einfluss auf die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung hat (Abbildung 14).

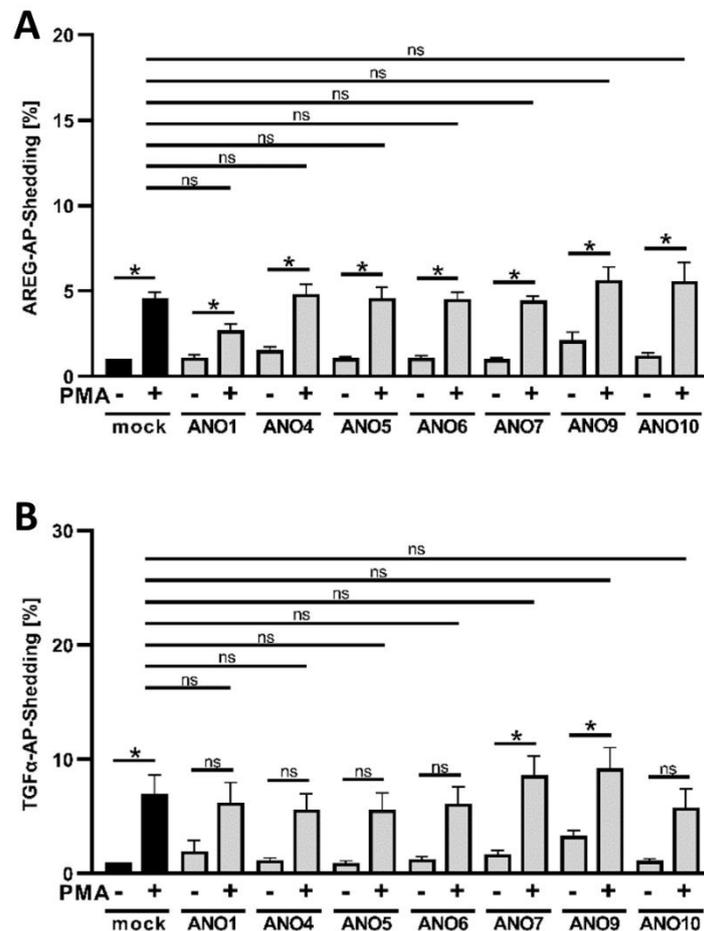


Abbildung 14: Überexpression von ANO1, ANO4, ANO5, ANO6, ANO7, ANO9 oder ANO10 hat keinen Einfluss auf das Shedding von AREG und TGFα unter PMA-Stimulation. HEK293T-Zellen wurden mit einem jeweiligen ANO-Plasmid oder einem mock-Vektor sowie einem der Substrate AREG-AP (A) oder TGFα-AP (B) transfiziert (48 h) und mittels AP-Assay untersucht. Die Stimulation mit PMA (300 ng/ml) erfolgte für 30 min. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg, ns steht für ein nicht signifikantes Verhältnis. (n=3; */# P < 0,05; MW ± SEM)

Die vorherigen AP-Assays wurden mit Plasmiden durchgeführt, welche einen V5-/His-Marker hatten. Der Einsatz von Plasmiden bei der Transfektion, die an eGFP gekoppelt sind, kann aber den Vorteil haben, dass eine Transfektion unkompliziert und zeitsparend anhand des eGFP-Signals (grün) im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden kann. Ein Nachteil könnte jedoch sein, dass eGFP durch seine relativ große Größe von 27 kDa den Transport oder die Funktion des Proteins in der Zelle beeinträchtigen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden die Versuche, die mit V5-/His-gekoppelten ANO-Plasmiden stattfanden, mit an eGFP-gekoppelten

Plasmiden wiederholt. Es wurden also HEK293T-Zellen mit einem ANO-eGFP-Plasmid und einem der Substrate BTC-AP, AREG-AP oder TGF α -AP transfiziert und für 30 min mit 1 μ M IO stimuliert und anschließend im AP-Assay untersucht (Abbildung 15A-C). Als mock-Kontrolle wurde hierbei ein eGFP-Leervektor verwendet. Die erfolgte Transfektion wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert (Abbildung 15D).

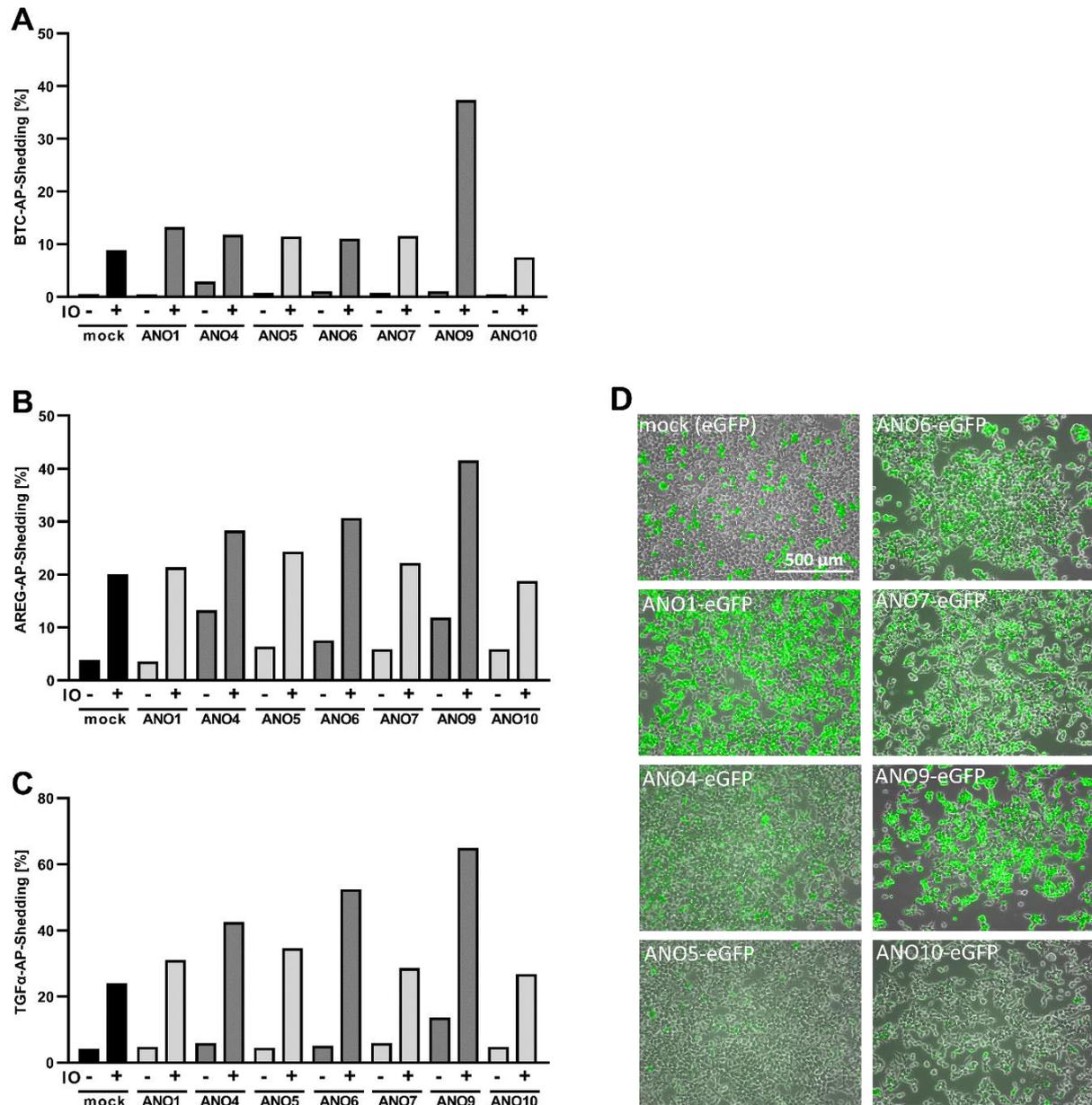


Abbildung 15: Überexpression von eGFP-gekoppelten ANOs ergibt die gleichen Tendenzen wie bei der Verwendung der V5/His-gekoppelten Plasmide. HEK293T-Zellen wurden mit einem jeweiligen ANO-eGFP-Plasmid oder eGFP-Leervektor (mock) sowie einem der Substrate BTC-AP (A), AREG-AP (B) oder TGF α -AP (C) transfiziert (48 h). Die Stimulation mit IO (1 μ M) erfolgte für 30 min und die Analyse erfolgte mittels AP-Assay. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysat (Shedding [%]). Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch. Die erfolgte Transfektion wurde anhand des eGFP-Signals (grün) im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Der Maßstab beträgt 500 μ m (D).

Für alle in den AP-Assays verwendeten Zellen konnte eine grüne Färbung der Zellen gezeigt werden. Dies bestätigte die erfolgte Transfektion der eGFP-gekoppelten Vektoren. Die Ergebnisse der AP-Assays deckten sich grundsätzlich mit den Beobachtungen aus Abschnitt 4.3.1 bei der Verwendung der V5-/His-gekoppelten Plasmide. Auch beim Einsatz der eGFP-fusionierten Plasmide führte die Stimulation mit IO zu einer erhöhten Freisetzung von BTC, AREG und TGF α unabhängig der mock- oder ANO-Transfektion. Bei Transfektion mit ANO6 sowie ANO4 oder ANO9 war das IO-induzierte Shedding von AREG und TGF α im Vergleich zur mock-Kontrolle deutlich erhöht. Auch hier wies ANO9 die stärksten Effekte auf. Für BTC war die Freisetzung nach ANO4- oder ANO6-Transfektion nur leicht erhöht, ANO9-Transfektion resultierte aber auch hier in einer deutlichen Erhöhung des Sheddings zur Kontrolle. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich die Plasmide mit eGFP-Marker nicht grundlegend von den V5-/His-gekoppelten unterscheiden und beide je nach Bedarf für kommende Experimente eingesetzt werden können.

4.3.2 NACHWEIS VON ÜBEREXPRIMIERTEM ANOCTAMIN-4 UND ANOCTAMIN-9 AUF DER ZELLOBERFLÄCHE

Da ANO4 und ANO9 zusätzlich zu ANO6 die stärksten Effekte in den vorangegangenen Experimenten zeigten, sollte ihre zelluläre Lokalisation nach Überexpression untersucht werden. Sowohl für überexprimiertes ANO4 als auch für ANO9 wurde eine Zelloberflächenexpression bereits postuliert (Schreiber et al., 2010; Tian et al., 2012). Um dies zu bestätigen, wurde eine Fraktionierung der Proteine mittels Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für ANO4-eGFP oder ANO9-eGFP kodierte oder mit einem mock-Vektor. 48 h nach Transfektion wurde die Biotinylierung durchgeführt. Anschließend folgte eine *Western Blot*-Analyse unbiotinylierter Zelllysate sowie der biotinylierten Proben (Abbildung 16). Da die verwendeten Vektoren für ANO4 und ANO9 an ein eGFP gekoppelt waren, konnte die Transfektion mit einem Antikörper gegen GFP überprüft werden. Als Kontrolle wurden Antikörper gegen EGFR sowie AKT verwendet. EGFR ist ein klassisches Oberflächenprotein und eignet sich daher als Kontrolle der erfolgten Markierung. AKT diente zum Ausschluss intrazellulärer Proteine als negative Kontrolle.

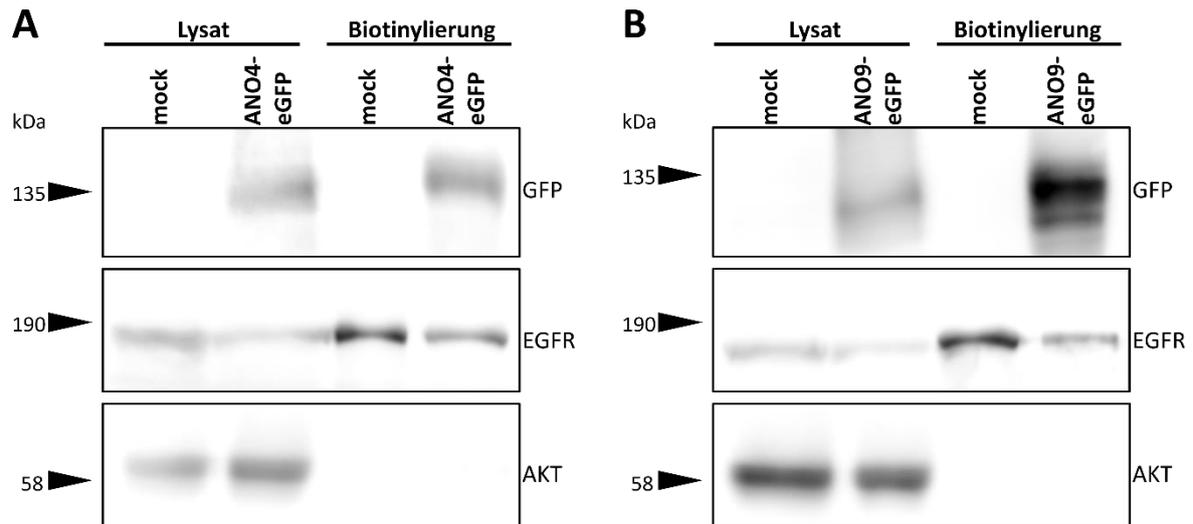


Abbildung 16: Oberflächenbiotinylierung von ANO4 und ANO9 in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit ANO4-eGFP (A) oder ANO9-eGFP (B) oder einem mock-Vektor transfiziert (48 h). Zur Untersuchung der Lokalisation beider ANOs wurde eine Oberflächenbiotinylierung und eine anschließende Analyse mittels *Western Blot* durchgeführt. Hierbei wurden sowohl das Gesamtzelllysate sowie die biotinylierte Fraktion aufgetragen. Als Kontrolle für Zellmembranproteine diente EGFR, AKT diente als Kontrolle für im Zytosol lokalisierte Proteine.

Das Signal für EGFR konnte erwartungsgemäß sowohl im Zelllysate als auch in der biotinylierten Fraktion detektiert werden. Das intrazelluläre Protein AKT wurde lediglich im Lysate detektiert (Abbildung 16A,B). Beides zusammen bestätigt die korrekte Fraktionierung. ANO4 besitzt eine errechnete Größe von 111 kDa. Zusammen mit dem gekoppelten eGFP (27 kDa) ergibt sich eine Größe von 138 kDa für das Gesamtprotein. Nach Transfektion mit ANO4-eGFP konnte eine entsprechende Bande mittels eines Antikörpers gegen eGFP im Lysate detektiert werden, welche in der mock-Kontrolle nicht vorhanden war (Abbildung 16A). Dies bestätigte die erfolgreiche Transfektion. Auch in der biotinylierten Fraktion konnte nach Transfektion mit ANO4-eGFP eine Bande bei ca. 138 kDa detektiert werden, die in der Kontrolle nicht vorkam. Dies weist darauf hin, dass ANO4 nach Überexpression in HEK293T-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. ANO9 hat eine errechnete Größe von 90 kDa. Summiert man 27 kDa für das gekoppelte eGFP dazu, ergibt sich eine erwartete Größe von 117 kDa. Äquivalent zu den Ergebnissen von ANO4 konnte eine entsprechende Bande durch den Einsatz eines eGFP-Antikörpers sowohl im Lysate als auch in den biotinylierten Proben nach Transfektion mit ANO9-eGFP nachgewiesen werden (Abbildung 16B). Die Bande des Lysats bestätigte wieder eine erfolgreiche Transfektion und die Bande bei der biotinylierten Fraktion bedeutet, dass auch ANO9 nach Überexpression in HEK293T-Zellen auf der Zelloberfläche detektiert werden kann.

4.3.3 BEI ÜBEREXPRESSION VON ANOCTAMIN-4 ODER ANOCTAMIN-9 WIRD TGF-ALPHA VON ANDEREN SHEDDASEN FREIGESETZT

In 4.3.1 wurde dargelegt, dass eine Überexpression von ANO4 oder ANO9 das Shedding der Substrate BTC, AREG und TGF α erhöht. Da die Substrate nicht nur durch eine Protease freigesetzt werden können, sollte durch die Verwendung der Inhibitoren Marimastat (MM), GI und GW untersucht werden, welchen Anteil ADAM10 und ADAM17 an der erhöhten Freisetzung der Substrate in ANO4- oder ANO9-transfizierten HEK293T-Zellen haben. Hierfür erfolgte die Stimulation mit 1 μ M IO für 30 min in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren und eine Analyse im AP-Assay.

Wie zuvor führte die Stimulation mit IO zu einer signifikant erhöhten Freisetzung aller drei Substrate sowohl in der mock-Kontrolle als auch in den ANO4-transfizierten (Abbildung 17A-C) oder ANO9-transfizierten (Abbildung 17D-F) Zellen. Die durch IO induzierte erhöhte Freisetzung von BTC, AREG und TGF α in ANO4-/ANO9-überexprimierenden Zellen konnte für alle drei Substrate durch die Zugabe von MM komplett gehemmt werden. Hieraus lässt sich schließen, dass allein Metalloproteasen an der Freisetzung der Substrate beteiligt sind. Das Shedding von BTC konnte darüber hinaus durch GW, aber erwartungsgemäß auch bereits durch den Einsatz des ADAM10-Inhibitors GI, signifikant verringert werden. Dies bedeutet, dass die Freisetzung von BTC nach Überexpression von ANO4 oder ANO9 weiterhin durch ADAM10 erfolgte (Abbildung 17A,D). Die Freisetzung von AREG wurde durch den Einsatz von GI nur gering inhibiert, durch Inkubation mit dem dualen ADAM10/17-Inhibitor GW hingegen deutlich gehemmt. Wie zu erwarten, war hier also ADAM17 weiterhin primär für das Shedding von AREG verantwortlich (Abbildung 17C,E). Das Shedding von TGF α hingegen wurde in ANO4- oder ANO9-überexprimierenden Zellen von GI und GW gleichermaßen und nur gering gehemmt. Dies macht deutlich, dass die Freisetzung teilweise durch ADAM10 vermittelt wurde. Die deutlich stärkere Hemmung des TGF α -Sheddings beim Einsatz von MM zeigte jedoch, dass den größten Anteil nicht weiter bekannte, durch Marimastat hemmbare Proteasen hatten (Abbildung 17C,F).

