

**Der Interleukin-6 Rezeptor:
Spezies-spezifische Unterschiede
der proteolytischen Freisetzung
durch die Metalloproteasen
ADAM10 und ADAM17
zwischen Maus und Mensch**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von
Christoph Garbers

Kiel, 2011

Referent: Prof. Dr. Stefan Rose-John
Koreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder
Koreferent: Prof. Dr. Andreas Ludwig
Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2011
Zum Druck genehmigt: 13.05.2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Für Yvonne

What we know is a drop, what we don't know is an ocean.
Sir Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
1.1 Shedding als physiologisch wichtiges regulatorisches Element	14
1.2 Interleukin-6 und der Interleukin-6 Rezeptor	15
1.2.1 Das pleiotrope Zytokin Interleukin-6	15
1.2.2 Signaltransduktion und struktureller Aufbau des IL-6R	17
1.2.3 Entstehung des löslichen Interleukin-6 Rezeptors	19
1.3 Die Familie der ADAM-Proteasen	22
1.3.1 ADAM10	24
1.3.2 ADAM17	25
1.3.3 Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17	27
1.4 Der P2X7 Rezeptor	28
1.5 Die Proteinfamilie der p38 MAPK	30
1.6 Ziel dieser Arbeit	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Antibiotika	33
2.1.2 Antikörper	33
2.1.3 Chemikalien	35
2.1.4 Enzyme	35
2.1.5 Größenmarker	35
2.1.6 Kits	35
2.1.7 Kulturmedien	36
2.1.8 Oligonukleotide	37
2.1.9 Plasmide	37
2.1.10 Puffer und Lösungen	38
2.1.11 Rekombinante Proteine	42
2.1.12 Zelllinien	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	43

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Zellkultur	48
2.2.3	Protein-biochemische Methoden	51
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden	54
2.2.5	Statistische Analysen	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Keine Reduktion des löslichen murinen IL-6R im Serum hypomorpher ADAM17 ^{ex/ex} -Mäuse	57
3.2	Shedding von IL-6R und CD62L von murinen CD3 ⁺ -Milzzellen	58
3.3	Generierung von Expressionsplasmiden für murinen und humanen IL-6R	59
3.4	Generierung einer murinen IL-6R exprimierenden Ba/F3-gp130-Zelllinie	61
3.5	NIH3T3-Zellen enthalten mIL-6R-RNA, aber kein detektierbares Protein	63
3.6	Humanes ADAM17 prozessiert humanen und murinen IL-6R	65
3.7	Murines ADAM17 prozessiert humanen, aber nicht murinen IL-6R . . .	66
3.8	Konstruktion von Chimären aus humanem und murinem IL-6R	68
3.9	Generierung der Expressionsplasmide für die IL-6R-Chimären	71
3.10	Analyse der Chimären D358E, TM und ICD	72
3.11	Analyse der Chimären D1, D2, D3 und S	74
3.12	Analyse von Chimären mit mehreren ausgetauschten Domänen	75
3.13	Zusammenfassung und Vergleich der erstellten Chimären	79
3.14	Stimulation mit Ionomycin führt zum Shedding von humanem und murinem IL-6R durch ADAM10	81
3.15	Analyse des IL-6R-Shedding in verschiedenen Protease-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	83
3.16	Stimulation des P2X7-Rezeptors führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10 <i>in vitro</i>	87
3.17	Stimulation des P2X7-Rezeptors in murinen Primärzellen führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10	88
3.18	Durch P2X7-Rezeptor ausgelöstes Shedding trägt zum Serumlevel an smIL-6R bei	90
3.19	Apoptose führt zum Shedding des mIL-6R durch ADAM10	91
3.20	Stimulation mit Anisomycin führt zum Shedding des humanem IL-6R durch ADAM17	93
3.21	Die p38 MAPK ist am Anisomycin-induzierten Shedding beteiligt	94
3.22	Generierung eines Expressionsplasmids für humanen IL-6R ohne intrazelluläre Domäne	95
3.23	Die intrazelluläre Domäne des hIL-6R ist für Anisomycin-induziertes Shedding notwendig	96
4	Diskussion	98
4.1	Der IL-6 Signalweg und der lösliche IL-6 Rezeptor	98
4.2	Analyse der speziesspezifischen Proteolyse durch IL-6R Chimären . . .	99
4.3	ADAM10 als wichtige induzierbare Protease des IL-6R	101
4.4	Einfluss der intrazellulären Domänen von Protease und Substrat	104

Inhaltsverzeichnis

4.5	Ausblick	106
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
	Literaturverzeichnis	112
7	Anhang	141
7.1	Alignment von humanem und murinem ADAM17	141
7.2	Schemata der Klonierung der IL-6R Chimären	143
7.3	Substrate von ADAM10	150
7.4	Substrate von ADAM17	152
7.5	Plasmidkarten	155
7.6	Publikationen	173
7.7	Lebenslauf	174
7.8	Danksagungen	175
7.9	Eidesstattliche Erklärung	176

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema der proteolytischen Ectomänenspaltung.	15
1.2	Interleukin-6 classic signaling.	17
1.3	Interleukin-6 trans-signaling.	20
1.4	Aufbau von gp130, ADAM10/17 und dem IL-6R.	23
1.5	Substratspektrum von ADAM17 und ADAM10.	27
1.6	Schema des P2X7-Rezeptors.	28
3.1	Löslicher muriner IL-6R im Mausserum.	57
3.2	Shedding von IL-6R und CD62L von murinen CD3 ⁺ -Milzzellen.	58
3.3	Expressionsplasmide für humanen und murinen IL-6R.	60
3.4	Expression von mIL-6R-GFP in Ba/F3-gp130-Zellen.	62
3.5	Proliferation von stabil transduzierten Ba/F3-Zelllinien.	63
3.6	NIH3T3-Zellen enthalten mIL-6R-RNA, aber kein Protein.	64
3.7	Humanes ADAM17 prozessiert humanen und murinen IL-6R.	65
3.8	Murines ADAM17 prozessiert humanen, aber nicht murinen IL-6R.	67
3.9	Alignment von humanem und murinem IL-6R	69
3.10	Schematische Übersicht der erstellten Chimären.	71
3.11	Analyse der Chimären D358E, TM und ICD.	73
3.12	Analyse der Chimären D1 und D2.	74
3.13	Analyse der Chimären D3 und S.	76
3.14	Analyse der Chimären D1+2, D1+3 und D2+3.	77
3.15	Analyse der Chimären D1-D3 und S/TM/ICD.	78
3.16	Ionomycin führt zum Shedding von humanem und murinem IL-6R durch ADAM10.	82
3.17	Selektivität der rekombinanten ADAM10 Prodomäne.	83
3.18	Shedding in ADAM10 ^{-/-} und ADAM17 ^{-/-} MEFs.	84
3.19	Shedding in ADAM10 ^{-/-} /ADAM17 ^{-/-} und Wildtyp MEFs.	86
3.20	Stimulation des P2X7-Rezeptors führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10 <i>in vitro</i>	87
3.21	Stimulation des P2X7-Rezeptors in murinen Primärzellen führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10.	89
3.22	Durch P2X7-Rezeptor ausgelöstes Shedding trägt zum Serumlevel an smIL-6R bei.	91
3.23	Apoptose führt zum Shedding des mIL-6R durch ADAM10.	92
3.24	Anisomycin induziert hIL-6R-Shedding durch ADAM17.	93
3.25	p38 MAPK ist am Anisomycin-induzierten Shedding beteiligt.	95

Abbildungsverzeichnis

3.26	Klonierung von pcDNA3.1-hIL-6R Δ ICD-GFP.	96
3.27	Die ICD des hIL-6R ist für Anisomycin-induziertes Shedding notwendig.	97
4.1	Stimuli für ADAM10 und ADAM17 in Mensch und Maus.	103
4.2	Alignment der ICD von humanem und murinem IL-6R	105
7.1	Alignment von humanem und murinem ADAM17	142
7.2	Klonierung der Chimären D1 und D2.	143
7.3	Klonierung der Chimären D3 und D1-D3.	144
7.4	Klonierung der Chimären D358E und S/TM/ICD.	145
7.5	Klonierung der Chimären S und TM.	146
7.6	Klonierung der Chimären ICD und D1+D2.	147
7.7	Klonierung der Chimären D1+D3 und D2+D3.	148
7.8	ORF von pcDNA3.1-hIL-6R-GFP	155
7.9	ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-GFP	156
7.10	ORF von pMOWS-mIL-6R-GFP	157
7.11	ORF von pcDNA3.1-hIL-6R	158
7.12	ORF von pcDNA3.1-mIL-6R	159
7.13	ORF von pcDNA3.1-hIL-6R Δ ICD-GFP	160
7.14	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D358E	161
7.15	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-TM	162
7.16	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-ICD	163
7.17	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D1	164
7.18	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D2	165
7.19	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D3	166
7.20	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D1-D3	167
7.21	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D1+D2	168
7.22	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D2+D3	169
7.23	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-D1+D3	170
7.24	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-S	171
7.25	Plasmidkarte und ORF von pcDNA3.1-mIL-6R-S/TM/ICD	172

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	41
3.1	Übersicht über die proteolytische Freisetzung der IL-6R Chimären. . . .	80
7.1	Verwendete Primer und Restriktionsendonukleasen für die Konstrukti- on der Chimären.	149
7.2	Bisher beschriebene Substrate von ADAM10	150
7.3	Bisher beschriebene Substrate von ADAM17	152

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ConA	Concanavalin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
f. c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gp130	Glykoprotein 130
h	human bzw. Stunde
ICD	intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharide
m	murin
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mg	Milligramm
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte bei X nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phytoerythrin
pg	Pikogramm
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
S	Stalk
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
U	<i>Units</i>
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/V	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 Shedding als physiologisch wichtiges regulatorisches Element

Für viele biologische Vorgänge ist die Expression bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche von großer Bedeutung. Einen besonderen Regulationsmechanismus stellt hierbei die proteolytische Ektodomänenspaltung durch Proteasen, auch kurz *Shedding* genannt, dar. Proteasen gehören der Enzymklasse der Hydrolasen an, d. h. sie können diese durch Addition eines Moleküls H_2O an eine Peptidbindung spalten. Sie werden daher häufig auch einfach als *Sheddasen* bezeichnet. Bei der limitierten Proteolyse werden somit die extrazellulären Domänen von Membranproteinen in eine lösliche Form überführt, wobei der Schnitt in der Nähe der Zellmembran stattfindet (HOOPER, KARRAN & TURNER, 1997). Dadurch wird nicht nur die Expression des Proteins auf der Zelle reduziert, vielmehr kann das gebildete lösliche Protein autokrine und parakrine Prozesse auslösen (siehe Abbildung 1.1). Auf diese Weise gebildete lösliche Zytokinrezeptoren wirken oftmals antagonistisch, indem sie ihren natürlichen Liganden binden und somit mit den membranständigen Rezeptoren konkurrieren. Sie können aber auch agonistisch wirken, wie dieses für den Komplex aus Interleukin-6 und dem löslichen Interleukin-6 Rezeptor beschrieben ist (*trans-signaling*).

Für das menschliche Genom sind 566 proteolytisch aktive Enzyme vorhergesagt, Proteasen machen zwischen 1 % und 5 % aller Gene in Eukaryoten aus. Diese Proteine haben wichtige Funktionen in vielen physiologischen Prozessen wie z. B. bei der Blutgerinnung und dem Zelltod. Sie spielen ebenso entscheidende Rollen in pathophysiologischen Prozessen wie Entzündung, Tumorentstehung und verschiedenen Infektionskrankheiten. Es wird angenommen, dass bis zu 10 % der auf der Zelloberfläche vorhandenen Proteine durch proteolytische Ectomänenspaltung prozessiert werden können (LEWANDROWSKI et al., 2009; FONG et al., 2011), wobei dies bislang vorwiegend für Typ-I und Typ-II Transmembranproteine sowie GPI-verankerte Proteine gezeigt werden konnte.

1 Einleitung

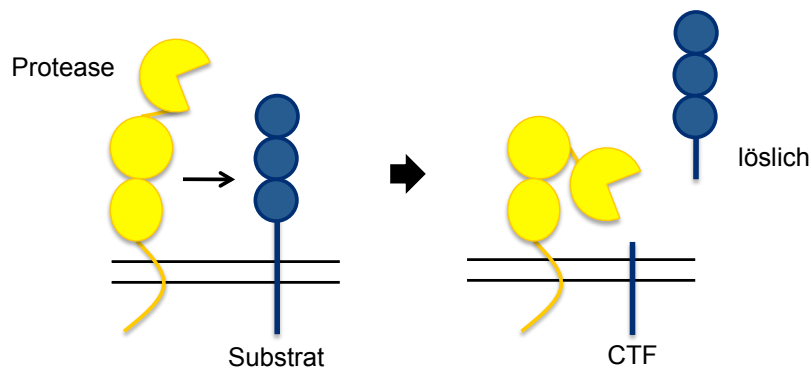


Abbildung 1.1: Vereinfachte schematische Darstellung der proteolytischen Ektodomänen-spaltung. Eine membranständige Protease (gelb) schneidet den extrazellulären Teil eines Membranproteins (blau) ab, das nun als lösliches Protein vorliegt. Das c-terminale Fragment (CTF) verbleibt in der Zellmembran und kann weiter prozessiert werden.

Das nach dem Shedding in der Membran verbleibende Fragment wird oftmals ein weiteres Mal proteolytisch prozessiert. Dieser als *RIPping* (regulierte intramembranäre Proteolyse) bezeichnete Vorgang führt in einigen Fällen zur Freisetzung eines Fragments in die Zelle, das im Falle von Notch-1 in den Zellkern transloziert und dort die Expression verschiedener Zielgene bewirken kann (OSWALD et al., 2001).

Zusammen genommen handelt es sich bei der limitierten Proteolyse durch Proteasen um eine irreversible posttranslationale Proteinmodifikation, die sie in ihrer Unumkehrbarkeit von anderen bekannten Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung oder Ubiquitinylierung unterscheidet. Da diesem Prozess entscheidende Bedeutung z. B. in der Regulation des Immunsystems und in der Krebsentstehung zukommt, ist die Untersuchung der zugrunde liegenden biochemischen Vorgänge unabdingbar.

1.2 Interleukin-6 und der Interleukin-6 Rezeptor

1.2.1 Das pleiotrope Zytokin Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) wurde erstmals 1986 als antigen-unspezifischer Differenzierungsfaktor identifiziert, der B-Zellen aktivieren und T-Zellen unabhängig die Produktion von Immunglobulinen veranlassen kann (HIRANO et al., 1986; MURAGUCHI et al., 1988). IL-6 erfüllt jedoch darüber hinaus eine große Bandbreite biologischer Funktionen, z. B. bei Immunreaktionen (vergleiche CHALARIS et al. (2011)). Durch die Ausschüttung

1 Einleitung

von IL-2 und die verstärkte Expression des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R) induziert es das Wachstum von T-Zellen und die Differenzierung zu cytotoxischen T-Zellen (OKADA et al., 1988). Zusammen mit TGF β sorgt es für die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen (HIROTA, MARTIN & VELDHOFEN, 2010). Außerdem ist IL-6 an der Differenzierung von Makrophagen (NICOLA et al., 1983), Megakaryozyten (ISHIBASHI et al., 1989), T-Zellen (DOMINITZKI et al., 2007; ATREYA et al., 2000; OKADA et al., 1988) und Neutrophilen (WALKER et al., 2008) beteiligt.

IL-6 wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sezerniert, darunter Immunzellen wie T- und B-Zellen, Makrophagen und Monozyten, aber auch Fibroblasten, Endothelzellen und Adipozyten (KISHIMOTO et al., 1995). Die Expression unterliegt dabei einer strengen Regulierung, die dazu führt, dass IL-6 unter normalen, nicht-pathologischen Bedingungen kaum detektiert werden kann. Gemeinsam mit Interleukin-1 (IL-1) und Tumor Necrosis Factor α (TNF α) löst IL-6 Fieber und Leukozytose aus, was zu einer beschleunigten Elimination von Pathogenen führt (CHEN et al., 2006; ROSE-JOHN & NEURATH, 2004).

Unter pathologischen Bedingungen kann es zu einem chronisch erhöhten Serumspiegel von IL-6 kommen. Dieses konnte z. B. bei Patienten gezeigt werden, die an Darmkrebs erkrankt waren (BECKER et al., 2005; CHUNG & CHANG, 2003). Auch im Tiermodell konnte die entscheidende Rolle von IL-6 bei der Entstehung verschiedener Krankheiten durch Untersuchungen an IL-6 defizienten Mäusen belegt werden. Diese sind sowohl gegen Kollagen-induzierte Arthritis, ein Modell für rheumatoide Arthritis im Menschen (ALONZI et al., 1998), als auch gegen die Ausbildung von Experimenteller Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE), einem murinen Modell Multipler Sklerose (SAMOILOVA et al., 1998; OKUDA et al., 1998), geschützt.

Die Zytokine der IL-6-Familie, zu der neben IL-6 selbst auch virales IL-6, IL-11, IL-27, Neuropeitin, CNTF, Cardiotrophin-1, OSM, LIF und CLC gehören, verwenden das Glykoprotein 130 (gp130) als signaltransduzierenden Teil des Rezeptorkomplexes (HIRANO, MATSUDA & NAKAJIMA, 1994). Sie alle haben den gleichen strukturellen Aufbau, der aus vier langen α -Helices besteht (BRAVO & HEATH, 2000). Unterschiedlich ist die Zusammensetzung des spezifischen Rezeptorkomplexes, in dem aber in jedem Fall ein Molekül gp130 vorhanden ist. Die einzige Ausnahme bildet hierbei IL-31, das über den heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-31 Rezeptor A und OSM Rezeptor signalisiert.

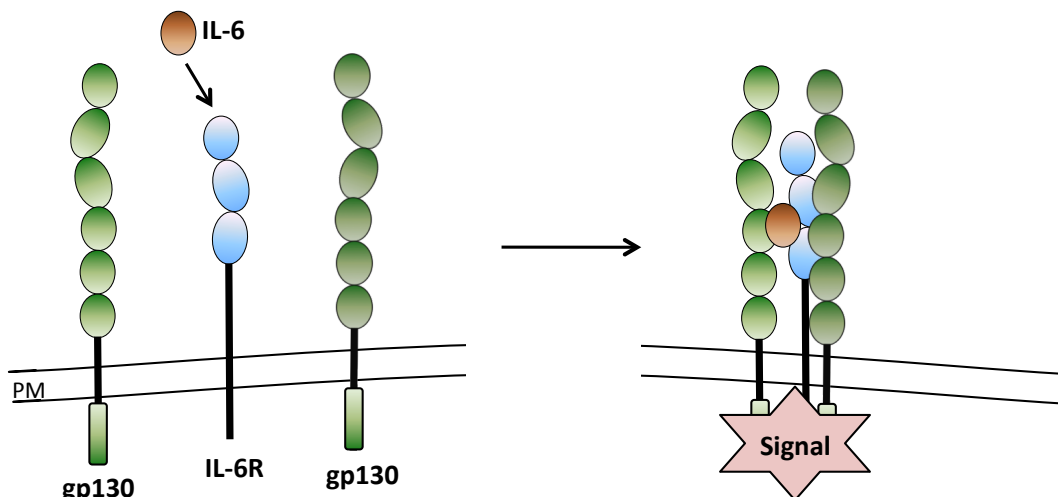


Abbildung 1.2: Vereinfachte schematische Darstellung des Interleukin-6 *classic-signaling*. IL-6 bindet zunächst an den membranständigen IL-6R α . Nach Rekrutierung von zwei Molekülen gp130 ist der vollständige Rezeptorkomplex vorhanden, der für die Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich ist. Abbildung modifiziert nach CHALARIS et al. (2011).

1.2.2 Signaltransduktion und struktureller Aufbau des Interleukin-6 Rezeptors

Die Interleukin-6-vermittelte Signaltransduktion kommt durch den IL-6 bindenden Interleukin-6 Rezeptor α (IL-6R, CD126, gp80), ein 80 kDa großes Glykoprotein (Typ-I-Transmembranprotein) zustande. Nach Bindung des Zytokins werden zwei Moleküle des signaltransduzierenden Glykoproteins gp130 (CD130) rekrutiert, das auf allen Zellen exprimiert wird. Der IL-6R wird nur von wenigen Zellenarten exprimiert. Hierzu zählen Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, B-Zellen und einige T-Zell-Subpopulationen (OBERG et al., 2006; ROSE-JOHN et al., 2006; SCHELLER & ROSE-JOHN, 2006). Die Entscheidung, ob eine Zelle responsiv für IL-6 ist, wird somit durch die Expression des membranständigen IL-6R determiniert. Zellen, die nur gp130, aber keinen IL-6R exprimieren, sind nicht in der Lage, auf IL-6 allein zu reagieren (siehe Abbildung 1.2).

Der extrazelluläre Teil des IL-6R besteht aus einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne und zwei modifizierten Fibronectin-Typ III-Domänen. Sie bilden gemeinsam das cytokine binding module (CBM) und besitzen neben dem Zytokin-Bindemotiv (W-S-X-S-W) vier konservierte Cysteine (SPRECHER et al. (1998), siehe auch Abbil-

1 Einleitung

dung 1.4). Aus der Kristallstruktur (BOULANGER et al., 2003) ergibt sich ein hexamerer Komplex der Zusammensetzung (IL-6/IL-6R α /gp130)₂. Die Bindung von IL-6 erfolgt hierbei durch drei konservierte Epitope (sites I, II und III), wobei site I an die Domänen D2 und D3 des IL-6R α bindet. Nur dieser heterodimere Komplex aus IL-6 und IL-6R α ist in der Lage, die Rekrutierung von zwei Molekülen gp130 auszulösen. Hierbei kommt es zu Interaktionen durch site II und site III mit gp130 (WIESINGER et al., 2009). Auf das CBM folgen im IL-6R ein langer, flexibler Stalk-Bereich, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne (ICD). Die ICD ist an der Signaltransduktion nicht beteiligt, da sie über die beiden Moleküle gp130 abläuft. Die genaue Funktion der ICD ist noch nicht bekannt, es konnten jedoch zwei Motive identifiziert werden, die für die basolaterale Sortierung in polarisierten Zellen essentiell sind (MARTENS et al., 2000).

Die nach der IL-6-Bindung erfolgte Dimerisierung von gp130 sorgt für Aktivierung von Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen, die zur Familie der Janus Kinasen (JAK) gehören, und durch Phosphorylierung aktiviert werden (GUSCHIN et al., 1995). In der cytoplasmatischen Domäne von gp130 befinden sich sechs Tyrosine, von denen fünf durch JAKs phosphoryliert werden können. Entscheidend sind hierbei die vier distalen Tyrosine, deren Aktivierung zur Rekrutierung und Aktivierung von STAT-Proteinen führt (Signal Transducer and Activator of Transcription) (GERHARTZ et al., 1996). Nach Bindung von IL-6 kommt es zu einer Aktivierung von STAT3 und STAT1 (ZHONG, WEN & DARNELL, 1994; HEINRICH et al., 1998), die dabei selbst phosphoryliert werden, Homo- und Heterodimere bilden und in den Zellkern translozieren. Dort binden sie an spezifische DNA-Bindungsstellen in den Promotoren ihrer Zielgene (SEKIMOTO et al., 1997). Beschrieben ist dies z. B. für Akut-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (WEGENKA et al., 1993) oder das Lipopolysaccharid-Binde-Protein (SCHUMANN et al., 1996), aber auch für Transkriptionsfaktoren wie c-myc (KIUCHI et al., 1999).

Die durch IL-6 ausgelöste Aktivierung der STAT-Proteine ist nur transient, da sie durch verschiedene Mechanismen wieder inaktiviert werden kann. Die verschiedenen Wege, die teilweise nebeneinander ablaufen, stellen dabei einen wichtigen Regulationsmechanismus dar, um eine dauerhafte Aktivierung des Systems zu verhindern. Ein Beispiel hierfür sind die SOCS-Proteine (Suppressor Of Cytokine Signalling) (YOSHIMURA, NAKA & KUBO, 2007), die Teil eines negativen Feedback-Loops sind. Ihre Expression kann direkt durch IL-6 induziert werden. Sie interagieren dabei direkt mit den JAKs, was die Tyrosin-Phosphorylierung von gp130 und STAT3 effektiv unterbindet (STARR et al., 1997; ENDO et al., 1997). PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3) stellt ein anderes regulatorisches Protein dar, das an phosphoryliertes STAT3 binden kann und

1 Einleitung

sowohl dessen Bindung an die DNA als auch die Expression der Zielgene verhindert (CHUNG et al., 1997).

Neben der transienten Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs ist mittlerweile auch beschrieben, dass es durch Überexpression des Sphingosine-1-phosphat Rezeptors 1 (S1PR1) in Tumoren zu einer konstanten Aktivierung von STAT3 kommen kann. Auch hier scheint IL-6 eine zentrale Rolle zu spielen (LEE et al., 2010).

