

Aus dem Institut für Biochemie
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

CANDIS - Die Rolle der *Stalk*-Region für
die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 und
Identifizierung des Bindungsepitopes des
humanen Interleukin-6 Rezeptors an seine
Sheddase ADAM17

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

vorgelegt von
Katharina Viktoria Höbel
aus Kaufbeuren

Kiel, 2015

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Joachim Grötzing
2. Berichtstatter: Prof. Dr. Philip Rosenstiel
Tag der mündlichen Prüfung: 02. August 2017
Zum Druck genehmigt: 02. August 2017

*Gewidmet meiner Familie voller Dankbarkeit für die Unterstützung
während Studium und Promotion*

“Das schönste Erlebnis ist die Begegnung mit dem Geheimnisvollen.”

Albert Einstein

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Katharina Viktoria Höbel, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mithilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Gezeichnet:

Datum:

Zusammenfassung

CANDIS - Die Rolle der *Stalk*-Region für die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 und Identifizierung des Bindungsepitopes des humanen Interleukin-6 Rezeptors an seine *Sheddase* ADAM17

von Katharina Viktoria Höbel

Die Metalloprotease ADAM17 spielt eine äußerst wichtige Rolle in physiologischen wie pathologischen Prozessen. Das liegt nicht zuletzt an ihrem breiten Substratspektrum, als dessen prominenteste Vertreter der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zu nennen sind. Trotz der hohen Relevanz dieser Protease sind die Aktivierungs- respektive Inhibitionsmechanismen und die Rolle, welche die einzelnen Domänen in diesem Zusammenhang spielen noch weitestgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollte insbesondere die Rolle der CANDIS (*Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence*) bezüglich ihrer Substratbindeigenschaften näher charakterisiert werden. Die als CANDIS bezeichnete Sequenz befindet sich im N-terminalen Bereich der *Stalk*-Region von ADAM17 und ist in ihrer konservierten Form unter den Mitgliedern der ADAM-Familie einzigartig.

Zur Untersuchung welchen Einfluss die membran-proximale Domäne und CANDIS auf das *Shedding*-Verhalten von ADAM17 haben, wurden mithilfe retroviraler Vektoren mEF^{ADAM17 ex/ex}-Zelllinien (*murine embryonic fibroblasts*, die kaum funktionelles ADAM17 exprimieren) generiert, welche ADAM17/ADAM22/ADAM10-Chimären anstelle von Wildtyp-ADAM17 exprimieren. Mit diesen Zellen kann die Rolle der membran-proximalen Domäne und CANDIS in Zukunft näher charakterisiert werden.

Bezüglich der bereits im Vorfeld bekannten Interaktion zwischen dem humanen Interleukin-6 Rezeptor und der CANDIS konnte das Bindungsepitop des humanen Interleukin-6 Rezeptors an CANDIS identifiziert werden. Es befindet sich im N-terminalen Bereich der *Stalk*-Region, genauer im Bereich zwischen E₃₁₇ und Q₃₃₂.

Bei Untersuchungen, ob die Bindung weiterer ADAM17-Substrate wie Tumornekrosefaktor- α oder der Interleukin-1 Rezeptor II an ADAM17 ebenfalls über CANDIS vermittelt wird, zeigten sich keine Hinweise für eine Interaktion zwischen einem Peptid, welches die Aminosäuresequenz der CANDIS enthält, und den Substraten. Somit liegt die Vermutung nahe, dass ADAM17 mehrere Substratbindestellen besitzt, welche es in Zukunft noch näher zu charakterisieren gilt.

Abstract

CANDIS - The Role of ADAM17's -Stalk Region for its Activity and Identification of the Human Interleukin-6 Receptor Binding Epitope to its Sheddase ADAM17

by Katharina Viktoria Höbel

The metalloprotease ADAM17 plays an extendently important role in physiological and pathological processes within the human body. Not least due to its broad spectrum of substrates. Among them the most prominent representatives are the interleukin-6 receptor (IL-6R) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Despite the high relevance of ADAM17 the mechanism of activation and inhibition and the role of the single domains within these processes are to a large extend still unknown. As a consequence one aim of this work has been to characterize the role of CANDIS (*Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence*) regarding its substrate binding properties. The sequence that is defined as CANDIS is situated at the C-terminal end of ADAM17's stalk region and unique among the members of the ADAM family.

In order to examine the influence of the membrane proximal domain and CANDIS on shedding activity meFADAM17 ex/ex cell lines (murine embryonal fibroblats almost completely lacking expression of functional ADAM17) that expressed ADAM17/ADAM22/ADAM10-chimeras instead of wild type ADAM17 have been created using a retroviral system. Those cell lines will be a useful tool to characterize the role of the membrane proximal domain and CANDIS in near future.

Concerning the already known interaction between the human Interleukin-6 receptor and CANDIS the binding epitope of human Interleukin-6 receptor to CANDIS could be identified. It is situated within N-terminal end of the stalk region more exactly between E₃₁₇ and Q₃₃₂.

Investigations whether binding of further ADAM17 substrates like tumor necrosis factor- α or Interleukin-1 receptor II to the protease is also mediated by CANDIS haven't shown an interaction between the used CANDIS peptide and the examined substrates. Hence we assume that ADAM17 contains several substrate binding sites that are to be characterized in near future.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	iv
Zusammenfassung	v
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
Abkürzungen	xi
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der ADAM-Proteasen und ADAM17	1
1.1.1 Die ADAM-Familie und deren Struktur	1
1.1.2 <i>Shedding</i> und ADAM17 im Speziellen	4
1.1.3 ADAM17- <i>Knockout</i> -Mäuse	5
1.1.4 Mit ADAM17 assoziierte Krankheiten	6
1.1.5 Aktivierung und Inhibition von ADAM17	8
1.1.6 ADAM17: Die membran-proximale Domäne und CANDIS	9
1.2 Interleukin-6 und sein Rezeptor	11
1.3 Zusammenfassung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Antibiotika	15
2.1.2 Antikörper	16
2.1.3 Chemikalien	16
2.1.4 Größenmarker	16
2.1.5 Kits	17
2.1.6 Oligonucleotide	17
2.1.7 Peptide	17
2.1.8 Plasmide	17

2.1.9	Puffer und Lösungen	18
2.1.10	Zellkulturmedien und -reagenzien	21
2.1.11	Zelllinien	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.2	Protein-biochemische Methoden	26
2.2.3	Zellkultur	29
3	Ergebnisse	33
3.1	Rolle der membran-proximalen Domäne und CANDIS hinsichtlich der <i>Shedding</i> -Aktivität von ADAM17	33
3.1.1	Produktion einer den IL-1RII stabil exprimierenden mEF ^{ex/ex} Zelllinie	33
3.1.2	Klonierung der ADAM17-Chimären in retrovirale Vektoren	35
3.1.3	Retrovirale Transduktion von mEF ^{ex/ex}	37
3.2	Identifizierung des Bindungsepitops des humanen Interleukin-6 Rezeptors an CANDIS ¹	38
3.2.1	Bindungsstudien mit IL-6R/IL-11R-Chimären	38
3.2.2	Bindungsstudien mit hIL-6R Deletionsmutanten	41
3.3	Bindungsstudien mit weiteren ADAM17-Substraten	43
4	Diskussion	47
4.1	Rolle der membran-proximalen Domäne und CANDIS hinsichtlich der <i>Shedding</i> -Aktivität von ADAM17	47
4.2	Interaktion der CANDIS mit ADAM17-Substraten	51
4.2.1	Identifizierung des Bindungsepitopes des hIL-6R an CANDIS	51
4.2.2	Bindungsstudien mit dem Interleukin-1 Rezeptor II und TNF- α	56
	Literaturverzeichnis	58
	Lebenslauf	63
	Danksagung	65

¹Die hier präsentierten Ergebnisse wurden bereits publiziert, siehe [14]

Abbildungsverzeichnis

1.1	ADAM17: Schematische Darstellung	2
1.2	Sequenzvergleich der <i>Stalk</i> -Region von ADAM17-Orthologen in unterschiedlichen Spezies	10
1.3	IL-6 <i>Classic Signaling</i>	12
1.4	IL-6 <i>Transsignaling</i>	13
3.1	Aktivitätstest der den IL-1R II-AP exprimierenden Klone	34
3.2	Verwendete ADAM17-Chimären	35
3.3	Gelelektrophorese <i>Colony-PCR</i>	37
3.4	Gelelektrophorese Testverdau	37
3.5	Westernblot der mit dem IL-1RII stabil transduzierten mEF ^{ex/ex}	38
3.6	Übersicht über die verwendeten IL-6R/IL-11R-Chimären	39
3.7	Chimäre V: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	39
3.8	Chimäre I: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	40
3.9	Chimäre X: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	41
3.10	Chimäre IX: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	41
3.11	hIL-6R Deletionsmutanten	42
3.12	hIL-6R Δ A ₃₃₃ -V ₃₆₂ : Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	43
3.13	hIL-6R Δ E ₃₁₇ -T ₃₅₂ : Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	43
3.14	hIL-6R Δ E ₃₁₇ -Q ₃₃₂ : Schematische Darstellung und Immunopräzipitation	44
3.15	Vergleich der Sequenzen von Hyper-IL-6 und sIL-6R	44
3.16	Hyper-IL-6: Immunopräzipitation	44
3.17	löslicher IL-6R: Immunopräzipitation	45
3.18	L-1RII: Immunopräzipitation	45
3.19	TNF- α : Immunopräzipitation	46
4.1	Aktivitätsassay zweier ADAM17-Chimären	49
4.2	CANDIS-Bindungsepitop des hIL-6R	53
4.3	<i>Shedding</i> der Deletionsmutante IL-6R Δ E ₃₁₇ -Q ₃₃₂ durch ADAM17	54
4.4	Co-Immunopräzipitation des hIL-6R mit MPD17-GPI und mut16	56

Tabellenverzeichnis

3.1 Übersicht durchgeführter Klonierungen	36
---	----

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>
AP	Alkaline Phosphatase
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATL	Adulte T-Zell-Leukämie
BSA	<i>Bovine Calf Serum</i>
c	<i>Concentration</i>
CANDIS	<i>Conserved ADAM-SeventeenN Dynamic Interaction Sequence</i>
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CRP	<i>C Reactive Protein</i>
dH ₂ O	<i>Distilled H₂O</i>
DMEM	<i>Doubleccos's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Desoxynucleoside triphosphate</i>
DSS	<i>4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic Acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetra-acetic Acid</i>
EGF	<i>Endothelial GrowthFactor</i>
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGFR	<i>Endothelial GrowthFactor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinases</i>
EXITS	<i>Exon Induced Translational Stop</i>

FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
g	Gramm
gp	Glykoprotein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	<i>Hour</i>
HB-EGF	<i>Heparin Binding Endothelial Growth Factor</i>
HB-EGFR	<i>Heparin Binding Endothelial Growth Factor Receptor</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
l	Liter
LB	Luria-Bertani
MAP-Kinase	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
mEF	<i>Murine Embryonic Fibroblasts</i>
min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
MPD	<i>Membrane Proximal Domain</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PES	<i>Ployethersulfone</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13- acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SH3	<i>SRC Homology 3 Domain</i>

sIL-6R	<i>Soluble IL-6 Receptor</i>
sTNF	<i>soluble Tumor Necrosis Factor</i>
TACE	<i>TNF-alpha Converting Enzyme</i>
tbl	Tablette
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
wt	Wildtyp

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Familie der ADAM-Proteasen und ADAM17

1.1.1 Die ADAM-Familie und deren Struktur

Die ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*) werden in der MEROPS-Klassifikation zu den Metzinkinen (M12) der größten Familie der Metalloendopeptidasen gezählt. Innerhalb dieser Familien bilden die ADAMs gemeinsam mit den Schlangengiftmetalloproteasen die Subfamilie M12B der sogenannten Adamalysine [10, 38]. Weitere Mitglieder der Metzinkin-Familie sind die Astacine, die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und die Serralysine (Proteasen, welche in einigen Prokaryonten vorkommen).

ADAMs wurden in zahlreichen Spezies ausgemacht, von der Nematode *Caenorhabditis elegans* bis hin zu Vertebraten [16]. Bisher sind mehr als 40 ADAMs in unterschiedlichen Spezies identifiziert worden. Es wird angenommen, dass im menschlichen Körper 21 ADAMs exprimiert werden, von welchen 13 katalytische Aktivität besitzen [16].

Struktur der ADAMs ist mit der gut bekannten Struktur der *Class III Snake Venom Metalloenzymes*, die auch als Reprolysin bekannt sind, eng verwandt [21]. Die Mitglieder der ADAM-Familie haben eine Länge von etwa 750 Aminosäuren [16]. Ihr charakteristischer, konservierter Aufbau enthält eine N-terminale Signalsequenz, die das Protein auf

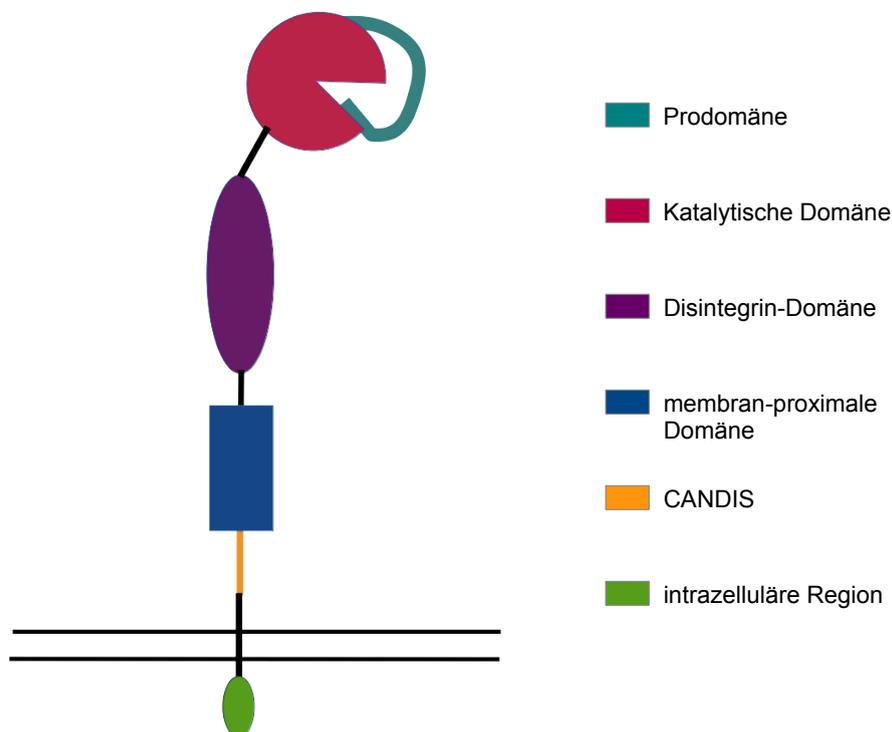


ABBILDUNG 1.1: ADAM17: Schematische Darstellung
Darstellung der Domänenstruktur von ADAM17

den sekretorischen Weg dirigiert, eine Prodomäne, katalytische Domäne, Disintegrin-Domäne mit einer cysteinreichen Region, einer EGF-Domäne und eine Transmembranregion, gefolgt von einem zytoplasmatischen Teil [46]. ADAM10 und ADAM17 nehmen innerhalb der Adamalysine eine Sonderrolle ein. Sie besitzen statt einer cysteinreichen und EGF-Domäne eine membran-proximale Domäne [50].

ADAM17 wird als inaktives Zymogen produziert. Dabei dient die Prodomäne der korrekten Faltung und spielt vermutlich als Chaperon beim intrazellulären Transport eine Rolle [29]. Die Prodomäne wird konstitutiv im trans-Golgi-Netzwerk durch Furin oder furinähnliche Konvertasen abgespalten. Nur prozessiertes ADAM17 wird auch zur Zelloberfläche transportiert [3]. Sowohl für ADAM17 als auch für ADAM10 wird berichtet, dass isolierte Formen der Prodomäne als selektive Inhibitoren der reifen Protease agieren können [16].

Die katalytische Domäne von ADAM17 ist länger als die der meisten anderen Adamalysine [29]. Die katalytisch aktiven Mitglieder der ADAM-Familie haben eine charakteristische *reprolysin-type* Sequenz HEXGHXXGXXHD in ihrem aktiven Zentrum [16]. Die drei darin enthaltenen Histidine binden dabei das katalytische Zinkion, während die Glutamine als katalytische Base für die Hydrolyse von entscheidender Bedeutung sind [16, 38].

Die Disintegrin-Domäne der ADAMs (mit Ausnahme von ADAM15) müsste korrekterweise als Disintegrin-*like*-Domäne bezeichnet werden, da sie sich durch das Fehlen der charakteristischen RGD-Sequenz und zusätzlichen Cystein-Resten von den in Schlangengift-Metalloproteasen identifizierten Disintegrin-Domänen unterscheidet, welche mit einer großen Bandbreite an Integrinen interagieren können [16, 21]. Der Disintegrin-Domäne der Mitglieder der ADAM-Familie wird eine Bedeutung für die Anordnung der extrazellulären Domänen zugesprochen [16]. Zudem kann die Disintegrin-Domäne die Interaktion von ADAM17 mit $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin vermitteln [22]. Die katalytisch inaktiven Mitglieder der ADAM-Familie sind über ihre Disintegrindomäne an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt [16].

Auf die Eigenschaften und Aufgaben der membran-proximalen Domäne wird später genauer eingegangen (siehe 1.1.6). Die Transmembranhelix scheint für das *Shedding* einiger ADAM17-Substrate von Bedeutung zu sein. An diesem Punkt sei darauf hingewiesen, dass ein Konstrukt bestehend aus den extrazellulären Domänen von ADAM17, welches durch einen Glykophosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Zellmembran befestigt ist, nicht in der Lage ist, die ADAM17-Substrate TGF- α , TNF- α und L-Selektin proteolytisch von der Zelloberfläche zu schneiden [31]. Die zytoplasmatische Region enthält unter anderem potentielle *SRC Homology 3 Domain* (SH3)-Bindungsdomänen [16]. Reddy *et al.* konnten im Jahr 2000 zeigen, dass eine humane ADAM17-Mutante, welche die komplette extrazelluläre Struktur und Transmembranregion enthält, allerdings ab V₆₉₄ abbricht – welcher somit die gesamte intrazelluläre Region fehlt – und dennoch in der Lage ist, TNF- α im gleichen Maße von der Zelloberfläche zu schneiden wie *full-length* ADAM17 [42].

Innerhalb der ADAM-Familie haben, wie oben erwähnt, ADAM10 und ADAM17 aufgrund der besonderen Organisation ihrer Domänen eine Sonderstellung inne. ADAM10 ist der nächste Verwandte von ADAM17. ADAM10 und ADAM17 weisen hinsichtlich der von ihnen prozessierten Substrate einige Überschneidungen auf. Beispielsweise sind beide in der Lage den Interleukin-6 Rezeptor proteolytisch von Zelloberflächen zu spalten, wobei ADAM10 den IL-6R konstitutiv und ADAM17 nach Stimulation durch PMA in seine lösliche Form überführt [19, 33].

1.1.2 *Shedding* und ADAM17 im Speziellen

Die Proteolyse, also das gezielte Schneiden von Proteinen durch Proteasen, stellt eine Stellschraube in einer großen Vielfalt von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen dar. Beispiele hierfür sind die Blutgerinnungskaskade, Apoptose (durch Aktivierung von Caspasen), Umbau von Gewebe und zahlreiche regulatorische Vorgänge im Immunsystem [10].