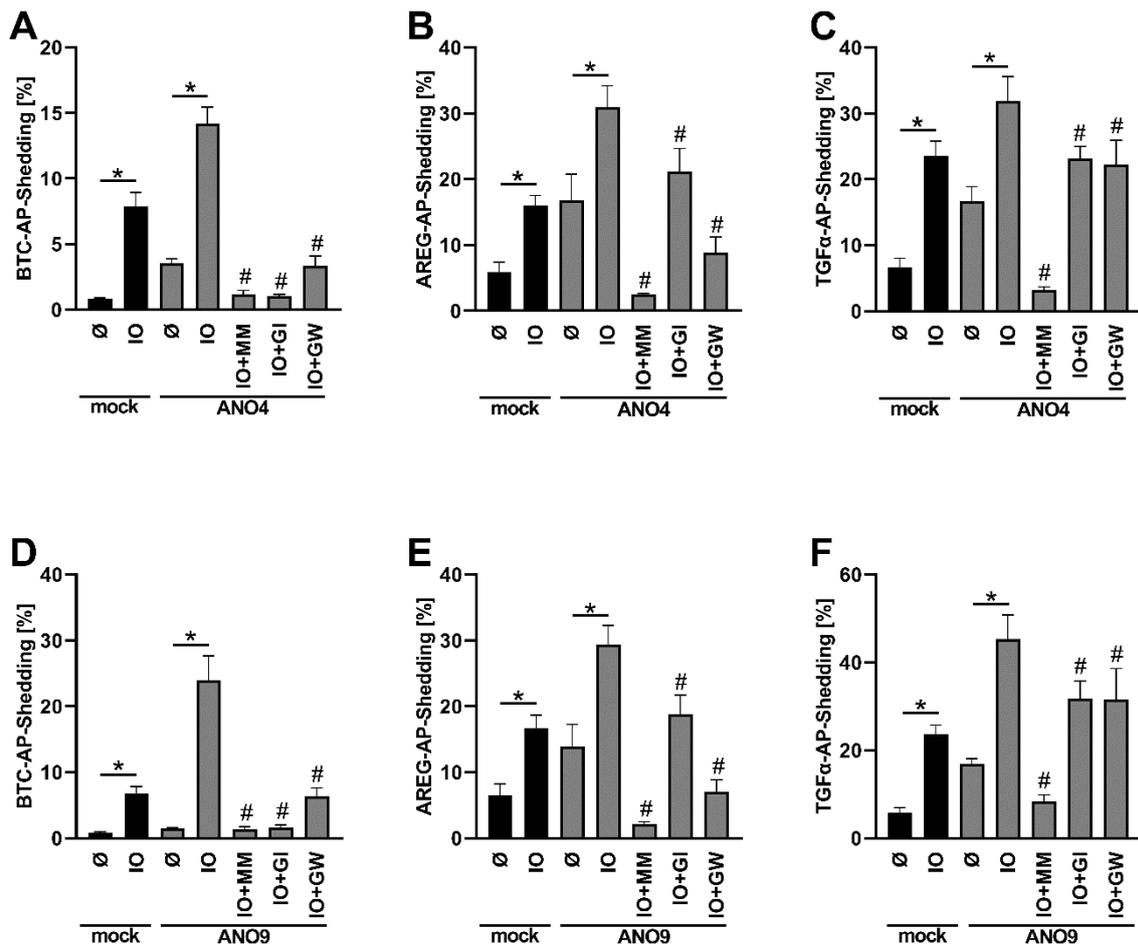


Abbildung 17: ANO4 und ANO9 erhöhen die ADAM10/ADAM17-vermittelte Freisetzung von BTC, AREG und TGFα. HEK293T-Zellen wurden mit ANO4 (A-C) oder ANO9 (D-F) oder einem mock-Vektor sowie einem der Substrate BTC-AP (A, D), AREG-AP (B, E) oder TGFα-AP (C, F) transfiziert (48 h). Die Stimulation mit IO (1 μM) erfolgte für 30 min in An- oder Abwesenheit der gekennzeichneten Inhibitoren, ∅: unstimuliert. Die Inhibitoren MM (10 μM), GI (3 μM) und GW (3 μM) wurden 15 min vor der Stimulation mit IO zu den Zellen gegeben. Die Untersuchung erfolgte mittels AP-Assay. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysat (Shedding [%]). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen nur mit IO behandelten Kontrolle. (n=5; */# P < 0,05; MW ± SEM)

4.3.4 DIE ÜBEREXPRESSION VON ANOCTAMIN-4 ODER ANOCTAMIN-9 FÜHRT ZU ERHÖHTEM SUBSTRAT-SHEDDING DURCH VERSTÄRKTE EXTERNALISIERUNG VON PHOSPHATIDYLSERIN

Die Überexpression von ANO6 führt zu einer Ca²⁺-induzierten Exposition von PS auf der Zelloberfläche in HEK293T-Zellen, was eine relevante Rolle für den Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10/17 hat (Veit et al., 2018). Ob eine erhöhte PS-Externalisierung entsprechend auch bei Überexpression von ANO4 oder ANO9 zu beobachten ist, sollte nachfolgend überprüft werden. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit einem ANO4- oder ANO9-Vektor

oder einem Kontroll-Vektor (mock) transfiziert und für 30 min mit 1 μM IO behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V-AF568 gefärbt, welches mit hoher Affinität an PS bindet. Da es die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann, wird ausschließlich auf der Oberfläche exponiertes PS angefärbt.

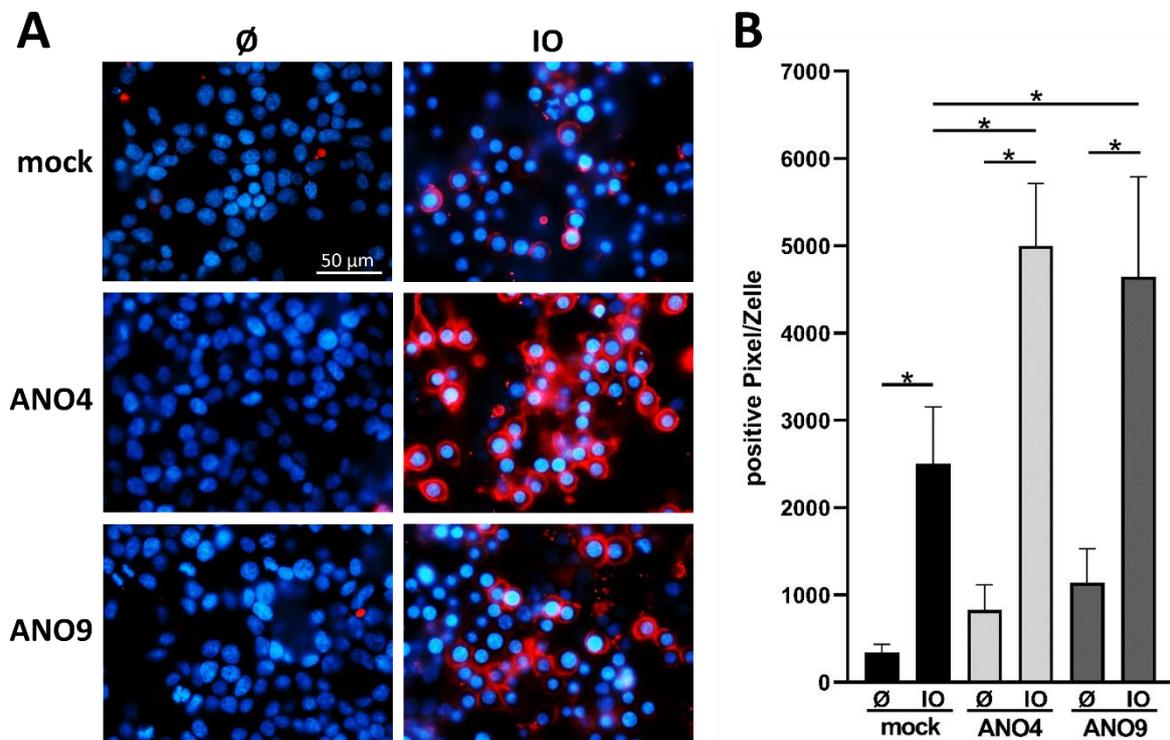


Abbildung 18: Calcium-Einstrom induziert eine erhöhte PS-Externalisierung in ANO4- oder ANO9-überexprimierenden Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit ANO4 oder ANO9 oder einem mock-Vektor transfiziert (48 h) und anschließend 30 min mit IO (1 μM) behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen mit Annexin V-AF568 (rot) angefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 angefärbt (blau). Der Maßstab beträgt 50 μm , Ø: unstimuliert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen eines Versuches (A). Für eine Quantifizierung der PS-Externalisierung wurden die Fläche der Annexin V-positiven Fluoreszenzsignale sowie die Zellzahl anhand der angefärbten Zellkerne bestimmt und die beiden Werte wurden ins Verhältnis gesetzt (B). (n=5; * P < 0,05; MW \pm SEM)

Eine Erhöhung der PS-Externalisierung in sowohl ANO4- als auch ANO9-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur mock-Kontrolle konnte bereits bei Abwesenheit eines Stimulus beobachtet werden (nicht signifikant, Abbildung 18B). Nach Stimulation mit IO wurde eine signifikante Erhöhung von exponiertem PS verglichen mit den unstimulierten Zellen festgestellt. Bei Überexpression von ANO4 oder ANO9 war die Ca^{2+} -induzierte PS-Externalisierung gegenüber der Kontrolle augenscheinlich (Abbildung 18A) und bei quantitativer Auswertung signifikant erhöht (Abbildung 18B).

Da nun gezeigt wurde, dass ANO4 und ANO9 die PS-Externalisierung erhöhen und bereits bekannt ist, dass ANO6 die Substratfreisetzung durch ADAM10/17 in Abhängigkeit von externalisiertem PS beeinflusst, sollte dies für ANO4 und ANO9 ebenfalls im AP-Assay überprüft werden. Hierfür erfolgte die Stimulation der transfizierten HEK293T-Zellen mit 1 μ M IO für 30 min in An- oder Abwesenheit des Inhibitors O-Phospho-L-Serin (OPS). Die mock-Kontrolle ist wie zuvor mit schwarzen Balken dargestellt. Die grauen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach ANO4- oder ANO9-Transfektion, wobei hellgrau die Daten kennzeichnet, die in Anwesenheit der Inhibitoren erhoben wurden (Abbildung 19).

Stimulation mit IO führte erneut zu einer signifikant erhöhten Substratfreisetzung in mock-, ANO4- oder ANO9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Außerdem resultierte ANO4- bzw. ANO9-Überexpression in erhöhtem Shedding verglichen mit der mock-Kontrolle. Bei allen drei Substraten BTC, AREG und TGF α resultierte der Einsatz von OPS in einer dosisabhängigen Reduktion des IO-induzierten Sheddings in sowohl ANO4- als auch ANO9-transfizierten Zellen. In der höchsten Konzentration von 30 mM war die Wirkung von OPS vergleichbar mit der von MM (Abbildung 19). Dies verdeutlicht den essentiellen Einfluss, den PS auf das ADAM-vermittelte Shedding hat und damit die Relevanz von ANO4 und ANO9, die durch PS-Translokation bedeutende Regulatoren sein könnten.

Auffällig war außerdem, dass das konstitutive Shedding aller Substrate bei ANO4- oder ANO9-Überexpression gegenüber der mock-Kontrolle erhöht war, so wie zuvor bereits eine konstitutiv erhöhte PS-Externalisierung beobachtet wurde. Eine statistisch signifikante Erhöhung zeigte sich bei Überexpression beider ANOs bei der Freisetzung von AREG (Abbildung 19B,E). Dies sollte nachfolgend weiter untersucht werden.

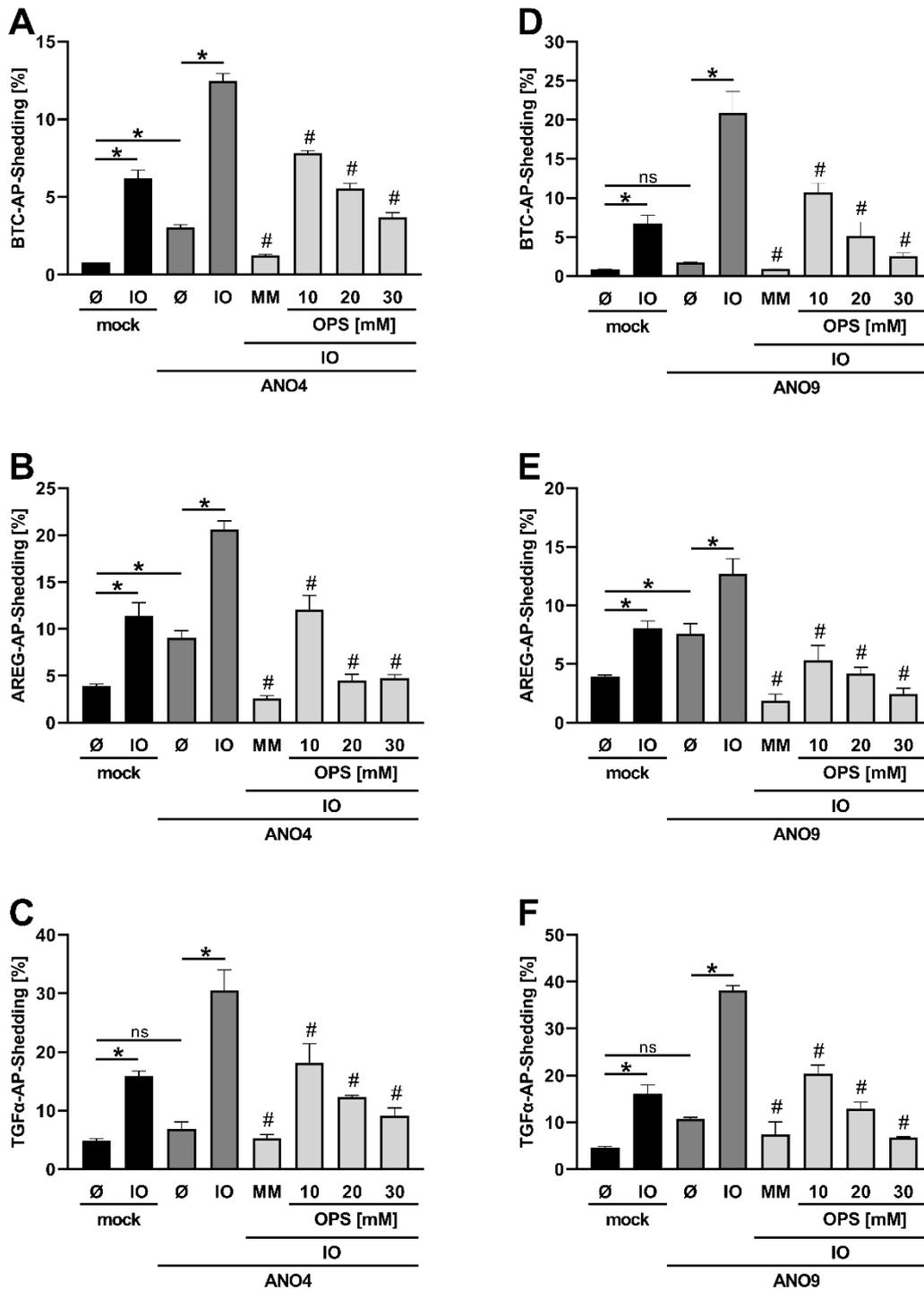


Abbildung 19: Anoctamin-4 und Anoctamin-9 erhöhen Phosphatidylserin-abhängig die Freisetzung von BTC, AREG und TGFα. HEK293T-Zellen wurden mit ANO4 (A-C) oder ANO9 (D-F) oder einem mock-Vektor sowie einem der Substrate BTC-AP (A, D), AREG-AP (B, E) oder TGFα-AP (C, F) transfiziert (48 h). Die Stimulation mit IO (1 μM) erfolgte für 30 min in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren MM (10 μM) oder OPS (10 mM, 20 mM, 30 mM), ∅: unstimuliert. Die Inhibitoren wurden 15 min vor der Stimulation mit IO zu den Zellen gegeben. Die Untersuchung erfolgte mittels AP-Assay. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysate (Shedding [%]). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen nur mit IO behandelten Kontrolle. (n=3; */# P < 0,05; MW ± SEM)

Die beobachtete konstitutiv erhöhte Freisetzung von AREG bei Überexpression von ANO4 oder ANO9 führte zu der Frage, ob dieser Effekt auf die in 4.3.6 erkannte, konstitutiv leicht erhöhte PS-Exposition zurückzuführen ist. Für diese Untersuchung wurden transfizierte HEK293T-Zellen ohne Zugabe eines Stimulus in An- oder Abwesenheit des Breitband-Metalloprotease-Inhibitors MM oder OPS, das die Interaktion von ADAM10/17 mit exponiertem PS blockiert, für 30 min inkubiert (Abbildung 20). Sowohl ANO4-Überexpression als auch ANO9-Überexpression resultierten in einer signifikant erhöhten Freisetzung von AREG im Vergleich zur mock-Kontrolle. Die Inkubation mit OPS bewirkte eine Inhibition der Freisetzung von AREG, welche vergleichbar mit der Inhibition durch MM war. Dadurch kann der beobachtete konstitutive Effekt auf die PS-Externalisierung, die durch ANO4 oder ANO9 vermittelt wird, zurückgeführt werden.