1.2.3 Entstehung des löslichen Interleukin-6 Rezeptors

Außer der membranständigen Form des IL-6R, deren Aufbau und Funktion im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, existieren zwei lösliche Isoformen. Beiden ist gemein, dass ihnen die Transmembran- und die cytoplasmatische Domäne fehlen, gebildet werden die beiden Isoformen jedoch durch unterschiedliche Prozesse (ROSE-JOHN et al. (1995), siehe unten). Im Plasma gesunder Erwachsener findet sich löslicher IL-6R (sIL-6R) in Konzentrationen von 25-35 ng/ml (HONDA et al., 1992). Der lösliche Rezeptor bindet seinen Liganden IL-6 mit der gleichen Affinität wie der membrangebundene Rezeptor (MÜLLER-NEWEN et al., 1996; YASUKAWA et al., 1992). Eine Besonderheit ist die Tatsache, dass der so gebildete Komplex aus IL-6/sIL-6R agonistisch auf Zellen wirkt, die nur gp130, aber keinen membranständigen IL-6R exprimieren. Dieser Prozess wird *trans-signaling* genannt, während die IL-6 vermittelte Signaltransduktion über den membrangebundenen IL-6R als *classic-signaling* bezeichnet wird (PETERS, MÜLLER & ROSE-JOHN, 1998; ROSE-JOHN & HEINRICH, 1994). Mittels *trans-signaling* können somit prinzipiell alle Zellen aktiviert werden, während *classic-signaling* auf die wenigen Zelltypen beschränkt ist, die den IL-6R exprimieren. Auch für andere Zytokine sind lösliche Rezeptoren beschrieben, wie z. B. für Interleukin-1 (IL-1); sie wirken allerdings antagonistisch, d. h. sie inhibieren den eigentlichen Effekt ihrer Zytokine (ROSE-JOHN & HEINRICH, 1994).

Die beiden unterschiedlichen Wege, die zur Generierung von löslichem IL-6R führen, sind alternatives Splicing und Ektodomänen-Shedding. Das alternative Splicing der mRNA führt durch Auslassung des für die Transmembrandomäne kodierenden Exons zu einer Verschiebung des Leserahmens und dadurch zu einem veränderten C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz (GSRRRGSCGL). Einen Einfluss auf die biologische Aktivität scheint diese geringe Varianz der Sequenz jedoch nicht zu haben (HORIUCHI et al., 1994). Lösliche Rezeptoren, die durch alternatives Splicing entstehen, sind auch für andere Zytokine beschrieben, wie z. B. LIF oder CNTF (ROSE-JOHN & HEINRICH, 1994). LIF-Rezeptor findet sich in einer Konzentration von 10 ng/ml

1 Einleitung

im menschlichen Plasma. Auch die signaltransduzierende Untereinheit des IL-6R-Komplexes, gp130, existiert in einer löslichen Form (sgp130). Sie entsteht ebenfalls durch alternatives Splicing, nicht aber durch limitierte Proteolyse (MÜLLBERG et al., 1993a).

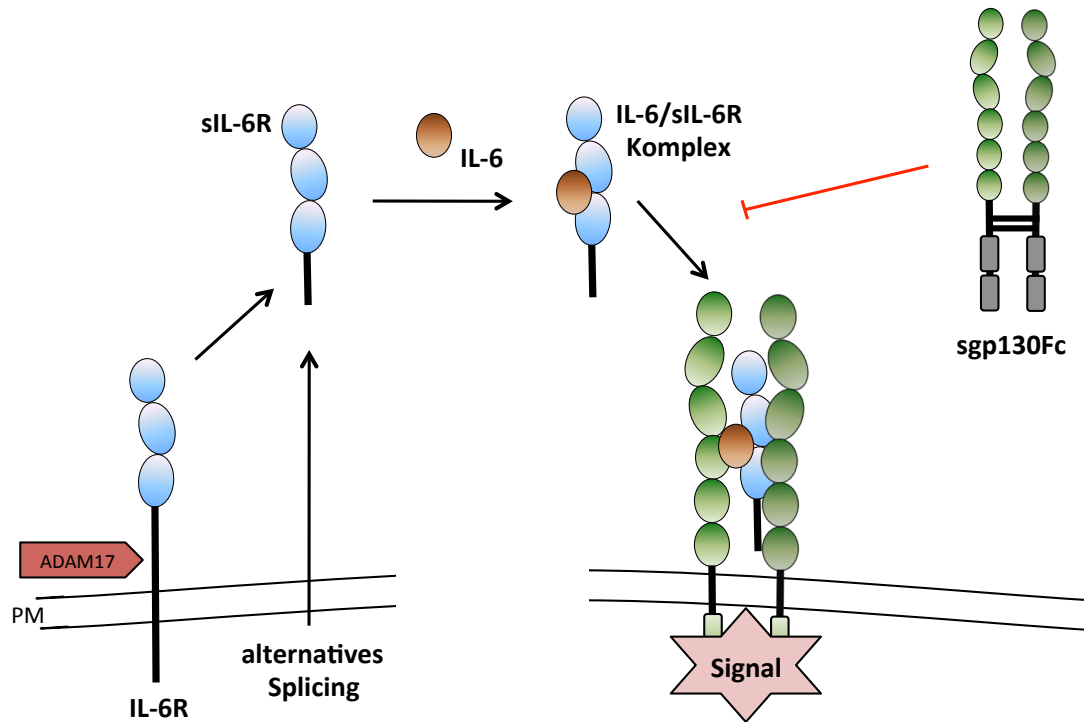


Abbildung 1.3: Vereinfachte schematische Darstellung des IL-6 trans-signalings. Hierbei bindet IL-6 an den löslichen IL-6R, der entweder durch Ektodomänen-Shedding, z. B. durch ADAM17, oder durch alternatives Splicing entsteht. Der entstandene Komplex aus IL-6 und sIL-6R kann nun Zellen stimulieren, die selbst keinen membrangebundenen IL-6R exprimieren oder Zellen, die den IL-6R bereits geshedded haben und/oder ihn selbst exprimieren. Das IL-6 *trans-signalings* kann spezifisch durch das Protein sgp130Fc inhibiert werden. Auf das *classic-signalings* hat es keinen Einfluss. Abbildung aus CHALARIS et al. (2011).

sgp130 kann in Konzentrationen von 100-400 ng/ml im menschlichen Plasma detektiert werden (MONTERO-JULIAN, 2001) und wird als natürlicher Inhibitor des IL6/IL-6R α vermittelten IL-6 trans-signalings angesehen (JOSTOCK et al., 2001; MÜLLER-NEWEN et al., 1998; NARAZAKI et al., 1993). Durch diesen Befund konnte ein Designerprotein namens sgp130Fc entwickelt werden, das den kompletten extrazellulären Teil

1 Einleitung

von gp130 fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG1 enthält. Durch die Dimerisierung ist es zehnfach effizienter darin, IL-6 *trans-signaling* zu blockieren, als es das monomere sgp130 wäre (ATREYA et al., 2000; JOSTOCK et al., 2001). IL-6 *classic-signaling* wird durch sgp130Fc nicht inhibiert (siehe Abbildung 1.3). Einen weiteren natürlichen Inhibitor stellt gp130-RAPS dar, eine verkürzte Form von gp130 mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Sie entsteht ebenfalls durch alternatives Splicing der gp130 mRNA und weist eine veränderte Aminosäuresequenz des C-terminalen Endes auf (NIASF). In Patienten, die an rheumatoider Arthritis erkrankt sind, wurden Autoantikörper gegen gp130-RAPS gefunden (TANAKA et al., 2000).

Auch der zweite Weg, das Ektodomänen-Shedding des membrangebundenen Rezeptors, führt zu einer löslichen Form des Rezeptors. Der proteolytische Schnitt erfolgt hierbei in der unmittelbaren Nähe der Plasmamembran (MÜLLBERG et al., 1992; MÜLLBERG et al., 1993b) und es bleibt ein C-terminales Fragment (CTF) zurück. Es wird im Anschluss weiter vom γ -Sekretase-Komplex prozessiert, der einen weiteren proteolytischen Schnitt innerhalb der Plasmamembran ausführt. Im Gegensatz zu z. B. Notch, bei dem das CTF anschließend in den Zellkern migriert, um dort die Transkription verschiedener Zielgene zu aktivieren (OSWALD et al., 2001), konnte dem CTF des IL-6R noch keine biologische Funktion zugewiesen werden (CHALARIS et al. (2010b)). Gezeigt werden konnte die limitierte Proteolyse des IL-6R bislang durch die Metalloproteasen ADAM10 (MATTHEWS et al., 2003) und ADAM17 (ALTHOFF et al., 2000) (siehe Abschnitt 1.3). Es wird angenommen, dass ADAM10 für das konstitutive Shedding verantwortlich ist, während ADAM17 nach Stimulation den IL-6R prozessiert (MATTHEWS et al., 2003). Auch viele andere Transmembranproteine werden durch limitierte Proteolyse in ihre lösliche Form überführt; eine Übersicht der Substrate findet sich in den Abschnitten 7.3 (ADAM10) und 7.4 (ADAM17).

Neben den schon genannten membrangebundenen ADAM-Proteasen kann der IL-6R auch von löslichen Proteasen, die von Bakterien sezerniert werden, prozessiert werden. Die *Serratia marcescens* Metalloprotease (SMP) ist in der Lage, sIL-6R von humanen Monozyten freizusetzen. Die bakterielle Protease verwendet hierfür eine andere Schnittstelle, als es ADAM17 tut (VOLLMER et al., 1996), sie wurde aber noch nicht genauer charakterisiert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass aktivierte Neutrophile große Mengen der Serin-Protease Cathepsin G freisetzen, die daraufhin IL-6R shedden kann (BANK et al., 1999). Löslicher IL-6R entsteht auch durch Behandlung der Osteoblastenähnlichen Zelllinie MG63 mit TNF α und IL-1 β (FRANCHIMONT et al., 2005), was nahelegt, dass dieser Stimulus auch *in vivo* an der Entstehung des Serumspiegels von sIL-6R beteiligt ist. Ein weiterer natürlicher Stimulus, der zur Entstehung des shIL-6R *in vivo*

1 Einleitung

führt, ist Apoptose. Bei dieser Form der programmierten Zelltodes kommt es zur Aktivierung von ADAM17 (siehe Abschnitt 1.3.2), die anschließend den humanen IL-6R shedded (CHALARIS et al., 2007).

1.3 Die Familie der ADAM-Proteasen

Die ADAM-Proteasen (A Disintegrin And Metalloprotease) gehören zur Superfamilie der Zink-abhängigen Proteasen, die auch als Metzinkine bezeichnet werden. Die Metzinkine werden anhand von Sequenzhomologien und verschiedener struktureller Gemeinsamkeiten wiederum in vier Unterfamilien eingeteilt: Die Adamalysine, zu denen neben den ADAMs die Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMPs) gehören, die Astacine, die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und die Serralysine (bakterielle Proteasen) (STÖCKER et al., 1995). SVMPs und ADAM-Proteasen weisen eine große Sequenzhomologie zueinander auf (BLOBEL, 1997).

Die ADAMs sind glykosylierte Typ-I Transmembranproteine mit einer durchschnittlichen Größe von rund 750 Aminosäuren, die aus verschiedenen Domänen aufgebaut sind: Einem N-terminalen Signalpeptid folgen eine Prodomäne, eine katalytische/Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-Domäne, eine EGF-ähnliche/Cystein-reiche Domäne, eine einzelne Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne (siehe Abbildung 1.4). Die Prodomäne weist inhibitorische Funktionen auf (MOSS et al., 2007; GONZALES, GALLI & MILLA, 2008) und wird im Verlauf des sekretorischen Pathways auf dem Weg an die Zelloberfläche von intrazellulären Pro-Protein Konvertasen, wahrscheinlich Furin-Proteinasen, abgeschnitten (ENDRES et al., 2003; SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Ihr wird außerdem eine Rolle als intramolekulares Chaperon zugeschrieben, das für die korrekte Proteinfaltung zuständig ist (ROGHANI et al., 1999). Bei einigen Vertretern der ADAM-Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass die Disintegrin-Domäne mit Integrinen interagiert und dadurch Zelladhäsion sowie Zell-Zell-Kontakte beeinflusst (EDWARDS, HANDSLEY & PENNINGTON, 2008). Außerdem wird eine Rolle der Disintegrin- und/oder der EGF-ähnliche Domäne bei der Substraterkennung angenommen, da keine Konsensussequenz in den Substraten auszumachen ist (CAESCU, JESCHKE & TURK, 2009). Dieses wird durch Untersuchungen von Antikörpern gestützt, die gegen Substrate von ADAM17 gerichtet sind und das Shedding durch ADAM17 inhibieren können. Deren Epitope liegen in Bereichen, die von der Schnittstelle weit entfernt sind und es somit wahrscheinlich machen, dass die dreidimensionale Struktur des Substrats wichtig für

1 Einleitung

die Erkennung durch die Protease ist (HANSEN et al., 2004).

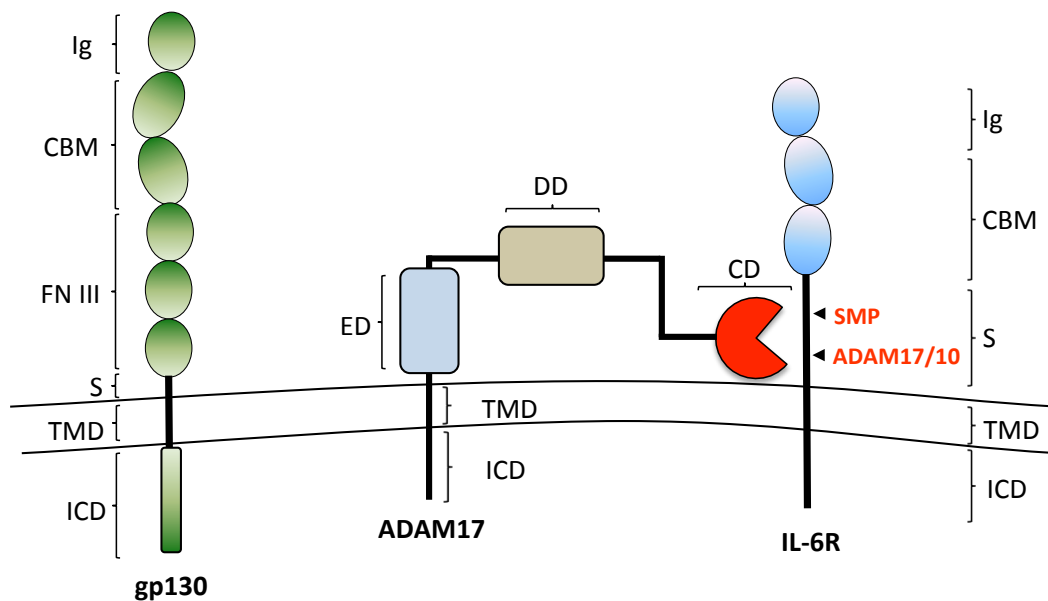


Abbildung 1.4: Vereinfachte schematische Darstellung von gp130, ADAM10/17 und dem IL-6R. gp130 (dargestellt in grün) besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne (Ig), den Cytokine Binding Modules (CBM), den Fibronectin Typ-III-ähnlichen (FN III) Domänen, einem Stalk (S), einer Transmembran- (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD). ADAM10/17 besteht aus einer katalytischen Domäne (CD), einer Desintegrin-Domäne (DD) einer EGF-ähnlichen (ED) Domäne, ebenfalls gefolgt von Transmembran- (TD) und einer intrazellulären Domäne (CD). Der IL-6R, in blau dargestellt, setzt sich aus einer Ig-ähnlichen (Ig) Domäne, den Cytokine Binding Modules (CBM), dem Stalk (S) und der Transmembran- (TM) sowie der intrazellulären (ICD) Domäne zusammen. Die roten Pfeile stellen die Schnittstellen für ADAM10/17 sowie die abweichende Schnittstelle der *Serratia marcescens* Metalloprotease (SMP) dar.

Von den 21 identifizierten humanen Vertretern konnte nur für 13 eine tatsächliche Proteaseaktivität gezeigt oder vorhergesagt werden. Determiniert wird die proteolytische Aktivität durch das konservierte Motiv HEXXHXXGXXH in der katalytischen Domäne (BODE, GOMIS-RÜTH & STÖCKLER, 1993), wobei die drei Histidine und ein Wassermolekül für die Koordination des notwendigen Zinkions im katalytischen Zentrum des Enzyms zuständig sind (STÖCKER et al., 1995). Inhibiert werden können die Proteasen vollständig und selektiv durch chemische Moleküle, die auf Hydroxamat-Basis synthe-

1 Einleitung

tisiert worden sind (LUDWIG et al., 2005).

Für viele bislang beschriebene proteolytische Prozesse sind ADAM10 und ADAM17 verantwortlich (EDWARDS, HANDSLEY & PENNINGTON, 2008). Auf sie wird in den beiden folgenden Unterpunkten näher eingegangen.

1.3.1 ADAM10

Die Metalloprotease ADAM10 wurde zuerst 1996 als Protein in *Drosophila* beschrieben, das essentiell für die Entwicklung von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen im zentralen und peripheren Nervensystem ist. Es wurde zunächst als *Kuzbanian* bezeichnet (ROOKE et al., 1996). Während viele ADAM-Proteasen nur in bestimmten Geweben, wie z. B. den Keimdrüsen, vorkommen, ist ADAM10 ubiquitär exprimiert (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Ein vollständiger Knockout von ADAM10 in der Maus führt zum Tode während der Embryonalentwicklung an Tag E9.5 (HARTMANN et al., 2002). Die Anzahl der Substrate, die von ADAM10 umgesetzt werden, ist mittlerweile auf über 40 angewachsen. Eine Übersicht findet sich in Abschnitt 7.3. Der Nachweis einer Relevanz *in vivo* für die Spaltung der meisten beschriebenen Substrate steht noch aus. Der grundsätzliche Aufbau der Protease entspricht dem unter Abschnitt 1.3 beschriebenen. Für die cytoplasmatische Domäne sind verschiedene Interaktionspartner beschrieben, darunter Eve1 (TANAKA et al., 2004) und SAP97 (MARCELLO et al., 2007). Auch gibt es in der intrazellulären Domäne ein Motiv, das für die korrekte basolaterale Sortierung zuständig ist (WILD-BODE et al., 2006). Ein Motiv, das für das Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums wichtig ist, konnte ebenfalls identifiziert werden (MARCELLO et al., 2010).

Interessanterweise kann ADAM10 selbst durch Proteasen prozessiert werden. Der extrazelluläre Bereich kann dabei sowohl durch ADAM9 als auch durch ADAM15 freigesetzt werden, das CTF wird anschließend durch die γ -Secretase weiter proteolytisch gespalten, was zur Entstehung eines ICD führt (TOUSSEYN et al., 2009). Als ein wichtiger Regulationsmechanismus von ADAM10 wird die Lokalisation in Membranbereichen angesehen, die reich an Tetraspaninen sind, insbesondere CD9, CD81 und CD82. Dieses führt zu einem erhöhten Shedding von Substraten wie $\text{TNF}\alpha$ und verschiedener Liganden des EGF-Rezeptors (ARDUISE et al., 2008).

Die Bindung bestimmter Liganden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) führt zur Proteolyse von Liganden des EGF-Rezeptors durch ADAM10, was eine Transaktivierung von EGF-Rezeptoren auf benachbarten Zellen auslöst (YAN, SHIRAKABE & WERB, 2002). Hierbei kommt es in der Folge zu einer Aktivierung von Ras und ERK.

1 Einleitung

Ein wichtiger Stimulus, der zur Aktivierung von ADAM10 führt, ist die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} -Ionen. Dieses kann in Zellkultur-Assays durch den Ionophor Ionomycin erreicht werden, der in vielen Studien eingesetzt wird (HUNDHAUSEN et al., 2007). Allerdings stellt es keinen ausschließlichen Aktivator von ADAM10 dar, da zumindest in ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) auch ADAM17 mittels Ionomycin aktiviert werden konnte (LE GALL et al., 2009), während der Phorbol-ester PMA ausschließlich ADAM17 aktiviert und keine Kreuzreaktivität zu ADAM10 bekannt ist (siehe Abschnitt 1.3.2). ADAM10 gilt eher als konstitutiv aktive Protease, während man annimmt, dass ADAM17 häufig erst nach Induktion durch verschiedene Stimuli aktiv ist (MARETZKY et al., 2005b).

Natürliche Inhibitoren von ADAM10 stellen die Proteine TIMP-1 und TIMP-3 dar (AMOUR et al., 2000).

1.3.2 ADAM17

Die Metalloprotease ADAM17 wird auch als TACE (Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme) bezeichnet, da sie zuerst 1997 als das Enzym beschrieben wurde, welches in der Lage ist, membran-gebundenes TNF α in seine lösliche Form zu überführen (MOSS et al., 1997; BLACK et al., 1997). Mittlerweile ist die Liste der Substrate auf über 70 angewachsen, eine Übersicht findet sich in Abschnitt 7.4. Die große Zahl an Substraten unterstreicht die enorme physiologische Bedeutung, die ADAM17 zukommt. Allerdings wurde die überwiegende Menge der Daten in Zellkulturexperimenten gewonnen und es ist unklar, welche Rolle diese Substrate tatsächlich *in vivo* spielen.

ADAM17 wird in praktisch allen Zellen und Geweben exprimiert. Die fundamentale Bedeutung von ADAM17 zeigt sich an der Tatsache, dass Mäuse, bei denen das Gen für ADAM17 deletiert ist, schon vor der Geburt sterben (PESCHON et al., 1998). Mittlerweile wurden jedoch Mäuse erzeugt, die in allen Geweben nur rund 5% ADAM17 exprimieren und lebensfähig sind, so dass sich die Rolle von ADAM17 nun auch *in vivo* in der Maus untersuchen lässt (CHALARIS et al., 2010a). Über die physiologischen Mechanismen, die zur Aktivierung von ADAM17 führen, ist noch sehr wenig bekannt. Mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) gibt es einen starken, nicht-physiologischen Aktivator der Proteinkinase C (PKC), der zum Shedding von ADAM17-Substraten führt. Die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 enthält putative Phosphorylierungsstellen für p38 MAPK und PKC (GECHTMAN et al., 1999; DÍAZ-RODRÍGUEZ et al., 1999), was die Möglichkeit für Regulationsmechanismen bietet. Allerdings gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass ein ADAM17-Konstrukt, bei dem die komplette intrazellu-

1 Einleitung

läre Domäne fehlt, ebenso wie das komplette ADAM17 durch PMA zum Shedding seiner Substrate angeregt werden kann, die cytoplasmatische Domäne somit für das PMA-induzierte Shedding nicht benötigt wird (REDDY et al., 2000; LE GALL et al., 2010). Das gleiche wurde für die intrazelluläre Domäne des IL-6R gezeigt (MÜLLBERG et al., 1994). Dieses legt nahe, dass die Aktivierung von ADAM17 auch unabhängig von intrazellulären Signalwegen erfolgen kann. Unterstützt wird dies durch eine Untersuchung, die zeigt, dass PMA das Shedding von ADAM17 durch Inaktivierung extrazellulärer Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) aktiviert (WILLEMS et al., 2010). Es wird spekuliert, dass PMA die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auslöst und dieses den Redox-Status der Zellen ändert, was zur Inaktivierung der PDIs und einer aktiven Konformation von ADAM17 durch Änderungen der Disulfidbrücken und zur Bewegung von ADAM17 und seinen Substraten innerhalb der Plasmamembran führt. ADAM17 befindet sich innerhalb der Membran in lipid rafts (TELLIER et al., 2006), d. h. in Bereichen der Zellmembran, die besonders reich an Cholesterol sind (LINGWOOD & SIMONS, 2010). Ihre Auflösung durch Depletion von Cholesterol führt zur Aktivierung des ADAM17-medierten Sheddings (MATTHEWS et al., 2003).

Nach der Aktivierung der PKC führen Phorbolester zur Phosphorylierung von ERK. Durch die Blockade von PKC und/oder ERK konnte das ADAM17-vermittelte Shedding inhibiert werden (XU & DERYNCK, 2010), was wiederum für die Beteiligung intrazellulärer Signalwege spricht. Zudem ist der größte Teil des endogenen ADAM17 intrazellulär gespeichert und wird erst nach Phosphorylierung an Thr⁷³⁵ an die Zelloberfläche gebracht (SOOND et al., 2005). Hierzu passt eine Untersuchung, wonach das Antibiotikum Anisomycin, das die Proteinsynthese hemmen und Stress-induzierte Kinasen stimulieren kann, die p38 MAPK aktivieren und diese ADAM17 an Thr⁷³⁵ phosphorylieren kann (XU & DERYNCK, 2010). Dieses führt zum Shedding von TGF α und anschließender Aktivierung des EGF-Rezeptors. Eine ADAM17-Mutante, bei der Thr⁷³⁵ durch Alanin ausgetauscht war, konnte nicht durch p38 MAPK aktiviert werden, während PMA-induziertes Shedding nicht betroffen war. Die Stimulation der p38 MAPK führte außerdem zu einer erhöhten Expression von ADAM17 an der Plasmamembran, unabhängig von der katalytischen Aktivität (XU & DERYNCK, 2010).