Der Prozess, bei dem Transmembranproteine von der Zelloberfläche geschnitten werden, wird als *Shedding* bezeichnet [7]. Dieses *Shedding* kann unter anderem dazu führen, dass zunächst membrangebundene Signalmoleküle in deren löslicher Form systemische Wirkung entfalten (prominentestes Beispiel TNF- α), Zytokinrezeptoren die Wirkung ihres Liganden antagonisieren oder aber auch, wie es bei IL-6 und dem IL-6R der Fall ist, sogenanntes *Transsignaling* auslösen (siehe auch 3.17) [16]). Es wird vermutet, dass bis zu 10% aller an der Zelloberfläche exprimierten Proteine proteolytisch gespalten und somit in den Extrazellulärraum entlassen werden [47].

Zudem ist die Fähigkeit einer Zelle, das Proteinexpressionsmuster auf ihrer Oberfläche durch Proteolyse zu verändern, für viele physiologische und auch pathologische Prozesse von großer Bedeutung. Andernfalls wäre die Zelle gezwungen in ihrem Momentanzustand zu verharren, unfähig sich zu bewegen und oftmals nicht in der Lage zur Kommunikation mit benachbarten oder auch weiter entfernten Zellen [7]. Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass unterschiedliche Proteasen diese Proteinmodifikation auf unterschiedlichem Wege erreichen. Möglicherweise hat jedes einzelne Zielprotein und jede Protease eine

spezielle Funktion, abhängig von der momentanen Entwicklungsphase des Organismus, dem Gewebe oder sogar der intrazellulären Lokalisation [6].

1997 wurde ADAM17 unabhängig voneinander von zwei Gruppen als die für die Produktion von löslichem TNF- α verantwortliche Protease entdeckt [4, 35]. Aufgrund dieser ersten Charakterisierung wurde die Protease zunächst als TACE (*TNF- α Converting Enzyme*) bezeichnet. ADAM17 mRNA wird in nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert. Aktives ADAM17 auf der Zelloberfläche hingegen findet man hauptsächlich während Entzündungsprozessen und Krebs. Unter physiologischen Bedingungen findet sich kaum ADAM17 auf der Zelloberfläche, die Reifung und Verteilung scheint sehr eng reguliert zu sein [16].

1.1.3 ADAM17-*Knockout*-Mäuse

Die Rolle von ADAM17 *in vivo* wurde zunächst in Studien mit ADAM17-*Knockout*-Mäusen erforscht. 1998 generierten Peschon *et al.* $tace^{\Delta Zn/\Delta Zn}$ -Mäuse, die homozygot für eine nicht-funktionsfähige ADAM17-Mutante sind. Ein Großteil dieser Mäuse starb bereits vor der Geburt (e17.5) oder am ersten Tag nach der Geburt, wobei diese Mäuse geöffnete Augenlider und Fehler in der Zellreifung und Organisation von Epithelien - vor allem im Gastrointestinaltrakt und der Lunge - aufwiesen [40]. Die wenigen $tace^{\Delta Zn/\Delta Zn}$ -Mäuse, die für einige Woche überlebten, zeigten im Vergleich zu ihren gleichaltrigen Wildtyp-Artgenossen ein um bis zu 40% reduziertes Körpergewicht, Entzündungen der Cornea, irreguläre Pigmentierungsmuster und gestörte Haarbildung [40]. Denselben Phänotyp, wie die $tace^{\Delta Zn/\Delta Zn}$ -Mäuse, wiesen auch ADAM17^{-/-} Mäuse auf, wobei diese nicht wie erwartet TNF- α -*Knockout*-Mäusen, sondern mehr *Tumor Growth Factor- α -Knockout*-Mäusen (TGF) ähnelten [46]. Das war als deutlicher Hinweis darauf zu werten, dass ADAM17 neben TNF- α weitere Substrate, die während der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung sind, wie den EGFR-Liganden TGF- α , prozessiert. Allerdings sind TGF- α -*Knockout*-Mäuse nicht pränatal letal [3].

In Studien mit HB-EGF^{-/-}-Mäusen zeigten diese, den ADAM17^{-/-} Mäusen ähnlich, deformierte Herzklappen. Dies deutete darauf hin, dass HB-EGF - ein weiterer Ligand des EGFR - ein für die Embryonalentwicklung wichtiges ADAM17-Substrat ist [27].

Obwohl sich das Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17 in einigen Bereichen überschneidet, sind ADAM10- und ADAM17-Doppel-*Knockout*-Mäuse bereits am Embryonaltag 8.5 letal. Zudem zeigten sie noch schwerwiegendere Defekte als ADAM10-*Knockout*-Mäuse, was darauf hinweist, dass beide Proteasen, trotz Überschneidungen im Substratspektrum, eigenständige Aufgabenbereiche in der Embryonalentwicklung erfüllen [46].

Um zu untersuchen, welche Rolle ADAM17-vermitteltes *Shedding* im Organismus nach der Geburt spielt, wurden mittels der EXITS-Technik (*exon-induced translational stop*), Mäuse generiert, bei welchen nur 5% der ADAM17 mRNA für die Wildtyp-Protease kodiert und somit das Expressionslevel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf 5% reduziert werden konnte [9]. Homozygote ADAM17^{ex/ex}-Mäuse waren *post partem* überlebensfähig, zeigten aber schwerwiegende Augen-, Haar und Hautdefekte. Außerdem war in diesen Mäusen die Regeneration der intestinalen Mukosa nach DSS-induzierter Kolitis blockiert, der EGF-Signalweg *downstream* des EGFR aber noch intakt [9].

2011 berichteten Blaydon *et al.* von einem Patienten, welcher homozygot für eine inaktive ADAM17-Deletionsmutante ist. Dieser Patient zeigte neben dem Verlust des katalytisch aktiven ADAM17 keine kompensatorische Hochregulation von ADAM10. Dennoch scheint der menschliche Körper andere Kompensationsmechanismen auszubilden, da der beschriebene Patient neben Infektionen der Haut, gastrointestinalen Entzündungen und einer Kardiomyopathie keine weiteren Auffälligkeiten zeigte [5].

1.1.4 Mit ADAM17 assoziierte Krankheiten

In vielen *in vitro* und *in vivo* Studien sind mittlerweile über 70 ADAM17-Substrate identifiziert worden (eine sehr gute Übersicht hierzu findet sich in [47]). Das übermäßige oder verminderte *Shedding* einiger dieser Substrate und die hoch- oder herunterregulierte Expression von ADAM17 werden mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht. Heute wird ADAM17 unter anderem eine Beteiligung an Krebs, neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen, Asthma und Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis zugesprochen [16, 46].

Adam17 und entzündliche Erkrankungen Nachdem ADAM17 zunächst als die Protease identifiziert wurde, die TNF- α von seiner membrangebundenen Proform in die lösliche reife Form überführt und nach wie vor als Haupt*shed*dase von proTNF- α gilt, ist eine Beteiligung von ADAM17 in chronisch entzündlichen Erkrankungen naheliegend. Zudem sind die Pathogenese von Arthritis, Kolitis und akutem Herzversagen auf einen teilweise massiven Anstieg von löslichem TNF- α infolge von ADAM17-Aktivität zurückzuführen, während membranständiges TNF- α dabei keine Rolle spielt [2, 16]. Des Weiteren ist ADAM17-vermitteltes *Shedding* von L-Selektin, ICAM-1 und V-CAM-1 für die transendotheliale Migration von Immunzellen notwendig [16].

Adam17 und Krebs Eine erhöhte ADAM17-Protein- oder mRNA-Expression wurde für maligne Tumore in verschiedenen Geweben gezeigt, darunter Mamma-, Kolon-, Nieren-, Bronchial- und Prostata Tumoren [46]. Zudem korreliert in einigen Tumorarten eine erhöhte ADAM17-Expression mit einer kürzeren Überlebenszeit [46]. Einige Mitglieder der ADAM-Familie, welche in der Lage sind durch ihre Proteaseaktivität Extrazellulärmatrix abzubauen, stehen unter dem Verdacht, die Invasivität und Metastasierung von Krebserkrankungen zu fördern [16]. ADAM17 ist für die Aktivierung des EGFR durch TGF- α *in vivo* notwendig und trägt somit zur Tumorgenese in Nacktmäusen bei [8]. Somit stellt ADAM17 ein vielversprechendes *Target* für die Krebstherapie dar, vor allem seit gezeigt werden konnte, dass Nierenkarzinomzellen nach ADAM17-*silencing* ihr invasives Potential verlieren und Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne von ADAM17 die Interaktion zwischen Fibroblasten und Karzinomzellen unterbinden können [29, 52].

ADAM17 und das Herz-Kreislauf-System Weitere pathologische Prozesse mit ADAM17-Beteiligung sind Herz-Kreislauf-erkrankungen: – Patienten mit Herzinfarkt zeigten eine erhöhte ADAM17-Expression in den Bereichen rupturierter Plaques [46].

Weitere ADAM17-assoziierte Erkrankungen und Behandlungsansätze Auch zur Behandlung von Barrieredefekten der Epidermis stellt ADAM17 durch seine Beteiligung an der EGFR-Achse ein potentiell therapeutisches Ziel dar [18]. Zudem können sowohl ADAM17 als auch ADAM10 und ADAM9 das APP (*amyloid precursor protein*)

als α -Sekretase spalten und werden demzufolge als Alzheimer-protective Faktoren gehandelt [34]. Deshalb ist es ein vielversprechendes Anliegen zu verstehen, wie ADAM17 reguliert wird und wie ADAM17-Inhibitoren wirken.

1.1.5 Aktivierung und Inhibition von ADAM17

Auf die Rolle der Prodomäne hinsichtlich der Reifung und Inhibition von ADAM17 wurde bereits in Abschnitt 1.1.1 hingewiesen. Des Weiteren kann die Aktivität der ADAMs durch Änderung der intrazellulären Verteilung, der Interaktion mit anderen Proteinen oder auch posttranslationale Modifikationen des zytoplasmatischen Teiles verändert werden [46]. Die ADAM17 *Shedding*-Aktivität ist stark beeinträchtigt, wenn ERK und/oder der p38-MAP-Kinase Signalweg blockiert sind [17, 20]. Des Weiteren können sowohl ADAM17 als auch ADAM10 durch Calciumeinstrom in die Zelle aktiviert werden [30]. Goos *et al.* zeigten 2012, dass sich, nach Serotonin-Stimulation über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, die Assoziation von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und ADAM17 löst und ADAM17-*Shedding* aktiviert wird [22].

Der stärkste bekannte Aktivator von ADAM17 ist Phorbol-12-myristat-13-acetat, kurz PMA. Zudem ist ADAM17 das einzige Mitglied der ADAM-Familie, das auf Stimulation durch PMA anspricht [47]. Für diese PMA-Stimulation werden die extrazellulären Domänen von ADAM17 benötigt, wobei der genaue Mechanismus der Aktivierung weiterhin unklar ist, da diese durch die Blockade der Proteinkinase C (PKC) oder ERK-Kinaseaktivität inhibiert werden kann [25, 47]. Des Weiteren bewirkt eine ausgedehnte PMA-Stimulation eine Internalisierung der Protease und somit eine verminderte Aktivität [29].

Der *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3*, kurz TIMP3, ist der einzige bekannte endogene Inhibitor von ADAM17. Es wurde unter anderem gezeigt, dass TIMP3 die sVCAM-Freisetzung von Endothelzellen nach Zytokinstimulation unterdrückt [49]. TIMP3-defiziente Mäuse zeigen einen erhöhten Anstieg an sTNF- α bei Entzündungen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass durch die Abwesenheit von TIMP3 die ADAM17-Aktivität in geringerem Maße reguliert werden kann. Somit kann gefolgert werden, dass *in vivo* ADAM17 ein Hauptziel von TIMP3 darstellt [39].

Obwohl ADAM17 ein vielversprechender Angriffspunkt für die Behandlung von Krebs und entzündlichen Autoimmunerkrankungen darstellt und sich ADAM17-Inhibitoren in präklinischen Studien und Mausmodellen durchaus als wirksam erwiesen haben, mussten klinische Studien wegen Wirkungslosigkeit und Anzeichen von Lebertoxizität abgebrochen werden [43]. Weitere zu erwartende Nebenwirkungen waren Haarverlust, Kardiomyopathien und Myokarditis [5]. Ferner wurde in einer Studie mit ADAM17-Inhibitoren an PBMCs gezeigt, dass diese zwar wirkungsvoll die Freisetzung von sTNF- α blockieren, *in vitro* im humanen System jedoch über die Aktivierung von Caspase-1 ein alternativer Entzündungsweg aktiviert wird [48].

1.1.6 ADAM17: Die membran-proximale Domäne und CANDIS

Hinsichtlich der Charakterisierung der Eigenschaften der membran-proximalen Domäne (MPD) von ADAM17 wurde in den letzten Jahren ein großer Fortschritt erzielt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Konstrukte bestehend aus der membran-proximalen Domäne und *Stalk*-Region, die über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert sind, in der Lage sind Dimere zu bilden. Das bedeutet, dass zur Dimerisierung von ADAM17 lediglich diese beiden Teile – die MPD und die *Stalk*-Region – nötig sind [32].

Des Weiteren konnte mithilfe dieses MPD-GPI-Konstruktes die Bindungsstellen sowohl des IL-6R als auch des IL-1RII auf die membran-proximale Domäne und die *Stalk*-Region eingegrenzt werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Bindungsstelle für das Typ II Protein proTNF- α wohl außerhalb der membran-proximalen Domäne liegt, da eine Co-Immunopräzipitation von TNF- α mit dem MPD-GPI-Konstrukt nicht möglich war. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die membran-proximale Domäne eine tragende Rolle hinsichtlich der Substraterkennung einiger ADAM17-Substrate spielt.

Das *Shedding* von L-Selektin und HB-EGF kann durch H₂O₂ stimuliert werden. Dies bedeutet, dass ADAM17 redox-sensitiv ist. Tatsächlich enthält die membran-proximale Domäne von ADAM17 ein Thioredoxinmotiv - C₆₀₀XXC₆₀₃, welches eine potentielle Angriffstelle für die Proteindisulfidisomerase (PDI) darstellt. In der Tat katalysiert die PDI eine Isomerisierung der Disulfidbrücken innerhalb dieses Thioredoxinmotives. Aufgrund ihrer Sekundärstruktur kann die MPD17 (membran-proximale Domäne von ADAM17)

Im Folgenden wird diese hochkonservierte, 14 Aminosäuren lange Sequenz als *Conserved Adam seventeeN Dynamic Interaction Sequence*, kurz CANDIS, bezeichnet. Eine Messung des Circular dichroismus (CD) der CANDIS zeigte, dass sie eine α -helikale Struktur aufweist [14]. Nun stellte sich die Frage, ob die Dimerisierungs- und Substratbindeigenschaften, welche aufgrund der experimentellen Datenlage der MPD zugesprochen wurden, zum Teil nicht auf die CANDIS zurückzuführen seien. *Pull down* Experimente zeigten, dass der hIL-6R an die Sequenz bindet.

Ein weiterer interessanter Fakt im Zusammenhang mit CANDIS und der MPD ist, dass eine Bindung zwischen einer inaktiven ADAM17-Mutante und dem IL-6R durch Vorbehandlung der Mutante mit der PDI unterbunden werden kann. Das verstärkt die Vermutung, dass durch die Konformationsänderung beim Übergang von der offenen zur geschlossenen Form, der Zugang des IL-6R zur CANDIS erschwert, wenn nicht sogar unmöglich wird [15]. Der gleiche Effekt kann bei einer Co-Immunopräzipitation mit dem MPD17-GPI-Konstrukt, das die CANDIS enthält und ebenfalls mit der PDI vorbehandelt wurde, und dem IL-6R beobachtet werden [14].

1.2 Interleukin-6 und sein Rezeptor

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) gehört zur Familie der Vier-Helix-Bündel Zytokine [45]. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Initiierung der hepatischen Akute-Phase-Entzündungsreaktion sowie bei Differenzierung und Wachstum von Zellpopulationen, wie hämatopoietischer Stammzellen, T- und B-Lymphozyten [45]. Der extrazelluläre Teil des IL-6R besteht aus einer immunglobulinähnlichen (*Ig-like*) Domäne und zwei modifizierten Fibronektin Typ-III Domänen [23]. Auf seinen Zielzellen bindet IL-6 zunächst an den membranständigen IL-6R, woraufhin dieser IL-6/IL-6R-Komplex mit dem Signaltransduktionsprotein gp130 - gp steht für Glykoprotein - assoziiert und damit dessen Dimerisierung initiiert [44]. Daraufhin wird intrazellulär der JAK/STAT- und der Ras/MAPK/AKT-Signalweg aktiviert [13].

Das Signaltransduktionsmolekül gp130 wird auf fast allen Zellen des Körpers exprimiert, wohingegen der membranständige IL-6R lediglich auf Hepatozyten, Monozyten

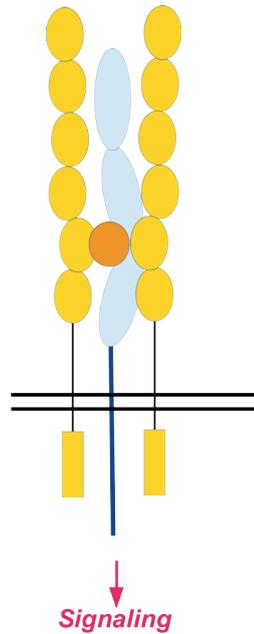


ABBILDUNG 1.3: IL-6 *Classic Signaling*

Schematische Darstellung des *Classic Signaling* über den membranständigen IL-6R. Darstellung des IL-6R in blau, IL-6 in orange und gp130 in gelb.

beziehungsweise Makrophagen und bestimmten anderen Leukozytenpopulationen zu finden ist [45].

Interessanterweise kann die Signaltransduktion von IL-6 nicht nur, wie oben beschrieben, klassisch mithilfe des membranständigen IL-6R, sondern auch über eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R), als sogenanntes *Transsignaling*, stattfinden. Dabei bindet IL-6 an den löslichen IL-6R, um dann, wie beim klassischen IL-6-*Signaling*, über membranständiges gp130 die intrazelluläre Kaskade auszulösen.

In gesunden Individuen liegt die Konzentration des löslichen IL-6R bei 25 bis 35 ng/ml. Bei einigen, insbesondere entzündlichen, Erkrankungen wurden ein erhöhtes sIL-6R/IL-6R-Verhältnis beobachtet [45]. Der sIL-6R kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen generiert werden: etwa 10% entstehen über alternatives *Splicing* [26], wohingegen die restlichen 90% auf Proteolyse des membranständigen IL-6R zurückzuführen sind [37].

Für gewöhnlich dient das *Shedding* membranständiger Rezeptoren ihrer Inaktivierung. Zusätzlich agiert ein Großteil der löslichen Rezeptoren als Antagonist ihres Liganden, wie beispielsweise die Rezeptoren für TNF- α .