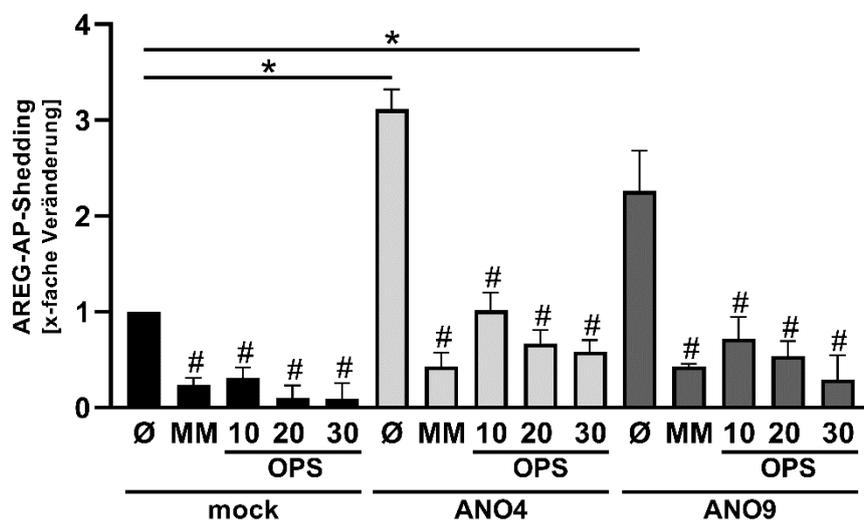


Abbildung 20: Die konstitutive Freisetzung von AREG in ANO4- oder ANO9-transfizierten Zellen wird durch MM sowie OPS gehemmt. HEK293T-Zellen wurden mit ANO4- oder ANO9- oder einem mock-Vektor sowie dem Substrat AREG-AP transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren MM (10 µM) oder OPS (10 mM, 20 mM, 30 mM) inkubiert und mittels AP-Assay analysiert, Ø: ohne Inhibitoren. Dargestellt ist das Verhältnis der in den Überstand freigesetzten AP zur Gesamt-AP aus dem Überstand und dem Zelllysat normiert auf die unbehandelte mock-Kontrolle (x-fache Veränderung). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die mock-Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle. (n=3; */# P < 0,05; MW ± SEM)

4.4 FUNKTIONELLE RELEVANZ DER EXPRESSION VON ANOCTAMIN-4 ODER ANOCTAMIN-9

Die bislang erhobenen Daten zeigten, dass die Überexpression von ANO4 sowie ANO9 die Shedding-Aktivität von ADAM10/17, ausgelöst durch vermehrte PS-Externalisierung, erhöht. Die Erkenntnis, dass nach ANO4-/ANO9-Transfektion eine vermehrte konstitutive Freisetzung

des Substrats AREG auftrat, führte zu der Frage über die biologische Relevanz dieser Beobachtung. Um diese zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen eingesetzt. Diese Zellen gehören zu den Epithelzellen und exprimieren AREG endogen, sodass keine Transfektion des Substrats nötig ist. Es handelt sich hierbei um Zellen aus einem Zervix-Adenokarzinom. Angesichts der biologischen Relevanz von sowohl ADAMs als auch Scramblasen in verschiedenen Tumorerkrankungen und aufgrund der endogenen Expression von AREG eigneten sich diese Zellen als Modellsystem für weitere Untersuchungen. Für die nachfolgenden Experimente wurden HeLa-Zellen mit einem ANO4- oder ANO9-Plasmid sowie mit einem Kontrollplasmid (mock) transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen über Nacht in An- oder Abwesenheit des Metalloprotease-Inhibitors MM inkubiert und in verschiedenen Versuchen analysiert.

4.4.1 ÜBEREXPRESSION VON ANOCTAMIN-4 ODER ANOCTAMIN-9 FÜHRT ZU VERSTÄRKTER PROLIFERATION

Zunächst wurden die konstitutiven Effekte von ANO4 und ANO9 auf die Freisetzung von endogen exprimiertem AREG untersucht. Dafür wurden die Überstände sowie die Zelllysate mittels AREG-ELISA untersucht und die detektierten Mengen ins Verhältnis gesetzt. Hierdurch ergab sich der Anteil des in den Überstand freigesetzten AREG (% AREG Shedding).

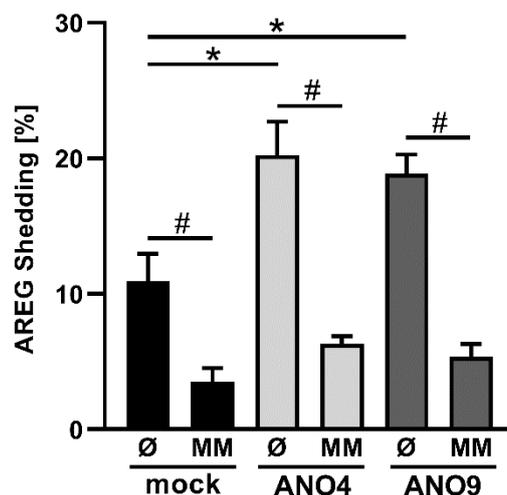


Abbildung 21: Überexpression von ANO4 oder ANO9 führt zu einer konstitutiv erhöhten Freisetzung an endogen exprimiertem AREG. HeLa-Zellen wurden mit ANO4 oder ANO9 oder einem mock-Vektor transfiziert. 24 h später wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen über Nacht in An- oder Abwesenheit von MM (10 µM) kultiviert. Die Menge an AREG im Überstand wurde im Verhältnis zur Gesamtmenge an AREG im ELISA untersucht (% Shedding). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg zur mock-Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Ø). (n=4; */# P < 0,05; MW ± SEM)

Wie zuvor in den mit AREG transfizierten HEK293T-Zellen führte die Transfektion mit ANO4 oder ANO9 auch bei endogener Expression des Substrats in HeLa-Zellen zu einem verstärkten konstitutiven Shedding von AREG. Der Effekt bei ANO4-Überexpression zeigte eine leicht stärkere Tendenz als bei ANO9. Durch Inkubation mit MM wurde die Beobachtung vollständig aufgehoben (Abbildung 21). Es ist bekannt, dass die Freisetzung von AREG unter anderem zu verstärkter Zellproliferation führen kann (Yarden & Sliwkowski, 2001). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die hier beobachtete verstärkte Freisetzung von AREG einen Einfluss auf die Zellproliferation der HeLa-Zellen haben könnte, welche durch eine Zellzahlbestimmung ermittelt werden kann. Für diese Untersuchung wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Zellzahl bei Überexpression beider ANOs, wobei der Effekt von ANO4 wieder stärker war. Der Effekt wurde erneut vollständig aufgehoben, wenn die Zellen mit MM inkubiert wurden (Abbildung 22). Das vorliegende Ergebnis verdeutlicht, dass sowohl ANO4 als auch ANO9 die Zellproliferation durch Aktivierung von Metalloproteasen fördern.

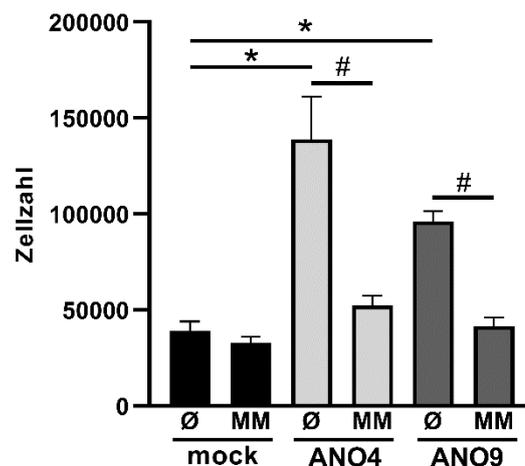


Abbildung 22: Überexpression von ANO4 oder ANO9 erhöht die Zellproliferation. HeLa-Zellen wurden mit ANO4 oder ANO9 oder einem mock-Vektor transfiziert. 24 h später wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen in An- oder Abwesenheit des Inhibitors MM (10 µM) über Nacht inkubiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und Post-Hoc Test nach Holm-Sidak statistisch ausgewertet. * steht für einen signifikanten Anstieg zur mock-Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Ø). (n=4; */# P < 0,05; MW ± SEM)

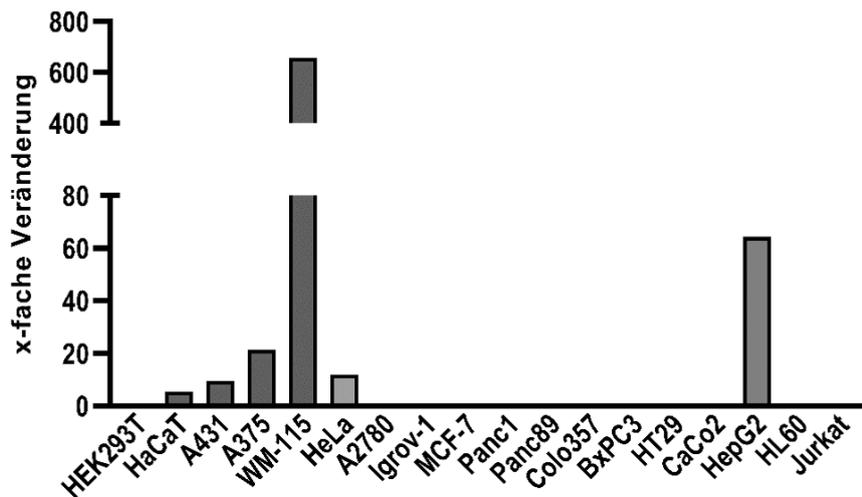
4.4.2 ENDOGENE EXPRESSION VON ANOCTAMIN-4 UND ANOCTAMIN-9 IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN

Die gewonnenen Daten im Überexpressionsmodell lieferten wichtige Hinweise darauf, dass ANO4 und ANO9 die Shedding-Aktivität von ADAM10/17 über PS-Exposition regulieren und durch die Induzierung einer vermehrten AREG-Freisetzung Einfluss auf die Zellproliferation

nehmen können. Darüber hinaus wäre es interessant mit Zelllinien zu arbeiten, die ANO4 und/oder ANO9 endogen exprimieren und dann zu untersuchen, ob Effekte beim Einsatz von siRNA zu beobachten sind. Zu diesem Zweck wurden diverse humane Zelllinien auf ihre endogene ANO4-/ANO9-Expression mit Hilfe von *Real-Time* PCR untersucht. Da unsere Arbeitsgruppe unter anderem eine dermatologische Ausrichtung hat, waren darunter die Hautzelllinien HaCaT (immortalisierte Keratinocytenzelllinie) und die aus einem epidermoiden Karzinom isolierten Zellen A431 sowie die beiden Melanomzelllinien A375 und WM-115, welche freundlicherweise durch die AG Schwarz, Dermatologie, UKSH Kiel zur Verfügung gestellt wurden. Bei den zuvor untersuchten HeLa-Zellen handelt es sich um Zellen eines Zervixkarzinoms. Um weitere Zelllinien des weiblichen Reproduktionstrakts zu untersuchen, wurden die Eierstockkrebszelllinien A2780 und Igrov-1 verwendet, welche freundlicherweise von der AG Bauernschlag/Arnold, Gynäkologie, UKSH Kiel bereitgestellt wurden. Ebenfalls durch diese AG wurde uns die Brustkrebszelllinie MCF-7 bereitgestellt, die mit in die Untersuchung eingeschlossen wurde. Da bereits postuliert wurde, dass ANO9 vermehrt in Pankreaskrebszellen vorkommt und eine hohe Expression als negativer prognostischer Marker gilt (Jun et al., 2017), wurden die aus Pankreaskarzinomen isolierten Zellen Panc1, Panc89, Colo357 und BxPC3 ebenfalls auf ihre endogene Expression beider ANOs untersucht. Ein Zusammenhang zwischen ANO9 und der Entstehung von kolorektalen Krebsarten soll ebenfalls bestehen (Li et al., 2015). Aus diesem Grund wurden zusätzlich die aus einem kolorektalen Adenokarzinom isolierten Zelllinien HT29 und CaCo2 verwendet. Um ein breiteres Spektrum an Zellen aus verschiedenen Geweben abzudecken, wurden drei weitere zur Verfügung stehende Zelllinien (HepG2, HL60 und Jurkat) in die Analyse aufgenommen. HepG2-Zellen stammen aus einem Leberkarzinom. HL60- sowie Jurkat-Zellen wurden aus Blut von Leukämiepatienten gewonnen.

Aus allen genannten Zelllinien wurde mRNA isoliert und eine *Real-Time* PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression von ANO4 und ANO9 durchgeführt. Als Kontrolle dienten HEK293T-Zellen, welche kaum endogen ANO4 oder ANO9 exprimieren. Die Ergebnisse wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet (*housekeeping gene*-Normalisierung) und mit dem Ergebnis der HEK293T-Zellen ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 23).

A ANO4



B ANO9

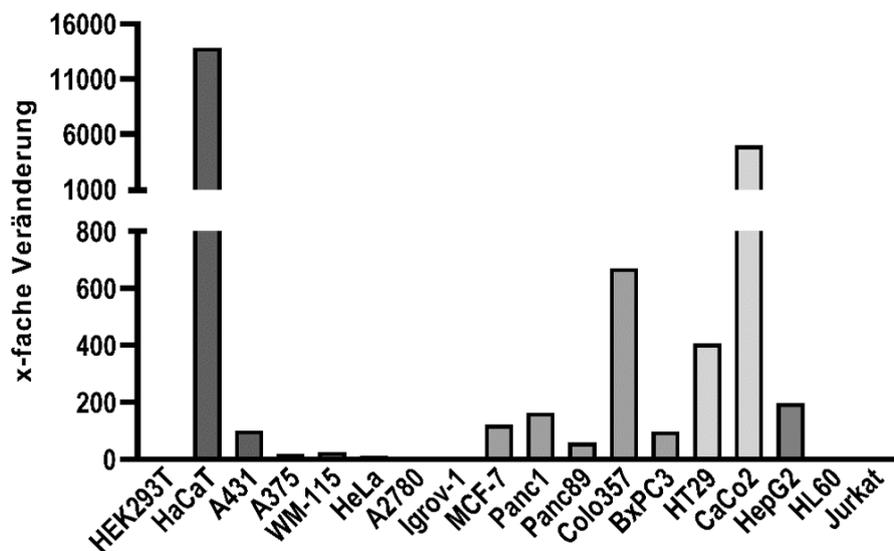


Abbildung 23: Endogene Expression von ANO4 oder ANO9 in verschiedenen Zelllinien. Verschiedene Zelllinien wurden mittels quantitativer *Real Time*-PCR auf ihre mRNA-Expression von ANO4 und ANO9 untersucht. Die Ergebnisse wurden nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode ausgewertet und mit der Expression von HEK293T-Zellen ins Verhältnis gesetzt. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um vorläufige Daten eines Experiments.

Im Vergleich mit den HEK293T-Zellen wiesen vor allem die verschiedenen Hautzelllinien HaCaT, A431, A375 und WM-115 eine stärkere Expression von ANO4 auf. Besonders hervorstechend war die Expression in WM-115-Zellen, welche um ein Vielfaches höher lag als bei allen anderen untersuchten Zelllinien. Den nächsthöheren Wert zeigten die Leberkarzinomzellen HepG2, deren ANO4-Expression ca. 60-fach gegenüber der von den HEK293T-Zellen erhöht waren. In HeLa-Zellen konnte eine ca. 12-fache stärkere Expression festgestellt werden.

Alle weiteren untersuchten Zelllinien wiesen keine zu den HEK293T-Zellen veränderte Expression auf (Abbildung 23).

Die Expression von ANO9 war in den Hautzellen HaCaTs auffällig stark und um das fast 14000-fache höher als in HEK293T-Zellen. Die anderen drei Hautzelllinien zeigten hierzu eine ca. 100-fach stärkere Expression bei den A431 bzw. eine ca. 20-fache bei den A375 sowie WM-115. Alle untersuchten Pankreaszelllinien wiesen wie erwartet eine höhere ANO9-Expression auf. Im Vergleich mit den HEK293T-Zellen am höchsten war diese in den Colo357-Zellen (ca. 650-fach), gefolgt von den Panc1 (ca. 150-fach), den BxPc3 (ca. 100-fach) und am niedrigsten in den Panc89 (ca. 60-fach). Auch die beiden kolorektalen Karzinomzelllinien HT-29 und CaCo2 zeigten eine ca. 400-fach (HT29) bzw. eine fast 5000-fach (CaCo2) stärkere ANO9-Expression als die HEK293T-Zellen. Ebenfalls hoch war die Expression in den HepG2-Zellen (ca. 200-fach) sowie den HeLa-Zellen (ca. 13-fach).

Bei den abgebildeten Ergebnissen handelt es sich um Daten eines Experiments, deren Aussagekraft deshalb limitiert ist. Für eine gesicherte und statistisch auswertbare Aussage müssen die Experimente wiederholt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen konnte. Sollten sich die Tendenzen bestätigen, würden sich vorrangig die WM-115 oder HepG2-Zellen eignen, um Versuche mit siRNA für ANO4 durchzuführen. Für den Einsatz von siRNA für ANO9 kämen HaCaT- und HepG2-Zellen sowie die untersuchten Pankreas- und Kolorektalkarzinomzelllinien in Betracht.

5 DISKUSSION

Die regulatorische Rolle der Zellmembran für die Funktion von Transmembranproteinen geriet in den letzten Jahren vermehrt ins Interesse der Forschung. Vor allem eine Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) wird mit diversen physiologischen Prozessen verknüpft. Die Externalisierung kann durch energieunabhängige, bidirektionale Lipidtransporter, sogenannte Scramblasen, erfolgen. Die bekanntesten Vertreter der Scramblasen gehören zu der Caspase-abhängigen Xkr-Familie oder zu der Ca^{2+} -aktivierten Anoctamin-Familie. Durch die Exposition von PS werden wiederum die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 aktiviert und es kommt zu einer verstärkten Substrat-Freisetzung. Die Scramblase Anoctamin-6 (ANO6) wurde kürzlich als Regulator des ADAM10/17-vermittelten Sheddings von EGFR-Liganden identifiziert. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch andere Scramblasen eine Rolle bei der Regulation der Shedding-Aktivität von ADAM10 und/oder ADAM17 haben könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Mitglieder der ANO-Familie sowie XKR8, dem bekanntesten Mitglied der Xkr-Familie, auf die Shedding-Funktion von ADAM10 und -17 untersucht. Die Regulation der ADAMs durch Scramblasen ist deshalb besonders interessant, da viele Mitglieder der ANO-Familie, ADAM10 und -17 sowie die EGFR-Liganden mit diversen entzündlichen und tumorösen Erkrankungen assoziiert sind und Erkenntnisse dieser Regulationsachse zum besseren Verständnis der Entstehung und Progression vieler Krankheiten beitragen könnten.