Shedding des TNFR1 durch ADAM17 erfolgte außerdem nach Aktivierung von Toll-Like Rezeptor 3 (TLR3), wobei sowohl Caspase-vermittelte Apoptose als auch die Produktion von ROS durch das NADPH-Oxidase-Analogon DUOX2 beteiligt war (YU et al., 2011). Interessanterweise waren hierbei weder p38 MAPK noch ERK beteiligt, was auf einen neuen Weg der Aktivierung von ADAM17 schließen lässt. Es konnte schon vorher gezeigt werden, dass Apoptose Shedding von L-Selectin (WANG et al.,

1 Einleitung

2010) und dem humanen IL-6R (CHALARIS et al., 2007) durch ADAM17 auslöst. Letzteres war ebenfalls unabhängig von der Aktivierung von ERK, PKC und p38 MAPK. Beschrieben ist ebenso durch TLRs ausgelöstes Shedding von L-Selectin (MORRISON et al., 2010). Die Aktivierung von purinergen Rezeptoren durch extrazelluläres ATP führt sowohl zu Apoptose als auch zur Aktivierung von DUOX (YU et al., 2011; BOOTS et al., 2009). Auch Shedding von verschiedenen Substraten nach Stimulation des purinergen Rezeptors P2X7 ist beschrieben (siehe Abschnitt 1.4).

Einen natürlichen Inhibitor von ADAM17 stellt das Protein TIMP-3 (AMOUR et al., 1998) dar.

1.3.3 Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17

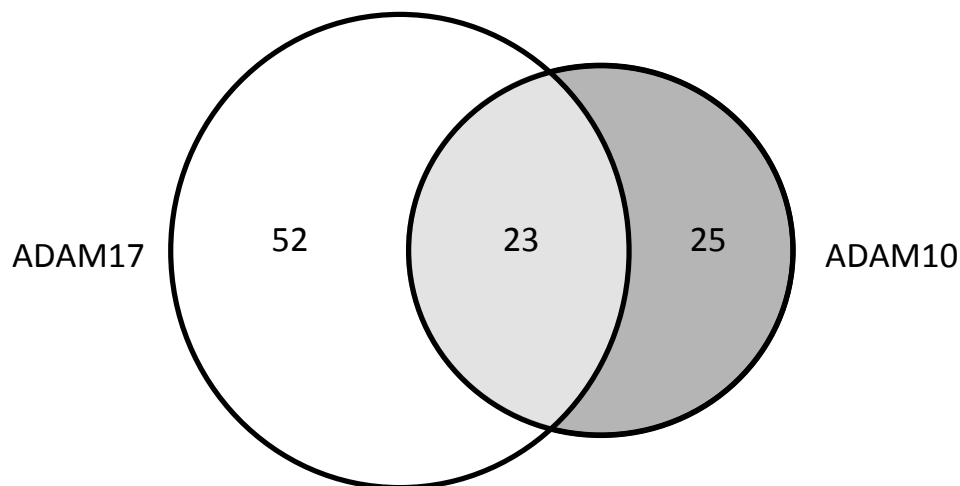


Abbildung 1.5: Substratspektrum von ADAM17 und ADAM10. Für ADAM17 sind bisher 75 Substrate beschrieben (linker, nicht-ausgefüllter Kreis), für ADAM10 48 Substrate (rechts, dunkelgrauer Kreis). 23 Substrate werden von beiden Metalloproteasen prozessiert (hellgrauer Überlappungsbereich).

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind für die Metalloprotease ADAM10 48 Substrate beschrieben, für ADAM17 sind es 75 Substrate (für eine vollständige Liste siehe die Abschnitte 7.3 und 7.4 im Anhang). Neben Adhäsionsmolekülen machen den größten Teil der Substrate beider Proteasen Zytokine/Wachstumsfaktoren und Rezeptoren

1 Einleitung

aus. Auffällig ist, dass es einen großen Überlappungsbereich im Substratspektrum gibt, d. h. 23 Substrate werden von beiden Proteasen gleichermaßen prozessiert (siehe Abbildung 1.5). Allerdings ist bei vielen Proteinen, die als Substrat nur einer der beiden Proteasen beschrieben worden sind, nicht gezeigt, dass sie von der jeweils anderen nicht auch prozessiert werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Überlappungsbereich im Substratspektrum noch weitaus größer ist, als bisher beschrieben.

1.4 Der P2X7 Rezeptor

Alle Zellen exprimieren Rezeptoren, die extrazelluläre Nukleotide binden können. Die unter dem Namen P2-Rezeptoren zusammengefassten 15 Proteine werden dabei in zwei Unterfamilien eingeteilt, die G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren und die P2X-Rezeptoren. Letztere stellen ATP-abhängige nicht-selektive Ionenkanäle dar, die durchlässig für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} sind. Allen sieben Mitgliedern der P2X-Rezeptorfamilie ist der gleiche strukturelle Aufbau gemein, bestehend aus zwei Transmembrandomänen, zwischen denen ein großer extrazellulärer Loop spannt, der zehn Cysteine und Glykosylierungsstellen enthält. N- und C-Terminus befinden sich im Cytoplasma der Zelle (siehe Abbildung 1.6) (SKAPER, DEBETTO & GIUSTI, 2010).

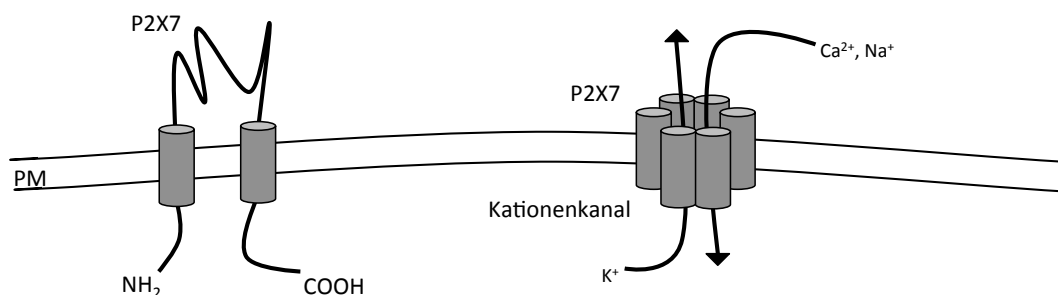


Abbildung 1.6: Schematische Topologie des P2X7-Rezeptors. Auf der linken Seite einzelner Rezeptor, bestehend aus zwei Transmembran-Domänen und einem großen extrazellulären Loop. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich im Cytoplasma. Auf der rechten Seite ein Kationenkanal, gebildet aus einem P2X7-Trimer, der für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle sorgt. Abbildung modifiziert nach GARCIA-MARCOS et al. (2006).

1 Einleitung

Bei der Funktion nimmt der P2X7-Rezeptor eine Sonderstellung ein. Nach Aktivierung durch ATP bildet der P2X7-Rezeptor eine Pore in der Plasmamembran aus. Neben den üblichen Ionen ist die Zelle auf diese Weise in der Lage, auch große hydrophile Stoffe (bis 900 Da) aufzunehmen (NORTH, 2002). Es wird angenommen, dass für die Ausbildung der Pore drei Rezeptoren benötigt werden. Durch Aktivierung verschiedener Signalwege wie Phospholipase A₂, Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK), Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) und von NF- κ B (AGA et al., 2002; POTUCEK, CRAIN & WATTERS, 2006) stellt der P2X7-Rezeptor einen wichtigen Faktor dar, der es der Zelle ermöglicht, in vielfältiger Weise auf externe Stimuli zu reagieren.

P2X7-Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert, wie z. B. Mastzellen, Erythrozyten, Monozyten, dendritische Zellen sowie B- und T-Lymphozyten (SKAPER, DEBETTO & GIUSTI, 2010). Im zentralen Nervensystem finden sich funktionale Rezeptoren sowohl auf Microglia und Schwannschen Zellen als auch auf Astrozyten (COLLO et al., 1997; FERRARI et al., 1996; SIM et al., 2004). Laut SKAPER, DEBETTO & GIUSTI (2010) ist die am besten charakterisierte Funktion des P2X7-Rezeptors ist seine Rolle bei der Freisetzung von Interleukin-1 β von Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten Makrophagen (FERRARI et al., 1997a; FERRARI et al., 1997b). In Makrophagen aus P2X7-defizienten Mäusen fehlte diese Funktion völlig (SOLLE et al., 2001).

Der einzige bislang bekannte physiologische Aktivator des P2X7-Rezeptors ist ATP (CHAKFE et al., 2002). Diese Aktivierung spielt unter normalen Bedingungen keine Rolle, da extrazelluläres ATP nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt. Hingegen sind u. a. aktivierte Immunzellen (FILIPPINI et al., 1990), Makrophagen (SIKORA et al., 1999) und sterbende Zellen (DUBYAK & EL-MOATASSIM, 1993) in der Lage, große ATP-Konzentrationen in den extrazellulären Bereich abzugeben (SKAPER, DEBETTO & GIUSTI, 2010). Zudem sind ATP-Konzentrationen außerhalb von Zellen bei Entzündungsreaktionen signifikant erhöht (LAZAROWSKI, BOUCHER & HARDEN, 2000). Auch proentzündliche Zytokine wie Interleukin-6 sind in der Lage, die Expression des P2X7-Rezeptors und damit die Empfindlichkeit gegenüber extrazellulärem ATP zu erhöhen (HUMPHREYS & DUBYAK, 1998; NARCISSE et al., 2005).

Der P2X7-Rezeptor wird auch als Sensor verstanden, über den z. B. der Untergang größerer Zellpopulationen wahrgenommen werden kann (SKAPER, DEBETTO & GIUSTI, 2010). Für diese Annahme sprechen sowohl die zelluläre Verbreitung als auch die Tatsache, dass große Mengen ATP zu seiner Aktivierung erforderlich sind. Seine Beteiligung an vielen Erkrankungen wie sensorischen Neuropathien (SPERLÁGH et al., 2006), Multipler Sklerose (WITTING et al., 2006) und Rheumatoider Arthritis (LABASI et al., 2002)

1 Einleitung

lässt den P2X7-Rezeptor als lohnendes therapeutisches Ziel erscheinen, für das momentan an selektiven Inhibitoren geforscht wird (DONNELLY-ROBERTS et al., 2009; HONORE et al., 2009).

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zum Ektodomänen-Shedding von CD21 (SENGSTAKE, BONEBERG & ILLGES, 2006), CD23 (GU, BENDALL & WILEY, 1998; SLUYTER & WILEY, 2002; FARRELL et al., 2010), CD27 (MOON et al., 2006) und L-Selectin/CD62L (GU, BENDALL & WILEY, 1998; SENGSTAKE, BONEBERG & ILLGES, 2006; SCHEUPLEIN et al., 2009) sowie zur Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP) (DELARASSE et al., 2011) führt.

1.5 Die Proteinfamilie der p38 MAPK

Die verschiedenen Signalwege, an denen Mitglieder der Proteinfamilie der p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) beteiligt sind, stellen für die Zelle ein wichtiges Werkzeug dar, um auf eine Vielzahl verschiedener externer Stimuli adäquat zu reagieren (CUADRADO & NEBREDÁ, 2010). Ein wichtiger Aktivator dieser Signalwege ist Zellstress, sie spielen aber auch wichtige Rollen im Rahmen von Immunantworten (NEBREDÁ & PORRAS, 2000).

Laut CUADRADO & NEBREDÁ (2010) wurde das erste Mitglied der Familie der p38 MAPK als ein 38 kDa großes Protein beschrieben, das durch Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) an einem Tyrosine phosphoryliert wurde (HAN et al., 1994). Mittlerweile wird es systematisch als p38 α bezeichnet. Es ist in den meisten Zelltypen detektierbar, während die anderen Mitglieder p38 β , p38 γ und p38 δ gewebespezifisch exprimiert werden. Interessanterweise interagiert p38 γ u. a. mit den beiden Proteinen PTPH1 (HOU et al., 2010) und SAP97 (SABIO et al., 2005), die wiederum beide als Interaktionspartner von ADAM17 beschrieben sind (ZHENG, SCHLONDORFF & BLOBEL, 2002; PEIRETTI et al., 2003).

Aktiviert werden MAPKs durch Phosphorylierung an einem flexiblen Bereich, dem *activation loop*. Diese Phosphorylierungen induzieren die Aktivierung durch Änderungen der räumlichen Konformation der Kinase. Bei oxidativem Stress spielt die *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1* (ASK1) eine wichtige Rolle in der Aktivierung der p38 α (DOLADO et al., 2007). Da auch in diesem System nur eine transiente Aktivierung gewünscht ist, erfolgt die Inaktivierung über verschiedene Phosphatasen.

Es sind mittlerweile eine Reihe von Substrate der p38 MAPK beschrieben worden, wobei viele Informationen durch Experimente mit chemischen Inhibitoren auf Pyridinyl-Imidazol-Basis wie SB203580 gewonnen wurden, die zu einer effektiven und voll-

1 Einleitung

ständigen Blockade der Kinase durch kompetitive Inhibition der ATP-Bindungstasche führt (KUMAR, BOEHM & LEE, 2003). Obwohl in Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen durchaus vielversprechend, haben klinische Studien aufgrund von Nebenwirkungen bislang nicht zum Erfolg geführt.

Ein interessantes Substrat der p38 α ist ADAM17, das nach Aktivierung der Kinase durch verschiedene Stimuli an Thr⁷³⁵ in seiner cytoplasmatischen Domäne phosphoryliert wird. Diese Aktivierung von ADAM17 führt zum Ektodomänen-Shedding von Liganden der TGF α -Familie (XU & DERYNCK, 2010). Zudem wird p38 α allgemein als Tumorsuppressor *in vivo* angesehen (VENTURA et al., 2007). Darüber hinaus besteht auch mit Interleukin-6 ein Zusammenhang. Die Promotoren verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, darunter IL-6, IL-8 und MCP-1, zeigen eine p38 MAPK-abhängige Anreicherung der Phosphorylierung von Histon H3 in myeloiden Zellen, die mit LPS stimuliert wurden (SACCANI, PANTANO & NATOLI, 2002; CUADRADO & NEBREDA, 2010). Darüber hinaus sind die p38 MAPKs in verschiedene zelluläre Signalwege eingebunden, darunter ERK, NK- κ B und Wnt (CUADRADO & NEBREDA, 2010). Über die tatsächlichen Funktionen *in vivo* ist trotz allem noch wenig bekannt.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Ektodomänen-Shedding des Interleukin-6 Rezeptors in der Maus durch die beiden Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 zu untersuchen.

Alle bisher veröffentlichten biochemischen Studien haben sich mit der proteolytischen Freisetzung des humanen IL-6R entweder in humanen oder murinen zellbasierten Systemen beschäftigt (siehe z. B. MATTHEWS et al. (2003) und CHALARIS et al. (2007)) und dabei zeigen können, dass für das induzierbare Shedding hauptsächlich ADAM17, für das konstitutive Shedding hingegen vornehmlich ADAM10 verantwortlich ist. Untersuchungen, ob der IL-6R in der Maus analog von den beiden Sheddasen prozessiert werden kann, fehlen bislang. Eine genauere Betrachtung erscheint allerdings umso wichtiger, als der lösliche IL-6R in vielen Krankheitsmodellen eine Rolle spielt und die Maus das am häufigsten genutzte Labortier ist, um diese Erkrankungen zu erforschen. Eine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen wird zwar immer angenommen, ist aber nicht nachgewiesen.

Zweites Ziel der Arbeit ist es, weitere Stimuli zu identifizieren, die zum Shedding des IL-6R führen. Obwohl schon verschiedene Auslöser des IL-6R Shedding bekannt sind, ist fraglich, in welchem Maße diese physiologische Stimuli darstellen, die natürlich vor-

1 Einleitung

kommende Prozesse abbilden. Die Identifikation weiterer, das Shedding auslösender Substanzen, die in stärkerem Maße physiologisch wirken, ist daher notwendig.

Untersucht werden soll die Fragestellung dabei in humanen und murinen Zelllinien, in denen sowohl humaner als auch muriner IL-6R überexprimiert wird. Analog wird mit MEFs verfahren, die defizient für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 sind. Zusätzlich sollen die gewonnenen Erkenntnisse mit Primärzellen aus Wildtyp- und geeigneten Knockout-Mäusen verifiziert werden. Die Unterscheidung zwischen ADAM10 und ADAM17 erfolgt dabei durch die Auswahl geeigneter Stimuli sowie verschiedener Inhibitoren, für die eine Selektivität zwischen den beiden Proteasen bereits gezeigt werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f. c. 100 µg/ml
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f. c. 25 µg/ml
Puromycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	f. c. 1,5 µg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

α -humaner IL-6R	monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon 4-11); bindet ein Epitop auf Domäne 1 des extrazellulären Teils des hIL-6R; Herstellung beschrieben in CHALARIS et al. (2007). Konzentrationen: 1:1000 (Western Blot, ELISA), 1:100 (FACS)
α -humaner IL-6R	monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon 14-18); bindet ein Epitop auf Domäne 3 des extrazellulären Teils des hIL-6R; Herstellung beschrieben in CHALARIS et al. (2007). Konzentration: 1:1000 (Western Blot)
α -humaner IL-6R	biotinylierter polyklonaler Antikörper aus der Ziege (BAF227, R&D Systems); gewonnen nach Immunisierung mit rekombinantem hIL-6R (Leu20–Asp358). Konzentration: 1:1000 (ELISA)

2 Material und Methoden

α -muriner IL-6R	polyklonaler Antikörper aus der Ziege (AF1830, R&D Systems); gewonnen nach Immunisierung mit rekombinanter extrazellulärer Domäne des mIL-6R. Konzentrationen: 1:1000 (Western Blot), 1:250 (ELISA)
α -muriner IL-6R	biotinylierter Antikörper aus der Ziege (BAF1830, R&D Systems); gewonnen nach Immunisierung mit rekombinanter extrazellulärer Domäne des mIL-6R. Konzentration: 1:250 (ELISA)
α -muriner IL-6R	PE-gekoppelter Antikörper aus der Ratte (Klon D7715A7, BioLegend); Konzentration: 1:100 (FACS)
α -muriner CD62L	FITC-gekoppelter Antikörper aus der Ratte (Klon MEL14, BD Biosciences); Konzentration: 1:100 (FACS)
α -muriner CD3e	PerCP-gekoppelter Antikörper aus der Ratte (Klon 17A2, BioLegend); Konzentration: 1:100 (FACS)
α - β -actin	monoklonaler Antikörper aus der Maus (C4, sc-4778, Santa Cruz Biotechnology); erkennt u.a. humanes und murines β -actin. Konzentration: 1:1000 (Western Blot)

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

α -Maus	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i> (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn, Germany). Konzentration: 1:5000 (Western Blot)
α -Ziege	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)</i> (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn, Germany). Konzentration: 1:5000 (Western Blot)

2 Material und Methoden

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) erworben.

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Restriktionsenzyme, Polymerasen u. a.) stammten von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot).

2.1.5 Größenmarker

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde der *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (250 – 10.000 bp) verwendet. Die Größenbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des *prestained molecular weight marker* (25 – 120 kDa); beide von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot).

2.1.6 Kits

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

Bestimmung von Proteinkonzentrationen	BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn)
Detektion von Chemilumineszenz	ECL Plus (GE Healthcare, München)
DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Reinigung von PCR-Produkten	NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Proliferationsassay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega GmbH, Mannheim)
Midi-Präparation von Plasmid-DNA	NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Präparation von RNA	NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)

2 Material und Methoden

2.1.7 Kulturmedien

2.1.7.1 Bakterien

Lysogeny-Broth-(LB)-Medium	10 g NaCl 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt ad 1000 ml
Lysogeny-Broth-(LB)-Platten	10 g NaCl 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 20 g Agar ad 1000 ml

Die Zusammensetzung der Medien wurde BERTANI (1951) entnommen.

2.1.7.2 Zellkultur

DMEM (-/-)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine
DMEM (+/+)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine, ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin
IMDM (+/+)	Iscove's Modified Dulbecco's Medium with L-Glutamine, ergänzt mit 30 % fötalem Kälberserum (FCS), 50 μ M β -mercaptoethanol und 1 % Penicillin/Streptomycin
RPMI 1640	RPMI 1640 without L-Glutamine, ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin und β -mercaptoethanol

2 Material und Methoden

Alle benutzten Medien sowie Trypsin/EDTA waren von PAA Laboratories GmbH (Cöln). Alle benötigten Plastikwaren für die Zellkultur wurden von Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) bezogen.

2.1.8 Oligonukleotide

Die für diese Arbeit benötigten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH (München) bezogen. Sie sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

2.1.9 Plasmide

pEGFP-N1	Expressionsplasmid von Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA) für eine mutierte Variante des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP), die für eine kräftige Fluoreszenz und hohe Expression in Säugetierzellen optimiert ist.
pcDNA3.1(+)	Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen von Invitrogen (Carlsbad, California, USA).
pcDNA3.1-hIL6R-GFP	Expressionsvektor, dessen Insert für humanen IL-6R kodiert, der c-terminal mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP) fusioniert ist; zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris (CHALARIS et al., 2010b).
pcDNA3.1-mIL6R-GFP	Expressionsvektor, dessen Insert für murinen IL-6R kodiert, der c-terminal mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP) fusioniert ist; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jürgen Scheller (Universität Düsseldorf).
pcDNA6-hP2X7R	Expressionsvektor, dessen Insert für humanen P2X7-Rezeptor kodiert; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Fritz Koch-Nolte (UKE Hamburg).
pcDNA6-mP2X7R	Expressionsvektor, dessen Insert für murinen P2X7-Rezeptor kodiert; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Fritz Koch-Nolte (UKE Hamburg).

2 Material und Methoden

pMOWS Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen; enthält Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicillin und Puromycin (KETTELER et al., 2002).

2.1.10 Puffer und Lösungen

Annexin V-Puffer (10x) (FACS)	0,1 M Hepes (pH 7,4) 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂
Blocking Puffer (Western Blot)	5 % Milchpulver in TBS-T
Erythrozyten-Lysepuffer (T-Zell-Isolation)	150 mM NH ₄ Cl 10 mM K ₂ HCO ₃ 100 nM EDTA
DNA-Probenpuffer (6x) (Agarosegele)	20 % (m/V) Glycerol in TBE-Puffer 0,1 % (m/V) Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
FACS-Puffer (FACS)	1 % (m/V) BSA in PBS
Laemmli-Puffer (2x) (SDS-PAGE)	4 % (m/V) SDS 5 % (m/V) β -mercaptoethanol 20 % (m/V) Glycerol 0,13 % (m/V) Bromphenolblau 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
Laemmli-Puffer (5x) (SDS-PAGE)	10 % (m/V) SDS 5 % (m/V) β -mercaptoethanol 50 % (m/V) Glycerol 0,13 % (m/V) Bromphenolblau 312 mM Tris-HCl (pH 6,8)

2 Material und Methoden

Lysis Puffer (Zellyse)	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 % (m/V) Triton X-100 1 % (m/V) NP-40 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF Proteaseinhibitoren
MACS-Puffer (T-Zell-Isolation)	0,5 % (m/V) BSA 2 mM EDTA in PBS (pH 7,2)
NaCl-Puffer (T-Zell-Stimulation)	140 mM NaCl 5 mM KCl 10 mM HEPES 10 mM Glucose
Phosphate Buffered Saline (PBS)	150 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) 1,7 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PBS-T	0,05 % (V/V) Tween-20 in PBS
Proteaseinhibitoren	COMPLETE Tabletten, Roche (Mannheim) eine Tablette gelöst in 2 ml PBS ergibt eine 25fache Stocklösung
S1 Puffer (DNA Mini-Präp)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA
S2 Puffer (DNA Mini-Präp)	200 mM NaOH 1 % SDS
S3 Puffer (DNA Mini-Präp)	2,8 mM Kaliumacetat (pH 5,1)

2 Material und Methoden

Sammelgel (4 %) (SDS-PAGE)	3,725 ml H ₂ O 625 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 670 µl 30 % Polyacrylamid 5 µl TEMED 25 µl 10 % APS
SDS Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % (m/V) SDS
Stripping Puffer (Western Blot)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % (m/V) SDS 0,1 % β-mercaptoethanol
TBE (Agarosegele)	44,5 mM Borsäure 44,5 mM Tris-HCl 10 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 20 % (V/V) Methanol
Trenngel (10 %) (SDS-PAGE)	3,87 ml H ₂ O 2,55 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 3,3 ml 30 % Polyacrylamid 10 µl TEMED 100 µl 10 % APS
Tris Buffered Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	1 % (V/V) Tween-20 in TBS

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz
pcDNA3.1-FP	5'-CTCTGGCTAACTAGAGAAC-3'
pcDNA3.1-RP/1	5'-CAAACAACAGATGGCTGGC-3'
oligo-dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
RT-mIL-6R-fwd	5'-AGAGAATGGACTACCACAGG-3'
RT-mIL-6R-rev	5'-CTGCTGAGAATACTGACAGG-3'
RT-GAPDH-fwd	5'-CAAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3'
RT-GAPDH-rev	5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'
IL6R-dICD-GFP-fwd	5'-AGGCACGTGGTGCAGCTTCG-3'
IL6R-dICD-GFP-rev	5'-GGTGGATCCCCGAGAACAATGGCAATGCA-3'
hIL-6R-fwd	5'-AGAAGACGTGGAAGCTGCGGGCTC-3'
hIL-6R-rev	5'-GCATGCGGCCGCTTATCTGGGGAAGAA-3'
mIL-6R-fwd	5'-GATCGGTACCATGCTGACCGTCGGC-3'
mIL-6R-rev	5'-GTACGCGGCCGCTTATCTGGGGAATAA-3'
V1-1	5'-GATCGGTACCATGCTGGCCGTCGGC-3'
V1-2	5'-GGGCTCCTCTGGGGGAACATCCACCAGCAA-3'
V1-3	5'-GTGGATGTTCCCCCAGAGGAGCCCAAGCTC-3'
V1-4	5'-AGGTGGATCCGGCTGCACCATTTT-3'
V2-1	5'-TGAGGCAGCTCAGCGAC-3'
V2-2	5'-GGGCTCCTCGGGGGGAACATCCACCAGCAA-3'
V2-3	5'-GTGGATGTTCCCCCGAGGAGCCCCAGCTC-3'
V2-4	5'-AGGTGGCTGCAAGATTCCACA-3'
V3-1	5'-CAGCCGCTGCCAAC-3'
V3-2	5'-GGGCTCTGCTATCCAAGGCGTGCCCATGGC-3'
V3-3	5'-GGCACGCCTTGGATAGCAGAGCCCAGGACC-3'
V3-4	5'-TCGATTATCTGGGGAA-3'
V5-1	5'-CAGCCACCTGCCAACCTTGTG-3'
V5-2	5'-CCTGGATTCTGTCCAAGGAGTGCCCGTGAC-3'
V5-3	5'-GGCACTCCTTGGACAGAATCCAGGAGTCCT-3'
V6-2	5'-GGAATCTTGCACTGGGGCGAGGAC-3'
V6-3	5'-CAAGATCATGTCCCTG-3'
V7-2	5'-GTGGGCAGGGATACTGAAGAAGAATCTTG-3'
V7-3	5'-CTTCAGTATCCCTGCCACATTCC-3'
hT-2	5'-TGTGGGCAGTGGCATGCTCGAGGATTC-3'
hT-3	5'-TCTGCATTGCCATTGTCCTGAGACTCAAG-3'
hT-4	5'-ACTGCCACATTCCCTGGTTGCTGG-3'
hT-5	5'-GCAATGCAGAGGAGCGTTCCGAAG-3'
hI-2	5'-CTTGAACCTCAGAATGATGAAGACAC-3'
hI-3	5'-ATCATTCTGAGGTTCAAGAAGACG-3'

2 Material und Methoden

2.1.11 Rekombinante Proteine

Hyper-IL-6	Fusionsprotein aus humanem IL-6 und humanem löslichen IL-6R. Wurde in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig wie in SCHROERS et al. (2005) beschrieben produziert; vergleiche auch FISCHER et al. (1997).
humanes IL-6	Routinemäßig produziert wie in VAN DAM et al. (1993) beschrieben.
murines IL-6	Gekauft bei R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt).