Dabei ist es von besonderem klinischen Interesse, dass ein hohes Level an sIL-6R mit T-Zell-Pathologien wie AIDS und adulter T-Zell-Leukämie (ATL) assoziiert ist [24]. *Transsignaling* findet vor allem während immunologischen Stresssituationen wie chronischen Entzündungen und Krebs statt [45]. Eine Fehlregulation des *Transsignaling* führt zu einer permanenten Leukozyteninfiltration des betroffenen Gewebes oder Organs. Somit kann die Entzündung in ein chronisches Stadium übergehen und schließlich in einer Destruktion des Zielgewebes resultieren [45].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass vor allem die proinflammatorische Eigenschaften von IL-6 über *Transsignaling* vermittelt werden, wohingegen anti-inflammatorische und regenerative Funktionen über den klassischen Signalweg initiiert werden [13]. Zudem scheint IL-6-*Transsignaling* vornehmlich während immunologischer Stresssituationen aktiviert zu werden [10].

Ein natürlicher Inhibitor des IL-6-*Transsignaling* ist lösliches gp130 (sgp130), welches ebenfalls als *Splicing*-variante des Wildtyp gp130 existiert [44]. In transgenen Mäusen konnte überexprimiertes sgp130 IL-6-*Transsignaling* wirkungsvoll blockieren, ohne das klassische IL-6-*Signaling* zu beeinflussen [41].

Die für die limitierte Proteolyse des IL-6R verantwortlichen Proteasen sind ADAM10 und ADAM17 [10, 33]. ADAM10 *shedded* den IL-6R vor allem konstitutiv und ADAM17

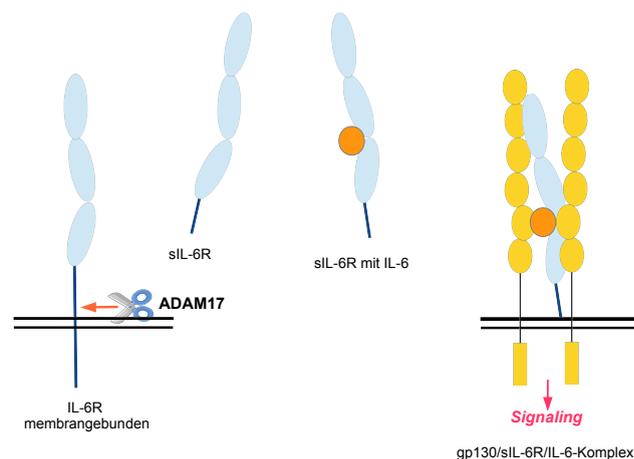


ABBILDUNG 1.4: IL-6 *Transsignaling*
Schematische Darstellung des *Transsignaling* über den löslichen IL-6R. Darstellung des IL-6R in blau, IL-6 in orange und gp130 in gelb.

nach Stimulation [33]. Bekannte Stimuli für ADAM17-vermitteltes IL-6R-*Shedding* sind PMA, Cholesteroldepletion, das *C Reactive Protein* (CRP), verschiedene mikrobielle Komponenten wie bakterielle Toxine, Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien und hitzeinaktivierte Bakterien sowie Apoptose [13]. Nachdem die extrazellulären Domänen des IL-6R durch ADAM17 von der Zelloberfläche freigesetzt worden sind, wird das C-terminale Fragment ein weiteres Mal durch die γ -Sekretase proteolytisch gespalten. Daraufhin werden die Überreste des IL-6R internalisiert. Allerdings scheint durch diese Prozessierung kein intrazellulärer Signalweg in Gang gesetzt zu werden, wie es zum Beispiel beim Notch-Rezeptor der Fall ist [11]. Die proteolytische Spaltung durch ADAM17 findet im C-terminalen Bereich der *Stalk*-Region nahe der Zellmembran statt. Müllberg *et al.* identifizierten die Lokalisation der Schnittstelle zwischen E₃₅₇ und D₃₅₈. Allerdings beeinflusste eine Deletion der zehn Aminosäuren, welche die Schnittstelle flankieren und die Proteolyse durch ADAM17 blockieren, das *Shedding* durch ADAM10 nur schwach. Sowohl die Erkennung als auch das Abspalten des IL-6R von der Zellmembran durch ADAM10 ist somit nicht von dieser Sequenz abhängig [1, 36].

Baran *et al.* zeigten 2013, dass weitere Deletionsmutanten des IL-6R, bei welchen Teile der *Stalk*-Region fehlen trotz intakter ADAM17-Schnittstelle nicht mehr durch ADAM17 von der Zelloberfläche geschnitten werden. Daraus wurde gefolgert, dass neben der definierten Schnittstelle auch die dreidimensionale Struktur zur Substraterkennung durch ADAM10 und ADAM17 beiträgt [1].

1.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass ADAM17, trotz intensiver Forschung vor allem bezüglich seiner Regulationsmechanismen und hinsichtlich seines therapeutischen Potentials, noch sehr viele offene Fragen birgt. Mit der Identifizierung der CANDIS als Substratbindestelle für den IL-6R und die Möglichkeit einer Interaktion dieser Sequenz mit der Zellmembran hat sich ein neuer, sehr interessanter Bereich für weitere Untersuchungen eröffnet.

Um die Rolle der CANDIS weiter zu klären wurden ADAM17 *full-length*-Chimären generiert, bei welchen entweder die membran-proximale Domäne, CANDIS oder aber

auch beide Regionen durch die entsprechenden Sequenzen von ADAM10 oder ADAM22 ersetzt wurden. Mithilfe dieser ADAM17-ADAM10/ADAM22-Chimären soll nun untersucht werden, welche Rolle die CANDIS hinsichtlich der ADAM17-*Shedding*aktivität von unterschiedlichen Substraten spielt. Des Weiteren soll in Anlehnung an die *Shedding*experimente von Baran *et al.* [1] untersucht werden, welcher Bereich des IL-6R als Bindungsepitop an CANDIS agiert. Außerdem sollen die Substratbindestellen von ADAM17 für weitere Substrate, wie den IL-1RII und TNF-alpha im Kontext mit dem aktuellen Stand der Forschung näher charakterisiert werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe)
Hygromycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria)
Puromycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Zeocin	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.1.2 Antikörper

primäre Antikörper

Anti-ADAM17 (A300D)	monoklonaler Antikörper aus der Maus; bindet an ein Epitop der Disintegrin-Domäne von ADAM17; Konzentration: 1:1000 (Westernblot); Herstellung beschrieben in [51]
Anti-Alkaline Phosphatase	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen ; detektiert die humane und murine alkaline Phosphatase; Konzentration: 1:500 (Westernblot); Abcam (Cambridge, UK)
Anti-humaner IL-6R	monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon 4-11); bindet an ein Epitop auf der Domäne 1 des extrazellulären Teils des hIL-6R; Konzentration 1:1000 (Westernblot); Herstellung beschrieben in [12]
Anti-myc (9E10)	monoklonaler Antikörper aus der Maus; bindet an den c-Myc-tag; Konzentration 1:1000 (Westernblot); Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-PC (HPC4)	monoklonaler Antikörper aus der Maus; bindet an die Aminosäuren 6-17 des humanen Protein C; Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

sekundäre Antikörper

Anti-Maus-Antikörper	Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Maus IgG (schwere und leichte Kette); Konzentration 1:5000 (Westernblot); Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Anti-Kaninchen-Antikörper	Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen-IgG (schwere und leichte Kette); Konzentration: 1:5000 (Westernblot); Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen, sofern nichts anderes vermerkt, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, MO, USA).

2.1.4 Größenmarker

GeneRulerTM 1kB DNA-Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRulerTM Prestained Protein-Ladder	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

2.1.5 Kits

PureYieldTM Plasmid-Midiprep System	Promega (Madison, WI, USA)
Nucleobond[®] AX-Kit	Machery-Nagel (Düren)
NucleosSpin[®] Extrakt-II-Kit	Machery-Nagel (Düren)

2.1.6 Oligonucleotide

Die für die beschriebenen Arbeiten verwendeten Oligonucleotide wurden von den Firmen Metabion GmbH (München) und Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Name	Sequenz
AgeI-forward	gatcACCGGTCTAGCGTTTTAAACTTAAGCTTGGTACC
PacI-reverse	gatcTTAATTAACCTCTAGACTCGAGCGGCCGC
TaceB forw	ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT
TaceB rev	CGCGGATCCCACACAGTGGACAAGAATGCTGAAAGG
pQC Sequ 5'	ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT
A17 reverse	gtacCTGAACAACGACACC

2.1.7 Peptide

Die für die Immunopräzipitation verwendeten Peptide wurden alle von der Firma Biosynthan GmbH (Berlin) hergestellt.

Name	Sequenz mit Linker
CANDIS	RVQDVIERFWDFWDQILS_gsgsgK
pA10	VDADGPLARLKKAIKIFSP_gsgsgK
CP	DQWRVVQIEFDIDLFRS_gsgsgK

2.1.8 Plasmide

Die Plasmide, welche die IL-6R/IL-11R-Chimären und Deletionsmutanten des sIL-6R enthalten, wurden von Christoph Garbers zur Verfügung gestellt.

2.1.9 Puffer und Lösungen

Antikörperpuffer für Westernblot 1% BSA in TBS-T

Blockierpuffer für Westernblot 6% BSA in TBS

Blockierlösung für Sepharosebeads

Ethanolamin	3 ml
Nacl	3 g

ad 100 ml mit dH₂O

pH eingestellt auf 8.0

10x DNA-Ladepuffer

Glycerin	5 ml
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	5 ml
Xylencyanol	Spatelspitze
Bromphenolblau	Spatelspitze

ad 10 ml mit dH₂O

5x reduzierender Lämmli-puffer

Glycerin	2 ml
Mercaptoethanolblau	1 ml
10% SDS-Lösung	4 ml
Tris (0.5 M, pH 6.8)	2.5 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze

ad 10 ml mit dH₂O

LB-Medium 25 g LB-Medium nach Miller in 1 000 ml dH₂O

LB-Agarplatten LB-Medium mit 1,2% Agarose und 0,01% Antibiotikum (Ampicillin/Kanamycin)

Lysepuffer

EDTA	0.404 g
NaCl	8.72 g
Tris (1 M), pH 7.6	20 ml
Triton	10 ml

ad 1 000 ml mit dH₂O

Lysispuffer

Lysepuffer	50 ml
Marimastat	10 μ l
Compete Protease-Inhibitor	1 Tablette

10x PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.02 g

ad 1 000 ml mit dH₂O

1x PBS 100 ml 10x PBS in 900 ml mit dH₂O

Sammelgel 7,5% (SDS-PAGE)

dH ₂ O	1 230 μ l
30% Polyacrylamid	630 μ l
Tris/HCl (0.5 M, pH 6.8)	630 μ l
10% SDS	25 μ l
10% APS	25 μ l
TEMED	2.5 μ l

10x SDS-PAGE-Laufpuffer

Glycin	144 g
Tris/HCl	30 g
10% SDS	100 ml

ad 1 000 ml mit dH₂O

1x SDS-PAGE-Laufpuffer 100 ml 10x SDS-PAGE-Laufpuffer in 900 ml dH₂O

10x TBE-Puffer

Borsäure 61.86 g
EDTA 7.31 g
Tris 121.14 g

ad 1 000 ml mit dH₂O

1x TBE-Puffer 100 ml 10x TBE-Puffer in 900ml dH₂O

10x TBS

NaCl 116.68 g
Tris/HCl 60.57 g

ad 1 000 ml mit dH₂O

pH eingestellt auf 7.4

1x TBS 100 ml 10x TBS in 900 ml dH₂O

1x TBS-T

10x Transferpuffer 100 ml
Tween 500 µl

ad 1 000 ml mit dH₂O

10x Transferpuffer

Glycin 144 g
Tris/HCl 30.3 g

ad 1 000 ml mit dH₂O

1x Transferpuffer 100 ml 10x Transferpuffer in 900 ml dH₂O

Trenngel 12,5% (SDS-PAGE)

dH ₂ O	3.06 ml
30% Polyacrylamid	4.14 ml
Tris/HCl (1.5 M, pH 8.8)	2.55 ml
10% SDS	100 μ l
10% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l

2.1.10 Zellkulturmedien und -reagenzien

Antibiotika s. 2.1.1

DMSO	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria)
DMEM	Sigma-Aldrich Chemie (St. Louis, MO, USA)
FCS	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria)
Marimastat	Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria)
Turbofect	Fermentas (St. Leon-Rot)
PMA	Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt)

2.1.11 Zelllinien

mEF ADAM17^{ex/ex} kurz mEF ^{ex/ex}	immortalisierte embryonale Mäusefibroblasten. Diese Zellen exprimieren im Vergleich zu Wildtyp-mEF nur 5% endogenes ADAM17 (zur Verfügung gestellt von Athena Chalaris, Biochemisches Institut der CAU)
HEK-293T	immortalisierte humane embryonale Nierenkarzinomzellen. Im Unterschied zu HEK-293-Zellen exprimieren sie zusätzlich das <i>SV40 large T-Antigen</i> (ATCC-Nummer: CRL-1573)
Phoenix-Eco	Verpackungszelllinie (HEK-293T), stabil mit cDNA transfiziert, die für Antigen, Polymerase und Hüllproteine für ecotrope murine Retroviren kodiert; (zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan, Stanford University, Palo Alto, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Auftrennung von DNA per Elektrophorese

Die verdauten Plasmide wurden per Elektrophorese von den herausgeschnittenen DNA-Fragmenten getrennt. Hierzu wurden Agarose-Gele mit einer Agarosekonzentration gewählt, mit der sich die Größe des Plasmides gut auftrennen lässt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TBE-Puffer aufgeköcht und auf Schiffschen ausgegossen. Die Proben wurden mit der benötigten Menge 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Durchführung der Elektrophorese in Elektrophoresekammern (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit TBE-Puffer wurde für 70 min eine Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurde das Agarosegel 30 min in einer ethidiumbromidhaltigen Lösung gefärbt und mit Wasser gespült.

Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung

Zur spektrometrischen Bestimmung von DNA-Konzentration in Lösung wurde der Nano-Drop-ND 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Das gewünschte Verhältnis der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) liegt zwischen 1.80 und 2.00.

Ligation

Zur Ligation des geschnittenen *Inserts* und des geschnittenen und dephosphorylierten Vektors wurden beide jeweils im Verhältnis 1:10 und 1:30 (Vektor : *Insert*) mit 1 U T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 μ l Ligase-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot) für 17 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei für 5 min bei 65°C inaktiviert und die Ligationsprodukte in chemisch kompetente *E. coli* transformiert.

PCR

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde eine Polymerasekettenreaktion

(PCR) durchgeführt. Die Ansätze wurden, wie unten aufgeführt, verwendet. Für Klonierungen wurde eine Pfu-Polymerase (Fremontas, St. Leon-Rot) mit *Proof-reading*-Funktion eingesetzt. Beim rein qualitativen DNA-Nachweis per PCR wurde eine Go-Taq-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) ohne *Proof-reading*-Funktion verwendet.

Mastermix-Pfu

10x Pfu-Puffer mit MgSO ₄	5 μ l
dNTPs	je 1 μ l (c = 10 mM)
<i>Primer forward</i>	2.5 μ l (c = 10 pM)
<i>Primer reverse</i>	2.5 μ l (c = 10 pM)
<i>Template</i>	1 μ l
Pfu-Polymerase	1 μ l
ddH ₂ O	37 μ l

Mastermix-Go-Taq

5*GoTaq-Puffer	10 μ l
dNTPs	je 1 μ l (c = 10 mM)
<i>Primer forward</i>	2.5 μ l (c = 10 pM)
<i>Primer reverse</i>	2.5 μ l (c = 10 pM)
<i>Template</i>	1 μ l
GoTaq-Polymerase	0.25 μ l
ddH ₂ O	32.75 μ l

Programm

Schritt-Nr.	Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	95°C	180 s	
2	Denaturierung	95°C	30 s	
3	<i>Annealing</i>		30 s	
4	Elongation	72°C		5
5	Denaturierung	95°C	30 s	
6	<i>Annealing</i>		30 s	
7	Elongation	72°C		25
8	Elongation	72°C		

Die Länge von Schritt 4, 7 und 8 wurde an die Länge des *Templates* und die Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase angepasst. Die *Annealing*-Temperaturen wurden mittels des auf <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (letzter Zugriff März 2013) zur Verfügung gestellten Programmes bestimmt.

Das PCR-Produkt wird über NucleoSpin[®]-Säulen des NucleoSpin[®] Extrakt-II-Kits (Machery-Nagel, Düren) gemäß dem Protokoll des Herstellers gereinigt und die DNA-Konzentration mithilfe des NanoDrop-Gerätes gemessen.

Plasmid-DNA Midi-Präparation

Für die Midi-Präparation wurden zunächst 100 μl LB-Medium (versetzt mit 0,01% des entsprechenden Antibiotikums) mit einem Klon von einer LB-Agarplatte angeimpft. Die Lösung wurde über Nacht in einem Schikanekolben bei 37°C und 180 rpm inkubiert und am nächsten Morgen abzentrifugiert (5 000 g, 15 min, 4°C). Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurde das PureYield[™] Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Die Konzentration des Produktes der Midi-Präparation wurde mithilfe des NanoDrop-Gerätes gemessen.

Plasmid-DNA Mini-Präparation

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium (versetzt mit 0,1% des entsprechendem Antibiotikums) mit einem Klon von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über 8 h bei 37°C und 180 rpm. Anschließend wurde die LB-Lösung für 15 min mit 6 000 g bei 4°C abzentrifugiert.

Für die weitere Reinigung wurden die Puffer des Nucleobond[®] AX-Kits (Machery-Nagel, Düren) verwendet. Das Pellet wurde in 400 μl S1-Puffer resuspendiert. Es wurden 400 μl S2- und ebenfalls 400 μl S3-Puffer zugegeben und das Behältnis vorsichtig mehrmals invertiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde für 15 min mit 6 000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden 660 μl 96%-ige Ethanollösung zugegeben und nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert (20 000 g, 4°C). Das Pellet wurde in 50 μl 70%-igem Ethanol resuspendiert und für weitere 10 min zentrifugiert (20 000 g, 4°C). Zur Entfernung von Ethanolrückständen wurde das Pellet für mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 μl ddH₂O aufgenommen. Die Reinheit und Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop-Gerätes bestimmt.

Reinigung des elektrophoretisch aufgetrennten Plasmides aus Agarose-Gel

Im Anschluss an die Elektrophorese von PCR-Produkten erfolgte der Nachweis der DNA-Banden unter UV-Licht. Als Größenreferenz diente der 1 kB DNA-*Ladder* (s. 2.1.4). Trat eine deutliche Bande auf Höhe der erwarteten Größe des Plasmids auf, wurde diese aus dem Gel herausgeschnitten, mithilfe des NucleosSpin[®] Extrakt-II-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerprotokoll extrahiert und gereinigt und anschließend deren Reinheit und Konzentration mithilfe des NanoDrop-Gerätes bestimmt.

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der selbst erstellten Plasmide wurden diese von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert. Die hierfür verwendeten Primer sind unter 2.1.6 aufgeführt.

Testverdau

Ein zusätzlicher Nachweis, ob das Plasmid ausgewählter Kolonien das *Insert* im richtigen Vektor enthält, erfolgte durch einen Testverdau. Dazu wurden 1 μg des Produktes einer Mini-Präparation mit 1 U der Restriktionsendonuklease NotI (Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 μl des passenden Puffers für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der Produkte unter UV-Licht dokumentiert.

Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Ein 50 μl -Aliquot bei -80°C gelagerter, chemisch kompetenter *E. coli* wurde für 20 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 μg des ausgewählten Plasmids weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock, für 6 s bei 42°C, wurde 500 μl LB-Medium zugegeben, die Bakterien anschließend für 60 s auf Eis und 60 min bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 3 500 rpm, wurden 450 μl des Überstandes abgenommen, das Pellet resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Verdau und Dephosphorylierung von PCR-Produkten und Plasmiden

Für den enzymatischen Verdau von PCR-Produkten wurden *FastDigest*-Restriktionsenzyme (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Ansätze wurden nach Herstellerinformationen berechnet. Pro Ansatz wurden 250 ng PCR-Produkt mit jeweils 1 μl der beiden *FastDigest*-Enzyme sowie 3 μl des zugehörigen *FastDigest*-Puffers verwendet und mit ddH₂O auf 20 μl verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über 60 min. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 10 min bei 80°C inaktiviert.

Für die Vorbereitung der Plasmide zur Ligation wurden zwei einzelne Reaktionen mit den jeweiligen Restriktionsenzymen durchgeführt. Der erste Verdau erfolgte in vier Ansätzen mit jeweils 4,5 μg des Plasmides mit 3 μl des Enzymes sowie 6 μl des zugehörigen Puffers. Die Ansätze wurden mit ddH₂O auf 60 μl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte über 4 h bei 37°C. Daraufhin wurden die Ansätze über NucleoSpin[®]-Säulen des NucleoSpin[®] Extrakt-II-Kits (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerprotokoll gereinigt und die Konzentration des Plasmids mithilfe des NanoDrop-Gerätes bestimmt. Für den zweiten Schritt des Verdau wurden zwei Ansätze, wie oben für den ersten Schritt beschrieben, erneut für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 U *Fast-AP* (Fermentas, St. Leon-Rot) und Inkubation über weitere 30 min dephosphoryliert.

2.2.2 Protein-biochemische Methoden

Immunopräzipitation

Die in PBS mit Azid gelagerten Sepharosebeads wurden zweimal mit 1 ml Lysispuffer mit 6% BSA, einmal mit Lysispuffer mit 1% BSA gewaschen und schließlich in 500 μl Lysispuffer mit 1% BSA resuspendiert. Zwischen den Waschsritten wurden die *Beads* auf Eis gelagert und sedimentieren gelassen. Dann wurden die Sepharosebeads für eine Stunde mit dem entsprechenden Zelllysate bei 4°C inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen sowie die *Beads* dreimal mit 1 ml Lysispuffer mit 1% BSA und zweimal mit Lysispuffer ohne BSA-Zusatz

gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vorsichtig komplett abgenommen, die *Beads* mit 20 μ l ddH₂O und 20 μ l reduzierendem 5x Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95.5°C inkubiert.

Kopplung von Antikörpern oder Peptiden an Sepharosebeads

Die in Isopropanol gelösten Sepharosebeads (*Beads 4 Fast Flow*, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) wurden dreimal mit 1 ml 1mM HCl versetzt und anschließend zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Um das Sedimentieren der *Beads* zu beschleunigen beziehungsweise *Beads*, die zu Beginn am Phasenübergang zwischen Isopropanol und HCl festhängen, sedimentieren zu lassen, konnten diese bei maximal 500 g für 30 s zentrifugiert werden. Über Nacht inkubierten die *Beads* mit dem entsprechenden Peptid beziehungsweise Antikörper (1 μ g pro μ l *Beads*) bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die sedimentierten *Beads* mit 1 ml Blockierlösung versetzt und wiederum über Nacht bei 4°C inkubiert. Schließlich wurden die blockierten *Beads* zweimal mit PBS gewaschen und zur Lagerung mit PBS mit 0,05% Azid versetzt.

Lyse von HEK 293T-Zellen

Zur Lyse der mit dem entsprechenden Substrat transfizierten Zellen, wurden diese, nachdem sie geerntet wurden, mit 250 μ l Lysispuffer versetzt, 30 min bei 4°C inkubiert und dann für 40 min bei 20 000 g abzentrifugiert. 50 μ l des Lysates wurden als *Inputkontrolle* mit 12.5 μ l reduzierendem 5x Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95.5°C aufgekocht.

SDS-PAGE und Westernblot

Zur Auftrennung und anschließenden Detektion von Proteinen wurden die Methoden der diskontinuierlichen SDS-Page nach Lämmli und Westernblot verwendet.

Für die SDS-Page wurden selbst hergestellte 12,5%ige Polyacrylamid-Gele in mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammern (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingespannt und mit entsprechenden Mengen der aufzutrennenden Proben beladen. Als Referenz diente ein Molekulargewichtsmarker *PageRulerTM Prestained Protein-Ladder* (s. 2.1.4).

Zur größenabhängigen Trennung der Probe wurde für 80 bis 90 min eine Spannung von 150 V angelegt. Um die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) (Immobilon-P[®], Merck Millipore, Darmstadt oder Amersham Hybond-P[®], GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) zu übertragen, wurde das “Mini Trans-Blot Cell System” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet. Zunächst wurde die Membran für 20 s in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer gewaschen. Daraufhin wurden Membran, Polyacrylamid-Gel und *Whatman Paper* (GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) nach Herstellerprotokoll in der Aparatur platziert. Der Proteintransfer erfolgte bei 94 V über 120 min. Sowohl für die *Blotting*-Aparatur als auch für die Elektrophorese diente das PowerPac-Basic (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) als Spannungsquelle.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran nach dem Transfervorgang über 2 h in 5 ml Blockierpuffer gerollt und anschließend mit 5 ml TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht. Hierzu wurde die entsprechende Menge des Antikörpers in 5 ml Antikörperpuffer (im Falle von HPC4: Antikörperpuffer mit einem Zusatz von 5 mM CaCl₂) gelöst. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit 5 ml TBS-T gespült und für 2 h mit dem sekundären Antikörper (1 μ l in 5 ml Antikörperpuffer) inkubiert. Die Membran wurde einmal mit TBS-T und dreimal mit TBS gewaschen (jeweils 5 ml).

Zur Detektion der Proteine beziehungsweise der gekoppelten Antikörper wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien entweder mit jeweils 100 μ l der Entwicklerlösungen *SuperSignal West Femto Stable Peroxide Buffer* und *Luminol/Enhancer Solution* oder jeweils 100 μ l der Entwicklerlösungen *SuperSignal West Pico Stable Peroxide Buffer* und *Luminol/Enhancer Solution* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) platziert. Die Aufnahme der Peroxidasereaktion erfolgte durch den *Luminescent Image Analyser*, LAS-1000 CH (Fujifilm, Düsseldorf), wobei die Expositionszeit abhängig von der Proteinnmenge und dem verwendeten Entwicklerreagenz zwischen 5 s und 20 min variierte.

2.2.3 Zellkultur

Alkaline Phosphatase-Aktivitätsassay mit mEF^{ex/ex}-Zellen

Für jedes Konstrukt, dessen Aktivität getestet werden sollte, wurden drei *wells* von *six-well-plates* mit der cDNA des Konstruktes transfeziert. Zur Kontrolle wurden parallel gleichbehandelte Zellen mit eGFP tranfeziert und deren Fluoreszenz nach 24 h sowie 48 h kontrolliert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden pro zu testendem Konstrukt jeweils ein *well* mit einem Stimulations-, einem Inhibitions- oder einem Kontrollansatz behandelt.

Ansätze

Stimulationsansatz

DMSO	2 μ l
PMA	2 μ l
DMEM ohne Zusätze	1 ml

Inhibitionsansatz

PMA	2 μ l
Marimastat	2 μ l
DMEM ohne Zusätze	1 ml

Kontrollansatz

DMSO	4 μ l
DMEM ohne Zusätze	1 ml

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und durch einen Milliliter der jeweiligen Ansätze ersetzt. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend gerntet, wobei das Medium ebenfalls für das AP-*Assay* aufbewahrt wurde. Die Zellpellets wurden in 100 μ l Lysispuffer mit Marimastat lysiert. Das AP-*Assay* wurde auf 96-*well* Platten durchgeführt. Um natürliche Schwankungen zu minimieren wurden von jedem Lysat und Überstand drei Proben gleichzeitig gemessen und bei der Auswertung der Mittelwert dieser drei Proben gebildet. Als Substrat für die Alkaline Phosphatase diente 4-Nitrophenyl-Disodium-Phosphat-Salz-Hexahydrat (Sigma Aldrich,

St. Louis, MO, USA; 1 Tablette pro 5 ml Substratpuffer). Pro *well* wurden entweder 10 μ l Lysat mit 40 μ l DMEM ohne Zusätze oder 100 μ l des Überstandes mit der gleichen Menge in Substratpuffer gelösten Substrates versetzt.

Anschließend wurde über einen Zeitraum von 2 h bis 4 h die Absorption von Licht einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Messungen erfolgten in einem Intervall von 15 bis 30 min. Zwischen den Messungen wurden die Lysate bei 4°C und die Überstände bei 37°C inkubiert. Als Maß für die *Shedding*-Aktivität des jeweiligen Konstruktes diente das Verhältnis der Aktivität der alkalinen Phosphatase im Lysat und dem Überstand der gleich behandelten mEF^{ex/ex}-Zellen. Anschließend wurde dieses Verhältnis in den mit PMA und DMSO behandelten Proben auf die *Ratio* der jeweiligen mit Marimastat behandelten Zellen normiert.

Berechnung der relativen Aktivität des zu testenden Konstruktes:

$$\frac{\left(\frac{\text{AP-Aktivität im Überstand}}{\text{AP-Aktivität im Lysat}} \right)_{\text{PMA oder DMSO}}}{\left(\frac{\text{AP-Aktivität im Überstand}}{\text{AP-Aktivität im Lysat}} \right)_{\text{Marimastat}}}$$

Ernten von Zellen

Zunächst wurde das Medium vollständig abgenommen und je nach dem, ob es für das weitere Experiment von Interesse war, kühl gestellt oder verworfen. Daraufhin wurden pro *well* einer *six-well-plate* oder pro 10 cm-Schale 1 ml PBS mit Azid hinzugegeben und die Platten für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die in PBS mit Azid suspendierten Zellen wurden für 15 min bei 1 000 g und 4°C zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand vollständig abgenommen.

Kultivierung adhärenter Zellen

Die Zelllinien mEF^{ex/ex}, HEK 293 T und Phoenix wurden, wenn nicht anders vermerkt, in *Dubblecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10% *fetal calf serum* (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin in einem Inkubator (Heracell, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂ auf 100x20 mm *Tissue Culture Dishes*

(10 cm-Schale) (Sarstedt, Newton, NC, USA) kultiviert. Für gewöhnlich wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 80 bis 90%, alle 3 bis 5 Tage, auf neue Platten umgesetzt. Hierfür wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und je nach Zelllinie 1 bis 4 min mit 2 ml 1:1 Trypsin-PBS-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Resuspension in 3 ml DMEM wurden die Zellen bei 1 020 g und 22°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 2 bis 5 ml DMEM mit Zusätzen resuspendiert, die Zellen abhängig vom Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien im Verhältnis 1:5 bis 1:40 *gesplittet* und in 8 ml frischem Medium auf neue 10 cm-Schalen ausgesetzt.

Stabile Transfektion von mEF^{ex/ex}-Zellen

Um mEF^{ex/ex}-Zellen stabil mit einem gewünschten Plasmid zu transfezieren, wurden zunächst $1 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 10 cm-Schale ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen transfeziert. Dazu wurden 1 ml DMEM ohne Zusätze mit 16 μ l Turbofect (Fermentas, St. Leon-Rot) und 8 μ g der cDNA für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu dem Medium auf die 10 cm-Schale gegeben. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen auf fünf 10 cm-Schalen *gesplittet* und mit dem Selektionsmedium (DMEM mit 1% Zeocin) weiter inkubiert. In den folgenden Wochen wurde das Selektionsmedium regelmäßig (alle 3 bis 4 Tage) gewechselt. Sobald sich sichtbare Kolonien gebildet hatten, wurden diese gepickt und gesondert hochgezüchtet.

Transiente Transfektion von HEK 293 T

Am Tag vor der Transfektion wurden pro 10 cm-Schale $3 \cdot 10^6$ Zellen in 7 ml DMEM mit Zusätzen ausgesät. Zur Transfektion der Zellen wurden pro 10 cm-Schale 1 ml DMEM ohne Zusätze mit 15 μ g Polyethylenimin (PEI) und 5 μ g pcDNA für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig dem Medium zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 8 bis 10 h wurde das Medium gegen DMEM mit 5% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin ausgetauscht und die Zellen weiterhin inkubiert, bis sie abhängig von ihrer Konfluenz am zweiten Tag nach der Transfektion geerntet werden konnten.

Transiente Transfektion von mEF^{ex/ex}-Zellen für AP-Assay

Es wurden pro *well* einer *six-well plate* $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde die transiente Transfektion durchgeführt. Dazu wurden pro *well* 220 μ l DMEM ohne Zusätze mit 4 μ l Turbofect (Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 μ g der jeweiligen cDNA

für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium vom Vortag wurde durch 400 μ l frisches DMEM mit Zusätzen ersetzt und der Transfektionsansatz hinzugegeben.

Retrovirale Transduktion von mEF^{ex/ex}

Für die retrovirale Transduktion von mEF^{ex/ex}-Zellen wurden die retroviralen Plasmide zunächst in Phoenix-Zellen mit den entsprechenden murinen Verpackungsproteinen ausgestattet und mit dem Überstand der mit den viralen Plasmiden transfezierten Phoenix-Zellen transduziert.

Am ersten Tag wurden Phoenix-Zellen ausgesät. Pro *well* einer *six-well-plate* wurden hierbei $5 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Nach eintägiger Inkubation wurden diese mit den retroviralen Plasmiden transfeziert. Hierzu wurden zunächst 1,5 μ g der Plasmid-cDNA mit 100 μ l DMEM ohne Zusätze und 3 μ g Turbofekt (Fermentas, St. Leon-Rot) ebenfalls mit 100 μ l DMEM ohne Zusätze 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die beiden Ansätze vereint und weitere 20 min inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurde das Medium vom Vortag von den Phoenix-Zellen durch 1 ml DMEM ohne Zusätze ersetzt und der Transfektionsansatz vorsichtig hinzugegeben. Nach fünfstündiger Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde pro *well* 1 ml DMEM mit 20% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben. Am selben Tag wurden ebenfalls die mEF^{ex/ex}-Zellen für die Transduktion vorbereitet. Hierzu wurden $0,75 \cdot 10^5$ Zellen pro *well* einer *12-well-plate* ausgesät.

Auf die Transfektion der Phoenix-Zellen und das Vorbereiten der mEF^{ex/ex}-Zellen folgte am nächsten Tag die Transduktion der mEF^{ex/ex}-Zellen. Dazu wurde das Medium von den mEF^{ex/ex}-Zellen abgenommen und durch den Überstand der Phoenix-Zellen ersetzt. Dieser wurde zuvor über einen 0,45 μ l Spritzenfilter mit PES-Membran (Filtropur S0.45 ohne Vorfilter, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht) gereinigt. Zusätzlich wurde Polybren (Hexadimethrin-Bromid) in einer Endkonzentration von 8 μ g/ml zugegeben, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 1 000 g und Raumtemperatur folgte die Inkubation der mEF^{ex/ex}-Zellen im Brutschrank über 48 h. Im Anschluss wurde der Überstand der Phoenix-Zellen durch das entsprechende Selektionsmedium ersetzt. Für den Vektor pQCXI H (Hygromycinresistenz) wurde Hygromycin in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml und für den Vektor pQCXI P

(Puromycinresistenz) Puromycin in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Auf diesem Selektionsmedium wurden die transduzierten $\text{mEF}^{\text{ex/ex}}$ -Zellen gehalten, bis sich sichtbare Kolonien gebildet hatten, die gepickt und hochgezüchtet werden konnten.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Rolle der membran-proximalen Domäne und CANDIS hinsichtlich der *Shedding*-Aktivität von ADAM17

3.1.1 Produktion einer den IL-1RII stabil exprimierenden mEF^{ex/ex} Zelllinie

Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurden mEF^{ex/ex}-Zellen stabil mit dem IL-1RII-AP transfeziert. Es konnten drei Klone gewonnen werden, die den IL-1RII-AP stabil exprimieren. Nun sollte überprüft werden, ob sich die generierten Klone für Alkaline-Phosphatase-Aktivitätsassays eignen. Hierzu wurden die Zellen auf *six-well plates* ausgesät, allerdings nicht mit ADAM17 oder ADAM17-Konstrukten transfeziert. Nach zwei Tagen wiesen die Zellen eine 80 bis 90%ige Konfluenz auf und wurden mit den Stimulations-, Inhibitions- oder Kontrollansätzen behandelt. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und das AP-*Assay* wie beschrieben durchgeführt.

Da in diesem Fall von Interesse war, welche Menge des mit der AP-*getaggen* Substrates sich im Zellysat befand, wurde das Verhältnis zwischen der Aktivität der alkalinen Phosphatase in Lysat und Überstand gebildet (und nicht wie üblich umgekehrt).

$$ratio = \frac{\text{Aktivität der AP im Zellysat zum Zeitpunkt } t_{(PMA)}}{\text{Aktivität der AP im Überstand zum Zeitpunkt } t_{(PMA)}}$$

Wie in Abb. 3.1 zu sehen ist, weisen alle drei Klone eine gute Expression des IL-1RII-AP auf. Für weitere Experimente wurde Klon 17 ausgewählt, da dieser im Test die höchste AP-Aktivität aufwies. Dieser Klon wird im Folgenden als IL-1RII-mEF^{ex/ex} bezeichnet.

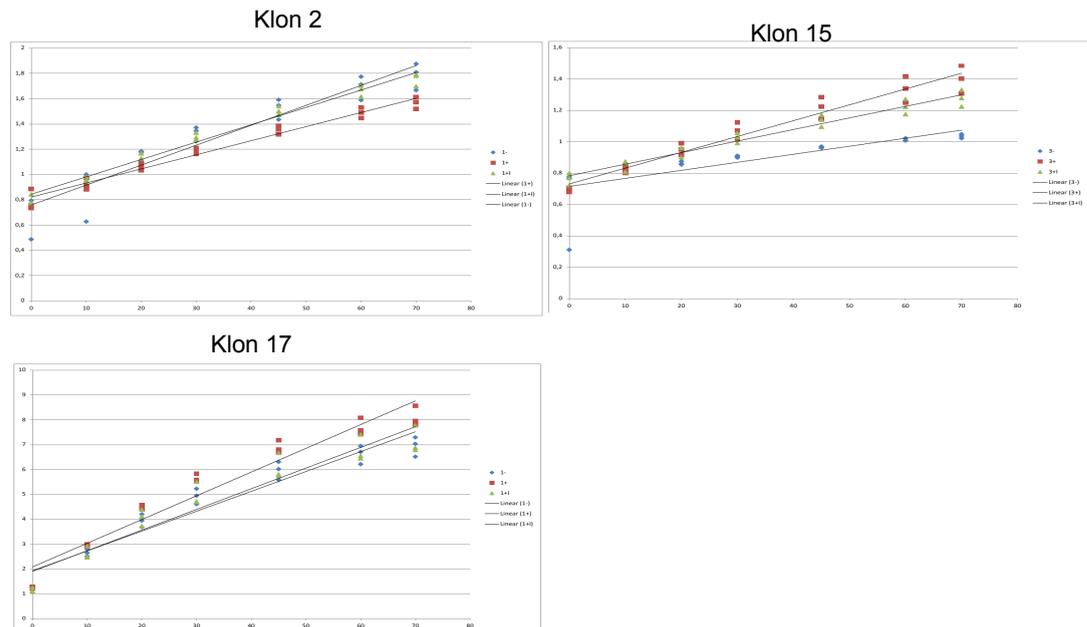


ABBILDUNG 3.1: Aktivitätstest der den IL-1R II-AP exprimierenden Klone
Für einen Test, ob der IL-1R II-AP von den ausgewählten Klonen tatsächlich exprimiert wird, wurde ein Aktivitätsassay durchgeführt, ohne die Zellen zuvor mit einem ADAM17-Konstrukt zu transfizieren. Zur Berechnung der Kinetik wurde die *Ratio* zwischen der Aktivität der alkalinen Phosphatase im Zellysate im Bezug auf die Aktivität im Überstand verwendet. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 70 min.