5.1 EINFLUSS VON XKR8 AUF DAS ADAM17-VERMITTELTE SHEDDING IST UNABHÄNGIG VON PMA-STIMULATION

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob XKR8 das Protein-Kinase C-abhängige Shedding von ADAM17 beeinflusst. Die Shedding-Aktivität von ADAM17 kann durch eine Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC), welche z.B. bei Stimulation mit PMA erfolgt, induziert werden. Dabei kommt es zu einer Externalisierung von PS, die unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist und deren Regulation bislang nicht aufgeklärt wurde (Nguyen et al., 2011; Sommer et al., 2016). Es wird vermutet, dass die PS-Externalisierung von einer Scramblase vermittelt wird, welche dies sein könnte ist allerdings bislang ungewiss. Da die Scramblasen der ANO-Familie ausnahmslos Ca^{2+} -abhängig aktiviert werden, kommen sie für diese Vermittlung nicht in Betracht (Kalienkova et al., 2021). Kürzlich wurde beschrieben, dass

murines XKR8 durch eine Phosphorylierungsreaktion aktiviert werden kann, wodurch eine Externalisierung von PS erfolgt (Sakuragi et al., 2019). Die Entdeckung machte diese Scramblase zu einem interessanten Kandidaten für die PKC-abhängige PS-Exposition bei der ADAM17-Aktivierung. XKR8 war bislang als Caspase-abhängige Scramblase bekannt, welche PS als frühes Signal während der Apoptose exponiert (Mariño & Kroemer, 2013; Suzuki et al., 2013). Sakuragi et al. entdeckten mittels Massenspektrometrie dann jedoch drei Phosphorylierungsstellen in murinem XKR8, von denen mindestens je eine in weiteren Säugetieren vorkommt. Humanes XKR8 hat zwei dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen (Sakuragi et al., 2019). Diese Phosphorylierungsstellen wurden in unserer Arbeitsgruppe mutiert, sodass potentielle Δ Phospho- oder Phosphomimik-Mutanten entstanden. Bei den Δ Phospho-Mutanten erfolgte ein Austausch von Serin oder Threonin zu Alanin, sodass eine Phosphorylierungsreaktion verhindert werden sollte. Durch die Phosphomimik-Mutationen mit Asparaginsäure entstanden potentiell hyperaktive XKR8-Mutanten.

Zunächst wurde ein Zusammenhang zwischen dem XKR8 Wildtyp und ADAM17 untersucht. Um einen Einfluss auf das ADAM17-vermittelte Shedding ausüben zu können, ist eine Lokalisation von XKR8 in der Plasmamembran entscheidend. Sakuragi et al. detektierten überexprimiertes murines XKR8 in der Plasmamembran von Mauszellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (Sakuragi et al., 2019). In dieser Arbeit konnte humanes XKR8 nach Überexpression in HEK293T-Zellen mit Hilfe eines Biotinylierungsassays auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Zur Untersuchung des Einflusses von XKR8 auf das PKC-abhängige Shedding durch ADAM17 wurden transfizierte HEK293T-Zellen in An- oder Abwesenheit verschiedener Inhibitoren mit PMA stimuliert. Eingesetzt wurden der Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM), der präferenzielle ADAM10-Inhibitor GI sowie GW, welcher ADAM10 und -17 inhibiert (Ludwig et al., 2005). PMA führte in mock-transfizierten Zellen erwartungsgemäß zu einer Aktivierung von ADAM17, was sich durch die erhöhte Freisetzung der AP-markierten ADAM17-Substrate TGF α und AREG (Sahin et al., 2004), welche durch den Einsatz von sowohl MM als auch GW signifikant reduziert wurde, zeigte. Der ADAM10-Inhibitor GI führte, wie in der Literatur beschrieben, zu keiner signifikanten Reduktion des Sheddings (Sommer et al., 2016; Veit et al., 2018).

Die Überexpression von XKR8 resultierte in einer konstitutiv erhöhten, allerdings nicht signifikanten Freisetzung von TGF α -AP, was zu den Daten der beobachteten, konstitutiv leicht erhöhten PS-Exposition passt. Die Behandlung mit PMA führte zu einem signifikant erhöhten

Shedding von TGF α -AP im Vergleich zur mock-Kontrolle. Das Shedding war in den XKR8-transfizierten Zellen jedoch nach PMA-Stimulation nur ca. 3-fach zu der unstimulierten Kontrolle erhöht, während es nach mock-Transfektion und PMA-Behandlung ca. 5-fach zu den unstimulierten Zellen erhöht war. Dies weist darauf hin, dass Überexpression von XKR8 einen konstitutiven Effekt auf das ADAM17-vermittelte TGF α -Shedding ausübt, dieser aber unabhängig von einer Stimulation mit PMA ist.

Im Gegensatz dazu führte die XKR8-Überexpression sowohl konstitutiv als auch nach PMA-Stimulation zu keiner signifikant erhöhten Freisetzung von AREG-AP. Wie ADAM10/17 ihre Substrate erkennen, ist bislang nicht abschließend geklärt. Es wird aber allgemein angenommen, dass Nanodomänen in der Zellmembran eine Rolle spielen und die räumliche Nähe von Substrat und Protease darüber entscheidet, welche Substrate von ADAM10/17 freigesetzt werden (Reiss & Bhakdi, 2017). So könnte spekuliert werden, dass XKR8 in Nanodomänen mit ADAM17 und TGF α vorliegt, nicht aber in räumlicher Nähe zu AREG.

Eine Analyse der Δ Phospho- oder Phosphomimik-Mutanten ergab, dass die ausgewählten potentiellen Phosphorylierungsstellen keine Rolle für die Funktion von humanem XKR8 haben, da sich keine der Mutanten signifikant unterschiedlich zum Wildtyp verhielt. Auch nach Transfektion der verschiedenen Mutanten war das konstitutive Shedding von TGF α im Vergleich zur mock-Kontrolle jeweils erhöht. Dies weist darauf hin, dass die mutierten Stellen für den beobachteten konstitutiven Einfluss von XKR8 auf das ADAM17-vermittelte Shedding nicht relevant sind. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch nach PMA-Stimulation kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Δ Phospho- oder Phosphomimik-Mutanten bestand, wird die These gestützt, dass XKR8 einen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM17 hat, ohne dass PMA-Stimulation dabei eine Rolle spielt. Um dies weiter zu überprüfen, könnten die hier durchgeführten Experimente mit einer Ionomycin (IO)-Stimulation wiederholt werden. Durch Behandlung mit IO wird ein Ca²⁺-Einstrom in die Zelle induziert, durch den die Aktivität von XKR8 nicht beeinflusst werden sollte. Würde sich das gleiche Ergebnis wie bei der PMA-Stimulation zeigen, könnte davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt tatsächlich unabhängig von PMA ist.

Die in murinem XKR8 identifizierten Phosphorylierungsstellen, deren Phosphorylierung im Gegensatz zur humanen Variante bereits biochemisch bestätigt wurde, sind also im Menschen

nicht relevant, was die Frage nach anderen Phosphorylierungsstellen in humanem XKR8 aufwirft. Die in der Maus identifizierten drei Positionen befinden sich im C-Terminus nahe der Caspase-Schnittstelle (Sakuragi et al., 2019). Die erste der drei Stellen ist in humanem XKR8 für eine Phosphorylierungsreaktion nicht relevant, da sich an dieser Position ein Alanin und somit eine nicht phosphorylierbare Aminosäure befindet. Drei andere Stellen in der Nähe der Caspase-Schnittstellen könnten aber für eine Phosphorylierungsreaktion von humanem XKR8 spekuliert werden. Die eine befindet sich an Position 359 (Serin) und ist damit nicht weit von der ersten Phosphorylierungsstelle in murinem XKR8 an Position 356 entfernt. Ein weiteres Serin im C-Terminus kommt an Position 391 in Frage. Theoretisch könnte auch Tyrosin das Ziel einer Phosphorylierungsreaktion sein. Es befindet sich eins im C-Terminus an Position 366 von humanem XKR8, allerdings wurde Tyrosin an Position 370 in murinem XKR8 nicht als Phosphorylierungsstelle identifiziert. Bislang fehlen Erkenntnisse zu einer möglichen Phosphorylierung der benannten Positionen. Eine Untersuchung von humanem XKR8 mittels Massenspektrometrie sowie eine biochemische Überprüfung der Phosphorylierungsreaktionen könnten Aufschluss darüber bringen, ob bzw. wie humanes XKR8 durch Phosphorylierung aktiviert werden kann.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass XKR8 mutmaßlich nicht die Scramblase ist, welche eine Rolle für die PS-Externalisierung während der PKC-induzierten ADAM17-Aktivierung spielt. Vermutlich existieren andere, bislang nicht identifizierte Scramblasen, die durch Phosphorylierung der PKC aktiviert werden können. Warum Überexpression von XKR8 konstitutiv zu einer Erhöhung der PS-Externalisierung und der Substrat-Freisetzung führt, kann nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise könnte eine Transfektion der HEK293T-Zellen mit XKR8 zu apoptotischen Signalkaskaden führen, wodurch eine erhöhte Menge an externalisiertem PS auftritt. Dies könnte durch Messung der Aktivität der Caspase-3/-7 mithilfe spezifischer Peptidsubstrate näher aufgeklärt werden. Denkbar wäre auch, dass XKR8 eine aktivierende Funktion auf andere Scramblasen ausübt, welche dann die PS-Exposition vermitteln. So berichteten bereits Suzuki et al. über eine konstitutive Aktivität von murinem XKR8 in einer Mauszelllinie und spekulierten, dass XKR8 mit Ca^{2+} -regulierten Proteinen interagiert (Suzuki et al., 2013).

5.2 ANOCTAMIN-6 REGULIERT ÜBER PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG DIE PROTEOLYTISCHE FREISETZUNG VON CD137

CD137 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und wird von diversen Zelltypen exprimiert. Am besten untersucht ist seine Rolle als ko-stimulatorisches Molekül von T-Zellen, in denen CD137 die Proliferation, Differenzierung und Zytokinausschüttung bei Aktivierung beeinflusst (Laderach et al., 2002; Ren et al., 2021).

TNF-Rezeptoren und ihre Liganden können sowohl membranständig als auch in löslicher Form vorkommen (Hehlgans & Pfeffer, 2005; Remouchamps et al., 2011). Die lösliche Form von CD137 kann ein Produkt alternativen *Splicings* sein, aber kürzlich konnte in HT29- und HEK293T-Zellen erstmalig gezeigt werden, dass lösliches CD137 auch ein Shedding-Produkt von sowohl ADAM10 als auch ADAM17 sein kann (Seidel et al., 2021). Eine zentrale Rolle für die Shedding-Aktivität von ADAM10/17 spielt die Translokation von PS auf die Zelloberfläche (Sommer et al., 2016), für welche wiederum Scramblasen wichtige Mediatoren sind (Suzuki et al., 2013). ANO6 ist bis dato die am besten charakterisierte Ca^{2+} -abhängige Scramblase und es konnten bereits Hinweise dafür geliefert werden, dass ANO6 einen regulatorischen Einfluss auf ADAM10/17 hat (Bleibaum et al., 2019; Veit et al., 2018). Diese Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe führten zu der Vermutung, dass die Freisetzung von CD137 durch eine Aktivierung von ANO6 beeinflusst wird.

Um eine Beteiligung von ANO6 zu überprüfen, wurde zunächst untersucht, ob die CD137-Freisetzung in Abhängigkeit von oberflächenexponiertem PS erfolgt. Hierfür wurden transfizierte HT29- und HEK293T-Zellen mit den Inhibitoren O-Phospho-L-Serin (OPS) und Lactadherin behandelt, welche eine Interaktion von ADAM10/17 mit exponiertem PS blockieren. Die Stimulation von ADAM10/17 erfolgte durch Ionomycin, wodurch es zu einer erhöhten Freisetzung von CD137 in beiden Zelllinien kam. Der Einsatz beider Inhibitoren resultierte jeweils in einer signifikanten Reduktion der Freisetzung, was ein deutlicher Hinweis darauf war, dass das Shedding von CD137 in HT29- und HEK293T-Zellen in Abhängigkeit von PS erfolgt.

Um den Einfluss von ANO6 zu überprüfen, wurden die Zellen zusätzlich mit ANO6 oder einer hyperaktiven ANO6-Mutante transfiziert. Die hyperaktive ANO6-Mutante wurde bei Untersuchungen von murinen B-Lymphozyten als natürlich auftretende Mutation entdeckt (Segawa et al., 2011). Sie weist eine Punktmutation auf, durch welche eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität auftritt, sodass die hyperaktive Mutante konstitutive Scrambling-Aktivität zeigt (Scudieri et al.,

2015; Segawa et al., 2011). Nach diesem Vorbild wurde in dieser Arbeitsgruppe eine humane Variante der hyperaktiven ANO6-Mutante erstellt. Charakteristische Untersuchungen ergaben, dass die erzeugte humane Mutante ebenfalls eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität aufweist, so dass sie konstitutiv eine PS-Externalisierung vermittelt, ohne dass ein Stimulus nötig ist (Veit et al., 2018). Durch die Verwendung der hyperaktiven ANO6-Mutante ergab sich die Möglichkeit, die alleinige Auswirkung einer PS-Externalisierung auf die Freisetzung von CD137 zu untersuchen.

Eine Aktivierung von ANO6 erfolgte durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche durch Ionomycin erreicht wurde. In diesem Versuch wurde deutlich, dass Überexpression von ANO6 die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung von CD137 verstärkt, während konstitutiv kein Effekt beobachtet wurde. Darüber hinaus resultierte die Überexpression der hyperaktiven ANO6-Mutante in Abwesenheit eines Stimulus zu einem erhöhten Shedding von CD137, was zuvor schon für andere ADAM-Substrate beobachtet wurde (Bleibaum et al., 2019; Veit et al., 2018). Dies verdeutlicht, dass eine erhöhte Freisetzung von CD137 durch ADAM10/17 alleine durch eine vermehrte PS-Externalisierung vermittelt werden kann, was die Relevanz von Scramblasen, wie hier ANO6, für die Regulation hervorstellt.

Die Entdeckung einer Verbindung zwischen CD137, Sheddasen und Scramblasen könnte eine Rolle für die Therapieansätze diverser Krankheiten spielen, da CD137 als eines der vielversprechendsten Zielmoleküle in der Immuntherapie gilt (Hashimoto, 2021; Ugolini & Nuti, 2021). Die Immuntherapie bekam vor allem in den letzten Jahren einen starken Aufschwung in der Krebstherapie und weckte Hoffnung für neue Heilungschancen. CD137 spielt eine tragende Rolle für die Homöostase des Immunsystems sowie bei der Verhinderung der Tumorentstehung (Ren et al., 2021). Es wird ebenfalls als potentiell Ziel bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen vorgeschlagen (Wong & Schwarz, 2020). Erhöhte Werte an löslichem CD137 wurden in Patienten mit rheumatoider Arthritis entdeckt und später u.a. in systemischem Lupus erythematodes und Multipler Sklerose nachgewiesen (Michel et al., 1998; Shao et al., 2008; Sharief, 2002). Das Verständnis der Regulation einer CD137-Freisetzung ist demnach entscheidend für den Erfolg zukünftiger Wirkstoffe und die Behandlung diverser Erkrankungen.

5.3 ANOCTAMIN-4 UND -9 BEEINFLUSSEN CALCIUM-ABHÄNGIG DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM10 UND -17

Da für mehrere Mitglieder der ANO-Familie eine Scramblase-Funktion postuliert wurde, kam die Frage auf, ob neben ANO6 auch andere ANOs einen regulatorischen Einfluss auf das Shedding durch ADAM10 oder ADAM17 ausüben können. Während über die letzten Jahre relativ deutlich wurde, dass ANO6 eine Ca^{2+} -abhängige Scramblase ist und ANO1 sowie ANO2 Cl^- -Kanäle darstellen, war die Rolle der übrigen ANOs lange ungewiss (Kalienkova et al., 2021). Interessant waren für diese Arbeit insbesondere jene ANOs, welche als Scramblasen eine Rolle bei der PS-Externalisierung spielen könnten. Suzuki et al. postulierten Scramblase-Aktivitäten für ANO3, ANO4, ANO6, ANO7 und ANO9, wobei für ANO3 vorrangig ein Transport von Phosphatidylcholin und nicht PS berichtet wurde (Suzuki et al., 2013). ANO5, ANO8 und ANO10 wurden in dieser Studie nicht als Scramblasen benannt, für ANO5 wurde aber kurze Zeit darauf ebenfalls eine Rolle als Scramblase bei der PS-Externalisierung gezeigt (Gyobu et al., 2016, 2017; Whitlock et al., 2018) und Bethel und Grabe spekulierten anhand von computergestützten Simulationsmethoden, dass ANO10 ebenfalls Scramblase-Aktivität aufweist (Bethel & Grabe, 2016). Gyobu et al. bestätigten dies kurze Zeit später mit dem Zusatz, dass ANO10 eine Scramblase in intrazellulären Membranen ist (Gyobu et al., 2017). Für ANO8 wurde bis heute keine Scramblase-Aktivität festgestellt und die Funktion bleibt überwiegend ungeklärt.

Um den Einfluss verschiedener ANOs auf die Shedding-Aktivität von ADAM10/17 zu analysieren, wurden HEK293T-Zellen verwendet und mit ANO1, ANO4, ANO5, ANO6, ANO7, ANO9 oder ANO10 transfiziert. ANO1 diente als Cl^- -Kanal als negative Kontrolle während ANO6 als am besten charakterisierte Scramblase mit nachgewiesenem Einfluss auf ADAM10/17 als positive Kontrolle mitgeführt wurde. ANO3 wurde aufgrund seiner postulierten Spezifität für Phosphatidylcholin ebenso wie ANO8 ohne Scramblase-Funktion für diese Experimente nicht verwendet. Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden mit Ionomycin stimuliert, um einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zu induzieren und somit die Ca^{2+} -abhängigen ANOs zu aktivieren. Anschließend wurde die Freisetzung der AP-markierten ADAM10/17-Substrate BTC, TGF α und AREG betrachtet. Bei allen drei Substraten zeigte sich, dass nicht nur Überexpression von ANO6, sondern auch von ANO4 oder ANO9 zu einer signifikant erhöhten Freisetzung führte und der Effekt bei ANO9-Transfektion sogar noch ausgeprägter war, als bei ANO6. Überraschenderweise resultierte die Überexpression von ANO1 ebenfalls in einem erhöhten

Shedding von BTC-AP. Es ist möglich, dass Überexpression von ANO1 hier das endogen exprimierte ANO6 in den Zellen aktiviert hat. Tatsächlich beobachteten Kunzelmann et al. ebenfalls, dass Expression von ANO1 die Ionomycin-induzierte Scrambling-Aktivität von ANO6 verstärken kann (Kunzelmann et al., 2019).

Überexpression von ANO10 resultierte erwartungsgemäß in keinem erhöhten Substrat-Shedding, was sich mit der Beobachtung deckt, dass ANO10 eine intrazelluläre Scramblase ist und deshalb keinen Einfluss auf die ADAMs an der Zelloberfläche hat. Mehrere Gruppen berichteten, dass die Scramblase-Funktion von ANO10 auf das Endoplasmatische Retikulum (ER) beschränkt ist (Bushell et al., 2019; Petkovic et al., 2020; Tsuji et al., 2019). Bushell et al. spekulierten, dass ANO10 hier als Scramblase eine essentielle Funktion für die Lipidverteilung in der ER-Membran besitzt, indem es die Translokation von Lipiden, welche auf der zytoplasmatischen Seite synthetisiert werden, vermittelt (Bushell et al., 2019).

Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass bei Überexpression von ANO5 und ANO7 keine erhöhte Substratfreisetzung auftrat, obwohl für beide eine Plasmamembranlokalisation und PS-Scramblase-Aktivität postuliert wurde (Falzone et al., 2018; Kalienkova et al., 2021; Suzuki et al., 2013). Die zelluläre Lokalisation verschiedener ANOs wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Schreiber et al. berichteten, dass u.a. ANO4, ANO5, ANO6, ANO7 und ANO9 nach Überexpression in der Plasmamembran von HEK293T-Zellen detektiert werden können (Schreiber et al., 2010; Tian et al., 2012). Duran et al. veröffentlichten hingegen, dass ANO3, ANO4, ANO5, ANO6 und ANO7 nach Überexpression in HEK293T-Zellen nur intrazellulär vorkommen (Duran et al., 2012). Um aufzuklären, warum ANO7 trotz postulierter PS-Scramblase-Aktivität in dieser Arbeit keinen Einfluss auf das ADAM10/17-vermittelte Shedding aufwies, müsste in zukünftigen Experimenten die Membranlokalisation von ANO7 überprüft werden.

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe gaben Hinweise darauf, dass überexprimiertes ANO5 in HEK293T-Zellen in der Plasmamembran detektiert werden kann, was die Erkenntnisse von Schreiber et al. bestätigen würde. Dies führt jedoch zu der Frage, warum Überexpression von ANO5 ebenfalls keinen Einfluss auf das Substrat-Shedding durch ADAM10/17 hatte. Suzuki et al. beobachteten keine PS-Scramblase-Aktivität von ANO5 (Suzuki et al., 2013), während Whitlock et al. ANO5 als Scramblase identifizierten, dabei allerdings eine stabile Transfektion anwendeten (Suzuki et al., 2013; Whitlock et al., 2018). In dieser Arbeit

wurde mit transienter Transfektion gearbeitet, was erklären könnte, warum die Ergebnisse von Whitlock et al. abweichen. Durch die Anwendung von transienter Transfektion können Artefakte, wie z.B. Veränderung des Phänotyps, die bei stabiler Transfektion auftreten können, vermieden werden (Stepanenko & Heng, 2017). In unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wurde außerdem deutlich, dass eine ANO5- sowie auch eine ANO7-Überexpression nicht mit einer vermehrten PS-Externalisierung einhergeht, was wiederum zu den Daten der unbeeinflussten Substratfreisetzung passt. Die Beobachtung, dass überexprimiertes ANO5 in der Plasmamembran von HEK293T-Zellen detektiert werden kann, aber keine erhöhte PS-Exposition detektiert wird, lässt spekulieren, dass ANO5 unter diesen Bedingungen nicht als Scramblase fungiert. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass ANO5 weniger sensitiv für Ca^{2+} ist als andere ANOs oder zusätzliche Aspekte bei der Regulation von ANO5 eine Rolle spielen. ANO5 besitzt von allen ANOs die höchste Sequenzhomologie zu ANO6, weshalb es naheliegt zu spekulieren, dass kompensatorische Effekte zwischen beiden auftreten können (Gyobu et al., 2016). Gleichzeitig erscheint es plausibel, dass ANO5 und ANO6 nicht ausschließlich eine redundante Rolle spielen. Whitlock et al. postulierten, dass sich ANO5 und ANO6 in Muskelzellen durch verschiedene Funktionen und/oder unterschiedliche Regulation unterscheiden und Gyobu et al. spekulierten, dass ANO5 lediglich im bestimmten biologischen Kontext Scramblase-Aktivität aufweist und dass sich diese überwiegend auf intrazelluläre Membranen beschränkt (Gyobu et al., 2016; Whitlock et al., 2018).

Für ANO4 und ANO9 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie nach Überexpression eine Plasmamembranlokalisation in HEK293T-Zellen aufweisen. Auch wurde in ANO4- oder ANO9-überexprimierenden Zellen bereits konstitutiv eine vermehrte PS-Exposition detektiert, welche nach Stimulation mit Ionomycin im Gegensatz zu den mock-transfizierten Zellen stark erhöht war. Dies steht im Einklang mit der beobachteten verstärkten Shedding-Aktivität von ADAM10/17 in ANO4- und ANO9-transfizierten Zellen.

Um zu bestätigen, dass die beobachteten Effekte bei ANO4 und ANO9 aufgrund der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auftraten, wurde der gleiche Versuchsaufbau wie zuvor genutzt, aber statt mit Ionomycin wurde mit PMA stimuliert. PMA gilt als ADAM17-Aktivator, bei dessen Einsatz eine Aktivierung der PKC und ebenfalls eine PS-Externalisierung erfolgt, die aber unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration ist (Sommer et al., 2016). Aufgrund der Beobach-

tung, dass die Überexpression aller untersuchter ANOs keinen Einfluss auf die Substrat-Freisetzung bei PMA-Stimulation zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass der zuvor beobachtete Effekt auf die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zurückführbar ist.

Da die untersuchten Substrate nicht ausschließlich von nur einer Protease freigesetzt werden können, sollten die Anteile der beteiligten Proteasen an der Substrat-Freisetzung ermittelt werden (Le Gall et al., 2009; Sahin et al., 2004). ANO4- oder ANO9-transfizierte Zellen wurden hierfür mit den Inhibitoren MM, GI oder GW behandelt und zur Aktivierung mit Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde die Freisetzung von BTC-AP, TGF α -AP und AREG-AP untersucht. BTC ist ein ADAM10-Substrat und es ist bekannt, dass die Freisetzung durch den Einsatz von GI gehemmt werden kann (Bleibaum et al., 2019). In den ANO4- oder ANO9-überexprimierenden Zellen wurde die stimulierte BTC-Freisetzung durch GI signifikant verringert, was bestätigt, dass ADAM10 weiterhin die Hauptsheddase von BTC war. TGF α und AREG gelten als präferentielle ADAM17-Substrate, deren Freisetzung größtenteils durch den ADAM10/17-Inhibitor GW und nur leicht durch GI gehemmt werden kann (Veit et al., 2018). Analog hatte GW in dieser Arbeit einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt auf das Shedding von AREG als GI, sodass hier wie erwartet primär ADAM17 als Sheddase von AREG identifiziert wurde. Allerdings hatten GI und GW auf die Freisetzung von TGF α in den ANO4- oder ANO9-transfizierten Zellen eine vergleichbare und zudem eher schwache Wirkung. Dies weist darauf hin, dass ADAM17 das Shedding von TGF α unter diesen Bedingungen nicht mehr beeinflusst hat und auch ADAM10 nur einen kleinen Teil davon vermittelt hat. Ein deutlich stärkerer inhibitorischer Effekt trat bei dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor MM auf. Dadurch zeigte sich, dass die Freisetzung von TGF α hier überwiegend von anderen, durch MM hemmbare Proteasen vermittelt wurde. Der Effekt, dass ein verstärktes TGF α -Shedding mit einer Erweiterung des Spektrums an beteiligten Metalloproteasen einhergeht, wurde bereits bei ANO6-Überexpression beobachtet (Veit et al., 2018). Es ist zudem bekannt, dass kompensatorische Effekte zwischen ADAM10 und ADAM17 auftreten. So konnte gezeigt werden, dass ADAM17 zwar die Hauptsheddase von TGF α ist, bei dessen Abwesenheit die TGF α -Freisetzung aber durch ADAM10 übernommen werden kann (Le Gall et al., 2009). Das Shedding von TGF α kann außerdem unter bestimmten Bedingungen durch andere Mitglieder der ADAM-Familie erfolgen, wie es z.B. für ADAM9 oder ADAM15 beschrieben ist (Merlos-Suárez et al., 2001; Schäfer et al., 2003). Denkbar wäre auch, dass Matrix-Metalloproteasen (MMP) an der Freisetzung beteiligt sind, für die bereits gezeigt wurde, dass

sich ihr Substratspektrum teilweise mit dem von ADAM10/17 überschneidet. So können MMP-3 und MMP-7 u.a. E-Cadherin (auch ADAM10-Substrat) und viele Mitglieder der MMPs TNF α (auch ADAM17-Substrat) freisetzen (Sternlicht & Werb, 2001).

Nicht ganz aufgeklärt werden kann allerdings, warum TGF α von anderen Metalloproteasen freigesetzt wurde, da das Vorhandensein sowie die funktionelle Aktivität von ADAM17 durch die Freisetzung von AREG gezeigt wurde und dies nicht der Auslöser für kompensatorische Effekte sein kann. In der Literatur ist beschrieben, dass die Lokalisation von Protease zu Substrat und Scramblase entscheidend für die Substratfreisetzung ist (Reiss & Bhakdi, 2017; Sommer et al., 2016). Wie in dieser Arbeit gezeigt, resultierte eine ANO4-/ANO9-Überexpression in einer deutlich erhöhten Translokation von PS auf die Membranaußenseite. Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die supranormale Scramblase-Aktivität verbunden mit einer erhöhten Translokation von Phospholipiden in der Zellmembran der Auslöser für eine Auflösung bzw. Neuordnung von Nanodomänen in der Membran ist. Einerseits könnte dadurch eine räumliche Trennung von TGF α und ADAM17 erfolgen und andererseits könnte es zu einem Aufeinandertreffen von TGF α und anderen Proteasen kommen, welche sonst nicht gemeinsam lokalisiert sind und nun vermehrt TGF α freisetzen können. Zusammengefasst mit der erhöhten TGF α -Freisetzung in ANO4- oder ANO9-transfizierten Zellen im Gegensatz zur Kontrolle kann spekuliert werden, dass auch andere Metalloproteasen durch eine vermehrte PS-Externalisierung aktiviert werden können.

In Experimenten mit dem Inhibitor OPS, welcher eine Interaktion zwischen oberflächenexponiertem PS und Sheddase verhindert, konnten deutliche Hinweise auf die PS-Abhängigkeit des verstärkten Sheddings von BTC-AP, TGF α -AP und AREG-AP in ANO4- oder ANO9-transfizierten HEK293T-Zellen erbracht werden.

5.4 ÜBEREXPRESSION VON ANOCTAMIN-4 UND -9 FÜHRT ZU KONSTITUTIV ERHÖHTER FREISETZUNG VON AREG UND GESTEIGERTER PROLIFERATION VON TUMORZELLEN

In den vorherigen Stimulationsversuchen mit den HEK293T-Zellen war auffällig, dass Transfektion von ANO4 oder ANO9 auch in Abwesenheit des Stimulus zu einer vermehrten PS-Externalisierung und zu einer erhöhten Freisetzung von AREG-AP führte. Suzuki et al. berichteten bereits von einer konstitutiven Scramblase-Aktivität für ANO4 (Suzuki et al., 2013). Um die konstitutiven Effekte im Hinblick auf die funktionelle Relevanz genauer zu untersuchen,

sollte eine Zelllinie verwendet werden, welche AREG endogen exprimiert. Angesichts der Assoziation von sowohl Scramblasen als auch den ADAMs mit Tumorerkrankungen, stellten insbesondere Krebszellen ein geeignetes Modellsystem dar. Für die folgenden Experimente wurden die zu den Epithelzellen zählenden HeLa-Zellen ausgewählt, die aus einem Zervix-Adenokarzinom isoliert wurden und AREG endogen exprimieren.

Die konstitutive Freisetzung von AREG in den HeLa-Zellen wurde mittels ELISA untersucht, nachdem die Zellen über Nacht in An- oder Abwesenheit von MM inkubiert wurden. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte AREG-Freisetzung nach ANO4- oder ANO9-Überexpression, die durch MM signifikant inhibiert werden konnte und somit auf Metalloproteasen zurückgeführt werden kann.

Es wurde vielfach beschrieben, dass eine Freisetzung von AREG, gefolgt von der Bindung an den EGFR, die Proliferation in den meisten Zellarten, darunter auch Epithelzellen, fördern kann (Berasain & Avila, 2014). Die Vermutung, dass Überexpression von ANO4 oder ANO9 durch erhöhtes AREG-Shedding einen Einfluss auf die Zellzahl haben könnte, lag deshalb nahe. Für diese Untersuchung wurden transfizierte HeLa-Zellen erneut über Nacht mit oder ohne MM inkubiert und anschließend eine Zellzahlbestimmung zur Untersuchung der Proliferation der Zellen durchgeführt. Die ANO4- und ANO9-überexprimierenden Zellen wiesen signifikant erhöhte Zellzahlen und damit eine stärkere Proliferation auf als die mock-Kontrolle (Abbildung 24).

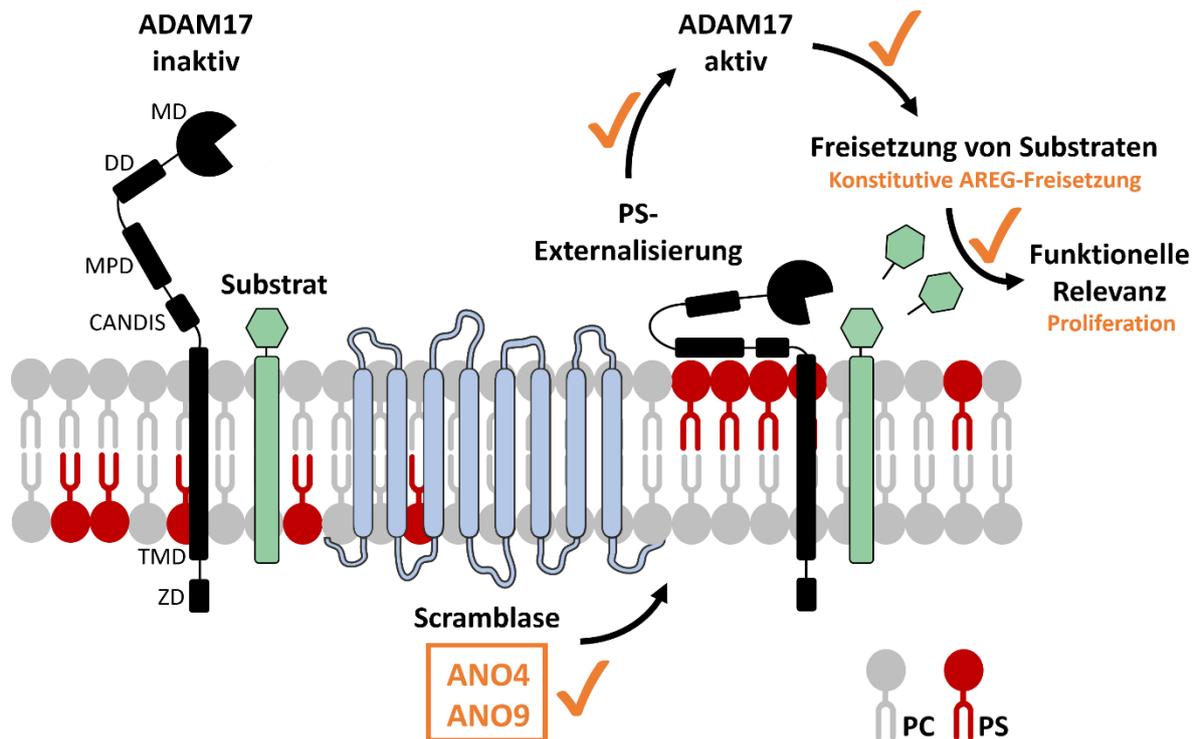


Abbildung 24: Regulation der ADAM-vermittelten Substratfreisetzung durch ANO4 und ANO9. Die durch ANO4 oder ANO9 vermittelte Externalisierung von PS resultiert in einer erhöhten Substratfreisetzung durch ADAM10/17. Eine Überexpression von ANO4 oder ANO9 führt zu einem vermehrten konstitutivem AREG-Shedding und erhöht die Proliferation von Tumorzellen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse stellte sich unweigerlich die Frage nach der pathophysiologischen Relevanz der Verbindung von ANO4/ANO9, ADAMs und einer erhöhten AREG-Freisetzung. Eine Vielzahl an Studien zeigte bereits eine Rolle von AREG bei der Tumorentstehung vieler Krebsarten und eine ständige Proliferation ist das grundlegendste Merkmal von Tumorzellen (Berasain & Avila, 2014; Hanahan & Weinberg, 2011). Der pathophysiologische Kontext von ANO4 und ANO9 ist deutlich schlechter erforscht. Für ANO4 wurde vorrangig ein Zusammenhang mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems berichtet, wie z.B. Multiple Sklerose sowie Alzheimer, Schizophrenie und Angststörungen (Reichhart et al., 2021). Genomweite Assoziationsstudien deckten außerdem auf, dass ANO4, u.a. zusammen mit weiteren Phospholipidtransportern (Flippasen und Floppasen), eine Rolle bei Brustkrebs spielt (Wittkowski et al., 2018). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Assoziation von ANO9 mit mehreren Krebsarten. So steht ANO9 im Zusammenhang mit der Entstehung von kolorektalen Krebserkrankungen, wobei eine hohe Expression von Vorteil für die Patienten zu sein scheint (Li et al., 2015). Das Gegenteil berichteten Katsurahara et al. bei der Erforschung von Speiseröhrenkrebs. Sie entdeckten eine verringerte Proliferation, Migration und Invasionsfähigkeit

der Krebszellen bei der Anwendung von ANO9-siRNA und damit einhergehend, dass eine hohe Expression ein negativer prognostischer Marker in Patienten ist (Katsurahara et al., 2020). ANO9 wurde außerdem vermehrt in Pankreaskrebszellen entdeckt und eine hohe Expression gilt hier ebenfalls als schlechter prognostischer Marker für die Patienten. Jun et al. veröffentlichten, dass ANO9 die Entstehung von Pankreastumoren über Beeinflussung des EGFRs fördert (Jun et al., 2017). Dies könnte in Zusammenhang mit ADAM10/17 stehen, welche die Hauptsheddasen von EGFR-Liganden sind. Eine hohe Expression und Shedding-Aktivität von sowohl ADAM10 als auch ADAM17 werden mit verschiedenen Krebsarten assoziiert. Für ADAM10 wurde eine Rolle bei Prostata- und Darmkrebs beschrieben und ADAM17 steht u.a. in Verbindung mit Brust- und auch Pankreaskrebs (Pruessmeyer & Ludwig, 2009). In zukünftigen Experimenten wäre es spannend zu untersuchen, ob eine verstärkte Expression von ANO9 in Pankreaskrebszellen mit einer erhöhten Shedding-Aktivität von ADAM10/17 einhergeht, die zu einer vermehrten Freisetzung von EGFR-Liganden führt. Die verstärkte Aktivierung des EGFR könnte letztendlich in einer pathologisch erhöhten Proliferation der Tumorzellen resultieren.