2.1.12 Zelllinien

Ba/F3-gp130	Murine prä B-Zelllinie, stabil mit cDNA für humanes gp130 transduziert; kann somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6R α bzw. Hyper-IL-6 wachsen.
Ba/F3-gp130-hIL-6R	Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen; beschrieben in FISCHER et al. (1997); VOLLMER et al. (1999).
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen; etablierte Zelllinie für transiente Transfektionen (ATCC-Nummer: CRL-1573).
MEF ADAM10 ^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinase ADAM10.
MEF ADAM17 ^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinase ADAM17.
MEF ADAM10 ^{-/-} ADAM17 ^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17.
MEF wt	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten.

2 Material und Methoden

NIH3T3	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten; etablierte Zelllinie für transiente Transfektionen (ATCC-Nummer: CRL-1658).
Phoenix-Eco	Verpackungszelllinie (HEK293T), stabil mit cDNA transfiziert, die für Antigen, Polymerase und Hüllproteine für ecotrope murine Retroviren kodiert (KETTELER et al., 2002); zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan (Stanford University, Palo Alto, CA, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Bestimmung erfolgte spektrometrisch unter Verwendung eines NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation wurde durch Überprüfung des Absorptionsverhältnisses A_{260}/A_{280} festgestellt, das für DNA 1,8 oder höher und für RNA 2,0 oder höher war.

2.2.1.2 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Nach dem Schneiden der DNA durch Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.1.14) wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 U FastAP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in den Reaktionsansatz dephosphoryliert. Nach 1 h bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt.

2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Agarosegelen (1-2 %ig, abhängig von der Größe der DNA Fragmente) in horizontalen Elektrophoresekammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) voneinander getrennt. Die Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) wurde dafür in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht, mit 0,001 % Ethidiumbromid versetzt, in Schlitten ausgegossen und nach dem Erkalten mit den Proben beladen, die vorher mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt worden waren. Die Elektrophorese erfolgte

2 Material und Methoden

mit konstanter Spannung von 120 V, die Gele wurden mit Hilfe eines Gel Doc 2000-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) dokumentiert.

2.2.1.4 Erzeugung von glatten Enden an linearisierten Plasmiden

Nach dem Schneiden der DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden mittels Klenow Fragment (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) 5'-überstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen aufgefüllt und 3'-überstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen abgebaut, um glatte Enden (*blunt ends*) zu erzeugen. Hierfür wurde der Restriktionsansatz mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 10 U Klenow Fragment versetzt. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C und Inaktivierung der verwendeten Enzyme (10 min, 75 °C) wurde die DNA mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerprotokoll gereinigt.

2.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente zu isolieren wurden Proben, wie unter Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, mittels Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen voneinander getrennt und auf einem UV-Tisch visualisiert. Die gewünschten Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und die Agarosestücke in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerprotokoll.

2.2.1.6 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA wurden $\sim 1 \times 10^7$ Zellen (entspricht einer 10 cm-Zellkulturschale) nach Herstellerprotokoll mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aufgearbeitet. Die RNA-Konzentration wurde wie unter Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben bestimmt.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Geschnittener und dephosphorylierter Vektor und geschnittenes Insert wurden im molaren Verhältnis 1:3 zusammen mit 1 U T4 DNA Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und 2 µl Ligasepuffer eingesetzt (20 µl Gesamtansatz, *sticky end*-Klonierung). Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Für *blunt end*-

2 Material und Methoden

Klonierungen wurden 2 U Ligase und zusätzlich 2 µl einer 50 %igen (m/V) PEG 4000-Lösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

2.2.1.8 Plasmid-DNA Mini-Präparation

Für Mini-Präparationen von Plasmid-DNA wurde LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. 2 ml Medium wurde mit einer einzelnen Kolonie einer LB-Platte angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C, 900 rpm). Nach Zentrifugation (15.000 g, 1 min) wurde das Pellet in 200 µl S1 Puffer resuspendiert, 200 µl S2 Puffer zugegeben und die Mischung für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl S3 Puffer und Invertieren der Suspension wurde zentrifugiert (15.000 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand in ein neues 2 ml- Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1200 µl Ethanol 100 % wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation pelletiert (15.000 g, 4 °C, 10 min) und anschließend mit 500 µl Ethanol 70 % gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (5 min, 15.000 g, 4 °C) wurde das DNA-Pellet in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.9 Plasmid-DNA Midi-Präparation

Zur Gewinnung großer DNA-Mengen wurden 100 ml LB-Medium mit dem passenden Antibiotikum versetzt, mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 min) und das Plasmid aus dem Bakterienpellet mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) isoliert. Nach Lösen der DNA in 120 µl ddH₂O wurde die Konzentration wie unter Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben bestimmt.

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Für Klonierungen wurde hierbei die Pfu Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet, da sie über eine Korrekturlese-Funktion (*proof-reading*) verfügt; bei rein qualitativem Nachweis war eine solche Fähigkeit nicht notwendig, hier kam daher die DreamTaq (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) zum Einsatz.

2 Material und Methoden

Üblicherweise wurde der folgende Ansatz für alle PCRs verwendet:

Template	100 ng Plasmid
5'-Primer	10 μ M
3'-Primer	10 μ M
dNTPs	jeweils 10 mM
PCR Puffer (10 x)	5 μ l
Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 50 μ l

Für die PCR wurde üblicherweise das folgende Temperaturprogramm verwendet:

95 °C	2 min	} 30 Zyklen
95 °C	1 min	
68 °C	1 min	
72 °C	0,5 min - 2,5 min	
72 °C	10 min	

Die Elongationszeit (vierte Zeile des Programms) wurde abhängig von der Größe des Amplifikats und der verwendeten Polymerase gewählt.

Um zwei oder mehr einzelne PCR-Fragmente miteinander zu ligieren, wurde eine *Splicing by Overlapping Extensions PCR (SOE-PCR)* durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 1 μ l der einzelnen PCR-Ansätze als Template in dem oben gezeigten Ansatz verwendet.

2.2.1.11 Reverse Transkription (RT)

Zur Erzeugung von cDNA wurden 2 μ g RNA mit 100 μ M oligo-dT-Primer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 13 μ l mit ddH₂O aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 70 °C und Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1 μ l RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), 2 μ l des entsprechenden Puffers und 4 μ l dNTP-Mix (1 μ l) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37 °C

2 Material und Methoden

und abschließend noch einmal für 10 min bei 70 °C inkubiert. Für die anschließende PCR wurde 1 µl der entstandenen cDNA eingesetzt.

2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Alle selbst erstellten Plasmide wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert. Hierfür wurden die firmeneigenen Primer pcDNA3.1-FP und pcDNA3.1-RP/1 verwendet.

2.2.1.13 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

Ein 25 µl-Aliquot chemisch kompetenter *Escherichia coli* XL-1 Blue wurde auf Eis für 20 min aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz versetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis erfolgte die Hitzeschock-Transformation (30 sec, 42 °C). Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Bakterien vorsichtig in 500 µl angewärmten LB-Medium resuspendiert und anschließend für eine Stunde inkubiert (37 °C, 700 rpm). 100 µl der Bakteriensuspension wurden schließlich auf einer LB-Platte, die das passende Antibiotikum zur Selektion enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.14 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten erfolgte mit Restriktionsendonucleasen. Für präparative Arbeiten wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 10 U des entsprechenden Enzyms mit passendem Puffer in einem Gesamtansatz von 100 µl für 3 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer entsprechenden Menge DNA-Ladepuffer beendet und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel voneinander getrennt. Mit PCR-Produkten, die für die Ligation in einen Expressionsvektor gedacht waren, wurde analog verfahren.

Bei analytischen Arbeiten wurde 1 µg Plasmid-DNA aus einer Mini-Präparation verwendet. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert.

Waren für einen Restriktionsansatz zwei verschiedene Enzyme notwendig, wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, in dem beide Restriktionsendonucleasen die höchste Aktivität zeigten.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle verwendeten adhärenenten Zelllinien wuchsen in DMEM (+/+) und wurden bei 37 °C in einem Inkubator NuAire US Autoflow (NuAire, Inc., Plymouth, USA) mit 5 % CO₂ kultiviert. Üblicherweise wurden sie alle drei Tage (Konfluenz ~ 80 %) mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:20 in eine neue 10 cm-Schale mit 10 ml Kulturmedium überführt.

2.2.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Ba/F3-gp130 wurden in DMEM (+/+) kultiviert, das mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 versetzt war. Sie wurden analog zu den adhärenenten Zellen in 10 cm-Schalen bei 37 °C in einem Inkubator NuAire US Autoflow (NuAire, Inc., Plymouth, USA) mit 5 % CO₂ kultiviert und standardmäßig alle fünf Tage im Verhältnis 1:1.000 passagiert. Stabil mit cDNA für humanen oder murinen IL-6R transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wuchsen statt mit Hyper-IL-6 mit 10 ng/ml humanem IL-6.

2.2.2.3 Transfektion von HEK293 und Phoenix-Eco

Zur Transfektion von HEK293-Zellen wurden 2×10^6 Zellen in eine 10 cm-Schale mit 10 ml DMEM (+/+) ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag mittels Turbofect (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Hierfür wurden 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl TurboFect in 1000 µl DMEM (-/-) gemischt und zu den Zellen getropft. Shedding-Experimente erfolgten wie in den Abschnitten 2.2.2.9 und 2.2.2.10 beschrieben 48 h nach Transfektion.

Phoenix-Eco-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 8×10^5 Zellen/well in einer 6-well-Platte mit 2 ml DMEM (+/+)/well ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit einer Mischung aus 1 µg Plasmid-DNA und 2 µl TurboFect in 200 µl DMEM (-/-), die zu den Zellen getropft wurde. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde das Medium gegen IMDM (+/+) ausgetauscht. Dieser Überstand wurde am nächsten Tag zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen benutzt (siehe Abschnitt 2.2.2.6).

Ein Ansatz mit pEGFP-N1 als Plasmid diente als Kontrolle der Transfektionseffizienz, die üblicherweise bei 80 % in beiden Zelllinien lag.

2 Material und Methoden

2.2.2.4 Transfektion von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Zur Transfektion von sowohl NIH3T3-Zellen als auch den ADAM10- bzw. ADAM17-defizienten MEFs wurden 2×10^6 Zellen in eine 10 cm-Schale mit 10 ml DMEM (+/+) ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag mittels Turbofect (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Hierfür wurden 5 µg Plasmid-DNA und 15 µl TurboFect in 1000 µl DMEM (-/-) gemischt. Vor dem Zutropfen des Reaktionsansatzes wurde das Medium aus der Schale abgesaugt und durch 4 ml frisches DMEM (+/+) ersetzt. Shedding-Experimente erfolgten wie in den Abschnitten 2.2.2.9 und 2.2.2.10 beschrieben 48 h nach Transfektion.

Ein Ansatz mit pEGFP-N1 als Plasmid diente als Kontrolle der Transfektionseffizienz, die üblicherweise bei 70 % in allen verwendeten Zelllinien lag.

2.2.2.5 Doppeltransfektion von Plasmid-DNA und siRNA

Zur Herunterregulation von spezifischen Genen in NIH3T3-Zellen wurden 2×10^6 Zellen in eine 10 cm-Schale mit 10 ml DMEM (+/+) ausgesät. Die Doppeltransfektion von Plasmid-DNA und siRNA erfolgte am nächsten Tag mittels Turbofect siRNA Transfection Reagent (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Hierfür wurden 5 µg Plasmid-DNA, jeweils 3 µl der drei spezifischen siRNAs bzw. unspezifischen Kontroll-siRNAs (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) und 15 µl TurboFect in 1000 µl DMEM (-/-) gemischt. Vor dem Zutropfen des Reaktionsansatzes wurde das Medium aus der Schale abgesaugt und durch 4 ml frisches DMEM (+/+) ersetzt. Shedding-Experimente erfolgten wie in den Abschnitten 2.2.2.9 und 2.2.2.10 beschrieben 48 h nach Transfektion.

2.2.2.6 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen

Zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen wurde Überstand von Phoenix-Eco-Zellen verwendet, die mit pMOWS-Plasmiden transfiziert wurden (KETTELER et al. (2002), siehe Abschnitt 2.2.2.3). Der retrovirale Überstand wurde durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben und hiervon 250 µl mit 50 µl Ba/F3-gp130-Zellen (entsprechen 1×10^5 Zellen) vermischt und 3 µl Polybren (f. c. 8 µg/ml) hinzugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 g, 2 h, 25 °C) wurden die Zellen für 48 h in 6-well-Platten mit jeweils 5 ml DMEM (+/+) kultiviert, das mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 versetzt war. Anschließend wurde zur Selektion

2 Material und Methoden

Puromycin (1,5 µg/ml) für mindestens zwei Wochen zugesetzt. Ba/F3-gp130-Zellen, die stabil mit IL-6R transduziert worden waren, wurden danach auf 10 ng/ml humanes IL-6 umgestellt.

2.2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression verschiedener Proteine auf Zellen wurde die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) verwendet. Hierfür wurde eine geeignete Anzahl Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C) und mit dem passenden Primärantikörper in 100 µl FACS-Puffer für 1 h auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer und einer weiteren Zentrifugation (300 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen – wenn nötig – mit einem passenden Sekundärantikörper in 100 µl FACS-Puffer wiederum für 1 h auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem finalen Waschen mit 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen noch einmal zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und analysiert (FACSCanto und FACS DIVA Software, beides von BD Biosciences, Heidelberg).

2.2.2.8 Proliferationsassay

Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen, gezählt und in DMEM (+/+) in einer Konzentration von 5×10^3 /100 µl resuspendiert. Nach Zugabe der entsprechenden Zytokine wurden jeweils 100 µl/well in eine 96-well-Platte pipettiert und für zwei Tage inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega GmbH, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers bestimmt und auf einem Lambda Fluoro 320 Fluorimeter (ex-filter 530/25, em-filter 590/35) gemessen. Die nach 60 min gemessenen Werte wurden durch Subtraktion der nach 0 min gemessenen Werte normalisiert und als RLU (*Relative Light Units*) angegeben. Alle Werte wurden durch Dreifachbestimmung ermittelt.

2.2.2.9 Analyse des Ectodomänen-Shedding (6well-Format)

Zur Bestimmung, welche absolute Menge des IL-6R und der erstellten Chimären sich im Überstand und welche sich im Zelllysat nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, von Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) befindet, wurden transduzierte HEK293- oder NIH3T3-Zellen 24 h nach Transfektion mit 2 ml Trypsin-EDTA

2 Material und Methoden

abgelöst, zentrifugiert (5 min, 1.500 g), gezählt und in 6-well-Platten mit einer Zellzahl von 7×10^5 /well in 2 ml DMEM (+/+) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml DMEM (-/-) ersetzt. Nach Zugabe von Inhibitoren wurden die Zellen 30 min inkubiert, nach Zugabe des ADAM17-Aktivators PMA weitere 2 h. Der Überstand wurde anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4 °C), um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Aus den in der 6-well-Schale verbliebenen Zellen wurde ein Zelllysat erstellt (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Die Menge des enthaltenen IL-6R in Überstand und Lysat wurde entweder mittels ELISA (siehe Abschnitt 2.2.3.7) quantifiziert oder per Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.3.5) analysiert, wobei der lösliche Rezeptor hierfür vorher aus dem Überstand präzipitiert wurde.

2.2.2.10 Analyse des Ectodomänen-Shedding (24well-Format)

Für alle weiteren Untersuchungen zum Ectodomänen-Shedding wurden transfizierte Zellen 24 h nach Transfektion mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst, zentrifugiert (5 min, 1.500 g), gezählt und in 24-well-Platten mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ /well in 500 μ l DMEM (+/+) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 200 μ l DMEM (-/-) ersetzt. Nach Zugabe von Inhibitoren wurden die Zellen 30 min inkubiert, das Medium dann abgesaugt und durch 200 μ l neues DMEM (-/-) ersetzt, dem die identischen Inhibitoren und die das Shedding auslösenden Substanzen zugesetzt waren. Mit BzATP wurden die Zellen 30 min, mit Ionomycin 60 min stimuliert. Anschließend wurde der Überstand in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4 °C), um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Menge des enthaltenen IL-6R in Überstand wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 2.2.3.7) quantifiziert.

2.2.3 Protein-biochemische Methoden

2.2.3.1 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden in 1 ml eiskaltem PBS abgekratzt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (15 sec, 15.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in Lysis Puffer resuspendiert (6-well-Platte: 75 μ l; 10cm-Schale: 300 μ l) und für 60 min unter permanenter Bewegung bei 4 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (30 min, 15.000 g, 4 °C), um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde das Zelllysat in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde der Proteingehalt bestimmt.

2 Material und Methoden

2.2.3.2 Bestimmung des Proteingehalts (BCA-Assay)

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten wurde der BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn) benutzt. Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10 mit Lysispuffer verdünnt. Der Assay mit den verdünnten Proben und BSA in verschiedenen Konzentrationen zur Erstellung einer Eichgerade wurde in einer 96-well-Platte nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgte die Analyse bei 562 nm in einem Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maennedorf, Schweiz).

2.2.3.3 Präzipitation von glykosylierten Proteinen aus Zellkultur-Überständen

Zur Präzipitation von glykosylierten löslichen Rezeptoren aus Zellkultur-Überständen wurden 1000 µl Überstand mit 50 µl Concanavalin-A Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) versetzt, die vorher zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C unter permanenter Bewegung wurde die Sepharose durch Zentrifugation pelletiert (2 min, 2.700 g, 4 °C), der Überstand verworfen und die Sepharose zweimal mit je 500 µl eiskaltem PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert (2 min, 2.700 g, 4 °C). Die Sepharose wurde anschließend in 40 µl Laemmli-Puffer (2,5x) aufgekocht (10 min, 95 °C), erneut zentrifugiert (2 min, 2.700 g, 4 °C) und der Überstand für die Analyse mittels Western Blot verwendet.

2.2.3.4 SDS-PAGE

Zur Trennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Hilfe des Mini-PROTEAN 3 Cell-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Verwendet wurden selbst gegossene Gele der Dicke 1 mm, die 10 Probenaschen aufwiesen und aus einem Laufgel von 6 cm und einem Trenngel von 1 cm Höhe bestanden. Proben von Zelllysaten wurden vor dem Auftragen mit Laemmli-Puffer (5x) versetzt und aufgekocht (10 min, 95 °C). Die Vorgehensweise bei Überständen ist in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben. Die auspolymerisierten Gele wurden mit Proben und Marker beladen und die Proteine bei 100-180 V voneinander getrennt, bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

2 Material und Methoden

2.2.3.5 Western Blot

Um die durch SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF, von GE Healthcare, München) zu transferieren, wurde das Trans-Blot SD semi-dry transfer System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) benutzt. Hierfür wurde die PVDF-Membran zuerst zur Aktivierung 2 min lang in Methanol inkubiert, danach 2 min in ddH₂O und schließlich 2 min in Transferpuffer. Acht Stücke Whatman-Papier wurden ebenfalls für 2 min in Transferpuffer inkubiert. Für den Transfer wurden nach Anweisung des Herstellers vier Stücke Whatman-Papier, Membran, Gel und abschließend wieder vier Stücke Whatman-Papier im Transfergerät aufeinander gelegt und die Proteine elektrophoretisch bei konstanter Spannung (15 V, 90 min) transferiert. Anschließend wurde die Membran in einem 50 ml-Falcon mit 5 %-Milchpulver, gelöst in TBS-T, bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 15 min und zwei Waschschritten mit TBS für jeweils 10 min wurden die Chemilumineszenz der Proteine mit Hilfe des ECL⁺ Kits (GE Healthcare, München) und eines FluorChem Q-Geräts (Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA) detektiert.

2.2.3.6 Stripping von Western Blot-Membranen

Die Ladekontrolle erfolgte bei Western Blots, auf denen Zellysate analysiert wurden, durch Detektion von β -actin auf der Membran. Zum Entfernen der Antikörper des ersten Detektionsverfahrens wurden die Membranen hierfür mit Stripping-Puffer für 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen, erneut mit Milchpulver blockiert und über Nacht mit dem neuen Primärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte am nächsten Tag wie in Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben.

2.2.3.7 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung des sIL-6R und der chimären Proteine wurde ein Sandwich-ELISA benutzt. Hierfür wurde der erste Antikörper über Nacht an eine 96-well-Mikrotiterplatte (Greiner Microton, Solingen) gebunden (50 μ l/well), nicht gebundener Antikörper anschließend durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 μ l

2 Material und Methoden

PBS-T entfernt und nicht besetzte Bindungsstellen auf der Platte durch Inkubation mit Blocking-Puffer besetzt. Nach 2 h wurden die wells erneut dreimal mit jeweils 200 µl PBS-T gewaschen und die mit einer Lösung von 1 % BSA in PBS verdünnten Proben aufgetragen. Zur absoluten Quantifizierung wurde rekombinantes Protein in verschiedenen Verdünnungen verwendet und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µl PBS-T entfernt und die wells mit 50 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers bedeckt. Nach weiteren 2 h wurden die wells wieder dreimal gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und 100 µl Streptavidin-POD-Lösung (von R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, verdünnt 1:200 in 1 % BSA/PBS) dazugegeben. Nach 30 min Inkubation unter Lichtausschluss wurden die wells dreimal mit jeweils 200 µl PBS-T gewaschen und 50 µl BM blue POD-Substrat (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) zugegeben. Die Reaktion wurde nach höchstens 20 min Inkubation durch Zugabe von 50 µl 1,8 M H₂SO₄ gestoppt und die colorimetrische Auswertung bei 450 nm an einem Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) durchgeführt.

Folgende Antikörper und Lösungen wurden benutzt:

Protein	Primärantikörper	Blocking-Puffer	Detektionsantikörper
hIL-6R	4-11 1 µg/ml	PBS mit 1 % BSA/ 5 % Saccharose	BAF227 50 ng/ml
mIL-6R	AF1830 1 µg/ml	PBS mit 5 % BSA	BAF1830 100 ng/ml

Zur Detektion der einzelnen Chimären wurde – je nach Domänenzusammensetzung der Chimären – einer der beiden geschilderten ELISA verwendet.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Alle geschilderten Tierexperimente wurden gemeinsam mit Dr. Athena Chalaris oder Dr. Nathalie Jänner (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.2.4.1 Tierhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der geschlossenen Barrierehaltung des Victor-Hensen-Hauses Kiel gehalten. Die Haltung erfolgte in *isolated ventilated cages* (IVC-Racks), die mikrobielle Belastung wurde in regelmäßigen Abständen geprüft.