Im Folgenden wurden die Aktivität einzelner ADAM17-Chimären (siehe Abb. 3.2) untersucht. Als Referenz für eine normale ADAM17-Aktivität diente PC-getaggetes Wildtyp-ADAM17, die inaktive Mutante mut16 wurde als Nullwert verwendet. Die IL-1RII-mEF^{ex/ex} wurden wie beschrieben, ausgesät, transfiziert, stimuliert respektive inhibiert, geerntet und die Aktivität der alkalinen Phosphatase im Lysat und Überstand gemessen. Die Auswertung mehrerer dieser Aktivitäts-Assays ergab hohe Schwankungen zwischen den gemessenen Aktivitäten der einzelnen Chimären. Somit konnte kein signifikanter Unterschied im *Shedding* des IL-1RII-AP festgestellt werden.

3.1.2 Klonierung der ADAM17-Chimären in retrovirale Vektoren

Ziel der Arbeit war es, die in Abb. 3.2 aufgeführten murinen ADAM17-Chimären in den Vektor pQCXI P zu klonieren. Dieser Vektor enthält ein Puromycinresistenzgen. Zusätzlich sollten eine inaktive ADAM17-Mutante (mut16) und Wildtyp-ADAM17 sowohl in den Vektor pQCXI P als auch pQCXI H kloniert werden, um später eventuelle Co-expressionseffekte der Chimären mit Wildtyp-ADAM17 oder der mut16 zu untersuchen. Eine Aufzählung aller Chimären, ihrer *Tags* und der Vektoren, in welche diese kloniert wurden, kann Tab. 3.1 entnommen werden.

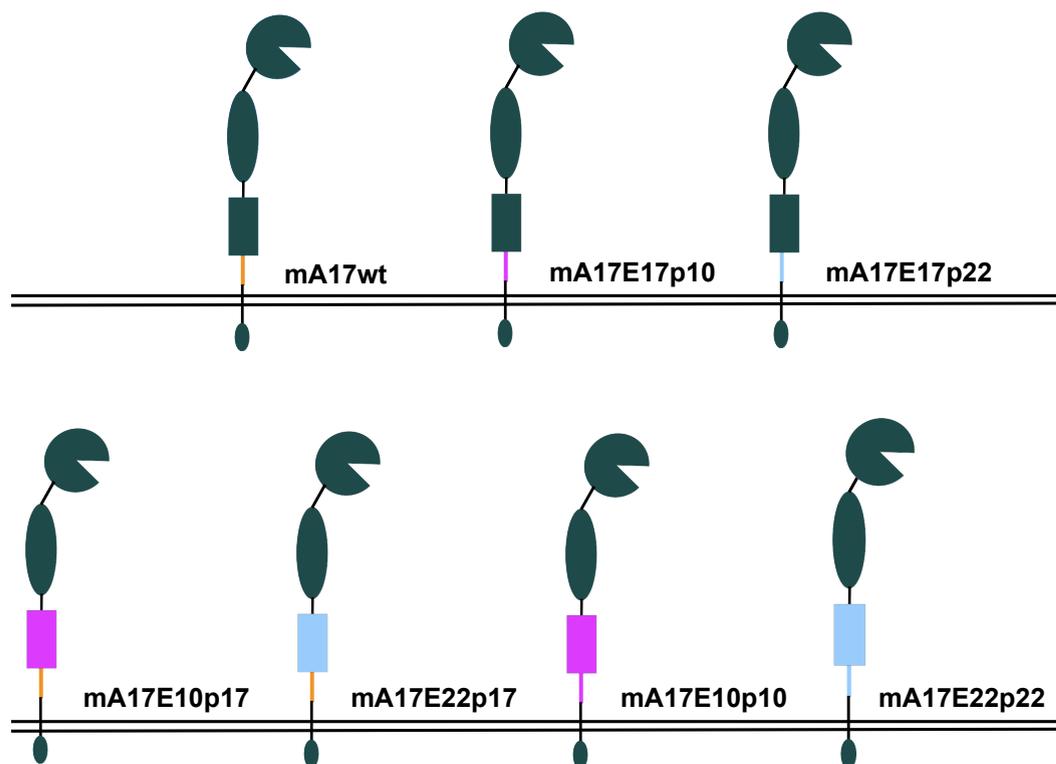


ABBILDUNG 3.2: Verwendete ADAM17-Chimären

Schematische Abbildung der in dieser Arbeit verwendeten murinen ADAM17-Chimären. Die MPD17 ist in türkis und CANDIS in orange abgebildet. Teile von ADAM22 sind in blau und Teile von ADAM10 in pink dargestellt.

Da der Klonierungsprozess bei allen zehn Klonierungen nach dem gleichen Schema durchgeführt wurde, wird im Folgenden exemplarisch die Klonierung der Chimäre mA17E22p17 (Kurzform: D) in den Vektor pQCXI P dargestellt.

Die Vektoren wurden, wie beschrieben, mit den Restriktionsenzymen AgeI und PacI (Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut, dephosphoryliert und die Verdauungsprodukte per

Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt. Die Chimäre wurde per PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase vervielfältigt. Dazu wurden die *Primer AgeI-forward* und *PacI-reverse* verwendet. Der Erfolg der PCR wurde per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, das PCR-Produkt gereinigt und mit den *FastDigest*-Enzymen AgeI und PacI verdaut. Im Anschluss wurden *Insert* und Vektor ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente *E. coli* transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillinzusatz ausgestrichen. Mit 20 Kolonien von diesen Platten wurde eine qualitative *Colony-PCR* mit der Go-Taq-Polymerase durchgeführt. Hierfür wurden die *Primer TaceB forward* und *Tace B reverse* verwendet, wodurch ein Leserahmen innerhalb des *Inserts* festgelegt wurde. Nach einer weiteren Gelelektrophorese (0.7%-iges Agarosegel, 100 V, 30 min) wurden acht Klone ausgewählt, bei welchen die *Colony-PCR* eine quantitativ hohe Vervielfältigung des *Inserts* aufzeigte.

Die ausgewählten Plasmide wurden durch eine Mini-Präparation vervielfältigt. Nach dem anschließenden Testverdau mit dem Restriktionsenzym NotI (Fermentas, St. Leon-Rot) und der Auftrennung der Fragmente per Gelelektrophorese (0.7%-iges Agarosegel, 100 V, 70 min) wurden zwei Klone ausgewählt. Mit diesen Klonen wurde eine Plasmid-DNA Midi-Präp durchgeführt und die Produkte sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte für beide Klone, dass das *Insert* korrekt in den Vektor kloniert wurde.

Vektor	<i>Insert</i>	Abkürzung	<i>Tag</i>
PQCXI H	mut16 (inaktive ADAM17-Mutante)	H+A	PC
PQCXI H	B41 (wt ADAM17)	H+B	PC
PQCXI P	mA17E22p17	H+D	HA
PQCXI P	mA17E22p22	H+E	HA
PQCXI P	mA17E17p10	H+F	HA
PQCXI P	mA17E10p17	H+G	HA
PQCXI P	mA17E10p10	H+H	HA
PQCXI P	B26_ 1 (wt ADAM17)	H+I	HA
PQCXI P	mut1 (inaktives wt ADAM17)	H+J	Flag

TABELLE 3.1: Übersicht durchgeführter Klonierungen

Es werden die retroviralen Vektoren, die Bezeichnungen der *Inserts* und deren jeweiliger *Tag* aufgeführt. Der Vektor pQCXI H enthält ein Hygromycinresistenzgen, der Vektor pQCXI P ein Puromycinresistenzgen.

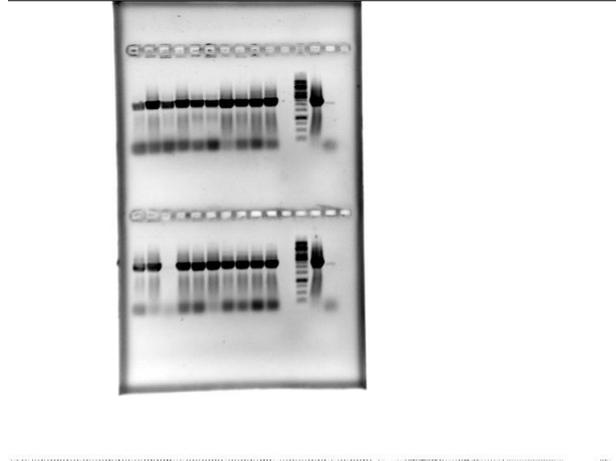


ABBILDUNG 3.3: Gelelektrophorese *Colony-PCR*

Gelelektrophorese der Produkte der *Colony-PCR* von 20 ausgewählten Klonen der Ligation des Inserts mA17E22p17, kurz D, in den Vektor pQCXI P. Die Elektrophorese erfolgte mit einem 0,7%-igen Agarosegel bei 100 V über 30 min.

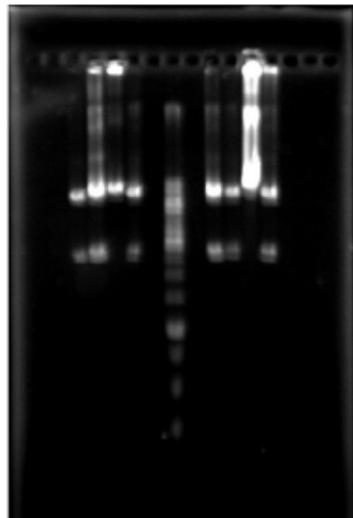


ABBILDUNG 3.4: Gelelektrophorese Testverdau

Gelelektrophorese des Testverdaus der acht ausgewählten Klone der Ligation des Vektors pQCXI P mit der cDNA der Chimäre mA17E22p17, kurz D. Die Produkte der Plasmid-Mini-Präparation wurden dazu mit dem Restriktionsenzym NotI verdaut und die Produkte auf einem 0,7%igen Agarosegel per Elektrophorese (100 V, 70 min) ihrer Größe nach aufgetrennt.

3.1.3 Retrovirale Transduktion von mEF^{ex/ex}

Nun wurden mEF^{ex/ex} mit dem in die Vektoren für eine retrovirale Transduktion umklonierten ADAM17-Chimären transduziert. Per Westernblot konnte gezeigt werden, dass die transduzierten Zelllinien sowohl mit dem Antikörper A300D, welcher gegen die Disintegrindomäne von ADAM17 gerichtet ist, als auch mit Antikörpern gegen die jeweiligen *Tags* der Konstrukte - PC-*Tag* im Falle von B41 und mut16 in pQCXI H und HA-*Tag* im Falle von mA17E22p22 in dem Vektor pQCXI P - nachgewiesen werden können.

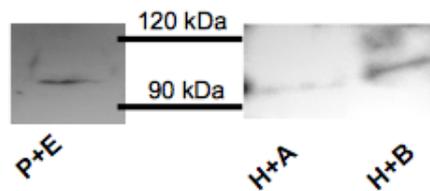


ABBILDUNG 3.5: Westernblot der mit dem IL-1RII stabil transduzierten mEF^{ex/ex} Westernblot zum Nachweis der erfolgreichen retroviralen Transduktion von mEF^{ex/ex}. Im Lysat aller vier transduzierten Zelllinien ist mit dem gegen die Disintegrin-Domäne von ADAM17 gerichteten Antikörper A300D ein Nachweis von ADAM17 zu erkennen.

3.2 Identifizierung des Bindungsepitops des humanen Interleukin-6 Rezeptors an CANDIS¹

3.2.1 Bindungsstudien mit IL-6R/IL-11R-Chimären

Für die im folgenden aufgeführten Immunopräzipitationen mit dem IL-6R, den IL-6R/IL-11R-Chimären und den IL-6R-Deletionsmutanten wurden zunächst die unter 2.1.7 aufgeführten Peptide an Sepharosebeads gekoppelt.

Alle Peptide enthalten die Sequenz gsggK, welche als *Linker* für die Kopplung an die Sepharosebeads dient. Das CANDIS-Peptid umfasst den konservierten Bereich von CANDIS zuzüglich einiger C-terminal gelegener Aminosäuren zur Stabilisierung der Struktur. Das als pA10 bezeichnete Peptid umfasst die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren der *Stalk*-Region von ADAM10, ist also gewissermaßen analog zu CANDIS in ADAM17. Das Kontrollpeptid (CP) besteht aus denselben Aminosäuren wie CANDIS, allerdings sind diese in zufälliger Reihenfolge angeordnet. Die Interaktion eines Substrates mit einem an Sepharosebeads gekoppelten Peptid wurde durch Detektion mittels Westernblot nachgewiesen.

Zunächst wurde untersucht, ob der hIL-6R mit seinen extrazellulären Domänen oder mit seiner *Stalk*-Region an CANDIS bindet. Deshalb wurde für die erste Immunopräzipitation eine IL-6R/IL-11R-Chimäre genutzt, welche aus den drei extrazellulären Domänen, der Transmembran- und intrazellulären Region des IL-6R besteht - die *Stalk*-Region

¹Die hier präsentierten Ergebnisse wurden bereits publiziert, siehe [14]

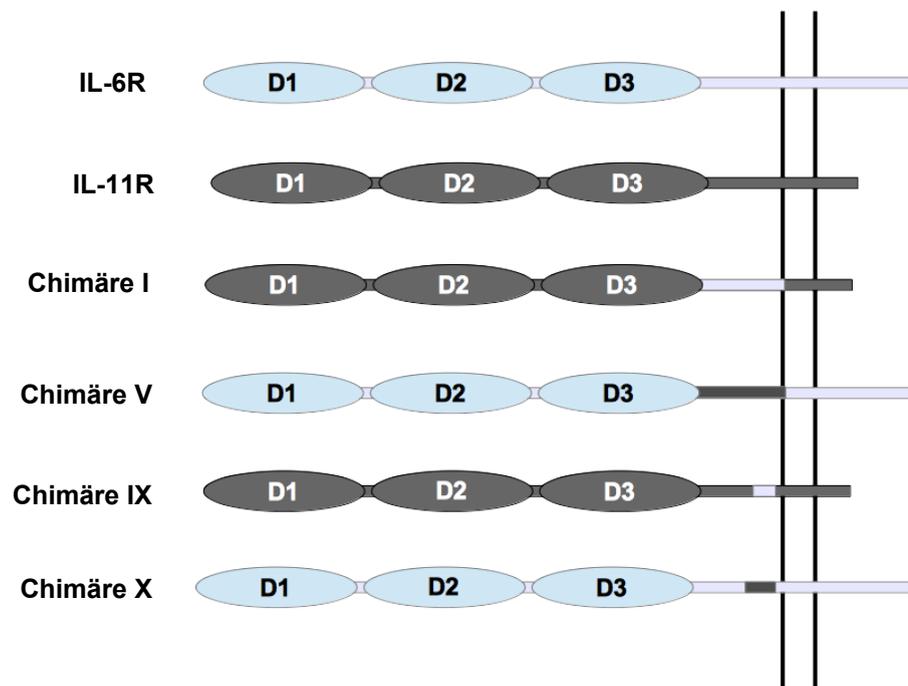


ABBILDUNG 3.6: Übersicht über die verwendeten IL-6R/IL-11R-Chimären
Dargestellt sind der Wildtyp-hIL-6R in hellblau, Wildtyp-hIL-11R in grau, sowie alle für die Immunpräzipitationen verwendeten IL-6R/IL-11R-Chimären.

wurde gegen die des IL-11R ausgetauscht. Das Konstrukt wird als Chimäre V bezeichnet (siehe Abb. 3.6). Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist, zeigte die Immunopräzipitation mit diesem Konstrukt keine Interaktion mit dem an die *Beads* gekoppelten CANDIS-Peptid auf. Ebenso war keine Bindung an eine der Kontrollen auszumachen. Es ist als ein Hinweis darauf zu werten, dass die drei extrazellulären Domänen des IL-6R nicht an der Bindung zu CANDIS beteiligt sind.

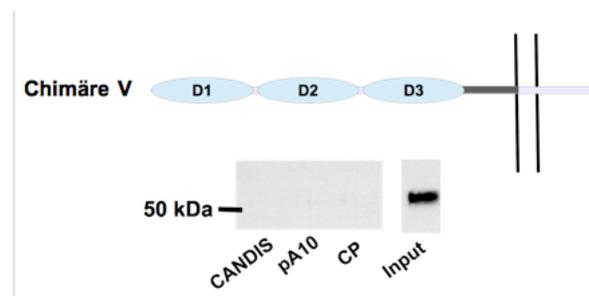


ABBILDUNG 3.7: Chimäre V: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation
Westernblot der Immunopräzipitation von Chimäre V mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden – CANDIS, pA10 und CP. Chimäre V weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch mit einer der verwendeten Kontrollen auf. Für den Nachweis der Chimäre V diente ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11).

Das nächste, hinsichtlich seiner Affinität zu CANDIS untersuchte Substrat, war Chimäre I, welche aus den extrazellulären Domänen, der Transmembran- und der intrazellulären Region des IL-11R sowie der *Stalk*-Region des IL-6R besteht (siehe Abbildung 3.6). Sie ist analog zu Chimäre V, wobei die Anteile der beiden Rezeptoren ausgetauscht sind. Hierbei zeigte sich, dass es möglich ist, diese Chimäre über CANDIS an die Sepharosebeads zu binden (siehe Abb. 3.8). Die *Stalk*-Region des IL-6R scheint eine Bindung zwischen dem hIL-6R und CANDIS zu vermitteln.

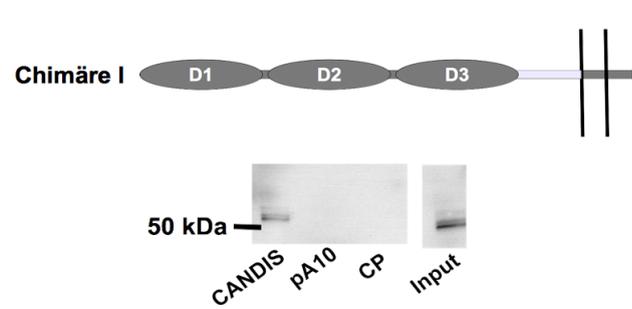


ABBILDUNG 3.8: Chimäre I: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation
Der Westernblot der Immunopräzipitation von Chimäre I mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP, zeigt, dass Chimäre I eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid, jedoch keine mit einer der verwendeten Kontrollen, aufweist. Für den Nachweis der Chimäre diente ein Antikörper gegen den N-terminalen myc-Tag (9E10).