Eine weitere interessante Verbindung zwischen ANOs, ADAMs und Krebserkrankungen ergibt sich durch die Betrachtung sogenannter Exosomen. Exosomen sind extrazelluläre Vesikel, welche von Zellen freigesetzt werden und durch den Transport von DNA/RNA, Lipiden und Proteinen in ihrem Inneren eine essentielle Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation spielen. Krebszellen sind bekannt dafür, mehr Exosomen zu produzieren und freizusetzen als gesunde Zellen, welche die Invasion und metastasierenden Eigenschaften der Krebszellen erhöhen (Azmi et al., 2013; Zhang & Yu, 2019). Sie können darüber nicht nur ihre direkte Umgebung modulieren, sondern auch weiter entfernte Zellen beeinflussen. Darüber hinaus können Exosomen als Biomarker für die Diagnose und Prognose von Krebserkrankungen dienen. Da sie sich in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin und Speichel befinden, ergibt sich dadurch eine für die Patienten schonende und wenig invasive Untersuchungsmöglichkeit (Kalluri & LeBleu, 2020; Zhang & Yu, 2019).

Bei der Entstehung von Exosomen spielt die Aufhebung der Zellmembran-Asymmetrie eine entscheidende Rolle und ein direkter Zusammenhang zwischen ANOs und Exosomen wurde postuliert (Kunzelmann et al., 2019; Whitlock & Hartzell, 2017). Einen ersten Hinweis darauf, dass Ca^{2+} -abhängige PS-Externalisierung die Produktion und Freisetzung von extrazellulären

Vesikeln reguliert, lieferte die Entdeckung einer verminderten Exosomen-Freisetzung in Patienten mit dem durch eine ANO6-Defizienz ausgelösten Scott-Syndrom (Dachary-Prigent et al., 1997; Sims et al., 1989; Toti et al., 1996). Insbesondere die Rolle von ANO6 bei der Freisetzung extrazellulärer Vesikel konnte mittlerweile mehrfach gezeigt werden (Bricogne et al., 2019; Fujii et al., 2015; Han et al., 2019) und auch eine Beeinflussung der Freisetzung durch ANO1 sowie ANO7 wurde beobachtet (Kaikkonen et al., 2020; Tian et al., 2011). Eine ähnliche Funktion wäre deshalb ebenfalls für ANO4 und ANO9 denkbar. Besonders spannend könnte hierbei die Beobachtung sein, dass Überexpression von ANO4 oder ANO9 bereits konstitutiv in einer erhöhten PS-Externalisierung resultiert. Durch die Externalisierung von PS kommt es in der Zellmembran zu einer veränderten Lipidanordnung, was wiederum eine Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften der Membran auslöst. Dadurch kommt es zu einer sogenannten Spannungskrümmung, welche zu der Produktion von extrazellulären Vesikeln führt (Whitlock & Hartzell, 2017). In Zellen, welche ANO4 und/oder ANO9 endogen bereits stark exprimieren, könnte so eine erhöhte Freisetzung von Exosomen auftreten.

Darüber hinaus wurden ADAM10 und ADAM17 wiederholt bei Untersuchungen von Exosomen detektiert (Tosetti et al., 2021). Groth et al. inkubierten Zellen, welche die ADAM17-Substrate AREG oder TGF α exprimierten, mit Exosomen, die ADAM17 enthielten, und beobachteten eine verstärkte Freisetzung der Substrate (Groth et al., 2016). Somit gelang es ihnen zu zeigen, dass in Exosomen lokalisiertes ADAM17 biologisch aktiv ist, was auch für ADAM10 nachgewiesen werden konnte (Gutwein et al., 2003, 2005; Stoeck et al., 2006). Durch den Transport von ADAM10/17 in extrazellulären Vesikeln können diese auch weiter entfernte Substrate auf der Oberfläche anderer Zellen erreichen und diverse physiologische und pathophysiologische Prozesse beeinflussen (Shimoda & Khokha, 2017). Die Kombination aus einer erhöhten Freisetzung extrazellulärer Vesikel durch ANO-Aktivität und dem Auftreten biologisch aktiven ADAM10/17 in den Vesikeln könnte entzündliche Prozesse sowie das Wachstum von Tumoren entscheidend fördern.

Die Daten dieser Arbeit wurden im Überexpressionsmodell erhoben, weshalb Überexpressionsartefakte nicht ausgeschlossen werden können. Tian et al. postulierten, dass sich die Funktion einiger ANOs bei Überexpression verändert und die meisten endogen exprimierten ANOs nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden können (Tian et al., 2012). Die Expression endogener ANOs ist allerdings um ein Vielfaches geringer als bei Überexpression. Dies könnte einerseits bedeuten, dass endogen exprimiertes ANO4 oder ANO9 tatsächlich in

keiner signifikanten Menge in der Plasmamembran akkumuliert oder andererseits, dass die geringe Menge mit den zurzeit kommerziell verfügbaren Antikörpern nicht nachgewiesen werden kann (Kunzelmann et al., 2019; Tian et al., 2012). Auch eine geringe Menge an ANO4 oder ANO9 in der Plasmamembran könnte theoretisch einen Einfluss auf ADAM10/17 haben, wenn Scramblase und Protease stets in räumlicher Nähe, wie z.B. in Nanodomänen, auftreten würden. Gegen die Annahme, dass die in dieser Arbeit gezeigte Plasmamembranlokalisation von ANO4 und ANO9 ausschließlich ein Überexpressionsartefakt ist, spricht die Beobachtung, dass ANO10 auch bei Überexpression typischerweise intrazellulär vorliegt (Bushell et al., 2019; Kunzelmann et al., 2019). Des Weiteren konnten Jun et al. ANO9 nicht nur nach Überexpression in der Plasmamembran nachweisen, sondern auch eine signifikante Menge auf der Oberfläche von Zellen detektieren, welche ANO9 endogen exprimierten (Jun et al., 2017). Zukünftige Experimente sollten die zelluläre Lokalisation von endogen exprimiertem ANO4 oder ANO9 überprüfen. Eine erste Untersuchung der endogenen Expression von ANO4 und ANO9 in verschiedenen Zelllinien wurde in dieser Arbeit mittels *Real-Time* PCR durchgeführt. Eine hohe Expression von ANO4 ergab sich vor allem in Hautzelllinien und einer Leberkarzinomzelllinie, während ANO9, wie in der Literatur beschrieben, verstärkt in kolorektalen Krebszellen und in Pankreaszelllinien detektiert wurde (Jun et al., 2017; Li et al., 2015). Eine spannende Ergänzung der im Überexpressionsmodell erhobenen Daten wären Experimente mit siRNA-transfizierten *Knock-down*-Modellen der Zelllinien mit hoher endogener ANO4-/ANO9-Expression. Eine Verringerung der PS-Externalisierung, der Shedding-Aktivität von ADAM10/17 oder der Proliferation in den *Knock-down*-Zellen könnten die hier erhobenen Daten möglicherweise untermauern.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass neben ANO6 auch ANO4 und ANO9 einen regulatorischen Einfluss auf ADAM10/17 ausüben können. ADAM10 und -17 werden mit diversen entzündlichen Erkrankungen und der Entstehung von Tumoren assoziiert, darüber hinaus spielen auch mehrere Mitglieder der ANOs eine Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen. Weitere Untersuchungen dazu, wie Scramblasen und ADAMs zusammenhängen, könnten wichtige Erkenntnisse für die Behandlung vieler Erkrankungen liefern.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der asymmetrischen Verteilung von Phospholipiden in der Zellmembran im Grundzustand der Zelle ist Phosphatidylserin (PS) hauptsächlich auf der zytosolischen Seite lokalisiert. Eine Externalisierung von PS auf die extrazelluläre Seite kann energieunabhängig durch Scramblasen erfolgen. Dieser Prozess spielt eine Rolle bei einer Vielzahl physiologischer Vorgänge. Eine erhöhte Expression oder die Fehlfunktion verschiedener Scramblasen wird u.a. mit zahlreichen Tumorerkrankungen assoziiert. Weiterhin ist bekannt, dass externalisiertes PS die Shedding-Aktivität von ADAM10 und -17 reguliert. Eine Fehlregulation der Proteasen steht in Verbindung mit diversen entzündlichen sowie tumorfördernden Prozessen. Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe die Scramblase Anoctamin-6 (ANO6), ein Mitglied der Ca^{2+} -abhängigen Anoctamin-Familie, als wichtiger Regulator für die ADAM10/17-vermittelte Substratfreisetzung identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei Fragen adressiert werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob XKR8, eine Scramblase der Xkr-Familie, eine Rolle bei der PMA-induzierten Aktivierung von ADAM17 spielt. Weiterhin sollte analysiert werden, ob ANO6 einen Einfluss auf das Shedding des TNFR-Superfamilienmitglieds CD137 hat. Als dritter Aspekt sollte ermittelt werden, ob auch andere Anoctamine eine Rolle als Regulatoren von ADAM10 und ADAM17 haben.

Während für XKR8 zwar ein positiver Einfluss auf das Shedding des ADAM17-Substrats $\text{TGF}\alpha$ gezeigt werden konnte, stellte sich heraus, dass der Effekt unabhängig von einer PMA-Stimulation war.

Bei der Analyse des Zusammenhangs zwischen ANO6 und der Freisetzung von CD137 durch ADAM10/17 konnte gezeigt werden, dass das CD137-Shedding in HT29- und HEK293T-Zellen durch Transfektion der Zellen mit ANO6 erhöht wird. Mittels Transfektion einer hyperaktiven ANO6-Mutante, durch die eine konstitutive PS-Externalisierung erfolgt, wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Freisetzung von CD137 durch ADAM10/17 bereits ausschließlich durch eine verstärkte PS-Externalisierung vermittelt wird. Dies verdeutlicht die Relevanz von Scramblasen wie ANO6 auf die Regulation des CD137-Sheddings.

Die Untersuchungen weiterer Mitglieder der Ca^{2+} -abhängigen Familie der Anoctamine (ANOs) zeigten auf, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei Überexpression

von ANO4 und ANO9 in HEK293T-Zellen zu einer vermehrten PS-Externalisierung führt. Daraus folgend kam es zu einer erhöhten Freisetzung von Substraten durch ADAM10/17, welche durch einen Breitband-Metalloprotease-Inhibitor oder durch eine Inhibition der Interaktion zwischen exponiertem PS und ADAM10/17 gehemmt werden konnte.

Überexpression von ANO4 und ANO9 in HeLa-Zellen, welche aus einem Zervix-Adenokarzinom stammen, resultierte in einer konstitutiv erhöhten Freisetzung des EGFR-Liganden AREG und in einer verstärkten Proliferation dieser Zellen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse zur Regulation der ADAM10/17-vermittelten Substratfreisetzung über die Externalisierung von PS durch verschiedene Scramblasen geliefert. Ein besseres Verständnis der Regulationsachse zwischen Scramblasen und ADAM10/17 könnten vor allem bei der Diagnose und Behandlung von Tumorerkrankungen relevant sein.

7 SUMMARY

Under resting conditions, phospholipids are asymmetrically distributed in the plasma membrane with phosphatidylserine (PS) being located on the intracellular face of the membrane. The exposure of PS to the extracellular leaflet can be facilitated in an energy-independent manner by scramblases. This process plays a role in a diversity of physiological conditions. An increased expression or function of scramblases is associated with numerous types of malignancies. Furthermore, it has become evident that surface-exposure of PS is a pivotal event for triggering sheddase activity of the metalloproteases ADAM10 und -17. Dysregulation of these proteases has been linked to various inflammatory pathologies as well as cancer development. Our group recently identified Anoctamin-6 (ANO6), a scramblase belonging to the Ca²⁺-activated Anoctamin family, as a key regulator for ADAM10/17 function.

The first aim of this study was to examine the role of XKR8, a scramblase of the Xkr family, for PMA-induced activity of ADAM17. A second question to address was whether ANO6 is a regulator of the shedding of CD137, a member of the TNFR superfamily. A third goal of this study was to test other members of the Anoctamin family for their ability to modulate ADAM10/17 sheddase function.

While overexpression of XKR8 led to increased shedding of the ADAM17 substrate TGF α , it became evident that this effect was independent of PMA stimulation.

Experiments monitoring CD137 release in HT29- and HEK293T-cells after IO-stimulation pointed out that CD137 shedding was increased as a consequence of ANO6 transfection. Cells transfected with an ANO6-mutant, which is hypersensitive to calcium and therefore permanently exposes PS, constitutively released large amounts of CD137 in the absence of any stimulus, indicating that CD137 shedding can be solely triggered via increased PS-exposure. This finding highlights the relevance of scramblases as regulators of CD137 shedding.

Examining the influence of different Anoctamin family members on ADAM10/17 shedding function revealed that, similar to ANO6, overexpression of ANO4 and ANO9 in HEK293T-cells led to increased externalization of PS. Consequently, the release of ADAM10/17 substrates was increased. Substrate shedding could be inhibited by a broad-spectrum metalloproteinase inhibitor or by blocking interaction of ADAM10/17 with surface exposed PS with OPS, the soluble head group of PS.

As a functional consequence, overexpression of ANO4 and ANO9 in the cervical cancer cell line HeLa led to a constitutively enhanced release of the EGFR ligand AREG resulting in increased cell proliferation.

In summary, this study provides new insights into the regulation of ADAM10/17 sheddase function via increased PS exposure facilitated by different scramblases. A better understanding of the complex field of interaction between scramblases and ADAM10/17 could most notably be important in diagnosis and treatment of various cancer types.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abmayr, S. M., & Pavlath, G. K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development (Cambridge, England)*, *139*(4), 641–656. <https://doi.org/10.1242/DEV.068353>
- Alberts, B., & Lewis, J. (2013). The Lipid Bilayer. In *Molecular Biology of the Cell* (pp. 6–11). Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
- Arribas, J., & Esselens, C. (2009). ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(20), 2319–2335. <https://doi.org/10.2174/138161209788682398>
- Azmi, A. S., Bao, B., & Sarkar, F. H. (2013). Exosomes in Cancer Development, Metastasis and Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Cancer Metastasis Reviews*, *32*(0), 623–642. <https://doi.org/10.1007/S10555-013-9441-9>
- Balreira, A., Boczonadi, V., Barca, E., Pyle, A., Bansagi, B., Appleton, M., Graham, C., Hargreaves, I. P., Rasic, V. M., Lochmüller, H., Griffin, H., Taylor, R. W., Naini, A., Chinnery, P. F., Hirano, M., Quinzii, C. M., & Horvath, R. (2014). ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Journal of Neurology*, *261*(11), 2192–2198. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7476-7>
- Bangham, A. D. (1968). Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *18*(C). [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(68\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0079-6107(68)90019-9)
- Bassé, F., Stout, J. G., Sims, P. J., & Wiedmer, T. (1996). Isolation of an Erythrocyte Membrane Protein that Mediates Ca²⁺-dependent Transbilayer Movement of Phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(29), 17205–17210. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.29.17205>
- Benarroch, E. E. (2017). Anoctamins (TMEM16 proteins): Functions and involvement in neurologic disease. *Neurology*, *89*(7), 722–729. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004246>
- Berasain, C., & Avila, M. A. (2014). Amphiregulin. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *28*, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005>
- Bethel, N. P., & Grabe, M. (2016). Atomistic insight into lipid translocation by a TMEM16 scramblase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(49), 14049–14054. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1607574113>
- Bevers, E. M., Comfurius, P., & Zwaal, R. F. A. (1983). Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *736*(1), 57–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90169-4)
- Bevers, E. M., & Williamson, P. L. (2016). Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiological Reviews*, *96*(2), 605–645. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2015>
- 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), 729–733. <https://doi.org/10.1038/385729A0>
- Bleibaum, F., Sommer, A., Veit, M., Rabe, B., Andrä, J., Kunzelmann, K., Nehls, C., Correa, W., Gutschmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2019). ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *Journal of Molecular Cell Biology*, *11*(11), 979. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJZ008>
- Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2005* *6*:1, *6*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1038/nrm1548>
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., & Stöckler, W. (1993). Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins.' *FEBS Letters*, *331*(1–2), 134–140. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80312-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80312-I)
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., & Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death. *Cell*, *85*(6), 803–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81265-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81265-9)
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. (1997). Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(42), 26159–26165. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.42.26159>
- Bretscher, M. S. (1972). Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes. *Nature New Biology* *1972* *236*:61, *236*(61), 11–12. <https://doi.org/10.1038/newbio236011a0>
- Bricogne, C., Fine, M., Pereira, P. M., Sung, J., Tijani, M., Wang, Y., Henriques, R., Collins, M. K., & Hilgemann, D. (2019). TMEM16F activation by Ca²⁺ triggers plasma membrane expansion and directs PD-1 trafficking. *Scientific Reports* *2019* *9*:1, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37056-x>
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, *100*(4), 391–398. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80675-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80675-3)
- Brunner, J. D., Lim, N. K., Schenck, S., Duerst, A., & Dutzler, R. (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* *2014* *516*:7530, *516*(7530), 207–212. <https://doi.org/10.1038/nature13984>
- Bushell, S. R., Pike, A. C. W., Falzone, M. E., Rorsman, N. J. G., Ta, C. M., Corey, R. A., Newport, T. D., Christianson, J. C., Scofano, L. F., Shintre, C. A., Tessitore, A., Chu, A., Wang, Q., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Love, J. D., Burgess-Brown, N. A., Sitsapesan, R., Stansfeld, P. J., ... Carpenter, E. P. (2019). The structural basis of lipid scrambling and inactivation in the endoplasmic reticulum scramblase TMEM16K. *Nature Communications* *2019* *10*:1, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11753-1>
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., & Galletta, L. J. V. (2008). TMEM16A, A Membrane Protein

- Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity. *Science*, 322(5901), 590–594. <https://doi.org/10.1126/science.1163518>
- Castoldi, E., Collins, P. W., Williamson, P. L., & Bevers, E. M. (2011). Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood*, 117(16), 4399–4400. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-01-332502>
- Cavadas, M., Oikonomidi, I., Gaspar, C. J., Burbridge, E., Badenes, M., Félix, I., Bolado, A., Hu, T., Bileck, A., Gerner, C., Domingos, P. M., von Kriegsheim, A., & Adrain, C. (2017). Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Reports*, 21(3), 745. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.09.074>
- Charlesworth, G., Plagnol, V., Holmström, K. M., Bras, J., Sheerin, U. M., Preza, E., Rubio-Agusti, I., Ryten, M., Schneider, S. A., Stamelou, M., Trabzuni, D., Abramov, A. Y., Bhatia, K. P., & Wood, N. W. (2012). Mutations in ANO3 Cause Dominant Craniocervical Dystonia: Ion Channel Implicated in Pathogenesis. *The American Journal of Human Genetics*, 91(6), 1041–1050. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2012.10.024>
- Clarke, R. J., Hossain, K. R., & Cao, K. (2020). Physiological roles of transverse lipid asymmetry of animal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(10), 183382. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2020.183382>
- Coleman, J. A., Quazi, F., & Molday, R. S. (2013). Mammalian P4-ATPases and ABC Transporters And Their Role in Phospholipid Transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(3), 555. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2012.10.006>
- Dachary-Prigent, J., Pasquet, J. M., Fressinaud, E., Toti, F., Freyssinet, J. M., & Nurden, A. T. (1997). Aminophospholipid exposure, microvesiculation and abnormal protein tyrosine phosphorylation in the platelets of a patient with Scott syndrome: a study using physiologic agonists and local anaesthetics. *British Journal of Haematology*, 99(4), 959–967. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.1997.5003302.X>
- Dang, S., Feng, S., Tien, J., Peters, C. J., Bulkley, D., Lolicato, M., Zhao, J., Zuberbühler, K., Ye, W., Qi, L., Chen, T., Craik, C. S., Jan, Y. N., Minor, D. L., Cheng, Y., & Jan, L. Y. (2017). Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature* 2017 552:7685, 552(7685), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature25024>
- Dimberg, J., Hugander, A., & Wågsäter, D. (2006). Expression of CD137 and CD137 ligand in colorectal cancer patients. *Oncology Reports*, 15(5), 1197–1200. <https://doi.org/10.3892/or.15.5.1197>
- Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A. O., Cui, Y., & Criss Hartzell, H. (2012). ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl - channel family are intracellular proteins. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 302(3), 482–493. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00140.2011>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00497>

- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 258. <https://doi.org/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. *European Journal of Biochemistry*, 270(11), 2386–2393. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03606.X>
- Erwig, L. P., & Henson, P. M. (2007). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation* 2008 15:2, 15(2), 243–250. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402184>
- Espinoza, I., Pochampally, R., Xing, F., Watabe, K., & Miele, L. (2013). Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1249–1259. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36162>
- Fadok, V A, Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7).
- Fadok, Valerie A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B., & Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000 405:6782, 405(6782), 85–90. <https://doi.org/10.1038/35011084>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., Van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50(Suppl), S9. <https://doi.org/10.1194/JLR.R800095-JLR200>
- Fairbanks, G., Steck, T. L., & Wallach, D. F. H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13), 2606–2617. <https://doi.org/10.1021/BI00789A030>
- Falzone, M. E., Malvezzi, M., Lee, B. C., & Accardi, A. (2018). Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. *Journal of General Physiology*, 150(7), 933–947. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711957>
- Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A., & Ullrich, A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1203–1208. <https://doi.org/10.1042/BST0311203>
- Frasch, S. C., Henson, P. M., Kailey, J. M., Richter, D. A., Janes, M. S., Fadok, V. A., & Bratton, D. L. (2000). Regulation of Phospholipid Scramblase Activity during Apoptosis and Cell Activation by Protein Kinase C δ . *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23065–23073. <https://doi.org/10.1074/JBC.M003116200>
- Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K., & Nagata, S. (2015). TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12800–12805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516594112>
- Furtner, M., Straub, R. H., Krüger, S., & Schwarz, H. (2005). Levels of soluble CD137 are enhanced in sera of leukemia and lymphoma patients and are strongly associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005 19:5, 19(5), 883–885. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403675>

- Giancotti, F. G. (2013). Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. In *Cell* (Vol. 155, Issue 4, p. 750). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.029>
- Gonzales, P. E., Solomon, A., Miller, A. B., Leesnitzer, M. A., Sagis, I., & Milla, M. E. (2004). Inhibition of the Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme by Its Pro Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31638–31645. <https://doi.org/10.1074/JBC.M401311200>
- Groth, E., Pruessmeyer, J., Babendreyer, A., Schumacher, J., Pasqualon, T., Dreytmueller, D., Higashiyama, S., Lorenzen, I., Grötzinger, J., Cataldo, D., & Ludwig, A. (2016). Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(11), 2795–2808. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.002>
- Gschwind, A., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2004 4:5, 4(5), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc1360>
- Gupta, A., Montepiedra, G., Gupte, A., Zeldow, B., Jubulis, J., Detrick, B., Violari, A., Madhi, S., Bobat, R., Cotton, M., Mitchell, C., & Spector, S. (2016). Low Vitamin-D Levels Combined with PKP3-SIGIRR-TMEM16J Host Variants Is Associated with Tuberculosis and Death in HIV-Infected and -Exposed Infants. *PLOS ONE*, 11(2), e0148649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148649>
- Gutiérrez-López, M. D., Gilsanz, A., Yáñez-Mó, M., Ovalle, S., Lafuente, E. M., Domínguez, C., Monk, P. N., González-Alvaro, I., Sánchez-Madrid, F., & Cabañas, C. (2011). The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(19), 3275–3292. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0639-0>
- Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., & Altevogt, P. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *The FASEB Journal*, 17(2), 292–294. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0430fje>
- Gutwein, P., Stoeck, A., Riedle, S., Gast, D., Runz, S., Condon, T. P., Marmé, A., Phong, M.-C., Linderkamp, O., Skorokhod, A., & Altevogt, P. (2005). Cleavage of L1 in Exosomes and Apoptotic Membrane Vesicles Released from Ovarian Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*, 11(7), 2492–2501. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1688>
- Gyobu, S., Ishihara, K., Suzuki, J., Segawa, K., & Nagata, S. (2017). Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24), 6274–6279. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703391114>
- Gyobu, S., Miyata, H., Ikawa, M., Yamazaki, D., Takeshima, H., Suzuki, J., & Nagata, S. (2016). A Role of TMEM16E Carrying a Scrambling Domain in Sperm Motility. *Molecular and Cellular Biology*, 36(4), 645–659. <https://doi.org/10.1128/MCB.00919-15>
- Han, T. W., Ye, W., Bethel, N. P., Zubia, M., Kim, A., Li, K. H., Burlingame, A. L., Grabe, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2019). Chemically induced vesiculation as a platform for studying TMEM16F activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), 1309–1318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817498116>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Illert, A. L., Von Figura, K., & Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, *11*(21), 2615–2624. <https://doi.org/10.1093/HMG/11.21.2615>
- Hashimoto, K. (2021). Cd137 as an attractive t cell co-stimulatory target in the tnfrsf for immuno-oncology drug development. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers13102288>
- Hehlgans, T., & Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, *115*(1), 1. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2005.02143.X>
- Holthuis, J. C. M., & Levine, T. P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2005* 6:3, *6*(3), 209–220. <https://doi.org/10.1038/nrm1591>
- Hsu, T. Y., & Wu, Y. C. (2010). Engulfment of Apoptotic Cells in *C. elegans* Is Mediated by Integrin α /SRC Signaling. *Current Biology*, *20*(6), 477–486. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.01.062>
- Huovila, A. P. J., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., & Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in Biochemical Sciences*, *30*(7), 413–422. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2005.05.006>
- 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 Evolutionary Biology*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-63>
- Jun, I., Park, H. S., Piao, H., Han, J. W., An, M. J., Yun, B. G., Zhang, X., Cha, Y. H., Shin, Y. K., Yook, J. I., Jung, J., Gee, H. Y., Park, J. S., Yoon, D. S., Jeung, H. C., & Lee, M. G. (2017). ANO9/TMEM16j promotes tumorigenesis via EGFR and is a novel therapeutic target for pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, *117*(12), 1798–1809. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.355>
- Kaikkonen, E., Rantapero, T., Zhang, Q., Taimen, P., Laitinen, V., Kallajoki, M., Jambulingam, D., Ettala, O., Knaapila, J., Boström, P. J., Wahlström, G., Sipeky, C., Pursiheimo, J. P., Tammela, T., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Fey, V., Maehle, L., Wiklund, F., Wei, G. H., & Schleutker, J. (2018). ANO7 is associated with aggressive prostate cancer. *International Journal of Cancer*, *143*(10), 2479. <https://doi.org/10.1002/IJC.31746>
- Kaikkonen, E., Takala, A., Pursiheimo, J. P., Wahlström, G., & Schleutker, J. (2020). The interactome of the prostate-specific protein Anoctamin 7. *Cancer Biomarkers*, *28*(1), 91. <https://doi.org/10.3233/CBM-190993>
- Kalienkova, V., Clerico Mosina, V., & Paulino, C. (2021). The Groovy TMEM16 Family: Molecular Mechanisms of Lipid Scrambling and Ion Conduction. *Journal of Molecular Biology*, *433*(16), 166941. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2021.166941>

- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6478).
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU6977>
- Katsurahara, K., Shiozaki, A., Kosuga, T., Kudou, M., Shoda, K., Arita, T., Konishi, H., Komatsu, S., Kubota, T., Fujiwara, H., Okamoto, K., Kishimoto, M., Konishi, E., Marunaka, Y., & Otsuji, E. (2020). *ANO9 Regulated Cell Cycle in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *27*(9), 3218–3230. <https://doi.org/10.1245/s10434-020-08368-y>
- Kay, J. G., & Fairn, G. D. (2019). Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *17*(1).
<https://doi.org/10.1186/S12964-019-0438-Z>
- Kodigepalli, K. M., Bowers, K., Sharp, A., & Nanjundan, M. (2015). Roles and regulation of phospholipid scramblases. *FEBS Letters*, *589*(1), 3–14.
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.11.036>
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L., & Gridley, T. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & Development*, *14*(11), 1343. <https://doi.org/10.1101/gad.14.11.1343>
- Kunzelmann, K., Ousingsawat, J., Benedetto, R., Cabrita, I., & Schreiber, R. (2019). Contribution of anoctamins to cell survival and cell death. *Cancers*, *11*(3), 1–24 .
<https://doi.org/10.3390/cancers11030382>
- Laderach, D., Movassagh, M., Johnson, A., Mittler, R. S., & Galy, A. (2002). 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells. *International Immunology*, *14*(10), 1155–1167.
<https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXF080>
- Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M., & Hammad, H. (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nature Reviews Immunology*, *18*(12), 745–758.
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0068-5>
- Le Gall, S. M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X. Da, Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., & Blobel, C. P. (2009). ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , I-selectin, and tumor necrosis factor α . *Molecular Biology of the Cell*, *20*(6), 1772–1784. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-10-1011>
- Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D. A., Niu, X. Da, 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. *Journal of Cell Science*, *123*(22), 3913–3922.
<https://doi.org/10.1242/jcs.069997>
- Le, S. C., Liang, P., Lowry, A. J., & Yang, H. (2021). Gating and Regulatory Mechanisms of TMEM16 Ion Channels and Scramblases. *Frontiers in Physiology*, *12*.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.787773>
- Lenoir, G., D’Ambrosio, J. M., Dieudonné, T., & Čopič, A. (2021). Transport Pathways That Contribute to the Cellular Distribution of Phosphatidylserine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.737907>

- Lentz, B. R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progress in Lipid Research*, 42(5), 423–438. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00025-0)
- Li, C., Cai, S., Wang, X., & Jiang, Z. (2015). Identification and characterization of ANO9 in stage II and III colorectal carcinoma. *Oncotarget*, 6(30), 29324–29334. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4979>
- Li, X., Maretzky, T., Weskamp, G., Monette, S., Qing, X., Issuree, P. D. A., Crawford, H. C., McIlwain, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6080–6085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505649112>
- Li, Y., Wang, X., Vural, S., Mishra, N. K., Cowan, K. H., & Guda, C. (2015). Exome Analysis Reveals Differentially Mutated Gene Signatures of Stage, Grade and Subtype in Breast Cancers. *PLOS ONE*, 10(3), e0119383. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0119383>
- Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R., & Rodriguez-Boulan, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9557–9561. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.24.9557>
- 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 Letters*, 586(8), 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2012.03.012>
- Lorenzen, I., Lokau, J., Korpys, Y., Oldefest, M., Flynn, C. M., Künzel, U., Garbers, C., Freeman, M., Grötzinger, J., & Düsterhöft, S. (2016). Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep35067>
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M., Broadway, N., Andrews, R., Bickett, D., Leesnitzer, M., & Becherer, J. (2005). Metalloproteinase Inhibitors for the Disintegrin-Like Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that Differentially Block Constitutive and Phorbol Ester-Inducible Shedding of Cell Surface Molecules. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(2), 161–171. <https://doi.org/10.2174/1386207053258488>
- Maretzky, T., Evers, A., Gall, S. Le, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7416–7425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603753>
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., De Strooper, B., Hartmann, D., & Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9182–9187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500918102>

- Mariño, G., & Kroemer, G. (2013). Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Research* 23:11, 23(11), 1247–1248. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.115>
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1545. <https://doi.org/10.1084/JEM.182.5.1545>
- Marx, A., Koopmann, L., Höflmayer, D., Büscheck, F., Hube-Magg, C., Steurer, S., Eichenauer, T., Clauditz, T. S., Wilczak, W., Simon, R., Sauter, G., Izbicki, J. R., Huland, H., Heinzer, H., Graefen, M., Haese, A., Schlomm, T., Bernreuther, C., Lebok, P., & Bonk, S. (2021). Reduced anoctamin 7 (ANO7) expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 18(1), 245. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2019.0324>
- Merlos-Suárez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J., & Arribas, J. (2001). Metalloprotease-dependent Protransforming Growth Factor- α Ectodomain Shedding in the Absence of Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48510–48517. <https://doi.org/10.1074/JBC.M103488200>
- Michel, J., Langstein, J., Hofstädter, F., & Schwarz, H. (1998). A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 28(1), 290–295. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199801\)28:01<290::AID-IMMU290>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<290::AID-IMMU290>3.0.CO;2-S)
- Mizuta, K., Tsutsumi, S., Inoue, H., Sakamoto, Y., Miyatake, K., Miyawaki, K., Noji, S., Kamata, N., & Itakura, M. (2007). Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 126–132. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.03.108>
- Moss, M.L., Jin, S.-L. C., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W.-J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., & Willard, D. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF- α converting enzyme (TACE). *Journal of Neuroimmunology*, 72(2), 127–129. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(96\)00180-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(96)00180-4)
- Moss, Marcia L., & Lambert, M. H. (2002). Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 38, pp. 141–153). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bse0380141>
- Müllberg, J., Althoff, K., Jostock, T., & Rose-John, S. (2000). The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *European Cytokine Network*, 11(1), 27–37. https://www.jle.com/fr/revues/ecn/e-docs/the_importance_of_shedding_of_membrane_proteins_for_cytokine_biology_90289/article.phtml
- Murphy, G. (2009). Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the “Sheddases.” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(2), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.09.004>

- Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., & Fujii, T. (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death and Differentiation*, 23(6), 952–961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.7>
- Nelson, G. J. (1967). Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 144(2), 221–232. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(67\)90152-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(67)90152-X)
- Nguyen, D. B., Wagner-Britz, L., Maia, S., Steffen, P., Wagner, C., Kaestner, L., & Bernhardt, I. (2011). Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Red Blood Cells. 28(5), 847–856. <https://doi.org/10.1159/000335798>
- Orr, J. W., & Newton, A. C. (1992). Interaction of Protein Kinase C with Phosphatidylserine. 1. Cooperativity in Lipid Binding. *Biochemistry*, 31(19), 4661–4667. <https://doi.org/10.1021/bi00134a018>
- 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 (New York, N.Y.)*, 282(5392), 1281–1284. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5392.1281>
- Petkovic, M., Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2020). TMEM16K is an interorganelle regulator of endosomal sorting. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17016-8>
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/JLR.E600002-JLR200>
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., & Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 69(17), 2919–2932. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-0960-2>
- Pruessmeyer, J., & Ludwig, A. (2009). The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(2), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.09.005>
- Rasche, S., Toetter, B., Adler, J., Tschapek, A., Doerner, J. F., Kurtenbach, S., Hatt, H., Meyer, H., Warscheid, B., & Neuhaus, E. M. (2010). Tmem16b is Specifically Expressed in the Cilia of Olfactory Sensory Neurons. *Chemical Senses*, 35(3), 239–245. <https://doi.org/10.1093/CHEMSE/BJQ007>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14608–14614. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.19.14608>
- Reichhart, N., Milenkovic, V. M., Wetzel, C. H., & Strauß, O. (2021). Prediction of functional consequences of missense mutations in ano4 gene. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms22052732>

- Reichhart, N., Schöberl, S., Keckeis, S., Alfaar, A. S., Roubex, C., Cordes, M., Crespo-Garcia, S., Haeckel, A., Kociok, N., Föckler, R., Fels, G., Mataruga, A., Rauh, R., Milenkovic, V. M., Zühlke, K., Klussmann, E., Schellenberger, E., & Strauß, O. (2019). Anoctamin-4 is a bona fide Ca²⁺-dependent non-selective cation channel. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37287-y>
- Reiss, K., & Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1864*(11), 2082–2087. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.06.006>
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., De Strooper, B., Hartmann, D., & Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *The EMBO Journal*, *24*(4), 742–752. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600548>
- Reiss, K., & Saftig, P. (2009). The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *20*(2), 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.11.002>
- Remouchamps, C., Boutaffala, L., Ganef, C., & Dejardin, E. (2011). Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- α /LT β R system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *22*(5–6), 301–310. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2011.11.007>
- Ren, A., Yin, W., Miller, H., Westerberg, L. S., Candotti, F., Park, C. S., Lee, P., Gong, Q., Chen, Y., & Liu, C. (2021). Novel Discoveries in Immune Dysregulation in Inborn Errors of Immunity. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.725587>
- Roca, C., & Adams, R. H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes & Development*, *21*(20), 2511–2524. <https://doi.org/10.1101/GAD.1589207>
- Saftig, P., & Reiss, K. (2011). The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? *European Journal of Cell Biology*, *90*(6–7), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.005>
- Sahin, U., & Blobel, C. P. (2007). Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS Letters*, *581*(1), 41–44. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.11.074>
- 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. *The Journal of Cell Biology*, *164*(5), 769–779. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307137>
- Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N., & Aradhyam, G. K. (2007). Phospholipid scramblases: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *462*(1), 103–114. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2007.04.002>
- Sakuragi, T., Kanai, R., Tsutsumi, A., Narita, H., Onishi, E., Nishino, K., Miyazaki, T., Baba, T., Kosako, H., Nakagawa, A., Kikkawa, M., Toyoshima, C., & Nagata, S. (2021). The tertiary structure of the human Xkr8–Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes. *Nature Structural & Molecular Biology* *28*:10, *28*(10), 825–834. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00665-8>