2.2.4.2 Isolierung von primären Milzzellen

Nach Töten der Maus durch zervikale Dislokation wurde die Milz entnommen und in ein 15 ml-Falcon mit 5 ml eiskaltem PBS gegeben. Die Milz wurde zur Zerkleinerung durch ein Metallsieb gedrückt und die Zellen in einer Petrischale in 5 ml PBS mit 0,5 % BSA aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1500 rpm) und Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen. Nach Zugabe von 10 ml PBS mit 0,5 % BSA wurde erneut zentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS mit 0,5 % BSA resuspendiert, die Zellen durch ein Nylonsieb mit Siebdurchmesser 40 μm (BD Falcon Cell Strainer, von BD Biosciences, Heidelberg) vereinzelt, anschließend gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml mit NaCl-Puffer eingestellt.

2.2.4.3 Isolierung von primären T-Zellen

Zur Isolierung von murinen T-Zellen wurde im Prinzip wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben vorgegangen. Allerdings wurden aus den Milzzellen nach dem Zählen T-Zellen mit Hilfe des *MACS Pan T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Hierbei handelt es sich um eine Negativselektion, d. h. alle nicht-T-Zellen werden erkannt und aussortiert, die benötigten T-Zellen verbleiben unbehandelt. Hierfür werden die Zellen mit einer Mischung aus monoklonalen, biotinylierten Antikörpern versetzt, die gegen CD45R, DX5, CD11b und Ter-119 gerichtet sind, und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Als zweiter Schritt werden magnetische *beads* zugesetzt, an die monoklonale α -biotin-Antikörper gekoppelt sind. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C und einer Zentrifugation (10 min, 300 g) wird der Überstand entfernt, das Pellet in Puffer resuspendiert und die magnetisch-markierten Zellen über eine MS-Säule sortiert. Die gereinigten T-Zellen befanden sich anschließend im Eluat und konnten für die Stimulationsexperimente verwendet werden.

2.2.5 Statistische Analysen

Soweit nicht anders angegeben entsprechen die Werte dem Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Die statistische Analyse wurde mit einem *Student's unpaired t test* durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen (Kennzeichnung mit einem *).

3 Ergebnisse

3.1 Keine Reduktion des löslichen murinen IL-6R im Serum hypomorpher ADAM17^{ex/ex}-Mäuse

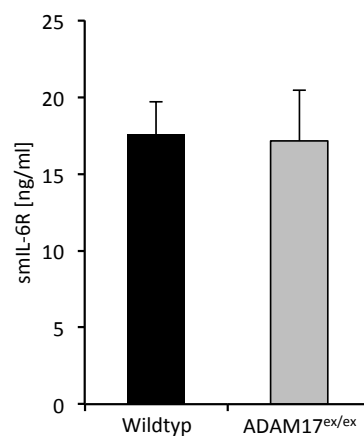


Abbildung 3.1: Löslicher muriner IL-6R im Mause Serum. Die Menge an smIL-6R in aus Vollblut gewonnenem Serum wurde mittels eines ELISA gegen den mIL-6R bestimmt. Vergleich zwischen C57BL/6-Wildtyp- und hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen. Gezeigt in der Mittelwert von drei Tieren pro Gruppe \pm SD. Alle Werte wurden dreifach bestimmt.

Da im Gegensatz zum Menschen für die Maus kein alternatives Splicing der mRNA des Interleukin-6 Rezeptors beschrieben ist, wird davon ausgegangen, dass der lösliche Rezeptor in der Maus nur durch proteolytische Spaltung der membrangebundenen Form entsteht. Um die Beteiligung der Protease ADAM17 zu untersuchen, wurde die Menge an löslichem IL-6R im Serum von C57BL/6-Wildtyp- und hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen bestimmt. Letztere exprimieren nur rund 5% ADAM17 im Vergleich zu Wildtyptieren. Hierfür wurde den Mäusen Vollblut aus der Schwanzvene entnommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 1 h bei 4 °C stehen gelassen, bis das Blut vollständig geronnen war. Nach einer Zentrifugation (5 min, 10.000 rpm, 4 °C)

3 Ergebnisse

wurde das erhaltene Serum im Verhältnis 1:15 verdünnt und mittels eines spezifischen mIL-6R-ELISA quantitativ bestimmt.

Wie Abbildung 3.1 zeigt, ist die Menge an smIL-6R im Serum hypomorpher ADAM17^{ex/ex}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypieren nicht reduziert, eine Beteiligung der Sheddase ADAM17 folglich fraglich.

3.2 Shedding von IL-6R und CD62L von murinen CD3⁺-Milzzellen

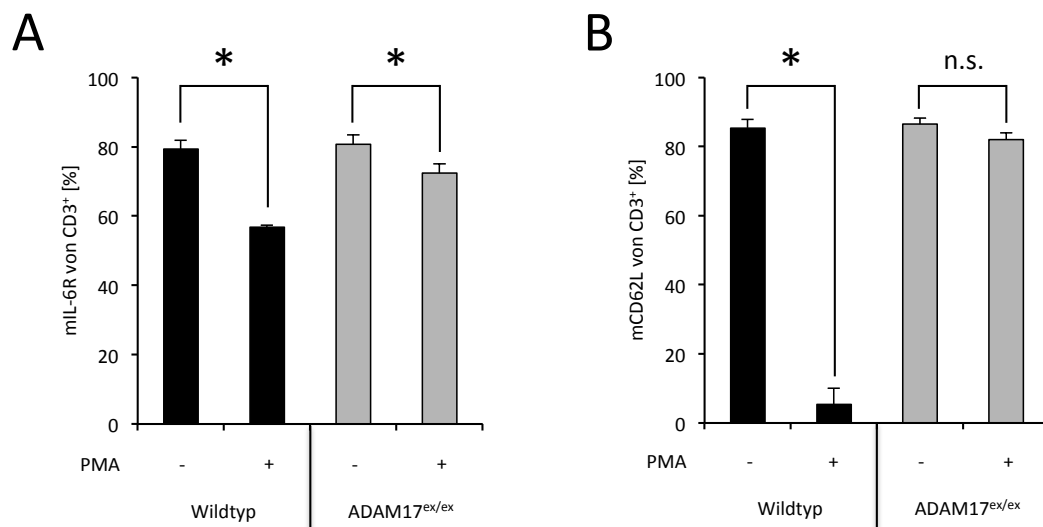


Abbildung 3.2: Shedding von IL-6R und CD62L von murinen CD3⁺-Milzzellen. Milzzellen von Wildtyp- oder ADAM17^{ex/ex}-Mäusen wurden wie unter Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben isoliert und anschließend mit PMA für 2 h stimuliert. Die Oberflächenexpression von (A) mIL-6R und (B) mCD62L wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, gezeigt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der CD3⁺-Milzzellen. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD von vier Wildtyp- und zwei ADAM17^{ex/ex}-Mäusen.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle der Sheddase ADAM17 in der Maus wurden Milzzellen aus Wildtyp- und hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isoliert und mit 100 nM Phorbol-12-acetat-13-myristat (PMA), dem stärksten bekannten Aktivator von ADAM17, für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen mCD3, mIL-6R und mCD62L gefärbt und deren Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Abbildung 3.2 A zeigt den prozentualen Anteil der mIL-6R positiven Zellen an der

3 Ergebnisse

Gesamtzahl der CD3⁺-Milzzellen. PMA induziert in Zellen von Wildtyp-Mäusen geringes Shedding des endogenen mIL-6R ($79,3 \pm 2,5\%$ ohne, $56,7 \pm 0,6\%$ mit PMA, $p < 0,001$, schwarze Balken). Dieser Effekt ist in den Zellen der ADAM17^{ex/ex}-Mäuse geringer, wobei PMA auch hier geringes Shedding des mIL-6R auslöst ($80,7 \pm 2,8\%$ ohne, $72,4 \pm 2,7\%$ mit PMA, $p = 0,049$, graue Balken). Dieses Experiment zeigt, dass murines ADAM17 prinzipiell in der Lage ist, mIL-6R zu prozessieren. Allerdings fällt der Effekt deutlich geringer aus als zuvor angenommen, da die Milzzellen aus Wildtyp-Tieren auch nach 2 h Stimulation mit PMA noch zu fast 60 % mIL-6R-positiv sind.

Im Gegensatz dazu löst PMA auf den gleichen Wildtyp-Zellen ein fast vollständiges Shedding von CD62L (L-Selectin) aus ($85,4 \pm 2,4\%$ ohne, $5,4 \pm 4,7\%$ mit PMA, $p < 0,001$, schwarze Balken in Abbildung 3.2 B). Dieser Effekt fehlt in den Zellen der hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäuse ($86,5 \pm 1,7\%$ ohne, $82 \pm 1,9\%$ mit PMA, $p = 0,08$, graue Balken). Das Experiment wurde freundlicherweise von Dr. Athena Chalaris (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt.

Das Experiment zeigt klar, dass ADAM17 die verantwortliche Protease für das Shedding von L-Selectin nach PMA-Stimulation in der Maus ist (Li et al., 2006), während es für den murinen IL-6R nicht so eindeutig ist. Im Folgenden soll das Shedding des mIL-6R daher genauer durch verschiedene Methoden *in vitro* untersucht werden.

3.3 Generierung von Expressionsplasmiden für murinen und humanen IL-6R

Zu Beginn dieser Arbeit waren Fusionskonstrukte aus humanem bzw. murinem IL-6R und GFP im Vektor pcDNA3.1 vorhanden. Daher wurde zunächst mIL-6R-GFP in den für die retrovirale Transduktion von murinen Zellen benötigten Vektor pMOWS subkloniert (KETTELER et al., 2002). Hierfür wurde der Vektor pcDNA3.1-mIL-6R-GFP mit den beiden Restriktionsendonucleasen *PmeI* und *Ecl136II* geschnitten, um das Insert mIL-6R-GFP mit *blunt ends* zu erhalten. Der Vektor pMOWS-GFP wurde mit den beiden Endonucleasen *EcoRI* und *XagI* geschnitten und anschließend mit Klenow Fragment behandelt, um am Vektor ebenfalls *blunt ends* zu erhalten. Die DNA wurde daraufhin durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt, die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA gereinigt und ligiert. Das entstandene Plasmid wird im Folgenden als pMOWS-mIL-6R-GFP bezeichnet (siehe Abbildung 3.3 A).

Für alle Experimente, bei denen transient transfizierte Zellen zum Einsatz kommen,

3 Ergebnisse

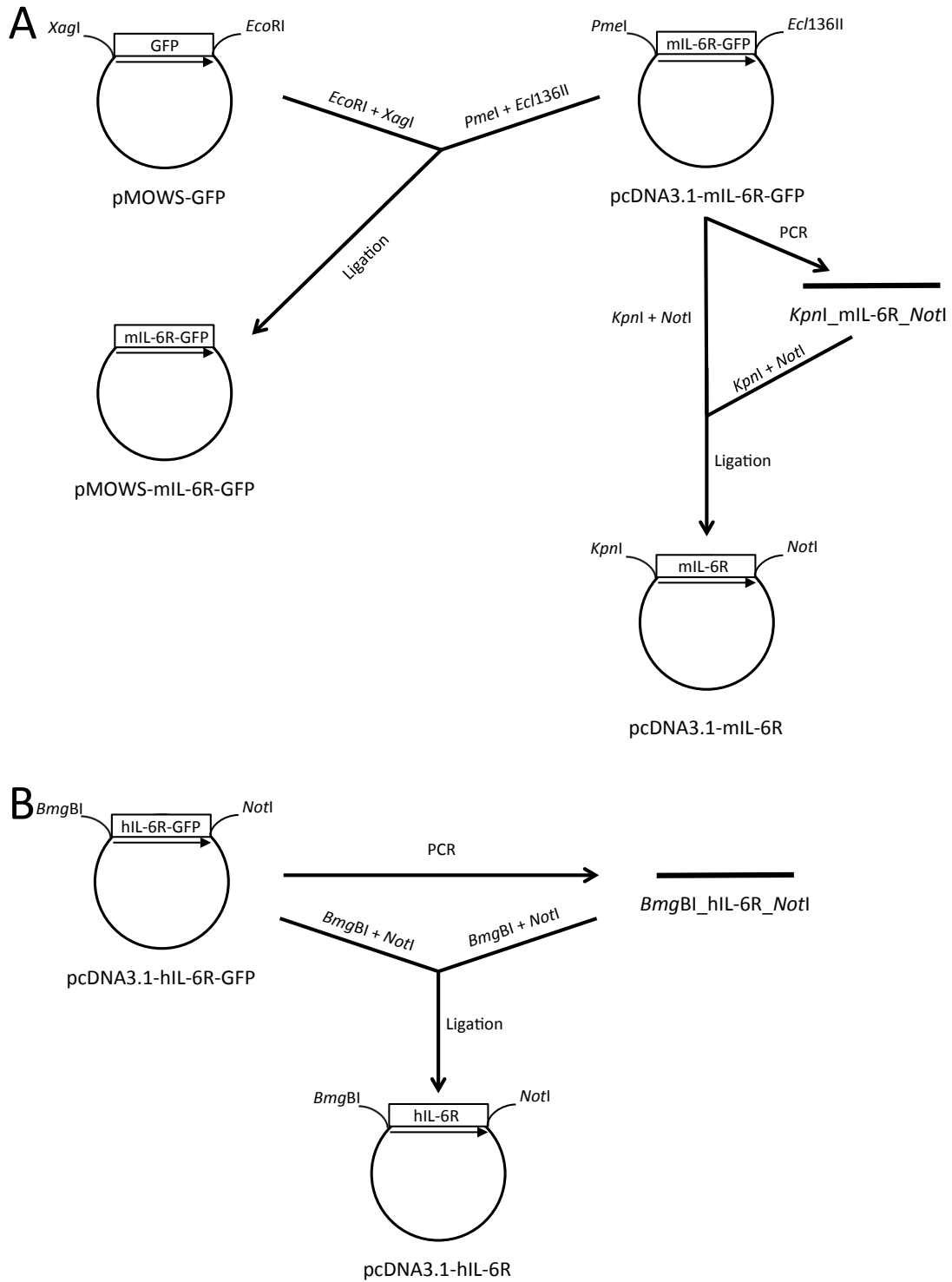


Abbildung 3.3: Generierung verschiedener Expressionsplasmide für murinen und humanen IL-6R. Alle Details sind in Abschnitt 3.3 beschrieben.

3 Ergebnisse

sollten humaner und muriner IL-6R ohne C-terminal fusioniertes GFP verwendet werden. Dafür wurde die vollständige kodierende Sequenz des mIL-6R in einer PCR mit den beiden Oligonukleotiden mIL-6R-fwd und mIL-6R-rev aus pcDNA3.1-mIL-6R-GFP amplifiziert, wobei mIL6R-fwd ein Stoppcodon nach der letzten Aminosäure enthielt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den beiden Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *NotI* geschnitten. Zur Präparation des Vektors wurde das Plasmid pcDNA3.1-mIL-6R-GFP mit den gleichen Enzymen geschnitten, dephosphoryliert und gereinigt. Der nach Ligation erhaltene Vektor wurde pcDNA3.1-mIL-6R genannt.

Zur Herstellung eines Expressionsplasmids für hIL-6R ohne GFP wurde die natürlicherweise vorkommende *BmgBI*-Schnittstelle im humanen IL-6R genutzt. Durch die beiden Oligonukleotide hIL-6R-fwd und hIL-6R-rev wurde der Bereich der Aminosäuren 389–468 mittels PCR amplifiziert, wobei hIL-6R-rev ein Stoppcodon nach der letzten Aminosäure enthielt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den beiden Restriktionsendonukleasen *BmgBI* und *NotI* geschnitten. Zur Präparation des Vektors wurde das Plasmid pcDNA3.1-hIL-6R-GFP mit den gleichen Enzymen geschnitten, dephosphoryliert und gereinigt. Der nach Ligation erhaltene Vektor wurde pcDNA3.1-hIL-6R genannt (siehe Abbildung 3.3 B).

3.4 Generierung einer murinen IL-6R exprimierenden Ba/F3-gp130-Zelllinie

Das Shedding des mIL-6R sollte nunmehr in einer murinen Zelllinie *in vitro* untersucht werden. Für diesen Zweck wurden Ba/F3-gp130-Zellen gewählt. Diese Zelllinie wächst in Abhängigkeit von Hyper-IL-6, einem Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6R α , die mit Hilfe eines flexiblen Linkers miteinander verbunden sind (FISCHER et al., 1997). Ba/F3-gp130-Zellen wurden retroviral mit pMOWS-mIL-6R-GFP transduziert und mit Hilfe des Antibiotikums Puromycin selektiert.

Nach erfolgreicher Transduktion proliferierten die Zellen mit IL-6 statt mit Hyper-IL-6. Die Oberflächenexpression des Fusionsproteins wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen (siehe Abbildung 3.4).

3 Ergebnisse

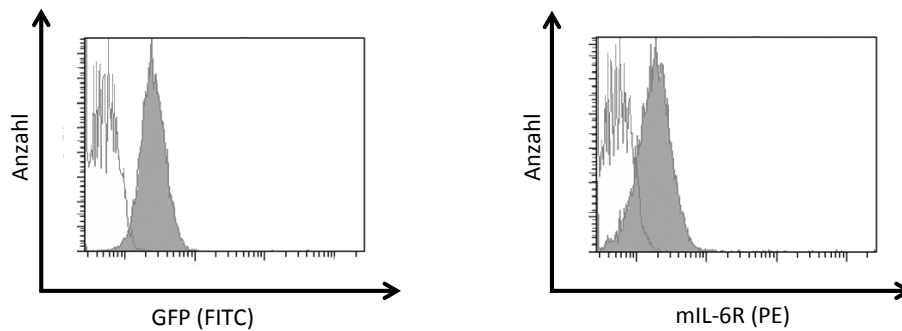


Abbildung 3.4: Expression von mIL-6R-GFP in stabil transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen. Intrazelluläre Expression von GFP wurde im FITC-Kanal gemessen (linkes Diagramm). Die Oberflächenexpression des mIL-6R wurde mit Hilfe eines PE-markierten Antikörpers detektiert (siehe Abschnitt 2.1.2). Ba/F3-gp130-Zellen dienten als Negativkontrolle (ungefüllte Histogramme).

Um sicherzustellen, dass der transduzierte mIL-6R funktional ist, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit verschiedenen Zytokinen (humanes IL-6, murines IL-6, Hyper-IL-6, jeweils 10 ng/ml) für 48 h kultiviert. Es konnte vorher gezeigt werden, dass Zytokinentzug zur Induktion von intrinsischer Apoptose in Ba/F3-gp130-Zellen führt (CHALARIS et al., 2007), d. h. Zellen ohne Zytokin sterben ab und geben kein Signal im Proliferationsassay. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Es zeigt sich, dass die mit mIL-6R-GFP transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen sowohl in Gegenwart von humanem als auch von murinem IL-6 wachsen. Hyper-IL-6 dient als Positivkontrolle (Abbildung 3.5 A). Dieses belegte, dass der transduzierte mIL-6R funktional ist, d. h. durch IL-6 ausgelöste Proliferation vermitteln kann. Während humanes IL-6 sowohl an den murinen als auch an den humanen IL-6R binden kann, signalisiert murines IL-6 spezie-spezifisch ausschließlich über den mIL-6R (JOSTOCK et al., 2001). Ba/F3-gp130-Zellen, die mit humanem IL-6R transduziert sind, wachsen daher nur in Gegenwart von humanem IL-6 (Abbildung 3.5 B). Ba/F3-gp130-Zellen wachsen ausschließlich mit Hyper-IL-6 (Abbildung 3.5 C).

3 Ergebnisse

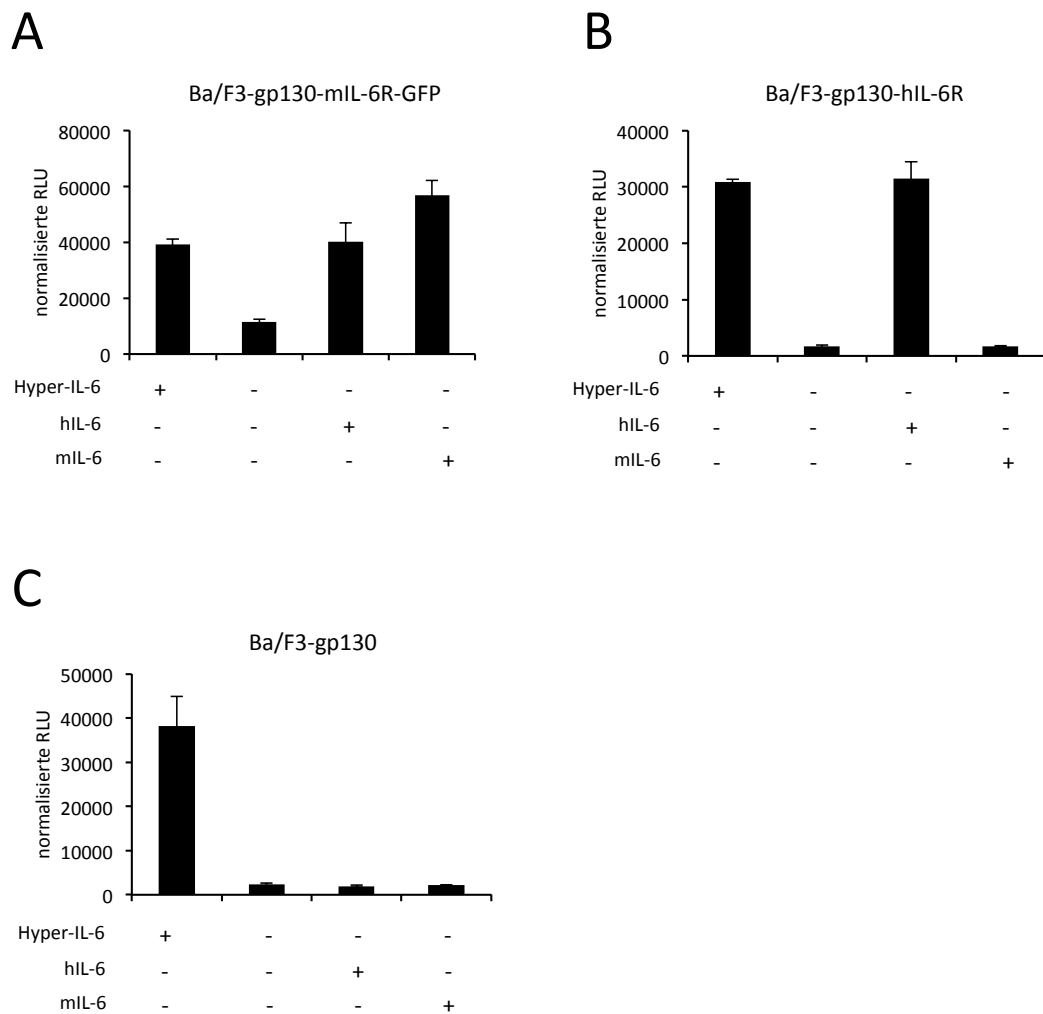


Abbildung 3.5: Proliferation von stabil transduzierten Ba/F3-Zelllinien. (A) Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-mIL-6R-GFP-Zellen wurden für 48 h mit 10 ng/ml der angegebenen Zytokine kultiviert. Als Vergleich dienten (B) stabil mit hIL-6R transduzierte Zellen sowie (C) Ba/F3-gp130-Zellen. Die Proliferation der Zellen wurde wie unter 2.2.2.8 beschrieben bestimmt.

3.5 NIH3T3-Zellen enthalten mIL-6R-RNA, aber kein detektierbares Protein

Neben den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Ba/F3-gp130-Zellen soll das Shedding des murinen IL-6R in einer weiteren murinen Zelllinie untersucht werden. Hierfür wur-

3 Ergebnisse

de die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 gewählt. Um sicherzustellen, dass diese nicht schon endogen mIL-6R exprimiert, der bei den geplanten Versuchen stören könnte, wurde die Existenz von entsprechender RNA mittels RT-PCR überprüft (siehe Abbildung 3.6 A). Im Gegensatz zu Ba/F3-gp130-Zellen enthalten NIH3T3-Zellen RNA für mIL-6R (Primer RT-mIL-6R-fwd und RT-mIL-6R-rev). Durch Sequenzierung des PCR-Produkts wurde sichergestellt, dass es sich tatsächlich um mIL-6R-RNA handelt. Die Verwendung gleicher Mengen cDNA wurde durch den Nachweis von murinem GAPDH (Primer RT-GAPDH-fwd und RT-GAPDH-rev) kontrolliert.