Um zu untersuchen, ob die Region um die ADAM17-*cleavage site* in die Bindung des hIL-6R an CANDIS involviert ist, wurden für weiterführende Experimente die IL-6R/IL-11R-Chimären X und IX ausgewählt. Diese beiden Chimären unterscheiden sich vom IL-6R (im Falle von Chimäre X) beziehungsweise dem IL-11R (im Falle von Chimäre IX) nur in den zehn der Membran am nächsten gelegenen Aminosäuren. Diese wurden durch den analogen Bereich des jeweils anderen Rezeptors ersetzt. So ist Chimäre X bis auf die zehn C-terminalen Aminosäuren der *Stalk*-Region, welche durch die Sequenz des IL-11R ersetzt wurde, identisch mit dem IL-6R. Im Falle des IL-6R ist in diesem Bereich die ADAM17-Schnittstelle enthalten. Durch Austausch dieses Bereichs der *Stalk*-Region kann beim hIL-6R das *Shedding* durch ADAM17 inhibiert werden (Müllberg *et al.*). Wie auf Abb. 3.9 zu sehen ist, interagierte Chimäre X mit den CANDIS-*Beads*, aber nicht mit den Kontrollen. Chimäre IX hingegen wies (siehe Abb. 3.10) keine Affinität zu sämtlichen an die Sepharosebeads gekoppelten Peptiden auf. Hieraus lässt sich schließen, dass das CANDIS-Bindungssepitop im N-terminalen Bereich des IL-6R zu lokalisieren ist. Die Region um die *cleavage site* ist für diese Interaktion nicht relevant.

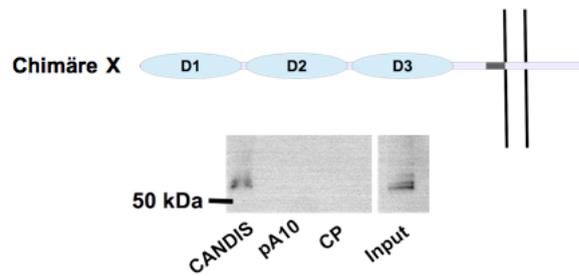


ABBILDUNG 3.9: Chimäre X: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation
 Westernblot der Immunopräzipitation von Chimäre X mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Chimäre X zeigte eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid, jedoch nicht mit einer der verwendeten Kontrollen. Für den Nachweis von Chimäre X wurde ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11) verwendet.

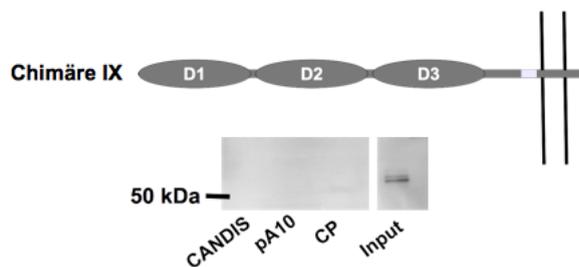


ABBILDUNG 3.10: Chimäre IX: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation
 Chimäre IX enthält N-terminal einen myc-Tag. Westernblot der Immunopräzipitation von Chimäre IX mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Chimäre IX weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch den verwendeten Kontrollen auf. Für den Nachweis von Chimäre IX diente ein Antikörper gegen den N-terminalen myc-Tag.

3.2.2 Bindungsstudien mit hIL-6R Deletionsmutanten

Im Folgenden sollte das Bindungssepitop des hIL-6R an CANDIS weiter eingegrenzt werden. Hierfür wurden die gleichen hIL-6R-Deletionsmutanten verwendet, mit welchen Baran *et al.* ihre *Shedding*-Experimente durchgeführt haben [1].

Für das erste Experiment wurde eine Deletionsmutante ausgewählt, bei welcher die *Stalk*-Region lediglich aus den ersten 16 Aminosäuren im N-terminalen Bereich bestand. Die Aminosäuren 333 bis 362 waren deletiert (hIL-6R Δ A_{333-V362}) (siehe Abb. 3.11). Im Experiment zeigt sich eine deutliche Interaktion mit den CANDIS-*Beads*, nicht jedoch mit den Kontrollen (siehe Abb. 3.12). Daher wird vermutet, dass der N-terminale Bereich der *Stalk*-Region für die spezifische Interaktion mit CANDIS notwendig ist. Um diese Annahme zu unterstützen, wurde eine Deletionsmutante, bei welcher dieser Teil fehlt, verwendet. Die Aminosäuren 317 bis einschließlich 352 sind deletiert (hIL-6R Δ E_{317-T352},

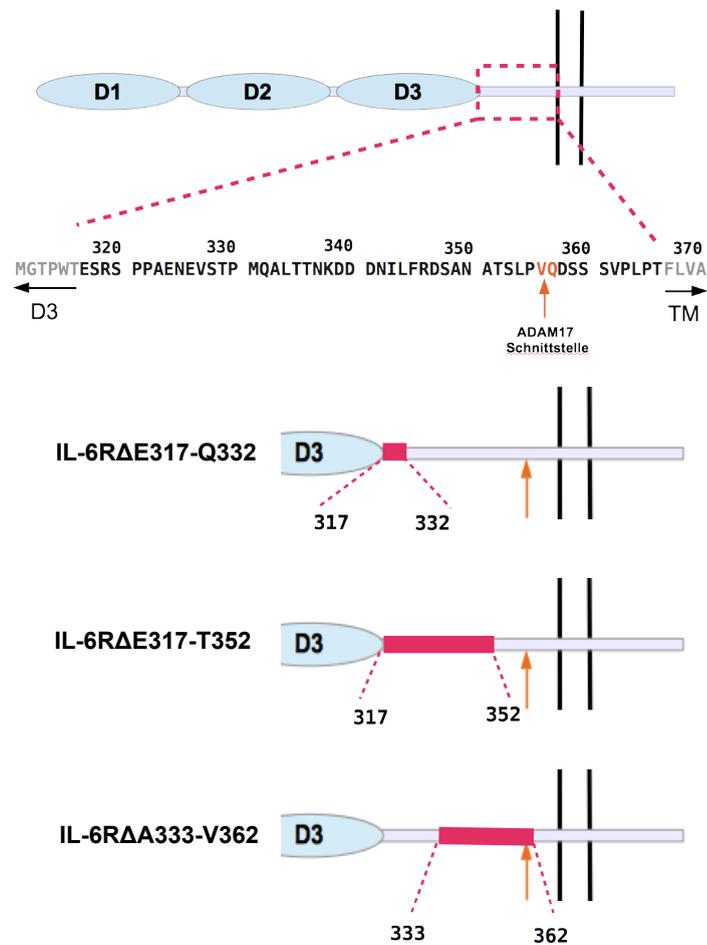


ABBILDUNG 3.11: hIL-6R Deletionsmutanten
Schematische Darstellung des hIL-6R, seiner *Stalk*-Region und der verwendeten hIL-6R Deletionsmutanten.

siehe Abb. 3.11). Diese Mutante zeigte mit keinem der an die Sepharosebeads gekoppelten Peptide eine Interaktion (siehe Abb. 3.13).

Da mit den vorherigen Experimenten das Bindungsepitop des IL-6R an die CANDIS auf eine Länge von 16 Aminosäuren eingegrenzt werden konnte, wurde von Christoph Garbers (CAU Kiel) eine hIL-6R-Deletionsmutante generiert, die diese 16 N-terminalen Aminosäuren der *Stalk*-Region fehlen (hIL-6RΔE₃₁₇-Q₃₃₂) (siehe Abb. 3.11). In der Immunopräzipitation zeigt die Mutante hIL-6RΔE₃₁₇-Q₃₃₂ weder eine Interaktion mit CANDIS noch mit einer der verwendeten Kontrollen (siehe Abb. 3.14). Daraus kann also

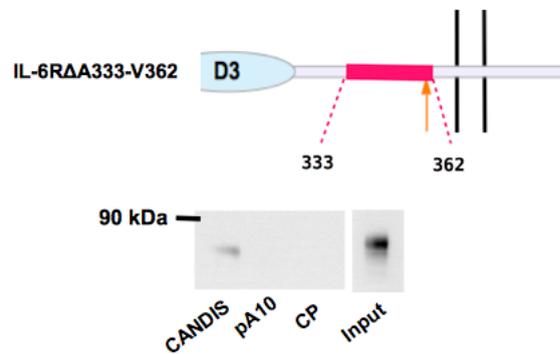


ABBILDUNG 3.12: hIL-6R Δ A₃₃₃-V₃₆₂: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation der Deletionsmutante hIL-6R Δ A₃₃₃-V₃₆₂ mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid, jedoch mit keiner der Kontrollen auf. Für den Nachweis des IL-6R diente ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11).

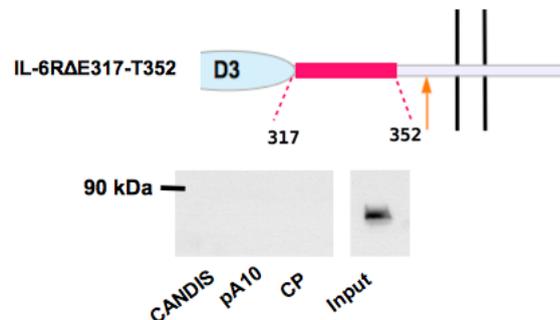


ABBILDUNG 3.13: hIL-6R Δ E₃₁₇-T₃₅₂: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation der Deletionsmutante hIL-6R Δ E₃₁₇-T₃₅₂ mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch mit einer der Kontrollen auf. Für den Nachweis des IL-6R diente ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11).

gefolgert werden, dass die Aminosäuren 317 bis 332 der *Stalk*-Region des hIL-6R für die Bindung dieses Rezeptors an CANDIS essentiell sind.

3.3 Bindungsstudien mit weiteren ADAM17-Substraten

Nach dem gleichen Vorgehen wie mit dem IL-6R/IL-11R-Chimären beziehungsweise den Deletionsmutanten des hIL-6R wurden mögliche Interaktionen des CANDIS-Peptids und den zur Kontrolle verwendeten Peptiden, pA10 und CP, mit dem löslichen IL-6R (sIL-6R) und Hyper-IL-6 untersucht (siehe Abb. 3.15, beide Proteine von CONARIS). Das als Hyper-IL-6 bezeichnete Protein besteht aus IL-6, welches bereits an eine lösliche Form des IL-6R gebunden ist. Somit kann Hyper-IL-6 direkt mit gp130 interagieren

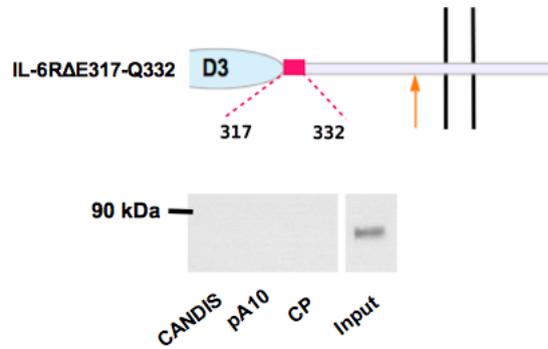


ABBILDUNG 3.14: hIL-6RΔE₃₁₇-Q₃₃₂: Schematische Darstellung und Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation der Deletionsmutante IL-6RΔE₃₁₇-Q₃₃₂ mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch mit einer der Kontrollen auf. Für den Nachweis des IL-6R diente ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11).

und IL-6-*Transsignaling* unabhängig von sIL-6R vermitteln. Hierbei zeigte sich, dass das verwendete Hyper-IL-6 weder mit dem CANDIS-Peptid noch mit den Kontrollen interagiert. Der lösliche IL-6R (sIL-6R) bindet hingegen das CANDIS-Peptid (vergleiche Abb. 3.16 und 3.17).

IL-6R-Anteil HyperIL-6

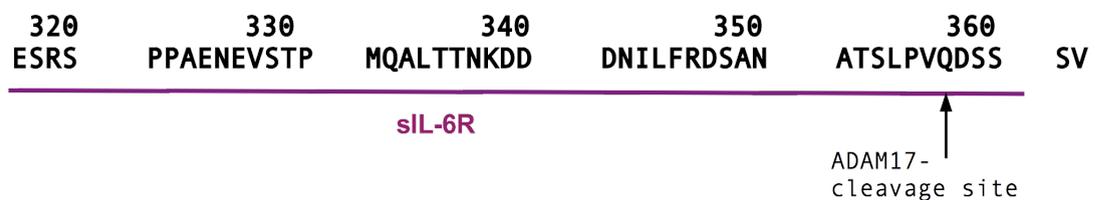


ABBILDUNG 3.15: Vergleich der Sequenzen von Hyper-IL-6 und sIL-6R. Schematische Darstellung, welche Anteile der *Stalk*-Region die jeweiligen verwendeten IL-6R-, sIL-6R- und Hyper-IL-6-Konstrukte enthalten. In schwarz ist die Aminosäuresequenz der *Stalk*-Region des IL-6R dargestellt. Blau unterstrichen ist der Bereich der *Stalk*-Region, welchen der IL-6R-Anteil des Hyper-IL-6 enthält; lila unterstrichen der Bereich der *Stalk*-Region, welchen das lösliche IL-6R-Peptid (sIL-6R) enthält. Die ADAM17-*cleavage site* wurde durch einen Pfeil markiert.

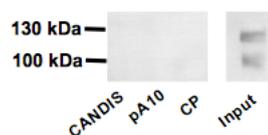


ABBILDUNG 3.16: Hyper-IL-6: Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation von Hyper-IL-6 mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch mit einer der Kontrollen auf. Für den Nachweis des IL-6R-Anteil des Hyper-IL-6 diente ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11).

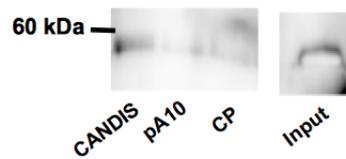


ABBILDUNG 3.17: löslicher IL-6R: Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation des sIL-6R mit den an Sepharose *beads* gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid, jedoch mit keiner der Kontrollen auf. Für den Nachweis des sIL-6R diente ein Antikörper gegen den extrazellulären Teil des hIL-6R (4-11).

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob neben dem IL-6R weitere ADAM17-Substrate mit CANDIS interagieren. Hierfür wurde die Immunopräzipitation analog zu den oben beschriebenen Experimenten mit den ADAM17-Substraten IL-1RII und TNF- α durchgeführt. Zur besseren Detektion mittels Westernblot wurden Konstrukte verwendet, welche einen *myc-Tag* enthalten. In keiner der Proben konnte der IL-1RII nachgewiesen werden (vergleiche Abb. 3.18). Wie an der *Input*-Kontrolle zu erkennen ist, wurde dieser jedoch gut von den zur Expression verwendeten Zellen exprimiert.

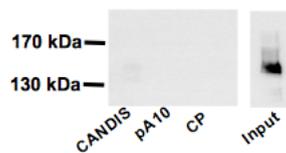


ABBILDUNG 3.18: L-1RII: Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation des IL-1RII-AP mit den an Sepharose *beads* gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch mit einer der verwendeten Kontrollen auf. Für den Nachweis des IL-1RII-AP diente ein Antikörper gegen den *myc-Tag* (9E10).

Das Typ-II-Transmembranprotein TNF α zeigt im Experiment keine spezifische Interaktion mit dem CANDIS-Peptid. Die leichten Banden, die auf dem Westernblot auszumachen sind (siehe Abb. 3.19), sind höchstwahrscheinlich auf unspezifische Interaktionen mit den *Beads* zurückzuführen, da diese Bande in allen Proben in einem vergleichbaren Ausmaß auftritt.

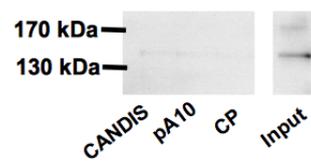


ABBILDUNG 3.19: TNF- α : Immunopräzipitation

Westernblot der Immunopräzipitation des TNF- α -AP mit den an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-, pA10- und Kontrollpeptiden, CANDIS, pA10 und CP. Die Mutante weist weder eine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid noch mit einer der Kontrollen auf. Für den Nachweis des TNF- α -AP diente ein Antikörper gegen den *myc-Tag* (9E10).

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Rolle der membran-proximalen Domäne und CANDIS hinsichtlich der *Shedding*-Aktivität von ADAM17

Durch stabile Transfektion mit IL-1RII-AP konnten drei Klone generiert werden, welche das erwünschte ADAM17-Substrat stabil exprimieren. Durch ein Alkaline-Phosphatase-Aktivitätsassay zur Messung der Aktivität der alkalinen Phosphatase konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt im Überstand im Vergleich zum Zellysat nur in vernachlässigbarer Menge zu finden ist.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass das Verhältnis zwischen der AP-Aktivität in Lysat und dem Überstand in den mit PMA, Marimastat und DMSO behandelten Ansätzen keine Unterschiede aufweisen, was für die geplanten Aktivitätsmessungen von ADAM17 in diesem System systematische Fehler durch die Beteiligung anderer in den mEF^{ex/ex} endogen exprimierter Proteasen nahezu ausschließt.

Ein Aktivitätsassay mit dem Klon 17 der IL-1RII-AP-mEF^{ex/ex}, welcher zuvor zusätzlich transient mit ADAM17 beziehungsweise der inaktiven ADAM17-Mutante mut16 transfiziert wurden, zeigte zudem, dass der IL-1RII-AP in diesen Zellen durch ADAM17 von der Zelloberfläche geschnitten werden kann. Somit sind diese Zellen für die Überprüfung des *Sheddings* des IL-1RII durch ADAM17 geeignet (Daten nicht gezeigt). Zur

Durchführung von ADAM17-Aktivitäts*assays* mit Klon 17 der IL-1RII-mEF^{ex/ex} wurde zunächst ein Protokoll etabliert, mit welchem eine möglichst hohe Expression der transient transfizierten Konstrukte erzielt werden soll. Die Aktivitäts*assays* zur Überprüfung des *Sheddings* des IL-1RII-AP durch die verschiedenen Chimären im Vergleich zu Wildtyp-ADAM17 ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitäten der einzelnen ADAM17-Chimären im Vergleich zu Wildtyp ADAM17. Zudem waren zum Teil sehr große Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen zu beobachten. Dies ist vermutlich weniger darauf zurückzuführen, dass die Chimären keine signifikanten Differenzen in ihrer Aktivität aufwiesen, als vielmehr darauf, dass die Expression der einzelnen transient transfizierten Konstrukte stark variierte. Trotz eines auf diese Zelllinie angepassten Protokolls für die transiente Transfektion wurden wahrscheinlich die transient transfizierten ADAM17-Chimären im Vergleich zu dem stabil transfizierten Substrat in einem wesentlich geringeren Maße auf der Zelloberfläche exprimiert.

Daraus folgte unter anderem, dass nach Induktion der ADAM17-Aktivität durch PMA und zweistündiger Inkubation bei 37°C immer noch ein großer Anteil des mit der alkalinen Phosphatase fusionierten ADAM17-Substrates auf der Zelloberfläche zurückgeblieben war. Infolgedessen wurde eine sehr hohe Aktivität der alkalinen Phosphatase im Zellysate und eine vergleichsweise geringe Aktivität im Überstand gemessen. Schon geringe Schwankungen der im Lysat gemessenen Aktivität konnten somit große Schwankungen im berechneten Verhältnis verursachen. Diese Schwankungen können ebenfalls auf einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen pro geerntetem *well*, die nicht vermieden werden können, beruhen. Da der IL-1RII-AP auf diesen Zellen so gut exprimiert wurde, können selbst marginale Unterschiede in der Zellzahl der einzelnen *wells* große Schwankungen in den gemessenen Aktivitäten der alkalinen Phosphatase verursachen. Zusätzliche Schwankungen konnten auch durch unterschiedliche Expressionsraten des IL-1RII-AP auftreten.