- Sakuragi, T., Kosako, H., & Nagata, S. (2019). Phosphorylation-mediated activation of mouse Xkr8 scramblase for phosphatidylserine exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 2907–2912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820499116>
- Schäfer, B., Gschwind, A., & Ullrich, A. (2003). Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 2004 23:4, 23(4), 991–999. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207278>
- Schlegel, R. A., & Williamson, P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death & Differentiation* 2001 8:6, 8(6), 551–563. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400817>
- Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., Tangermann, S., Kenner, L., Schleder, M., Sibilia, M., Linder, M., Altendorf-Hofmann, A., Knösel, T., Gruber, E. S., Oberhuber, G., Bolik, J., Rehman, A., Sinha, A., Lokau, J., Arnold, P., Cabron, A. S., Zunke, F., ... Rose-John, S. (2018). ADAM17 is required for EGF-R–induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 215(4), 1205. <https://doi.org/10.1084/JEM.20171696>
- Schreiber, R., Uliyakina, I., Kongsuphol, P., Warth, R., Mirza, M., Martins, J. R., & Kunzelmann, K. (2010). Expression and function of epithelial anoctamins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7838–7845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065367>
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 134(6), 1019–1029. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.09.003>
- 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. *Circulation Research*, 102(10), 1192–1201. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.169805>
- Schwarz, H., Tuckwell, J., & Lotz, M. (1993). A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene*, 134(2), 295–298. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90110-O](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90110-O)
- Scudieri, P., Caci, E., Venturini, A., Sondo, E., Pianigiani, G., Marchetti, C., Ravazzolo, R., Pagani, F., & Galietta, L. J. V. (2015). Ion channel and lipid scramblase activity associated with expression of TMEM16F/ANO6 isoforms. *The Journal of Physiology*, 593(Pt 17), 3829. <https://doi.org/10.1113/JP270691>
- Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 17(1), 7–30. <https://doi.org/10.1101/GAD.1039703>
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, 344(6188), 1164–1168. <https://doi.org/10.1126/science.1252809>
- Segawa, K., & Nagata, S. (2015). An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 639–650. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.08.003>

- Segawa, K., Suzuki, J., & Nagata, S. (2011). Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(48), 19246–19251. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1114799108>
- Seidel, J., Leitzke, S., Ahrens, B., Sperrhacker, M., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2021). Role of ADAM10 and ADAM17 in regulating CD137 function. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22052730>
- Seigneuret, M., & Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(12), 3751. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.12.3751>
- Seipold, L., Damme, M., Prox, J., Rabe, B., Kasperek, P., Sedlacek, R., Altmeyden, H., Willem, M., Boland, B., Glatzel, M., & Saftig, P. (2017). Tetraspanin 3: A central endocytic membrane component regulating the expression of ADAM10, presenilin and the amyloid precursor protein. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, *1864*(1), 217–230. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.11.003>
- Shao, Z., Sun, F., Koh, D. R., & Schwarz, H. (2008). Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus. *Molecular Immunology*, *45*(15), 3990–3999. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2008.05.028>
- Sharief, M. K. (2002). Heightened intrathecal release of soluble CD137 in patients with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, *9*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1046/J.1468-1331.2002.00323.X>
- Shimoda, M., & Khokha, R. (2017). Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1864*(11), 1989–2000. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.05.027>
- Shin, H. W., & Takatsu, H. (2020). Phosphatidylserine exposure in living cells. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *55*(2), 166–178. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1758624>
- Simons, K., & Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(10), 688–699. <https://doi.org/10.1038/NRM2977>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *1*(1), 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- Sims, P. J., Wiedmer, T., Esmon, C. T., Weiss, H. J., & Shattil, S. J. (1989). Assembly of the Platelet Prothrombinase Complex Is Linked to Vesiculation of the Platelet Plasma Membrane: Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(29), 17049–17057. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71457-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71457-9)
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, *175*(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.175.4023.720>
- Sivagnanam, U., Palanirajan, S. K., & Gummadi, S. N. (2017). *The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: An overview*. *1864*(12), 2261–2271. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.08.008>

- Smith, K. M., Gaultier, A., Cousin, H., Alfandari, D., White, J. M., & DeSimone, D. W. (2002). The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *Journal of Cell Biology*, 159(5), 893–902. <https://doi.org/10.1083/JCB.200206023>
- 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. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11523>
- Spector, A. A., & Yorek, M. A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*, 26(9), 1015–1035. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34276-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34276-0)
- Stepanenko, A. A., & Heng, H. H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 773, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.002>
- Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). HOW MATRIX METALLOPROTEINASES REGULATE CELL BEHAVIOR. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 463. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.17.1.463>
- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M. P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E., & Altevogt, P. (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochemical Journal*, 393(Pt 3), 609. <https://doi.org/10.1042/BJ20051013>
- Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R., & Nagata, S. (2013). Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6144), 403–406. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1236758>
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM 16 protein family members. *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13305–13316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457937>
- Suzuki, J., Imanishi, E., & Nagata, S. (2014). Exposure of Phosphatidylserine by Xk-related Protein Family Members during Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30257–30267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583419>
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., & Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468(7325), 834–840. <https://doi.org/10.1038/NATURE09583>
- Takeda, S. (2016). ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. *Toxins 2016, Vol. 8, Page 155*, 8(5), 155. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8050155>
- Tian, Y., Kongsuphol, P., Hug, M., Ousingsawat, J., Witzgall, R., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2011). Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *The FASEB Journal*, 25(3), 1058–1068. <https://doi.org/10.1096/FJ.10-166884>

- Tian, Y., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2012). Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Journal of Cell Science*, *125*(21), 4991–4998. <https://doi.org/10.1242/jcs.109553>
- Tosetti, F., Alessio, M., Poggi, A., & Zocchi, M. R. (2021). ADAM10 Site-Dependent Biology: Keeping Control of a Pervasive Protease. *International Journal of Molecular Sciences* *2021*, Vol. 22, Page 4969, 22(9), 4969. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094969>
- Toti, F., Satta, N., Fressinaud, E., Meyer, D., & Freyssinet, J. M. (1996). Scott Syndrome, Characterized by Impaired Transmembrane Migration of Procoagulant Phosphatidylserine and Hemorrhagic Complications, Is an Inherited Disorder. *Blood*, *87*(4), 1409–1415. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V87.4.1409.BLOODJOURNAL8741409>
- Tsuji, T., Cheng, J., Tatematsu, T., Ebata, A., Kamikawa, H., Fujita, A., Gyobu, S., Segawa, K., Arai, H., Taguchi, T., Nagata, S., & Fujimoto, T. (2019). Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(27), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822025116>
- Ugolini, A., & Nuti, M. (2021). CD137+ T-Cells: Protagonists of the Immunotherapy Revolution. *Cancers*, *13*(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13030456>
- van Meer, G., Stelzer, E. H., Wijnaendts-van-Resandt, R. W., & Simons, K. (1987). Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *The Journal of Cell Biology*, *105*(4), 1623–1635. <https://doi.org/10.1083/JCB.105.4.1623>
- Van Meer, Gerrit, Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(2), 112. <https://doi.org/10.1038/NRM2330>
- Varshney, P., Yadav, V., & Saini, N. (2016). Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology*, *149*(1), 13. <https://doi.org/10.1111/IMM.12617>
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1865*(11), 1598–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.011>
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W. F., Fita, I., & Gómez-Fernández, J. C. (1999). Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine. *The EMBO Journal*, *18*(22), 6329. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.22.6329>
- Verkleij, A. J., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., & van Deenen, L. L. M. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, *323*(2), 178–193. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90143-0)
- Wang, X., Wang, J., Gengyo-Ando, K., Gu, L., Sun, C. L., Yang, C., Shi, Y. Y., Kobayashi, T., Shi, Y. Y., Mitani, S., Xie, X. S., & Xue, D. (2007). C. elegans mitochondrial factor WAH-1 promotes phosphatidylserine externalization in apoptotic cells through phospholipid scramblase SCRMB-1. *Nature Cell Biology* *2007* 9:5, 9(5), 541–549. <https://doi.org/10.1038/ncb1574>

- White, J. M. (2003). ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), 598–606. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2003.08.001>
- Whitlock, J. M., & Hartzell, H. C. (2017). Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles. *Annual Review of Physiology*, 79(5), 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034031>
- Whitlock, J. M., Yu, K., Cui, Y. Y., & Hartzell, H. C. (2018). Anoctamin 5/TMEM16E facilitates muscle precursor cell fusion. *Journal of General Physiology*, 150(11), 1498–1509. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812097>
- Wittkowski, K. M., Dadurian, C., Seybold, M. P., Kim, H. S., Hoshino, A., & Lyden, D. (2018). Complex polymorphisms in endocytosis genes suggest alpha-cyclodextrin as a treatment for breast cancer. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199012>
- Wong, H. Y., & Schwarz, H. (2020). CD137 / CD137 ligand signalling regulates the immune balance: A potential target for novel immunotherapy of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 112(May), 102499. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102499>
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, S. R., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). TMEM16F Forms a Ca²⁺-Activated Cation Channel Required for Lipid Scrambling in Platelets during Blood Coagulation. *Cell*, 151(1), 111–122. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.07.036>
- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K., & Oh, U. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008 455:7217, 455(7217), 1210–1215. <https://doi.org/10.1038/nature07313>
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:2, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Yu, K., Whitlock, J. M., Lee, K., Ortlund, E. A., Cui, Y. Y., & Hartzell, H. C. (2015). Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. *ELife*, 4(JUNE), 1–23. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.06901>
- Zhang, L., & Yu, D. (2019). Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1871(2), 455. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2019.04.004>
- Zhao, J., Zhou, Q., Wiedmer, T., & Sims, P. J. (1998). Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 273(12), 6603–6606. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6603>
- Zhou, Q., Zhao, J., Al-Zoghaibi, F., Zhou, A., Wiedmer, T., Silverman, R. H., & Sims, P. J. (2000). Transcriptional control of the human plasma membranephospholipid scramblase 1 gene is mediated by interferon- α . *Blood*, 95(8), 2593–2599. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V95.8.2593>
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T., & Sims, P. J. (1997). Molecular Cloning of Human Plasma Membrane Phospholipid Scramblase: A PROTEIN MEDIATING TRANSBILAYER MOVEMENT OF PLASMA MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18240–18244. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.29.18240>

- Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., & Sims, P. J. (2002). Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood*, *99*(11), 4030–4038. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2001-12-0271>
- Zunke, F., & Rose-John, S. (2017). The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1864*(11), 2059–2070. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.07.001>
- Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (2004). Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1636*(2–3), 119–128. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2003.07.003>

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Regulation der Zellmembranasymmetrie über Lipidtransporter.....	2
Abbildung 2: Übersicht über die Funktionen der ANOs.	8
Abbildung 3: Domänenstruktur „typischer“ ADAMs im Vergleich zu ADAM10 und ADAM17.	10
Abbildung 4: Regulation der Substratfreisetzung durch Scramblasen am Beispiel von ADAM17.	13
Abbildung 5: Strategie zur Klonierung und Mutation eines ANO5-eGFP-Überexpressionsvektors.	38
Abbildung 6: Oberflächenbiotinylierung von XKR8 in HEK293T-Zellen.	42
Abbildung 7: In Anwesenheit von XKR8 ist die PS-Externalisierung erhöht.	43
Abbildung 8: XKR8 erhöht die Freisetzung von TGF α	44
Abbildung 9: Überexpression von Δ Phospho- oder Phosphomimik-Mutanten von XKR8 zeigt keine veränderte Shedding-Aktivität verglichen zum Wildtyp.	47
Abbildung 10: Aktivierung und Inhibition von ADAM10/17-vermitteltem Shedding.	49
Abbildung 11: Freisetzung von CD137 wird über oberflächenexponiertes PS vermittelt.	50
Abbildung 12: ANO6 ist an der Regulation der Freisetzung von CD137 beteiligt.	51
Abbildung 13: ANO4, ANO6 und ANO9 erhöhen Calcium-abhängig die Freisetzung von BTC, AREG und TGF α	53
Abbildung 14: Überexpression von ANO1, ANO4, ANO5, ANO6, ANO7, ANO9 oder ANO10 hat keinen Einfluss auf das Shedding von AREG und TGF α unter PMA-Stimulation.	55
Abbildung 15: Überexpression von eGFP-gekoppelten ANOs ergibt die gleichen Tendenzen wie bei der Verwendung der V5/His-gekoppelten Plasmide.	56
Abbildung 16: Oberflächenbiotinylierung von ANO4 und ANO9 in HEK293T-Zellen.	58
Abbildung 17: ANO4 und ANO9 erhöhen die ADAM10/ADAM17-vermittelte Freisetzung von BTC, AREG und TGF α	60
Abbildung 18: Calcium-Einstrom induziert eine erhöhte PS-Externalisierung in ANO4- oder ANO9-überexprimierenden Zellen.	61
Abbildung 19: Anoctamin-4 und Anoctamin-9 erhöhen Phosphatidylserin-abhängig die Freisetzung von BTC, AREG und TGF α	63
Abbildung 20: Die konstitutive Freisetzung von AREG in ANO4- oder ANO9-transfizierten Zellen wird durch MM sowie OPS gehemmt.	64
Abbildung 21: Überexpression von ANO4 oder ANO9 führt zu einer konstitutiv erhöhten Freisetzung an endogen exprimiertem AREG.	65
Abbildung 22: Überexpression von ANO4 oder ANO9 erhöht die Zellproliferation.	66
Abbildung 23: Endogene Expression von ANO4 oder ANO9 in verschiedenen Zelllinien.	68
Abbildung 24: Regulation der ADAM-vermittelten Substratfreisetzung durch ANO4 und ANO9.	82

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Primäre Funktion der Anoctamine und ihre Gewebeexpression	7
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 3: Chemikalien	17
Tabelle 4: Enzyme	19
Tabelle 5: Kits.....	20
Tabelle 6: Geräte.....	20
Tabelle 7: Primäre Antikörper	21
Tabelle 8: Sekundäre Antikörper	22
Tabelle 9: Plasmide	22
Tabelle 10: Software	23
Tabelle 11: Zusätzliche verwendete Zelllinien	24
Tabelle 12: Pipettierschema für Transfektionsansätze	26
Tabelle 13: Stimulanzen und Inhibitoren	26
Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide	35
Tabelle 15: Verwendetes Programm für die <i>Real-Time</i> PCR	36

11 PUBLIKATIONEN

Influence of Anoctamin-4 and -9 on ADAM10 and ADAM17 Sheddase Function

Leitzke S., Seidel J., Ahrens B., Schreiber R., Kunzelmann K., Sperrhacke M., Bhakdi S., Reiss K.

Membranes 2022, 12, 123. <https://doi.org/10.3390/membranes12020123>

Scramblases as Regulators of Proteolytic ADAM Function

Reiss K., **Leitzke S.**, Seidel J., Sperrhacke M., Bhakdi S.,

Membranes 2022, 12, 185. <https://doi.org/10.3390/membranes12020185>

Role of ADAM10 and ADAM17 in Regulating CD137 Function

Seidel J., **Leitzke S.**, Ahrens B., Sperrhacke M., Bhakdi S., Reiss, K.

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 2730. <https://doi.org/10.3390/ijms22052730>

The role of scramblases for the shedding of CD137 in epithelial cells

Leitzke S., Seidel J., Sperrhacke M., Reiss K.

Exp. Dermatol. 2021, 30 (3), e10. <https://doi.org/10.1111/exd.14263>

12 DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben eine Reihe von Menschen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Zuallererst danke ich Frau Prof. Dr. Karina Reiß für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Vielen Dank für die Bereitstellung des spannenden Forschungsthemas und die Begleitung meiner Doktorarbeit. Ich habe mich stets sehr gut betreut und aufgehoben gefühlt und wusste besonders den unkomplizierten, offenen Austausch sehr zu schätzen.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Roeder für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dem SFB877 danke ich für die wissenschaftliche Förderung.

Ein großes Dankeschön gilt der Reiß'schen Tierfamilie, dem Adler Björn, dem Reh Jana und der Löwenmama Maria für die vielfältige Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Besonders dankbar bin ich euch, dass ich die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die angenehme Arbeitsatmosphäre und gegenseitige Hilfe erfahren durfte. Björn, vielen Dank fürs „unter die Arme greifen“ bei Experimenten und dem zu Rate stehen bei sämtlichen Laborproblemen. Maria, ich danke dir für die vielen produktiven und aufmunternden Gespräche, für dein kritisches Mitdenken und dein stets offenes Ohr. Ich kann dir nicht genug danken für die kompetente Beantwortung unzähliger Fragen, egal ob fachlicher Natur oder die Probleme des täglichen Lebens betreffend. Wenn ich nochmal Doktorandin wäre, würde ich dich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich immer wieder als Postdocin wählen.

Jani, du weißt am besten wie das ganze Projekt Doktorarbeit für mich war. Ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen. Danke, dass du für mich da warst, als ich mehr genommen habe als ich geben konnte. Danke, dass du mir geholfen hast meinen Mut wiederzufinden und so aus vielen Tiefs endlich wieder viele Hochs werden konnten. Danke für alles.

Ein großer Dank gilt schließlich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mir mein Studium mit all seinen Erfahrungen ermöglicht haben. Ich konnte mir eurem bedingungslosen Rückhalt jederzeit sicher sein und das weiß ich sehr zu schätzen.

13 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Sinje Leitzke, dass ich die vorliegende Arbeit – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuerinnen und Betreuer – selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Des Weiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Influence of Anoctamin-4 and -9 on ADAM10 and ADAM17 Sheddase Function

Leitzke S., Seidel J., Ahrens B., Schreiber R., Kunzelmann K., Sperrhacke M., Bhakdi S., Reiss K. Membranes 2022, 12, 123. <https://doi.org/10.3390/membranes12020123>

Role of ADAM10 and ADAM17 in Regulating CD137 Function

Seidel J., **Leitzke S.**, Ahrens B., Sperrhacke M., Bhakdi S., Reiss, K. Int. J. Mol. Sci.2021,22,2730. <https://doi:10.3390/ijms22052730>

The role of scramblases for the shedding of CD137 in epithelial cells

Leitzke S., Seidel J., Sperrhacke M., Reiss K. Exp. Dermatol. 2021, 30 (3), e10. <https://doi.org/10.1111/exd.14263>

Ort, Datum

Sinje Leitzke