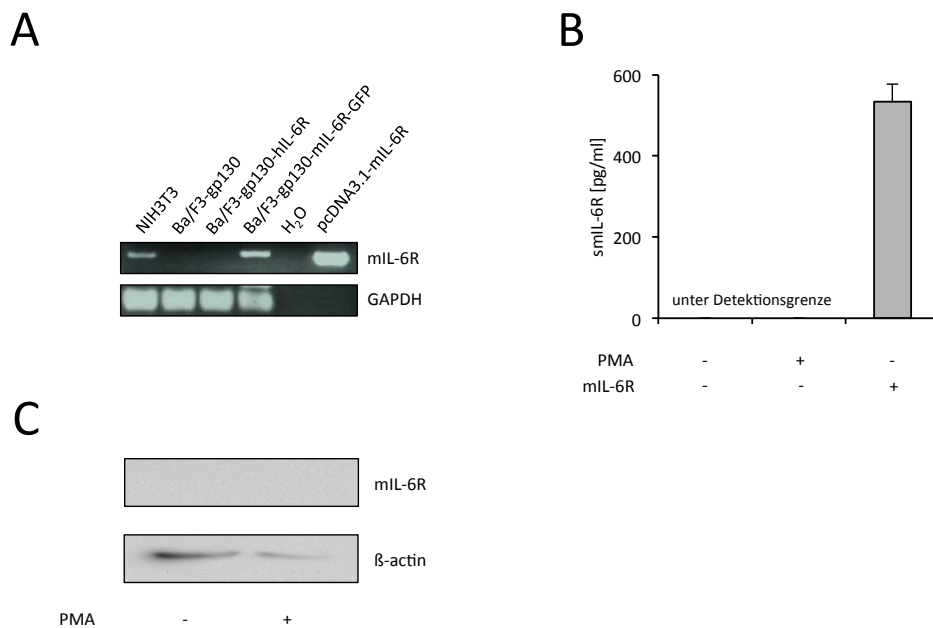


Abbildung 3.6: NIH3T3-Zellen enthalten mIL-6R-RNA, aber kein nachweisbares Protein. (A) Nachweis von RNA für mIL-6R in NIH3T3 und verschiedenen Ba/F3-gp130-Zelllinien mittels RT-PCR. Als Negativkontrolle diente H₂O, 1 ng pcDNA3.1-mIL-6R wurde als Positivkontrolle verwendet. Gleiche Mengen cDNA wurden durch den Nachweis von murinem GAPDH kontrolliert. (B) Gleiche Mengen NIH3T3-Zellen wurden für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert und der smIL-6R im Überstand anschließend mittels ELISA quantifiziert. 48 h vor Stimulation wurden die Zellen, wenn angegeben, mit mIL-6R transfiziert. (C) Die untransfizierten Zellen aus (B) wurden nach der Stimulation lysiert und 50 µg Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Nach der ersten Detektion gegen mIL-6R wurde der blot gestrippt und mit einem Antikörper gegen β-actin erneut detektiert.

3 Ergebnisse

Erstaunlicherweise war auf Proteinebene weder mit ELISA noch mit Western blot mIL-6R nachweisbar (siehe Abbildung 3.6 B und C, vergleiche auch (ROSE-JOHN et al., 1991)). Daher wurden NIH3T3-Zellen im Folgenden zur Untersuchung des Sheddings von murinem IL-6R und den in Abschnitt 3.8 beschriebenen Chimären verwendet.

3.6 Humanes ADAM17 prozessiert humanen und murinen IL-6R

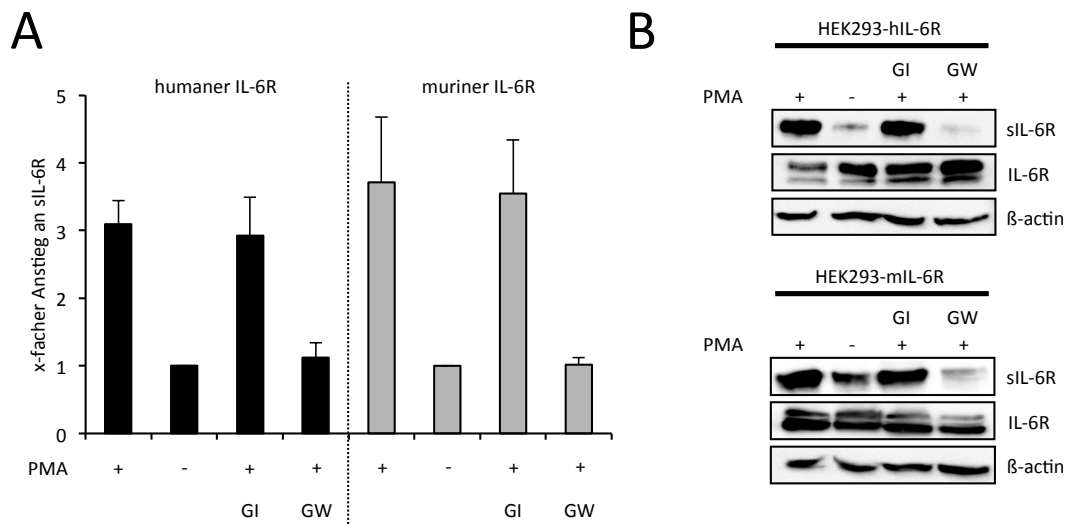


Abbildung 3.7: Humanes ADAM17 prozessiert humanen und murinen IL-6R. (A) HEK293-Zellen wurden mit hIL-6R oder mIL-6R transfiziert und nach 48 h gleiche Zellzahlen mit PMA für 2 h stimuliert. Die Inhibitoren GI254023X (GI) und GW280264X (GW) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Der lösliche Rezeptor im Überstand wurde mit entsprechenden ELISAs quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an sIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD. (B) Die Zellen wurden wie unter (A) beschrieben behandelt, der lösliche Rezeptor aus dem Überstand mittels Concanavalin-A Sepharose präzipitiert und dann per Western Blot visualisiert. Die Zellen wurden nach der Stimulation lysiert und 50 μ g Protein pro Spur im Western Blot analysiert. Nach dem Strippen wurde die gleichmäßige Beladung durch Visualisierung von β -actin sichergestellt.

3 Ergebnisse

Es konnte in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl humanes als auch murines ADAM17 in der Lage ist, nach Induktion den humanen IL-6R zu schneiden (siehe z. B. MATTHEWS et al. (2003); CHALARIS et al. (2007)). Äquivalente Untersuchungen zum murinen IL-6R fehlen bislang. Als erstes Experiment sollte daher untersucht werden, ob der murine IL-6R ebenso wie der humane ein Substrat für humanes ADAM17 darstellt.

Hierzu wurden HEK293-Zellen mit humanem und murinem IL-6R transfiziert und gleiche Zellzahlen 48 h nach Transfektion für 2 h mit PMA stimuliert. Die Inhibitoren GI254023X (GI, spezifisch für ADAM10) und GW280264X (GW, inhibiert ADAM10 und ADAM17) wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Wie Abbildung 3.7 A zeigt, findet sich im Überstand PMA-stimulierter Zellen dreimal mehr sIL-6R im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Dieser Effekt lässt sich mit GW vollständig inhibieren, mit dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI jedoch nicht. Beim murinen IL-6R zeigt sich das gleiche Bild. Dieser wird sogar noch etwas stärker von hADAM17 prozessiert, da sich hier nach Stimulation mit PMA viermal mehr löslicher Rezeptor im Überstand befindet. Auch dieses lässt sich vollständig mit GW, nicht jedoch mit GI hemmen. Zur Kontrolle wurden identische Experimente auch mit Western Blots analysiert (siehe Abbildung 3.7 B), wobei hier sowohl der präzipitierte sIL-6R detektiert wurde, als auch der im Lysat verbliebene membrangebundene Rezeptor.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass humanes ADAM17 keinen Unterschied zwischen murinem und humanem IL-6R macht und in der Lage ist, beide Substrate gleichermaßen von der Zelloberfläche zu shedden.

3.7 Murines ADAM17 prozessiert humanen, aber nicht murinen IL-6R

Um herauszufinden, ob sich die Prozessierung des IL-6R in murinen Zellen im Vergleich zu humanen Zellen (siehe Abschnitt 3.6) unterscheidet, wurde das Shedding von humanem und murinem IL-6R in zwei verschiedenen murinen Zelllinien untersucht. Abbildung 3.8 A zeigt, dass murine NIH3T3-Zellen nach PMA-Stimulus in der Lage sind, humanen IL-6R in hohem Maße zu shedden (schwarze Balken). Die vollständige Inhibition durch GW identifiziert ADAM17 als verantwortliche Protease, während GI keine inhibierenden Eigenschaften hat. Transfiziert man NIH3T3-Zellen hingegen mit murinem IL-6R, führt die Stimulation mit PMA zu keinem signifikanten Anstieg des sIL-6R im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($p=0,327$). Interessanterweise lässt

3 Ergebnisse

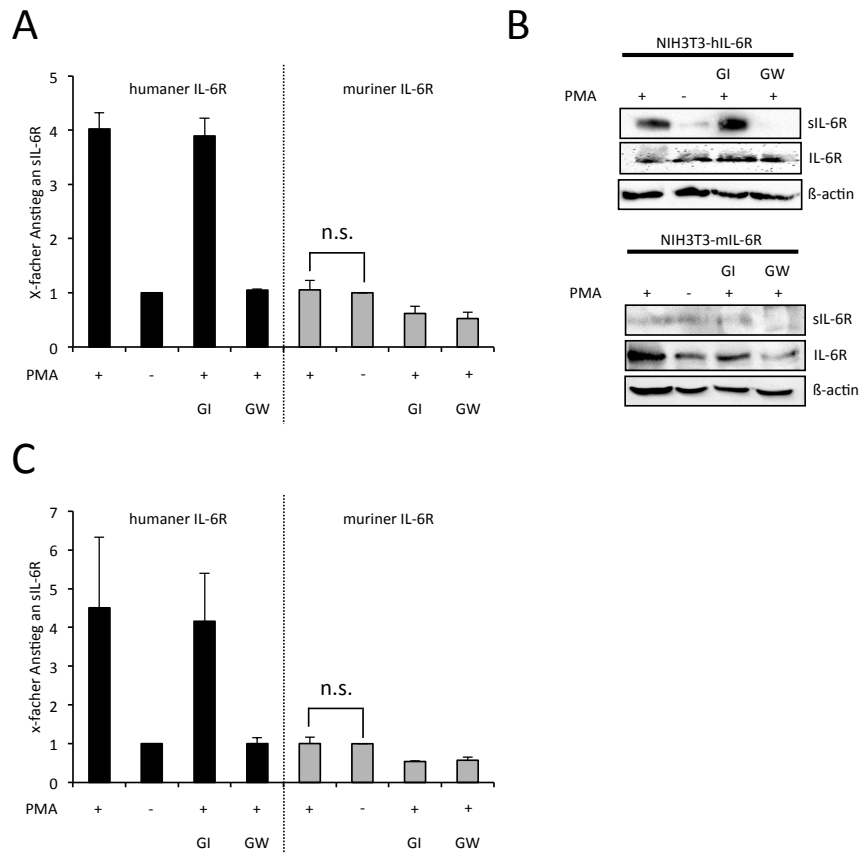


Abbildung 3.8: Murines ADAM17 prozessiert humanen, aber nicht murinen IL-6R. (A) NIH3T3-Zellen wurden mit hIL-6R oder mIL-6R transfiziert und nach 48 h gleiche Zellzahlen mit PMA für 2 h stimuliert. Die Inhibitoren GI und GW wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Der lösliche Rezeptor im Überstand wurde mit entsprechenden ELISA quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an sIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD. (B) Die Zellen wurden wie unter (A) beschrieben behandelt, der lösliche Rezeptor aus dem Überstand mittels Concanavalin-A Sepharose präzipitiert und dann per Western Blot visualisiert. Die Zellen wurden nach der Stimulation lysiert und 50 μ g Protein pro Spur im Western Blot analysiert. Nach dem Strippen wurde die gleichmäßige Beladung durch Visualisierung von β -actin sichergestellt. (C) Gleiche Mengen Ba/F3-gp130-hIL-6R-Zellen und Ba/F3-gp130-mIL-6R-GFP-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben stimuliert, analysiert und die Ergebnisse ausgewertet.

3 Ergebnisse

sich das konstitutive, unstimulierte Shedding des mIL-6R sowohl mit GI als auch mit GW um ungefähr 50 % inhibieren, was auf die Beteiligung einer sowohl durch GI als auch durch GW inhibierbaren Protease hindeutet.

Abbildung 3.8 B zeigt zur Bestätigung das gleiche Experiment, analysiert mit Western Blots. Um sicher zu gehen, dass dieser Befund kein Artefakt der gewählten Zelllinie ist, wurde das Experiment mit Ba/F3-gp130, d. h. einer zweiten murinen Zelllinie, analog durchgeführt (Abbildung 3.8 C). Auch hier zeigt sich starkes Shedding des humanen IL-6R durch ADAM17 nach PMA-Stimulation, aber kein signifikant erhöhtes induziertes Shedding des murinen IL-6R nach gleicher Behandlung ($p=0,374$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in primären Milzzellen (vergleiche Abschnitt 3.2) gewonnene Erkenntnis, dass murines ADAM17 den murinen IL-6R nur in geringem Maße shedden kann, sich auch mit zwei verschiedenen murinen Zelllinien *in vitro* zeigen lässt, wobei es hier zu gar keinem induzierten Anstieg des smIL-6R kommt.

3.8 Konstruktion von Chimären aus humanem und murinem IL-6R

	SP	D1	
human	MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGV		50
murin	MLTVGCTLLVALLAAPAVALLVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGK		50
	**	*** ** ***** ** * * ** * * ***** *** **	
	D1		
human	EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRSVQLHDSGNYSYRAG		100
murin	EAAGNVTIHWVY SGSQNREWTTTGNTLVLRDVQLSDTGDYLCSLND		96
	*	* * * ** ** * * * * * * * * * *	
	D1	D2	
human	RPAGTVHLLVDVPP	EEPKLSCFRKSNVVCWGRSTPSLTTKAVLLV	150
murin	HLVGTVPLLVDVPP	EEPKLSCFRKNPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFA	146
	***	***** ** * * * * * * * * * *	
	D2		
human	RKFQNSP AEDFQEPCQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVG		199
murin	KKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEGDKVYHIVSLCVANSVG		196
	*	*** ***** **** * * * * * * * * *	

3 Ergebnisse

	D2	D3		
human	SKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFY		249	
murin	SKSSHNEAFHSLKMQPDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPETWDPSYY		246	
	** *	***** * *	**** * ** * * * *	
	D3			
human	RLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWGLRHVVQLRAQEEFG		299	
murin	LLQFQLRYPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVHVQVRGKEELD		296	
	* * ****	** ** * ***** * **** * **		
	D3	S		
human	QGEWSEWSPEAMGTPW	TESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSA	349	
murin	LGQWSEWSPEVTGTPW	IAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESST	346	
	* *****	**** * *	*	
	S	TM	ICD	
human	NATS L PVQDSSSV	PLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIV	LRFKKTWKLRAL	397
murin	EATSVLAPVQESSM	SLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFII	LRLKQKWKSEAE	396
	*** * *** **	*****	*** * ** * ** *	
	ICD			
human	KEGKTSMHPP	YSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSH	445	
murin	KESKTTSPPPPYSGLPKP	TFLLVPLLTPHSSGSDNTVNH	437	
	** ** ** **** * *	* * * * **** * *		
	ICD			
human	NRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR	468		
murin	SCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP	460		
	** **** * * ** **			

Abbildung 3.9: Alignment von humanem und murinem IL-6R. Das Alignment der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem IL-6R wurden mit dem Programm ClustalX erstellt (JEANMOUGIN et al., 1998). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) markiert. Die einzelnen Domänen der Proteine sind farblich dargestellt. Signalpeptid (SP): violett; Domäne 1 (D1): orange; Domäne 2 (D2): grün; Domäne 3 (D3): hellblau; Stalk (S): gelb; Transmembrandomäne (TM): dunkelgrau; intrazelluläre Domäne (ICD): hellgrau. Die Schnittstelle von ADAM17 im humanen IL-6R ist rot markiert.

Die Darstellung des Alignments erfolgte mit TeXshade (BEITZ, 2000).

Es ist erstaunlich, dass humaner und muriner IL-6R von murinem ADAM17 unterschiedlich prozessiert werden, während humanes ADAM17 keinen Unterschied zwi-

3 Ergebnisse

schen den beiden Spezies macht. Um Bereiche zu identifizieren, die für diese Differenzen verantwortlich sind, bietet sich die Erstellung von Chimären an, d. h. von Proteinen, in denen einzelne Domänen gegen ihre Gegenstücke der anderen Spezies ausgetauscht sind. Humanes und murines ADAM17 weisen eine Sequenzidentität von 91,9 % auf (die Sequenzähnlichkeit beträgt sogar 97,5 %), was es unwahrscheinlich macht, dass strukturelle Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen für das beobachtete Phänomen verantwortlich sind (siehe das Alignment in Abschnitt 7.1). Humaner und muriner IL-6R bestehen nur zu 53,4 % aus identischen und zu 77,0 % aus ähnlichen Aminosäuren (siehe das Alignment in Abbildung 3.9, alle Werte bestimmt mit Hilfe von FASTA (PEARSON & LIPMAN, 1988)). Daher wurde entschieden, insgesamt zwölf verschiedene Chimären aus humanem und murinem IL-6R zu erstellen. Hierbei wurde ein so genannter *gain of function*-Ansatz gewählt, d. h. der kaum prozessierte murine IL-6R diente als Ausgangspunkt und es wurde untersucht, welche Substitutionen zum Shedding der Chimäre durch ADAM17 führen.

In der ersten Chimäre D358E wurde nur eine einzelne Aminosäure ausgetauscht. Diese Punktmutation führt dazu, dass die Chimäre nun die identische Aminosäuresequenz rund um die ADAM17 Schnittstelle aufweist, die für den humanen IL-6R identifiziert wurde (MÜLLBERG et al., 1993a). Die Chimären TM und ICD enthalten den transmembranären bzw. intrazellulären Bereich des humanen IL-6R. Bei den folgenden Chimären D1, D2, D3 und S wurde jeweils eine der extrazellulären Domänen des murinen IL-6R durch ihr humanes Gegenstück ausgetauscht. Die Chimären D1-D3, D1+D2, D1+D3 und D2+D3 enthalten zwei bzw. drei humane Domänen im extrazellulären Bereich, während bei der Chimäre S/TM/ICD Stalk, Transmembran- und intrazelluläre Domäne von humanen, der Rest vom murinen IL-6R stammen. Abbildung 3.10 zeigt eine schematische Übersicht der erstellten Konstrukte.

Ziel dieser Vorgehensweise ist es, für die Substraterkennung durch ADAM17 relevante Bereiche des IL-6R zu identifizieren. Da die bekannten ADAM17-Substraten keine Konsensussequenz der Schnittstelle aufweisen, müssen andere Bereiche des Substrats für seine Erkennung durch die Protease wichtig sein. Es ist zu erwarten, dass Domänen des extrazellulären Bereiches für diese Erkennung wichtig sind, während die intrazelluläre Domäne (ICD) vermutlich keinen Einfluss haben wird, da bereits für den humanen IL-6R gezeigt werden konnte, dass eine vollständige Deletion der ICD keinen Einfluss auf das PMA-induzierte Shedding hat.

3 Ergebnisse

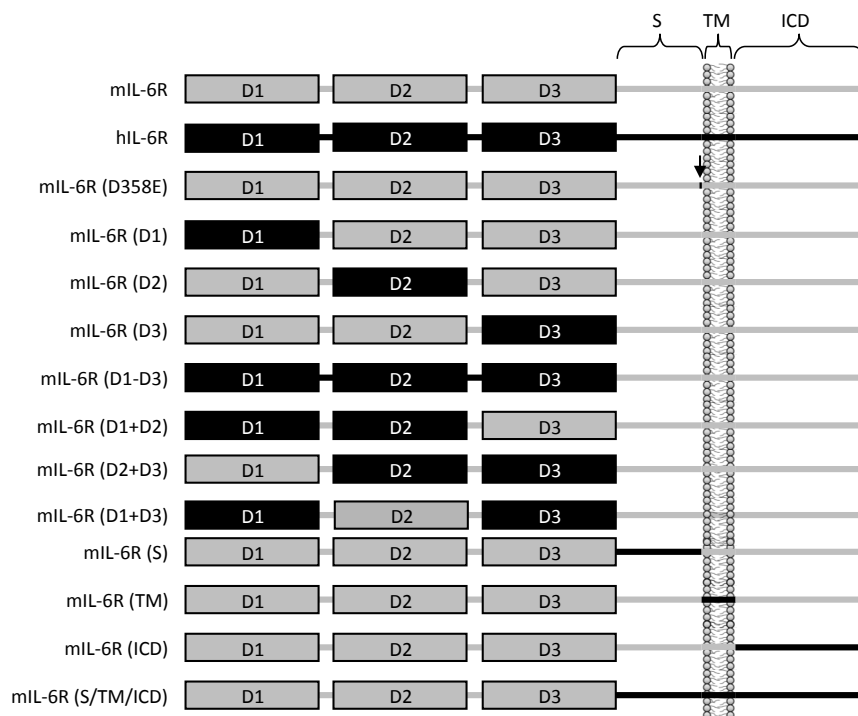


Abbildung 3.10: Schematische Übersicht der erstellten Chimären aus humanem und murinem IL-6R. Der schematische Aufbau der Domänen von murinem (grau) sowie von humanem (schwarz) IL-6R und der zwölf erstellten Chimären ist dargestellt. Details finden sich im Text von Abschnitt 3.8. Verwendete Abkürzungen: Signalpeptid (SP); Domäne 1 (D1); Domäne 2 (D2); Domäne 3 (D3); Stalk (S); Transmembrandomäne (TM); intrazelluläre Domäne (ICD).

3.9 Generierung der Expressionsplasmide für die IL-6R-Chimären

Ausgangspunkt für die Konstruktion der Expressionsplasmide der IL-6R Chimären waren die beiden Plasmide pcDNA3.1-hIL-6R und pcDNA3.1-mIL6R (siehe Abschnitt 3.3). Beispielhaft sei hier die Erstellung der Chimäre D2 erläutert. Dafür wurde der Bereich des Signalpeptids und der Domäne 1 des murinen IL-6R mittels PCR amplifiziert (Primer V2-1 und V2-2). Mit einer zweiten PCR wurde Domäne 2 des humanen IL-6R vervielfältigt (Primer V2-3 und V2-4). Durch eine SOE-PCR (Primer V2-1 und V2-2) wurden die beiden PCR-Fragmente miteinander verbunden, da die Primer V2-2 und V2-3 der initialen PCRs so gewählt wurden, dass sie zueinander komplementäre Über-

hänge besitzen. Nach Reinigung des finalen PCR-Produkts und Inkubation mit den beiden Restriktionsendonukleasen *BmgBI* sowie *BamHI* wurde der Vektor pcDNA3.1-mIL-6R analog geschnitten, dephosphoryliert, gereinigt und anschließend ligiert. Der erhaltene Vektor bekam die Bezeichnung pcDNA3.1-mIL-6R-D2.

In Abschnitt 7.2 finden sich schematische Klonierungsschemata für sämtliche erstellten Chimären. Im selben Abschnitt (Tabelle 7.2) finden sich alle hierfür verwendeten Oligonukleotide sowie die Restriktionsendonukleasen, die benötigt wurden. Aus dem Alignment in Abbildung 7.1 können die gewählten Domänengrenzen entnommen werden.

3.10 Analyse der Chimären D358E, TM und ICD

Zur Analyse der Chimären wurden diese transient sowohl in HEK293 als auch in NIH3T3-Zellen transfiziert, um das Shedding sowohl durch humanes als auch durch murines ADAM17 zu untersuchen. Wie beschrieben wurde ADAM17 durch Stimulation mit 100 nM PMA für 2 h aktiviert und der lösliche chimäre IL-6R im Überstand mit einem geeigneten ELISA quantifiziert.

Die erste untersuchte Chimäre, D358E, wurde in NIH3T3-Zellen genau wie der mIL-6R nach PMA-Stimulation nicht geshedded (siehe Abbildung 3.11 A, graue Balken). Ebenso ließ sich das unstimulierte, konstitutive Shedding der Chimäre sowohl mit GI als auch mit GW hemmen. Die Hemmung wies jedoch keine statistische Signifikanz auf ($p=0,116$). Chimäre D358E ist somit kein geeignetes Substrat für murines ADAM17. Durch humanes ADAM17 ließ sich der Rezeptor hingegen analog zum unveränderten murinen und humanen IL-6R prozessieren (schwarze Balken). Auch in der Analyse mittels Western Blot (Abbildung 3.11 B) war im Überstand der NIH3T3-Zellen kein löslicher IL-6R detektierbar, während die Expression der membrangebundenen Chimäre deutlich sichtbar war.

Bei der zweiten analysierten Chimäre (TM) wurde die murine Transmembrandomäne durch ihr humanes Gegenstück ausgetauscht. Auch diese Substitution hatte keinen Einfluss auf die Prozessierung durch murines ADAM17, wie Abbildung 3.11 C (graue Balken) zeigt. Nach PMA-Stimulation zeigte sich eine geringfügige Erhöhung an löslichem Rezeptor. Diese war aber nicht signifikant ($p=0,35$). In HEK293-Zellen hingegen wurde die Chimäre von humanem ADAM17 geshedded (schwarze Balken). Die Analyse per Western blot bestätigte die Ergebnisse der ELISA (Abbildung 3.11 D).