Letztendlich kann im Bezug auf die Ergebnisse der Aktivitäts*assays* nicht sicher gesagt werden, ob die fehlende Signifikanz der Messergebnisse tatsächlich darauf zurückzuführen ist, dass die Aktivität der Chimären hinsichtlich des *Sheddings* des IL-1RII keinen Unterschied aufwiesen. Deshalb gilt es nun, ein neues experimentelles *Setting* zu finden, welches eine zuverlässige Messung der *Shedding*-Aktivität der einzelnen ADAM17-Chimären erlaubt.

Dass ein Unterschied im *Shedding* des IL-1RII-AP durch ADAM17-Chimären, deren membranproximale Domäne beziehungsweise CANDIS durch die entsprechenden Teile anderer Mitglieder der ADAM17-Familie ausgetauscht wurde, besteht, wurde bereits durch Experimente von Stefan Düsterhöft nachgewiesen (bisher unveröffentlichte Daten). Für dieses Experiment wurden mEF^{ex/ex} sowohl mit dem IL-1RII-AP als auch mit den entsprechenden ADAM17-Chimären, Wildtyp ADAM17 und der inaktiven ADAM17-Mutante mut16 transient transfiziert.

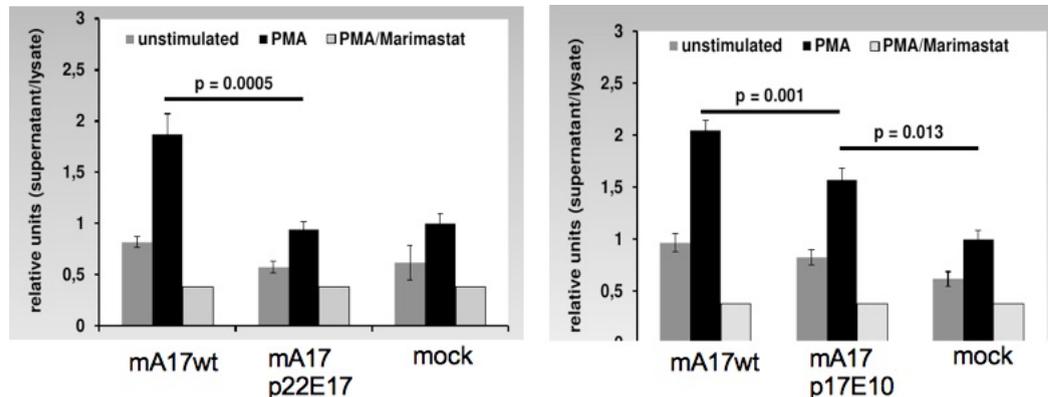


ABBILDUNG 4.1: Aktivitätsassay zweier ADAM17-Chimären
 Als Substrat diente der IL-1RII-AP. Die Chimäre mA17E22p17, bei welcher die MPD17 durch die EGF-like Domäne von ADAM22 ersetzt wurde, prozessiert das Substrat nicht. Die Chimäre mA17E17p10, bei welcher CANDIS durch die 14 Aminosäuren lange Sequenz von ADAM10 ersetzt wurde, welche direkt C-terminal an die MPD10 anschließt, prozessiert den IL-1RII-AP allerdings in einem signifikant geringeren Maße als Wildtyp-ADAM17. Die Experimente wurden von Stefan Düsterhöft (Biochemisches Institut der Universität Kiel) durchgeführt.

Wie dem Aktivitätsassay gut zu entnehmen ist, schneidet die Chimäre, deren membranproximale Domäne gegen die EGF-like Domäne von ADAM22 ausgetauscht wurde (mA17E22p17), den IL-1RII-AP nicht von der Zelloberfläche. Die Chimäre hingegen, deren CANDIS gegen die korrespondierende Aminosäuresequenz von ADAM10 ausgetauscht wurde (mA17E17p10), ist noch immer in der Lage den Rezeptor in seine lösliche Form überzuführen. Allerdings ist die *Shedding*-Aktivität der Chimäre mA17E17p10 im Vergleich zu Wildtyp-ADAM17 signifikant reduziert. Diese Reduktion der *Shedding*-Aktivität der Chimäre ist ein Hinweis darauf, dass ein Austausch von CANDIS einen Einfluss auf die Effizienz von ADAM17-vermittelten *Shedding* hat. Allerdings scheint das Vorhandensein der CANDIS hierfür nicht von essentieller Bedeutung zu sein. Ein Austausch der membranproximalen Domäne hingegen resultiert in einer Inaktivierung von ADAM17. In Anbetracht der Tatsache, dass die membranproximale Domäne eine

Rolle bei der Bindung des IL-1RII an ADAM17 spielt und einen Schalter für die *Shedding*-aktivität von ADAM17 darstellt, überrascht dieses Ergebnis nicht [15, 32].

Die typischen Mitglieder der ADAM-Familie wie ADAM22 besitzen eine EGF-*like* Domäne, wohingegen ADAM10 und ADAM17 als atypische Vertreter der ADAMs anstelle der cysteinreichen und EGF-*like* Domänen eine sogenannte membran-proximale Domäne besitzen [50]. Deshalb wäre es von großem Interesse zu untersuchen, ob und wie sich ein Austausch der membran-proximalen Domäne von ADAM17 durch die von ADAM10 auswirkt, wobei es zu beachten gilt, dass die membran-proximale Domäne von ADAM10 im Gegensatz zu der von ADAM17 nicht redoxsensitiv ist.

Weiterhin wird vermutet, dass die EGF-*like* Domäne der typischen Mitglieder der ADAM-Familie zur Regulation der Substratbindung an die cysteinreiche Domäne und Bindung an Proteoglykane an der Zelloberfläche beteiligt ist [53]. Von CANDIS ist vor kurzem gezeigt worden, dass sie mit der Zellmembran interagiert [14]. Es wäre eine durchaus denkbare Möglichkeit, dass diese Aufgaben, die der EGF-*like* Domäne der typischen ADAMs zugesprochen wird, bei ADAM17 zumindest partiell von CANDIS übernommen werden.

Des Weiteren wäre es notwendig zu überprüfen, ob sich vergleichbare Unterschiede in der Aktivität zwischen den Chimären und dem Wildtyp auch beim *Shedding* anderer ADAM17-Substraten zeigen. Hierbei wäre in der ersten Linie der IL-6R von Interesse, da dieser hauptsächlich an CANDIS zu binden scheint und somit zu erwarten wäre, dass ein Austausch der CANDIS einen Abfall in der *Shedding*-Aktivität bewirkt. Ein weiteres Substrat, das sich für derartige *Shedding-Assays* anbietet, ist membran-gebundenes TNF- α (proTNF- α). In bisherigen Untersuchungen hat proTNF- α keine Bindungsaffinität an die membran-proximale Domäne oder CANDIS gezeigt (siehe auch 4.2.2). Außerdem gehört TNF- α im Gegensatz zum IL-1 RII und IL-6 zu den Typ II-Transmembranproteinen. Es wurde bereits gezeigt, dass ein ADAM17-Konstrukt, bei welchem der C-terminale Teil ab der membran-proximalen Domäne durch die entsprechenden Anteile von ADAM10 ersetzt wurden, den p75 TNF-R und proTNF- α im gleichen Maße schneiden konnte wie

Wildtyp-ADAM17. Der IL-1RII hingegen nicht mehr *shedded* werden konnte [42]. Dieselben Resultate ergab das analog durchgeführte Experiment mit einem Konstrukt, bei welchen allein die Disintegrindomäne durch die von ADAM10 ersetzt worden war [42].

Gerade im Hinblick auf das *Shedding* von proTNF- α ist interessant, dass löslich exprimiertes ADAM17 – nur bestehend aus dem extrazellulären Anteil der Protease – in einem zellfreien System in der Lage ist proTNF- α spezifisch zu spalten [4]. Es bleibt festzustellen, dass Zellen, welche die ADAM17-Chimären nach retroviraler Transduktion stabil exprimieren und transient mit den entsprechenden ADAM17-Substraten transfeziert werden können, ein gutes Modell darstellen, um weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung anzuschließen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene ADAM17-Chimären, Wildtyp ADAM17 und eine inaktive ADAM17-Mutante in Vektoren zur retroviralen Transduktion kloniert. Mit dreien dieser Konstrukte konnten bereits stabil transduzierte mEF^{ex/ex}-Zelllinien generiert werden. Die Expression dieser Konstrukte wurde mittels Westernblot nachgewiesen.

4.2 Interaktion der CANDIS mit ADAM17-Substraten

4.2.1 Identifizierung des Bindungsepitopes des hIL-6R an CANDIS

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die *Stalk*-Region des hIL-6R mit der CANDIS von ADAM17 interagiert. Chimäre V, hIL-6R mit der *Stalk*-Region des IL-11R, konnte nicht mit den CANDIS-*Beads* gezogen werden, wohingegen Chimäre I, hIL-11R mit der *Stalk*-Region des hIL-6R, ein positives Ergebnis in der Immunopräzipitation ergab, also scheinbar in der Lage ist an CANDIS zu binden. Es war keine Interaktion mit den Kontrollen zu erkennen.

Aus den Daten von Baran *et al.* [1] konnte bereits die Vermutung angestellt werden, dass Bindungsepitop und Schnittstelle des hIL-6R für ADAM17 nicht identisch sind. So konnten Deletionsmutanten des hIL-6R nicht von ADAM17 von der Zelloberfläche geschnitten werden, obwohl der C-terminale Teil der *Stalk*-Region inklusive der

cleavage site intakt war. Dieser Verdacht konnte mithilfe von zwei weiteren IL-6R/IL-11R-Chimären bestätigt werden. Die Chimäre X, hIL-6R, bei dem die zehn C-terminalen Aminosäuren der *Stalk*-Region, inklusive der ADAM17 *cleavage site*, durch die des hIL-11R ersetzt worden waren, wies eine Interaktion mit CANDIS auf, wohingegen Chimäre IX, hIL-11R, bei welchem die zehn C-terminalen Aminosäuren der *Stalk*-Region durch die des hIL-6R inklusive der ADAM17-Schnittstelle ersetzt worden waren, nicht mit den CANDIS-*Beads* gezogen werden konnte. Somit konnte auch im *pull down*-Experiment gezeigt werden, dass die Bindung des hIL-6R an CANDIS von einer Region N-terminal der ADAM17-Schnittstelle vermittelt wird. Für eine weitere Eingrenzung der Lage des Bindungsepitopes des hIL-6Rs wurde auf Mutanten des hIL-6R zurückgegriffen, bei welchen unterschiedliche Teile der *Stalk*-Region deletiert worden waren. Es handelt sich um dieselben Mutanten, welche schon von Baran *et al.* verwendet wurden, um das *Shedding* des hIL-6R abhängig von der Länge der *Stalk*-Region zu charakterisieren.

Um zu untersuchen, ob der C-terminale Bereich der *Stalk*-Region an der Bindung zwischen Protease und dem hIL-6R involviert ist, wurde die Deletionsmutante hIL-6R Δ A₃₃₃-V₃₆₂ verwendet. Bei dieser Deletionsmutante fehlt der Bereich A₃₃₃ bis V₃₆₂. Die Mutante war noch immer in der Lage, mit dem CANDIS-Peptid zu interagieren. Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, dass ein potentielles CANDIS-Bindungsepitop in der *Stalk*-Region des hIL-6R N-terminal von A₃₃₃ lokalisiert sein müsste. Deshalb wurde für das nächste Experiment die Mutante hIL-6R Δ E₃₁₇-T₃₅₂, bei der dieser Bereich von der Deletion betroffen ist, ausgewählt. In der Tat konnte keine Interaktion zwischen CANDIS und hIL-6R Δ E₃₁₇-T₃₅₂ nachgewiesen werden.

Für eine weitere Bestätigung wurde eine Deletionsmutante generiert, welcher die Sequenz zwischen E₃₁₇ und Q₃₃₂ fehlte. Diese Mutante zeigte keine Interaktion mit dem CANDIS-Peptid. Ebenso wurde durch Christoph Garbers gezeigt, dass diese Mutante im Vergleich zum *full length* hIL-6R in einem signifikant geringeren Maße durch ADAM17 von der Zelloberfläche geschnitten werden kann, obwohl sie die ADAM17 *cleavage site* enthält. Das verminderte *Shedding* durch ADAM17 ist somit höchstwahrscheinlich auf eine reduzierte Bindung zwischen Substrat und Protease zurückzuführen.

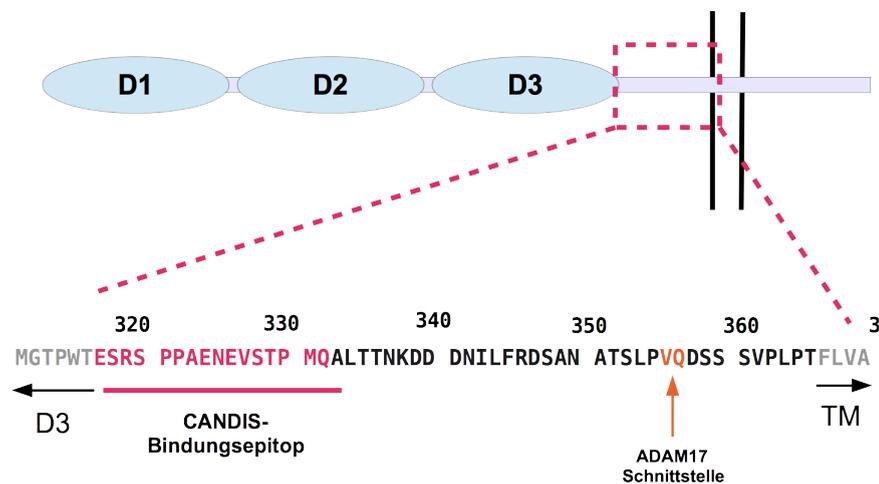


ABBILDUNG 4.2: CANDIS-Bindungsepitop des hIL-6R

Schema des hIL-6R und Sequenz der *Stalk*-Region des hIL-6R. Das mögliche Bindungsepitop an CANDIS ist rot hervorgehoben. Die ADAM17 *cleavage site* ist zwischen Q₃₅₇ und D₃₅₈ lokalisiert (mit Pfeil gekennzeichnet), TM: Transmembranregion.

Somit konnte das Bindungsepitop des hIL-6R an die CANDIS auf die in Abbildung 4.2 dargestellte Sequenz eingegrenzt werden. Ein Peptid bestehend aus dieser Aminosäuresequenz wies bei einer Messung mittels CD eine *random coil* Struktur – ungefaltet – auf. Zudem war es nicht möglich, eine Interaktion von diesem Peptid, welches über einen *Linker* an Sepharosebeads gekoppelt wurde (vergleichbar zur Kopplung des CANDIS-Peptids an Sepharosebeads) mit inaktivem *full length* ADAM17 oder MPD-CANDIS-GPI zu zeigen [14]. Gleichwohl gilt es hier fest zu halten, dass Interaktionen in einem zellfreien Experiment immer wesentlich schwächer ausgeprägt sind als in einem *in vitro*-setting. Zudem gilt es zu klären, inwieweit eine Interaktion von CANDIS mit der Zellmembran möglicherweise die Bindungseigenschaften dieser Sequenz beeinflusst [14].

Die in den *Shedding*-Experimenten mit hIL-6R Δ E₃₁₇-Q₃₃₂ zu beobachtende Restaktivität könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Bindung des IL-6R an ADAM17 nicht allein durch CANDIS vermittelt wird. So wurde mittlerweile auch eine Interaktion zwischen der membran-proximalen Domäne allein (ohne CANDIS) und dem hIL-6R nachgewiesen werden (Stefan Düsterhöft, bisher unveröffentlichte Daten). Zudem werden durch die Deletion dieser Sequenz keine umfassenden Änderungen in der Struktur des humanen IL-6 Rezeptors erwartet [14].

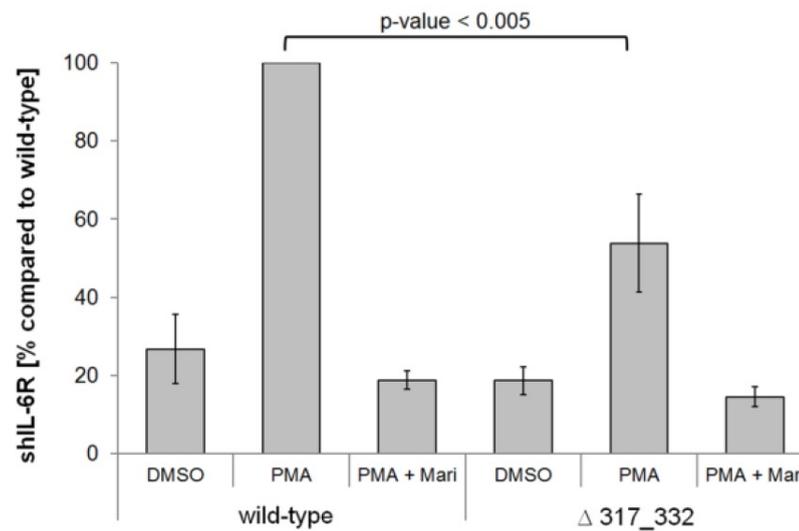


ABBILDUNG 4.3: *Shedding* der Deletionsmutante IL-6R Δ E₃₁₇-Q₃₃₂ durch ADAM17
 Vergleich des *Sheddings* des Wildtyp hIL-6R und der Deletionsmutante L-6R Δ E₃₁₇-Q₃₃₂, bei welcher das mögliche CANDIS-Bindungssepitop fehlt, durch ADAM17. Die Deletionsmutante wird in einem signifikant geringeren Maße von ADAM17 prozessiert als der Wildtyp-hIL-6R. Das Experiment wurde von Christoph Garbers (biochemisches Institut der Universität Kiel) durchgeführt.

In Verbindung mit früheren Ergebnissen zum *Shedding* von hIL-6R Mutanten durch ADAM17 scheint es schlüssig, dass die Interaktion zwischen CANDIS und dem hIL-6R auf der dreidimensionalen Struktur des N-terminalen Bereichs der *Stalk*-Region beruht. Das identifizierte Bindungssepitop hat definitiv keinen α -helikalen Charakter [14]. Es wäre ebenfalls möglich, dass die Bindung vom Abstand der Domänen zur Plasmamembran abhängt [1]. Diese Überlegungen konnten in den durchgeführten zellfreien Experimenten nicht mit berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wäre es wichtig alle Ergebnisse mit *Shedding*-Experimenten zu überprüfen.

Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle nahe der Schnittstelle des IL-6R wird tatsächlich auch als solche verwendet, allerdings hat diese Glykosylierung keinen Einfluss auf das *Shedding* des Rezeptors von der Zelloberfläche [36]. Ein weiterer wichtiger Punkt bezüglich des *Sheddings* des IL-6R durch ADAM17 ist, dass dieses speziesspezifisch zu sein scheint. Wie bereits angemerkt ist CANDIS bei verschiedenen Spezies, auch zwischen Mensch und Maus, hochkonserviert (siehe auch 1.2), die *Stalk*-Region des IL-6R ist es jedoch nicht. Garbers *et al.* zeigten, dass murines ADAM17 nicht die Haupt*shed*dase des murinem IL-6R ist. Nach PMA-Stimulation kann murines ADAM17 den humanen, nicht

aber den murinen IL-6R schneiden. Humanes ADAM17 hingegen kann beide Rezeptoren proteolytisch spalten [19]. Deshalb wäre es interessant, welches Bindungsverhalten Chimären des humanen und murinen IL-6R an CANDIS und die membran-proximale Domäne zeigen.

Im Gegensatz zu ADAM17, welches den hIL-6R nach erst nach Stimulation prozessiert, erfolgt das *Shedding* durch ADAM10 konstitutiv. Allerdings sind die ADAM17- und ADAM10-Schnittstellen nicht identisch. Eine Deletionsmutante ohne die ADAM17-Schnittstelle, hIL-6R Δ S₃₅₃-V₃₆₂, konnte immer noch von ADAM10 proteolytisch gespalten werden [1]. Diesbezüglich wäre es zunächst wichtig die Schnittstelle für ADAM10-vermitteltes *Shedding*, das Bindungsepitop und die Domäne von ADAM10, über welche die Bindung vermittelt wird, zu finden, um weitere Vergleiche anstellen zu können.

Nach wie vor ist für die meisten Substrate noch nicht geklärt, ob sich diese zum *Shedding* durch ADAM17 auf derselben Zelle – also in *cis* – oder auf einer anderen Zelle – in *trans* – exprimiert werden müssen. Von ADAM10 ist berichtet worden, dass der Rezeptortyrosinkinase-Ligand Ephrin, nachdem dieser an Eph gebunden hat, in *trans* prozessiert wird [28]. Allerdings ist für proTNF- α bekannt, dass dieses nicht in *trans* von ADAM17 geschnitten werden kann [42]. Angenommen das proteolytische Verhalten von ADAM10 und ADAM17 ist hinreichend vergleichbar, wäre es denkbar, dass Substrate, die über ein Adaptermolekül an ADAM17 binden, wie es für Ephrin der Fall ist, in *trans* gespalten werden, Substrate, die direkt mit der Protease interagieren, hingegen in *cis* prozessiert werden.

Die Ergebnisse der Immunopräzipitationen, welche mit dem sIL-6R und Hyper-IL-6 durchgeführt wurden, stehen mit den oben beschriebenen Ergebnissen im Einklang. Der lösliche IL-6R enthält die *Stalk*-Region bis zur ADAM17-Schnittstelle (Q₃₅₇, siehe 3.15) und interagiert mit dem CANDIS-Peptid, wohingegen der in dem HyperIL-6 enthaltene Anteil des IL-6R nur einen N-terminalen Bereich der *Stalk*-Region bis E₃₂₄ enthält und in den durchgeführten Immunopräzipitationen keine Interaktion nachzuweisen ist. Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung des IL-6R an MPD-CANDIS-GPI durch Zugabe der Proteindisulfidomerase in ihrer reduzierenden Form unterbunden werden kann [14]. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass durch den Übergang der MPD

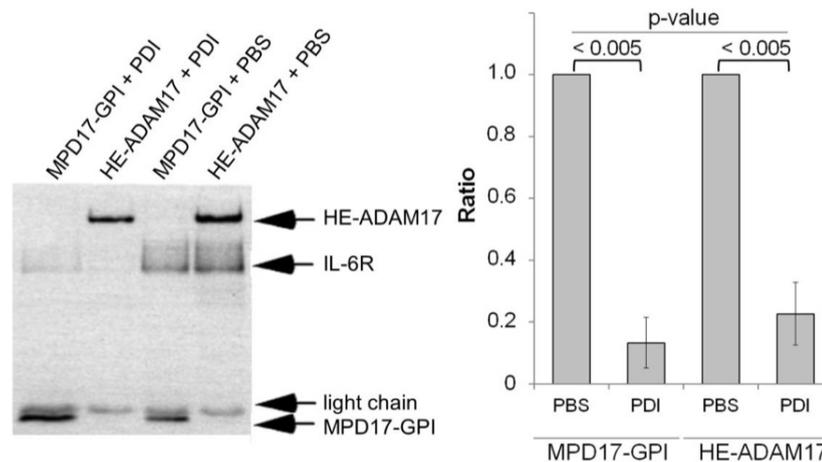


ABBILDUNG 4.4: Co-Immunopräzipitation des hIL-6R mit MPD17-GPI und mut16. Sowohl MPD17-GPI als auch die verwendete ADAM17-Mutante besitzen einen PC-*Tag*. In den rechten beiden Spalten des Westernblots ist zu sehen, dass mit beiden Konstrukten der IL-6R coimmunopräzipitiert werden kann. Werden MPD17-GPI und mut16 zuvor mit der reduzierten Form der PDI vorinkubiert kann der IL-6R nicht mehr binden. In der rechten Abbildung ist die Quantifizierung des auf dem Westernblot gemessenen Signals geplottet. Der Unterschied im Signal zwischen der mit der PDI unbehandelten und behandelten Probe ist statistisch signifikant. Das Experiment wurde von Stefan Düsterhöft (Biochemisches Institut der Universität Kiel) durchgeführt.

von ihrer offenen in die geschlossene Form auch CANDIS eine Veränderung erfährt, die eine Bindung des IL-6R unmöglich macht.

Gerade hinsichtlich der Ergebnisse, die zeigen, dass sowohl CANDIS als auch die MPD allein in der Lage sind, den hIL-6R zu binden, wäre es nützlich zu wissen, ob eine potentielle Dimerisierung von ADAM17 auch durch eine Interaktion zwischen CANDIS und MPD vermittelt werden kann. Falls dies der Fall ist, stellt sich die Frage, ob diese Interaktion ebenso mit der MPD in ihrer geschlossenen Form stattfindet. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Dimerisierung von CANDIS auch noch möglich ist, wenn ein Substrat bereits gebunden hat oder möglicherweise über Substratbindung vermittelt werden kann. Dazu könnte das schon gut etablierte System der Immunopräzipitationen mit dem an Sepharosebeads gekoppelten CANDIS-Peptid verwendet werden.

4.2.2 Bindungsstudien mit dem Interleukin-1 Rezeptor II und TNF- α

Es konnte bestätigt werden, dass die Bindungsstelle des hIL-6R innerhalb der CANDIS lokalisiert ist. Die Untersuchungen, ob auch die ADAM17-Substrate IL-1RII und TNF- α an diese Region binden, ergaben keine Interaktion zwischen den Substraten und CANDIS. Dies bestätigt die Vermutung, dass ADAM17 mehrere Substratbindestellen besitzt,

welche es weiter zu charakterisieren gilt. Insbesondere hinsichtlich therapeutischer Ansätze, wie der gezielten Blockade des *Sheddings* einzelner ADAM17-Substrate, bleibt diese Frage sehr interessant.

Literaturverzeichnis

- [1] P. Baran, R. Nitz, J. Grötzinger, J. Scheller, and C. Garbers. Minimal interleukin 6 (il-6) receptor stalk composition for il-6 receptor shedding and il-6 classic signaling. *J Biol Chem*, 288(21):14756–68, 2013.
- [2] V. Baud and M. Karin. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11(9):372–7, 2001.
- [3] R. A. Black. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(1):1–5, 2002.
- [4] R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618):729–33, 1997.
- [5] D. C. Blaydon, P. Biancheri, W. L. Di, V. Plagnol, R. M. Cabral, M. A. Brooke, D. A. van Heel, F. Ruschendorf, M. Toynbee, A. Walne, E. A. O’Toole, J. E. Martin, K. Lindley, T. Vulliamy, D. J. Abrams, T. T. MacDonald, J. I. Harper, and D. P. Kelsell. Inflammatory skin and bowel disease linked to adam17 deletion. *N Engl J Med*, 365(16):1502–8, 2011.
- [6] C. P. Blobel. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of tnf alpha and notch. *Cell*, 90(4):589–92, 1997.
- [7] C. P. Blobel. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol*, 12(5):606–12, 2000.
- [8] M. Borrell-Pages, F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga, and J. Arribas. Tace is required for the activation of the egfr by tgf-alpha in tumors. *EMBO J*, 22(5):1114–24, 2003.
- [9] A. Chalaris, N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Hasler, C. Becker, M. F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller, and S. Rose-John. Critical role of the disintegrin metalloprotease adam17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*, 207(8):1617–24, 2010.
- [10] A. Chalaris, C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John, and J. Scheller. The soluble interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*, 90(6-7):484–94, 2011.
- [11] A. Chalaris, J. Gewiese, K. Paliga, L. Fleig, A. Schneede, K. Krieger, S. Rose-John, and J. Scheller. Adam17-mediated shedding of the il6r induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim Biophys Acta*, 1803(2):234–45, 2010.

- [12] A. Chalaris, B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C. A. Fielding, S. A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller. Apoptosis is a natural stimulus of il6r shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, 110(6):1748–55, 2007.
- [13] A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, K. Yamamoto, and S. Rose-John. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Dig Dis*, 30(5):492–9, 2012.
- [14] S. Düsterhöft, K. Höbel, M. Oldefest, J. Lokau, G. H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen, and J. Grötzinger. A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*, 289(23):16336–48, 2014.
- [15] S. Düsterhöft, S. Jung, C. W. Hung, A. Tholey, F. D. Sonnichsen, J. Grötzinger, and I. Lorenzen. Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc*, 135(15):5776–81, 2013.
- [16] D. R. Edwards, M. M. Handsley, and C. J. Pennington. The adam metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29(5):258–89, 2008.
- [17] N. F. Endres, R. Das, A. W. Smith, A. Arkhipov, E. Kovacs, Y. Huang, J. G. Pelton, Y. Shan, D. E. Shaw, D. E. Wemmer, J. T. Groves, and J. Kuriyan. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the egf receptor. *Cell*, 152(3):543–56, 2013.
- [18] C. W. Franzke, C. Cobzaru, A. Triantafyllopoulou, S. Loffek, K. Horiuchi, D. W. Threadgill, T. Kurz, N. van Rooijen, L. Bruckner-Tuderman, and C. P. Blobel. Epidermal adam17 maintains the skin barrier by regulating egfr ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *J Exp Med*, 209(6):1105–19, 2012.
- [19] C. Garbers, N. Janner, A. Chalaris, M. L. Moss, D. M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John, and J. Scheller. Species specificity of adam10 and adam17 proteins in interleukin-6 (il-6) trans-signaling and novel role of adam10 in inducible il-6 receptor shedding. *J Biol Chem*, 286(17):14804–11, 2011.
- [20] Z. Gechtman, J. L. Alonso, G. Raab, D. E. Ingber, and M. Klagsbrun. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*, 274(40):28828–35, 1999.
- [21] M. Gooz. Adam-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45(2):146–69, 2010.
- [22] P. Gooz, Y. Dang, S. Higashiyama, W. O. Twal, C. J. Haycraft, and M. Gooz. A disintegrin and metalloenzyme (adam) 17 activation is regulated by alpha5beta1 integrin in kidney mesangial cells. *PLoS One*, 7(3):e33350, 2012.
- [23] P. C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. Principles of interleukin (il)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1):1–20, 2003.

- [24] M. Honda, S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto. Human soluble il-6 receptor: its detection and enhanced release by hiv infection. *J Immunol*, 148(7):2175–80, 1992.
- [25] K. Horiuchi, S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig, and C. P. Blobel. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol Biol Cell*, 18(1):176–88, 2007.
- [26] S. Horiuchi, Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto, and N. Yamamoto. Soluble interleukin-6 receptors released from t cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol*, 24(8):1945–8, 1994.
- [27] L. F. Jackson, T. H. Qiu, S. W. Sunnarborg, A. Chang, C. Zhang, C. Patterson, and D. C. Lee. Defective valvulogenesis in hb-egf and tace-null mice is associated with aberrant bmp signaling. *EMBO J*, 22(11):2704–16, 2003.
- [28] P. W. Janes, N. Saha, W. A. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann, and D. B. Nikolov. Adam meets eph: an adam substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, 123(2):291–304, 2005.
- [29] T. Klein and R. Bischoff. Active metalloproteases of the a disintegrin and metalloprotease (adam) family: biological function and structure. *J Proteome Res*, 10(1):17–33, 2011.
- [30] S. M. Le Gall, P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X. D. Niu, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C. P. Blobel. Adams 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, l-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell*, 20(6):1785–94, 2009.
- [31] X. Li, L. Perez, Z. Pan, and H. Fan. The transmembrane domain of tace regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res*, 17(12):985–98, 2007.
- [32] I. Lorenzen, A. Trad, and J. Grötzinger. Multimerisation of a disintegrin and metalloprotease protein-17 (adam17) is mediated by its egf-like domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 415(2):330–6, 2011.
- [33] V. Matthews, B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen, and S. Rose-John. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by adam10 and adam17 (tace). *J Biol Chem*, 278(40):38829–39, 2003.
- [34] M. L. Moss and J. W. Bartsch. Therapeutic benefits from targeting of adam family members. *Biochemistry*, 43(23):7227–35, 2004.
- [35] M. L. Moss, S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer, and et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385(6618):733–6, 1997.

- [36] J. Mullberg, W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. The soluble human il-6 receptor. mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol*, 152(10):4958–68, 1994.
- [37] J. Mullberg, H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*, 23(2):473–80, 1993.
- [38] Rawlings N., A. Barrett, and A. Bateman. Summary for peptidase m12.217, <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?id=m12.217;type=p>.
- [39] H. Nagase, R. Visse, and G. Murphy. Structure and function of matrix metalloproteinases and tims. *Cardiovasc Res*, 69(3):562–73, 2006.
- [40] J. J. Peschon, J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March, and R. A. Black. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392):1281–4, 1998.
- [41] B. Rabe, A. Chalaris, U. May, G. H. Waetzig, D. Seegert, A. S. Williams, S. A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood*, 111(3):1021–8, 2008.
- [42] P. Reddy, J. L. Slack, R. Davis, D. P. Cerretti, C. J. Kozlosky, R. A. Blanton, D. Shows, J. J. Peschon, and R. A. Black. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, 275(19):14608–14, 2000.
- [43] S. Rose-John. Adam17, shedding, tace as therapeutic targets. *Pharmacol Res*, 71:19–22, 2013.
- [44] S. Rose-John, J. Scheller, G. Elson, and S. A. Jones. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*, 80(2):227–36, 2006.
- [45] S. Rose-John, G. H. Waetzig, J. Scheller, J. Grötzinger, and D. Seegert. The il-6/sil-6r complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*, 11(5):613–24, 2007.
- [46] P. Saftig and K. Reiss. The ã disintegrin and metalloproteasesãadam10 and adam17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*, 90(6-7):527–35, 2011.
- [47] J. Scheller, A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John. Adam17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol*, 32(8):380–7, 2011.
- [48] M. Sharma, J. Mohapatra, A. Acharya, S. S. Deshpande, A. Chatterjee, and M. R. Jain. Blockade of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (tace) enhances il-1beta and ifn-gamma via caspase-1 activation: a probable cause for loss of efficacy of tace inhibitors in humans? *Eur J Pharmacol*, 701(1-3):106–13, 2013.
- [49] R. J. Singh, J. C. Mason, E. A. Lidington, D. R. Edwards, R. K. Nuttall, R. Khokha, V. Knauper, G. Murphy, and J. Gavrilovic. Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (vcam-1) ectodomain release is regulated by timp-3. *Cardiovasc Res*, 67(1):39–49, 2005.

-
- [50] S. Takeda. Three-dimensional domain architecture of the adam family proteinases. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2):146–52, 2009.
- [51] A. Trad, N. Hedemann, M. Shomali, V. Pawlak, J. Grötzinger, and I. Lorenzen. Development of sandwich elisa for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. *J Immunol Methods*, 371(1-2):91–6, 2011.
- [52] A. Trad, M. Riese, M. Shomali, N. Hedeman, T. Effenberger, J. Grötzinger, and I. Lorenzen. The disintegrin domain of adam17 antagonises fibroblastcarcinoma cell interactions. *Int J Oncol*, 42(5):1793–800, 2013.
- [53] S. Weber and P. Saftig. Ectodomain shedding and adams in development. *Development*, 139(20):3693–709, 2012.

Lebenslauf

Name Katharina Viktoria Höbel
Geburtsdatum 05.08.1989
Geburtsort Kaufbeuren

Bildungsweg

09/2000 - 06/2009 Jakob-Brucker-Gymnasium Kaufbeuren
humanistischer Zweig
Leistungskurse Mathematik und Physik

10/2009 bis heute Studium der Humanmedizin
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

09/2011 1. medizinisches Staatsexamen

10/2012 bis 09/2013 Promotionsstipendium des SFB877
Integrated Research Training Group "Proteolysis and Pathophysiology",
Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Famulaturen unter anderem am Deutschen Herzzentrum München
Unversitätsklinikum Oslo (Norwegen)
Rockingham General Hospital (Perth, WA, Australien)

10/2015 2. medizinisches Staatsexamen

04/2010 bis heute Studium der Physik
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

11/2015 bis 04/2016 Forschungspraktikum und Bachelorarbeit
Wellman Center for Photomedicine,
Massachusetts General Hospital,
Harvard Medical School, Boston, MA, USA

04/2012 bis heute Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
05/2013 bis 05/2015 Sprecherin der Regionalgruppe Kiel-Flensburg der Studienstiftung
06/2013 bis heute Botschafterprogramm der Studienstiftung

Konferenzen und Kurse

- 02/2013** Interdisziplinäres Symposium des
Exzellenzclusters "*Inflammation at Interfaces*"
- 09/2013 bis 03/2015** Lebenswissenschaftliches Kolleg der Studienstiftung
Arbeitsgruppe: Biophysik
- 02/2015 bis 03/2015** IFF Spring School "Functional Soft Matter "
Forschungszentrum Jülich

Publikation S. Düsterhöft, K. Höbel, M. Oldefest, J. Lokau, G.H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen und J. Grötzinger.
A Disintegrin and Metalloprotease 17 Dynamic Interaction Sequence, the Sweet Tooth for the Human Interleukin 6 Receptor, Journal of Biological Chemistry, 289 (23), 06/2014

Danksagung

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Herrn Professor Joachim Grötzinger für die Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen. Für die Bereitstellung des Themas und die ausgiebige fachliche Betreuung danke ich Inken Lorenzen.

Ebenso gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe: Stefan Düsterhöft für seine Geduld und Beratung, Mirja Oldefest, Nina Hedemann, Juliane Lokau, Anna Zaslowski und Tim Kerkow für ihre Unterstützung und Hilfe, Denis Neesen für seine nie versiegende Zuversicht und Anne Grahl für ihre Freundschaft und die zahlreichen aufbauenden Gespräche.

Christoph Garbers danke ich für die Unterstützung, schier unerschöpfliche gute Laune und der Bereitstellung seiner Konstrukte. Ahmad Trad für seine hilfreichen Anregungen.

Bei Britta Hansen und Jessica Schneider bedanke ich mich für ihre unermüdliche Unterstützung (nicht nur bei der Laborarbeit).

Vielen Dank Athena Chalaris und ihrer Gruppe für die nette Betreuung und die Möglichkeit ihre Einrichtungen mitzuverwenden.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne ihren bedingungslosen Rückhalt wäre ich heute nicht dort, wo ich bin.