Auch der Austausch der intrazellulären Domäne (Chimäre ICD) führte zu keiner Erhöhung des Sheddings in murinen NIH3T3-Zellen. Allerdings wurde auch diese Chimäre

3 Ergebnisse

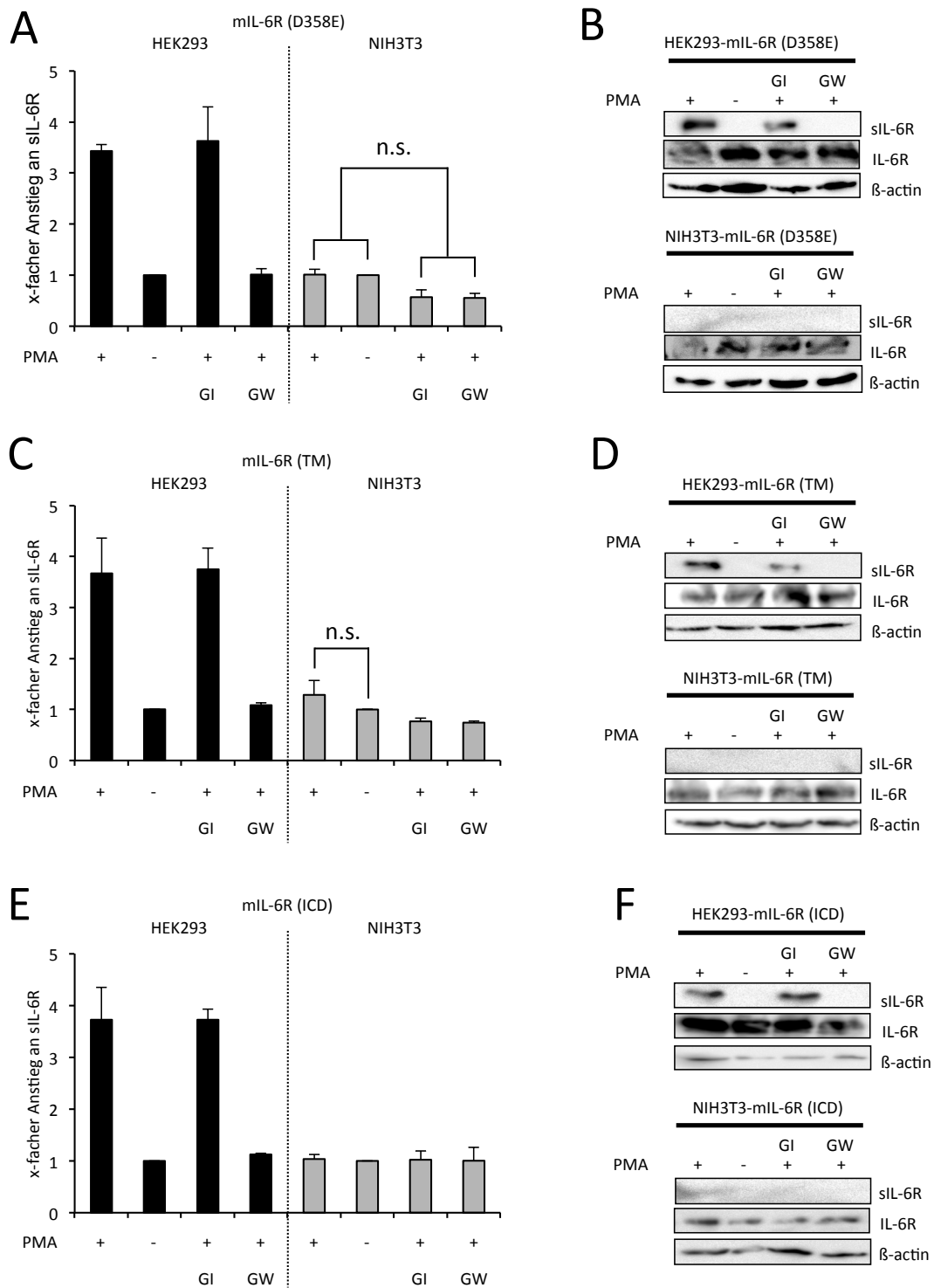


Abbildung 3.11: Analyse der Chimären D358E, TM und ICD. (A) – (F) Die Experimente wurden wie in den Abbildungen 3.7 und 3.8 beschrieben durchgeführt, Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.10.

3 Ergebnisse

in humanen HEK293-Zellen normal prozessiert (Abbildung 3.11 E, F). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Transmembran- und intrazelluläre Domäne sowie die vermutete Schnittstelle des murinen IL-6R keinen Einfluss auf die Prozessierung durch murines ADAM17 nach PMA-Stimulation haben.

3.11 Analyse der Chimären D1, D2, D3 und S

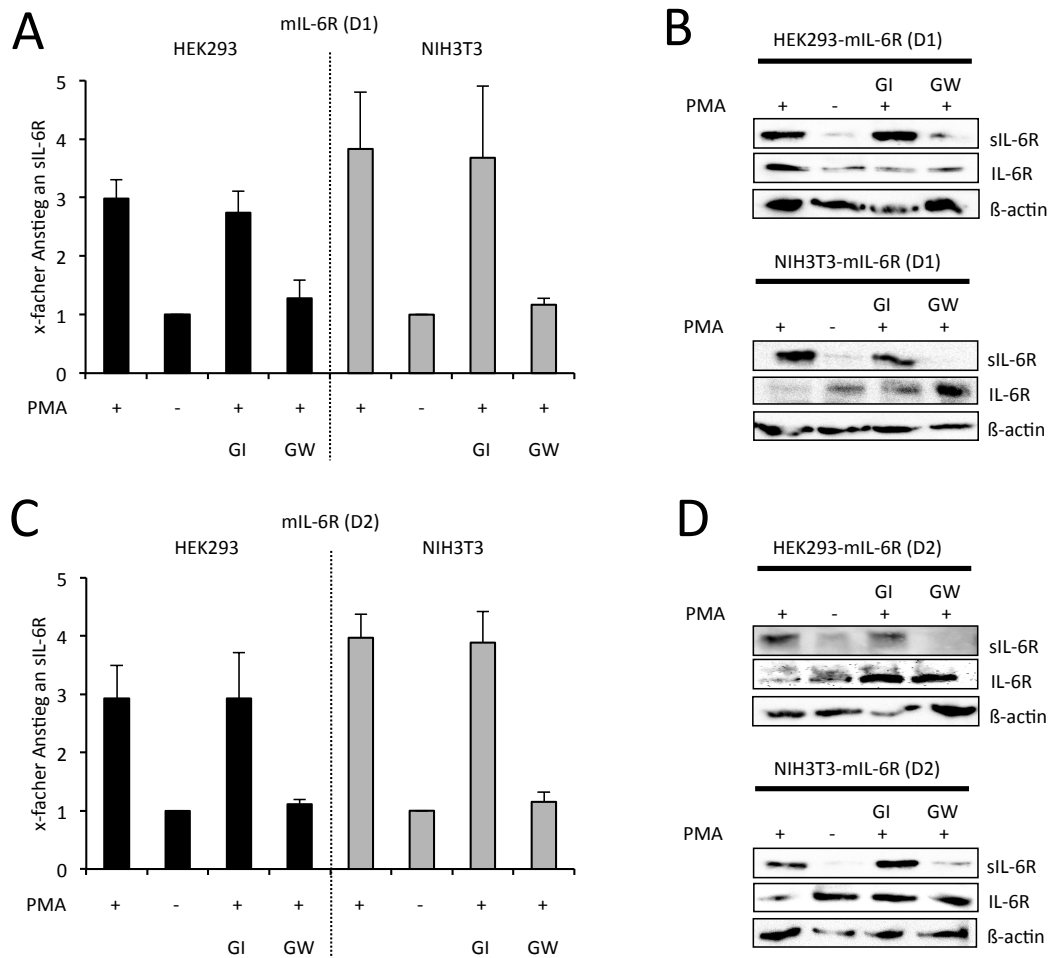


Abbildung 3.12: Analyse der Chimären D1 und D2. (A) – (D) Die Experimente wurden wie in den Abbildungen 3.7 und 3.8 beschrieben durchgeführt, Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.11.

3 Ergebnisse

Da, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, die bisher untersuchten Bereiche des murinen IL-6R die Unterschiede zum humanen IL-6R nicht erklären können, wurden Chimären erstellt, bei denen einzelne Domänen des extrazellulären Bereichs ausgetauscht wurden.

Wie Abbildung 3.12 A zeigt, führte der Austausch der Domäne D1 zum Shedding des IL-6R in murinen NIH3T3-Zellen durch murines ADAM17 (graue Balken). In HEK293-Zellen wurde auch diese Chimäre wie alle bisher untersuchten von humanem ADAM17 prozessiert. Ebenso wurde in den Western Blots (Abbildung 3.12 B) in beiden untersuchten Zelllinien löslicher Rezeptor nach Stimulation im Überstand nachgewiesen. Die Stimulation ließ sich in beiden Fällen mit GW, aber nicht mit GI hemmen, was ADAM17 als verantwortliche Protease identifizierte.

Chimäre D2, bei der Domäne D2 im murinen IL-6R ausgetauscht wurde, konnte ebenso von murinem und humanem ADAM17 prozessiert werden (Abbildung 3.12 C, D).

Auch die nächsten beiden Chimären, bei denen die verbliebenen extrazellulären Domänen D3 und S einzeln durch die entsprechenden humanen Domänen substituiert wurden, ließen sich spezies-unabhängig von humanem und murinem ADAM17 gleichermaßen prozessieren (Abbildung 3.13 A – D). Insgesamt zeigten diese Experimente, dass die Selektivität von mADAM17 gegenüber dem mIL-6R durch den extrazellulären Bereich bestimmt wird. Allerdings ließ sich diese unterschiedliche Selektivität nicht an einer bestimmten Domäne festmachen. Vielmehr scheint die vollständige dreidimensionale Struktur des IL-6R bestimmend für die Frage zu sein, ob es sich um ein Substrat von mADAM17 handelt oder nicht. Dieses zeigt sich daran, dass es keinen Unterschied macht, welcher der vier Bereiche ausgetauscht wurde.

3.12 Analyse von Chimären mit mehreren ausgetauschten Domänen

Um die gewonnenen Erkenntnisse weiter zu untermauern, wurden als nächster Schritt Chimären erstellt, bei denen mehr als eine Domäne des extrazellulären Bereichs ausgetauscht wurde. Abbildung 3.14 A – F zeigt die Daten für die Chimären D1+D2, D1+D3 und D2+D3. Erwartungsgemäß konnten alle drei chimären Proteine von murinem ADAM17 in ihre lösliche Form überführt werden. Von humanem ADAM17 in HEK293-Zellen wurden sie (wie alle anderen getesteten Varianten des IL-6R) ebenfalls geshedded.

Auch ein Austausch der drei Domänen D1, D2 und D3 von murin zu human macht

3 Ergebnisse

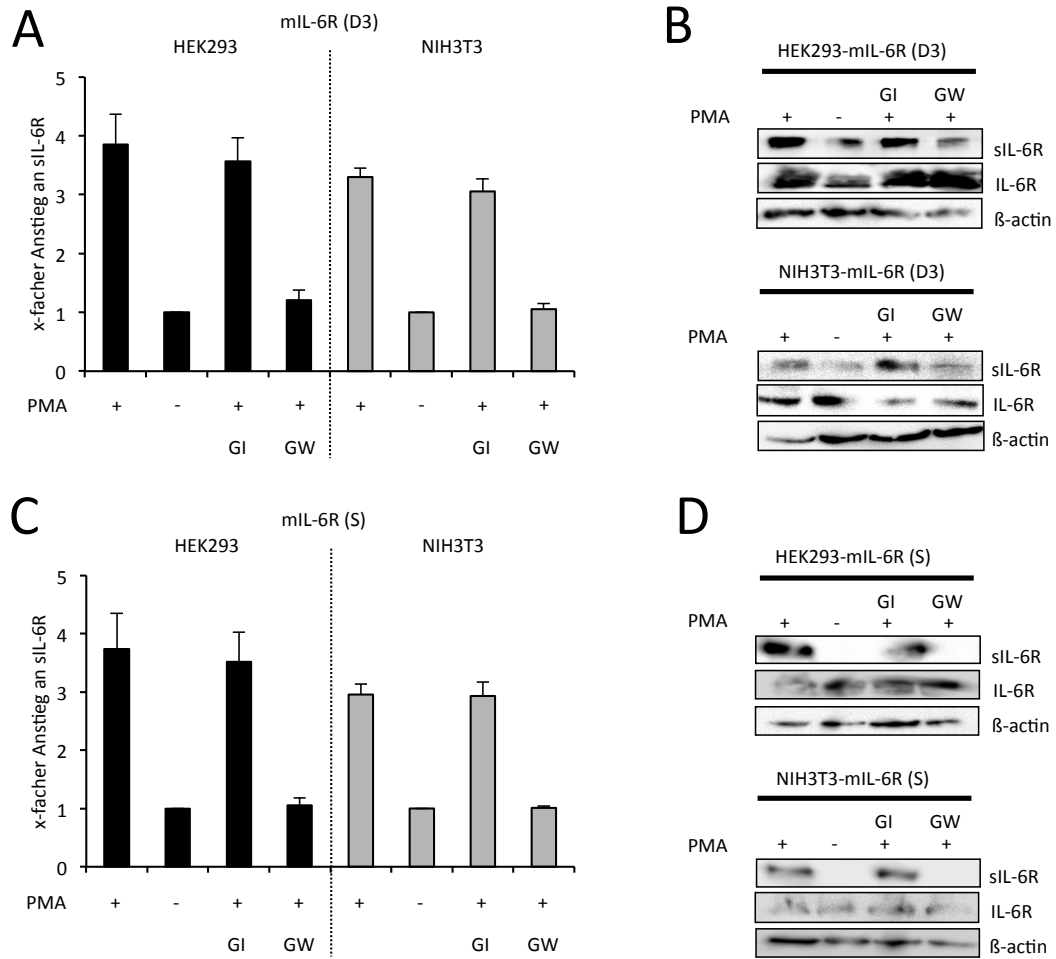


Abbildung 3.13: Analyse der Chimären D3 und S. (A) – (D) Die Experimente wurden wie in den Abbildungen 3.7 und 3.8 beschrieben durchgeführt, Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.11.

3 Ergebnisse

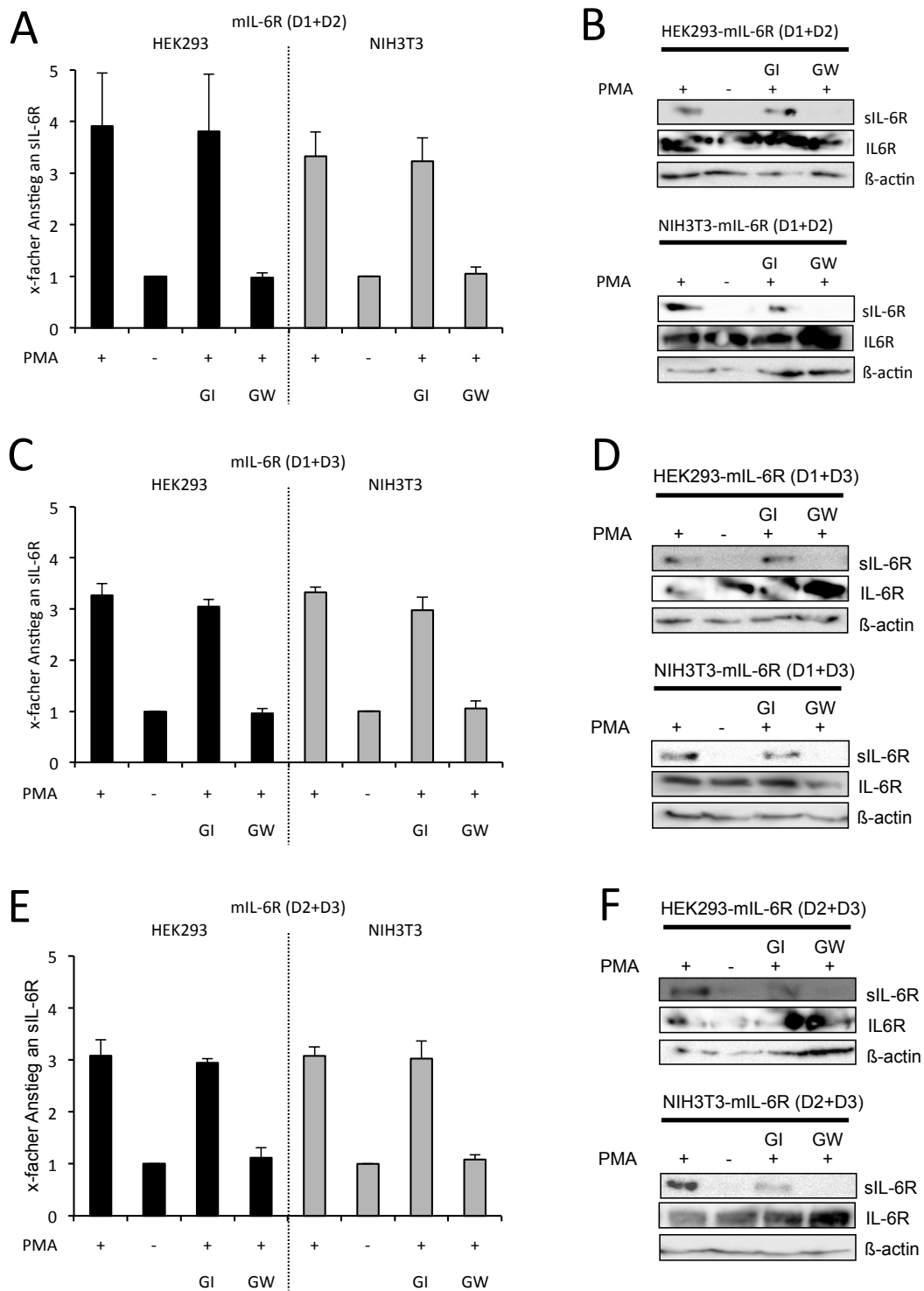


Abbildung 3.14: Analyse der Chimären D1+2, D1+3 und D2+3. (A) – (F) Die Experimente wurden wie in den Abbildungen 3.7 und 3.8 beschrieben durchgeführt, Erläuterungen finden sich im Abschnitt 3.12.

3 Ergebnisse

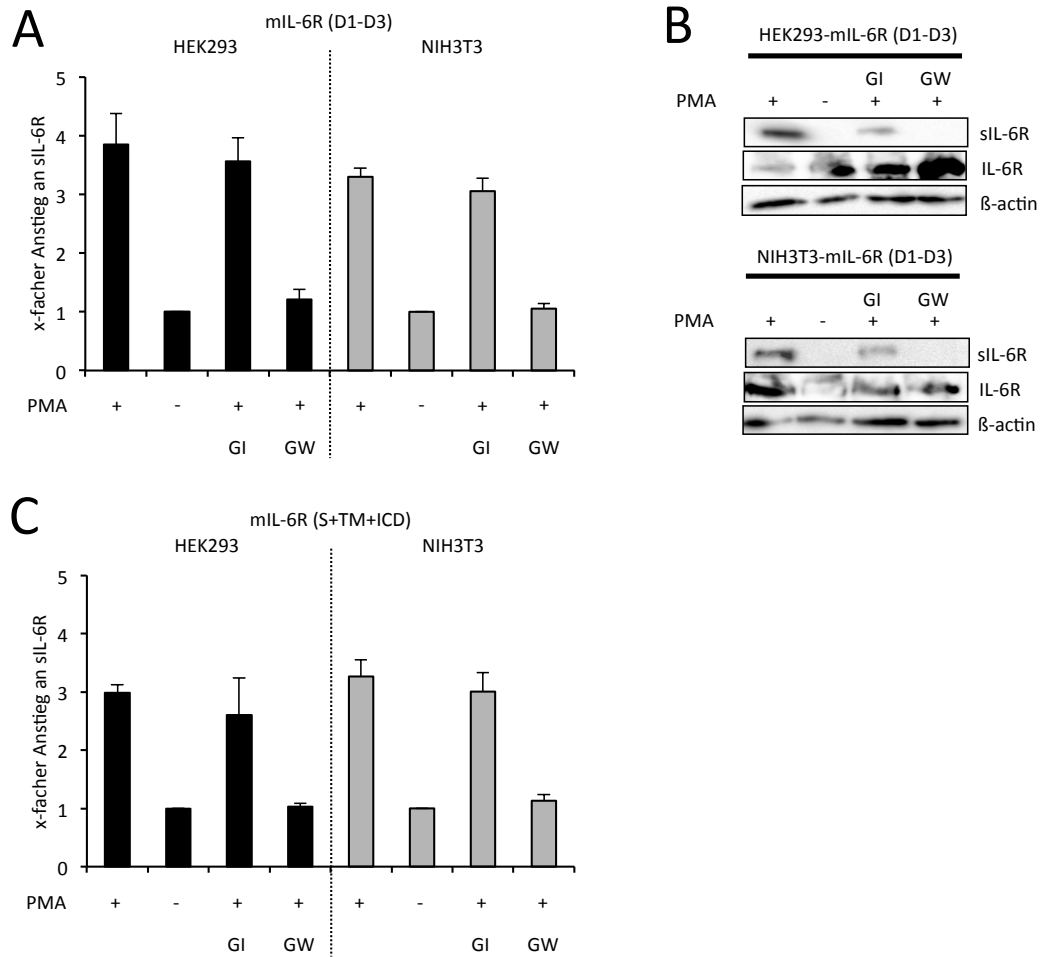


Abbildung 3.15: Analyse der Chimären D1-D3 und S/TM/ICD. (A) – (C) Die Experimente wurden wie in den Abbildungen 3.7 und 3.8 beschrieben durchgeführt, Erläuterungen finden sich im Abschnitt 3.12.

aus dem mIL-6R ein Substrat für murines ADAM17 (Abbildung 3.15 A, B). Interessanterweise wurde auch eine IL-6R-Chimäre, bei der neben dem Stalk auch TM und ICD ausgetauscht wurden, von mADAM17 prozessiert, obwohl die vorherigen Experimente gezeigt hatten, dass weder Transmembran- noch intrazelluläre Domäne bei der Selektivität eine Rolle spielen. Der Austausch der Stalk-Region, der ja allein schon ausreichend war, schien in dieser Chimäre die dominierende Rolle zu spielen, die aus ihr ein Substrat für murines ADAM17 machte (Abbildung 3.15 C, D).

3.13 Zusammenfassung und Vergleich der erstellten Chimären

Eine Übersicht der quantitativen Daten, die mit den Chimären und Rezeptoren gewonnen werden konnten, ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Auf einige Punkte soll an dieser Stelle besonders hingewiesen werden.

Durch PMA-Stimulation von transient transfizierten NIH3T3-Zellen und anschließende Quantifizierung sowohl des löslichen Rezeptors im Überstand als auch des in den Zellen verbliebenen membranständigen Rezeptors zeigte sich, dass mehr als die Hälfte des humanen IL-6R nach Stimulation in die lösliche Form überführt wurde. Konstitutiv, d. h. ohne Stimulation, waren dies nur rund 15 %. Bei murinem IL-6R führte die PMA-Stimulation zu keinem nennenswerten Anstieg des löslichen Rezeptors ($13,43 \pm 2,23$ % gegenüber $13,52 \pm 1,41$ %). Ähnliche Werte erhält man für die Chimären D358E, T und ICD, während alle anderen untersuchten Chimären in vergleichbar starkem Maße in NIH3T3 und HEK293-Zellen proteolytisch prozessiert werden. Einzig Chimäre D3 fällt mit einer leicht reduzierten Sheddingrate von $28,09 \pm 9,22$ % etwas heraus.

Das gleiche Bild zeigt sich bei der Berechnung des x-fachen Anstiegs des löslichen Rezeptors nach Stimulation verglichen mit unstimulierten Zellen. Weder beim Wildtyp-mIL-6R noch bei den Chimären D358E, TM und ICD findet sich ein nennenswerter Anstieg nach PMA-Stimulation. Bei allen anderen bewegt er sich zwischen dem drei- und dem vierfachen. Auch hier fällt Chimäre D3 mit einem Wert von $2,02 \pm 0,20$ etwas heraus. In HEK293-Zellen werden alle Rezeptoren gleichermaßen gut prozessiert, der x-fache Anstieg bewegt sich zwischen dem drei- und vierfachen der unstimulierten Kontrolle, wobei wiederum Chimäre D3 mit $2,28 \pm 1,11$ die größte Abweichung nach unten aufweist.

Tabelle 3.1: Zusammenfassende Übersicht über die proteolytische Freisetzung der IL-6R Chimären. Spalte 1: Bezeichnung des Rezeptors; Spalte 2 und 3: NIH3T3-Zellen wurden transient mit dem angegebenen Rezeptor transfiziert, mit oder ohne PMA für 2 h inkubiert, die Menge an IL-6R in Überstand und Lysate mittels ELISA quantifiziert und der prozentuale Anteil im Überstand errechnet; Spalte 4: x-facher Anstieg des sIL-6R nach PMA-Stimulation von NIH3T3-Zellen; Spalte 5: x-facher Anstieg des sIL-6R nach PMA-Stimulation von HEK293-Zellen.

Rezeptor	prozentualer Anteil des gesamten IL-6R im Überstand \pm SD von NIH3T3-Zellen		x-facher Anstieg \pm SD	
	+ PMA	- PMA	NIH3T3	HEK293
mIL-6R	13,43 \pm 2,23	13,52 \pm 1,41	1,05 \pm 0,18	3,71 \pm 0,96
hIL-6R	51,97 \pm 4,15	15,36 \pm 3,08	4,02 \pm 0,30	3,10 \pm 0,35
mIL-6R (D358E)	14,01 \pm 0,78	14,06 \pm 2,10	1,01 \pm 0,10	3,43 \pm 0,12
mIL-6R (D1)	41,47 \pm 3,66	13,99 \pm 2,83	3,83 \pm 0,97	2,99 \pm 0,32
mIL-6R (D2)	36,94 \pm 3,55	13,92 \pm 1,53	3,97 \pm 0,40	2,92 \pm 0,57
mIL-6R (D3)	28,09 \pm 9,22	10,88 \pm 1,70	2,02 \pm 0,20	2,28 \pm 1,11
mIL-6R (D1-D3)	34,09 \pm 1,61	18,14 \pm 3,01	3,30 \pm 0,15	3,85 \pm 0,52
mIL-6R (D1+D2)	41,20 \pm 3,57	12,08 \pm 0,61	3,33 \pm 0,47	3,91 \pm 1,04
mIL-6R (D2+D3)	35,35 \pm 1,05	15,25 \pm 1,82	3,08 \pm 0,17	3,08 \pm 0,30
mIL-6R (D1+D3)	37,94 \pm 2,57	15,83 \pm 4,87	3,33 \pm 0,10	3,27 \pm 0,23
mIL-6R (S)	35,43 \pm 3,46	11,27 \pm 2,20	2,95 \pm 0,18	3,73 \pm 0,61
mIL-6R (TM)	17,36 \pm 1,34	12,70 \pm 2,13	1,29 \pm 0,28	3,67 \pm 0,69
mIL-6R (ICD)	13,25 \pm 4,17	13,11 \pm 3,49	1,04 \pm 0,09	3,72 \pm 0,62
mIL-6R (S/TM/ICD)	35,00 \pm 6,57	11,89 \pm 5,78	3,26 \pm 0,28	3,26 \pm 0,28

3.14 Stimulation mit Ionomycin führt zum Shedding von humanem und murinem IL-6R durch ADAM10

Die Analyse des konstitutiven Sheddings von murinem IL-6R in NIH3T3-Zellen (siehe Abschnitt 3.7) deutet auf die Beteiligung einer Protease hin, die von den beiden Inhibitoren GI und GW gleichermaßen inhibiert werden kann. Dieses trifft z. B. auf ADAM10 zu (LUDWIG et al., 2005). Um zu untersuchen, ob murines ADAM10 in der Lage ist, mIL-6R zu shedden, wurden transient transfizierte NIH3T3-Zellen mit 1 μ M Ionomycin für 1 h stimuliert (Abbildung 3.16 A, graue Balken). Zudem wurde mit der rekombinanten Prodomäne von ADAM10 (A10 pro) ein sehr spezifischer Inhibitor von ADAM10 zusätzlich verwendet (MOSS et al., 2007). Das Experiment zeigte, dass Ionomycin zur proteolytischen Freisetzung des murinen IL-6R führte und dieses mit GI, GW und A10 pro gehemmt werden konnte. Die verantwortliche Protease ist also sehr wahrscheinlich ADAM10. Interessanterweise gilt dieses analog für den humanen IL-6R (schwarze Balken), der ebenfalls nach Stimulation durch Ionomycin von murinem ADAM10 gespalten wird. Gleiches ist auch in humanen HEK293-Zellen zu beobachten (Abbildung 3.16 B), d. h. auch humanes ADAM10 kann durch Ionomycin zum Shedding sowohl des murinen als auch des humanen IL-6R angeregt werden. Abbildung 3.16 C zeigt wiederum in NIH3T3-Zellen, dass eine Herunterregulierung von mADAM10 durch spezifische siRNAs zu einer Hemmung des durch Ionomycin ausgelösten Sheddings führt, was die Beteiligung von ADAM10 an diesem Prozess weiter untermauert.

Die Fähigkeit der rekombinanten Prodomäne von ADAM10, tatsächlich selektiv ADAM10 und nicht ADAM17 hemmen zu können, wurde durch das in Abbildung 3.17 dargestellte Experiment überprüft. Hierfür wurden transient mit humanem oder murinem IL-6R transfizierte NIH3T3-Zellen mit PMA stimuliert. Die ADAM10 Prodomäne hatte hierbei keinen inhibierenden Einfluss auf das ADAM17-medierte Shedding des humanen IL-6R (schwarze Balken). Sie war aber in der Lage, das konstitutive Shedding des murinen IL-6R um 50 % zu reduzieren (graue Balken) und ist folglich ein selektiver ADAM10-Inhibitor, der keine Kreuzreaktivität zu ADAM17 zeigt.

3 Ergebnisse

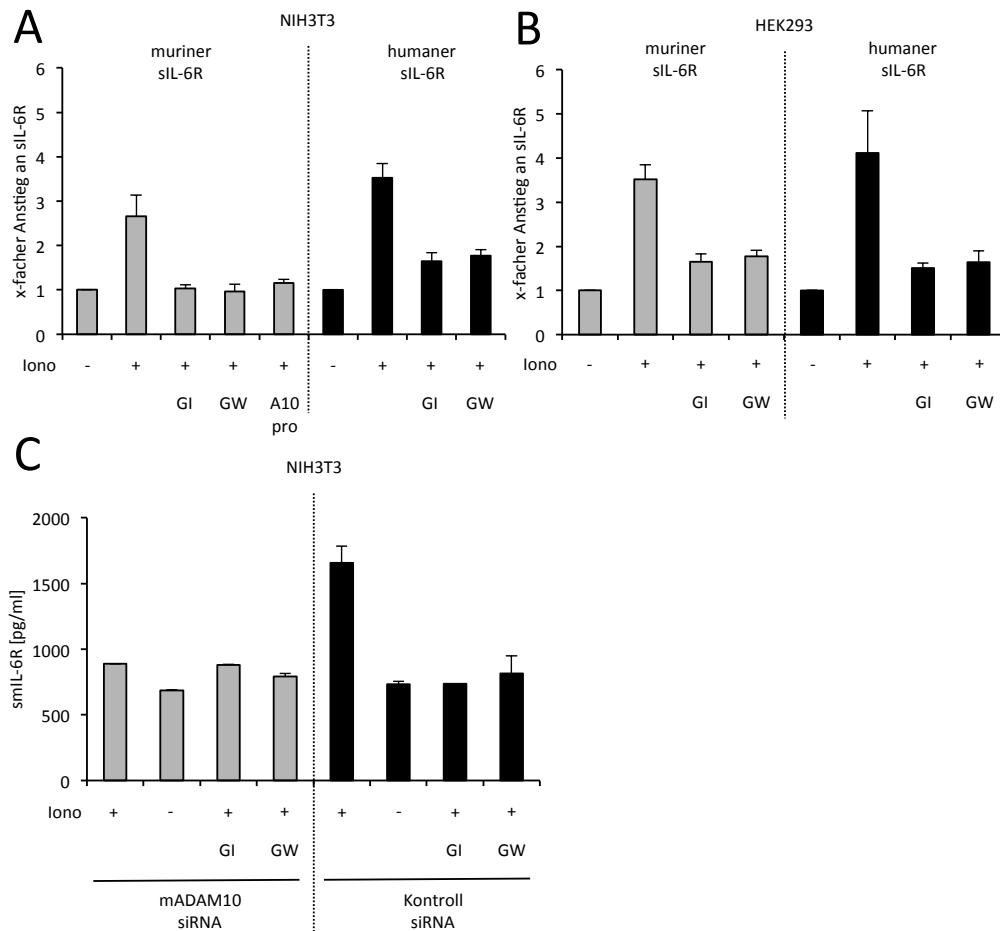


Abbildung 3.16: Stimulation mit Ionomycin führt zum Shedding von humanem und murinem IL-6R durch ADAM10. (A) NIH3T3-Zellen wurden transient entweder mit murinem oder humanem IL-6R transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden gleiche Anzahl von Zellen mit 1 μ M Ionomycin für 1 h stimuliert. Die Inhibitoren GI, GW und rekombinante ADAM10 Prodomäne wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. (B) HEK293-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben transfiziert und stimuliert. Der lösliche Rezeptor im Überstand wurde mit entsprechenden ELISA quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an sIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD. (C) NIH3T3-Zellen wurden transient sowohl mit humanem bzw. murinem IL-6R als auch mit einer Mischung aus drei siRNAs transfiziert, die gegen murines ADAM10 gerichtet sind. Die Stimulation erfolgte wie unter (A) beschrieben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm SD.

3 Ergebnisse

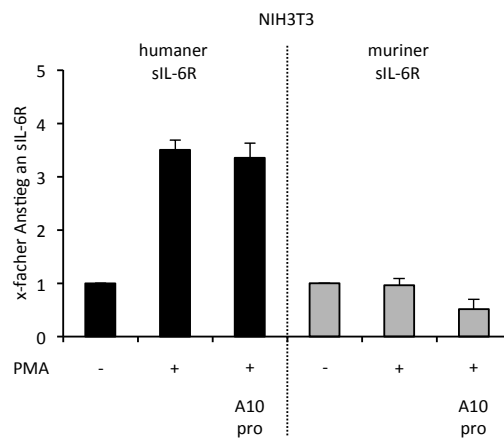


Abbildung 3.17: Die rekombinante ADAM10 Prodomäne hemmt selektiv ADAM10, aber nicht ADAM17. NIH3T3-Zellen wurden transient entweder mit murinem oder humanem IL-6R transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die gleiche Anzahl Zellen mit 100 mM PMA für 2 h stimuliert. Rekombinante ADAM10 Prodomäne wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Der lösliche Rezeptor im Überstand wurde mit entsprechenden ELISA quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an sIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD.

3.15 Analyse des IL-6R-Shedding in verschiedenen Protease-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Um die Beteiligung von verschiedenen Metalloproteasen an Sheddingprozessen zu untersuchen, können, wie bisher beschrieben, verschiedene Inhibitoren mit unterschiedlicher Selektivität verwendet werden. Nachteilig ist dabei, dass fast alle verfügbaren Inhibitoren mehr als eine Protease inhibieren, eine 100 %ige Selektivität also in der Regel nicht gegeben ist. Als Alternative können Zellen verwendet werden, die aus Knockout-Mäusen für die entsprechenden Proteasen gewonnen und immortalisiert worden sind. Üblicherweise sind dies murine embryonale Fibroblasten (MEFs). Für die folgenden Experimente wurden Wildtyp-Zellen, ADAM10^{-/-}, ADAM17^{-/-} sowie ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} MEFs verwendet, um die beteiligten Proteasen an den ge-

3 Ergebnisse

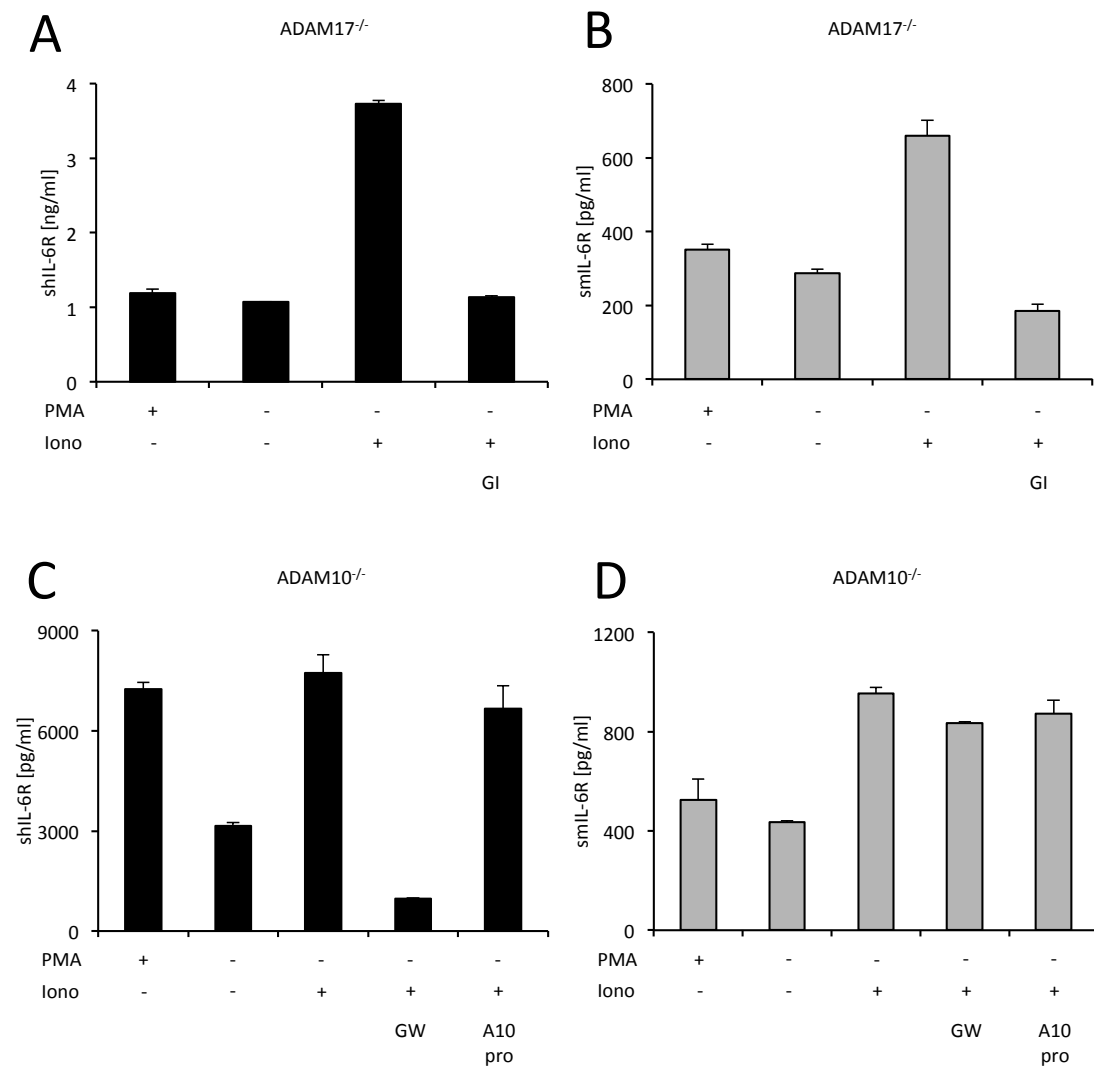


Abbildung 3.18: Analyse des Sheddings in ADAM10^{-/-} und ADAM17^{-/-} MEFs. ADAM17^{-/-} MEFs wurden mit (A) hIL-6R oder (B) sIL-6R transient transfiziert. Nach 48 h wurden gleiche Zellzahlen mit den angegebenen Chemikalien stimuliert. Die angegebenen Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Die in (C) und (D) gezeigten Experimente wurden analog mit ADAM10^{-/-} MEFs durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm SD.

3 Ergebnisse

schilderten Prozessen zweifelsfrei untersuchen zu können.

Zunächst wurden ADAM17^{-/-} MEFs transient sowohl mit humanem als auch mit murinem IL-6R transfiziert. Die Stimulation erfolgte entweder mit PMA oder Ionomycin (Iono). Die Abbildungen 3.18 A und B zeigen die entsprechenden per ELISA gewonnenen Daten. PMA führte in ADAM17^{-/-} MEFs erwartungsgemäß nicht zum Shedding des humanen IL-6R. Ionomycin stimulierte hingegen die Freisetzung des shIL-6R. Dieses konnte mit GI vollständig gehemmt werden. Das gleiche Ergebnis erhielt man bei Untersuchung des murinen IL-6R in dieser Zelllinie. Ionomycin führte auch hier zur Freisetzung des löslichen Rezeptors, was mit GI vollständig inhibiert werden konnte. Zusammengefasst zeigten die Experimente mit den ADAM17^{-/-} MEFs, dass Stimulation mit Ionomycin selektiv ADAM10 aktivierte, während Shedding des humanen IL-6R nach PMA-Stimulation mittels ADAM17 erfolgte.

Im nächsten Schritt wurden ADAM10^{-/-} MEFs transient mit humanem und murinem IL-6R transfiziert und, wie in den Abbildungen angegeben, stimuliert. Abbildung 3.18 C zeigt die Quantifizierung des hIL-6R-ELISA. PMA führte, wie schon mehrfach gezeigt, zur proteolytischen Freisetzung des hIL-6R durch ADAM17. Das Fehlen von ADAM10 in den Zellen beeinflusste diesen Prozess nicht. Interessanterweise löste die Stimulation mit Ionomycin ebenfalls Shedding des hIL-6R aus, obwohl ADAM10 nicht vorhanden war. GW hemmte diesen Vorgang vollständig, während A10 pro keinen Einfluss auf die Freisetzung hatte. Dieser Effekt steht im Einklang mit einer Publikation von LE GALL et al. (2009), die zeigte, dass bei Fehlen von ADAM10 in Zellen ADAM17 durch Ionomycin aktiviert werden konnte. Ein solches Phänomen ist für den IL-6R jedoch noch nicht beschrieben. Ein anderes Bild zeigte sich allerdings bei murinem IL-6R (Abbildung 3.18 D). Auch hier führte Ionomycin zum Shedding des murinen IL-6R, obwohl ADAM10 in den Zellen vollständig fehlt. Allerdings ließ sich der Effekt weder mit A10 pro noch mit GW hemmen. Ein Einfluss von ADAM17 konnte somit ausgeschlossen werden, da sonst eine hemmende Wirkung von GW zu beobachten gewesen wäre. Verantwortlich musste folglich eine andere Protease sein, die sich weder mit GW noch mit A10 pro hemmen ließ.

Zur Bestätigung der gewonnenen Erkenntnisse wurde das Experiment analog mit doppelt-defizienten ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} MEFs durchgeführt. Abbildung 3.19 A zeigt, dass weder PMA noch Ionomycin in diesen Zellen zur Freisetzung des humanen IL-6R führten, somit ADAM10 und ADAM17 die beiden für die Prozessierung verantwortlichen Proteasen darstellten. Beim murinen IL-6R war dies anders, wie Abbildung 3.19 B illustriert. Während PMA zu keinem Anstieg an löslichem Rezeptor führte, sorgte auch hier Ionomycin für einen Anstieg, der weder mit GW noch der ADAM10-

3 Ergebnisse

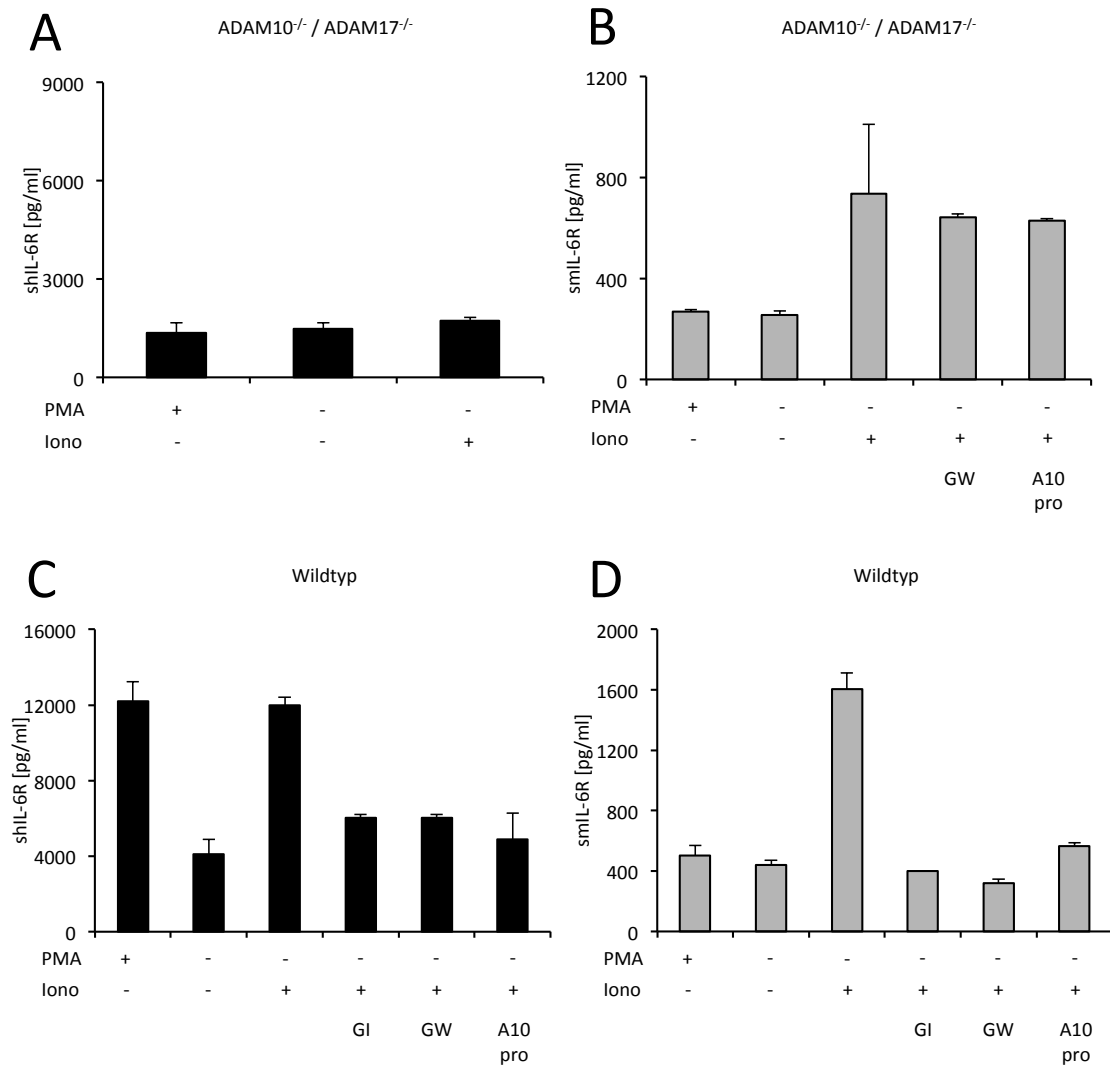


Abbildung 3.19: Analyse des Sheddings in ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} und Wildtyp MEFs. ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} MEFs wurden mit (A) hIL-6R oder (B) mIL-6R transient transfiziert. Nach 48 h wurden gleiche Zellzahlen mit den angegebenen Chemikalien stimuliert. Die angegebenen Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Die in (C) und (D) gezeigten Experimente wurden analog mit Wildtyp MEFs durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm SD.

3 Ergebnisse

Prodomäne inhibiert werden konnte. Für dieses Shedding konnten weder ADAM10 noch ADAM17 verantwortlich sein, was die Beteiligung einer weiteren Protease in der Maus nahelegte.

Die Abbildungen 3.19 C und D zeigen die als Kontrolle durchgeführten Experimente mit Wildtyp-MEFs. Die Ergebnisse entsprechen den mit NIH3T3 und Ba/F3-gp130-Zellen gewonnenen Erkenntnissen (vergleiche Abschnitte 3.7).

3.16 Stimulation des P2X7-Rezeptors führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10 *in vitro*

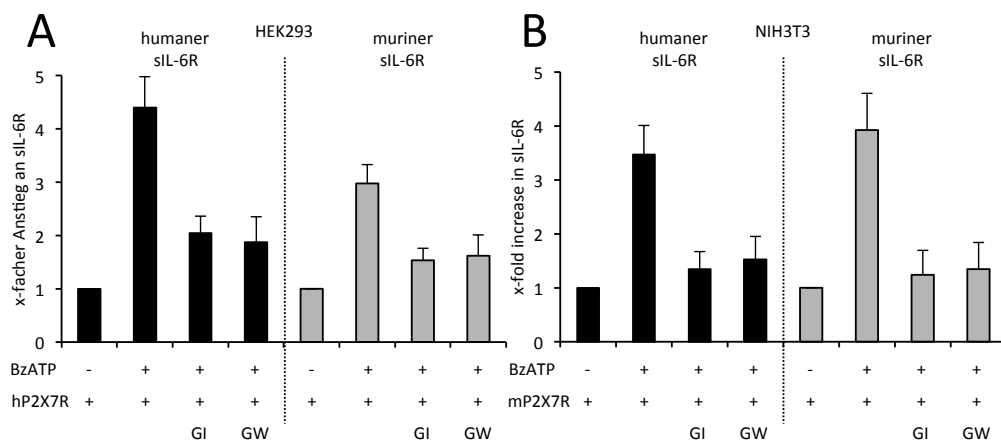


Abbildung 3.20: Stimulation des P2X7-Rezeptors führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10 *in vitro*. (A) HEK293-Zellen wurden transient doppelt mit hIL-6R/hP2X7R oder mIL-6R/hP2X7R transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden gleiche Zellzahlen mit 500 μ M BzATP für 30 min stimuliert, Inhibitoren 30 min vor der Stimulation zugesetzt. (B) NIH3T3-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben transfiziert und stimuliert. Der lösliche Rezeptor im Überstand wurde mit entsprechenden ELISA quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an sIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD.

Noch immer ist wenig über physiologische Stimuli bekannt, die zur Aktivierung von Metalloproteasen und in der Folge zur proteolytischen Freisetzung des IL-6R führen. Um zu überprüfen, ob die Stimulation des purinergen P2X7-Rezeptors zum Shed-

3 Ergebnisse

ding des IL-6R führt, wurden HEK293-Zellen transient doppelt mit hIL-6R/hP2X7R oder mL-6R/hP2X7R transfiziert. Zur Aktivierung des P2X7R wurde BzATP, ein ATP-Analogon mit höherer Halbwertszeit, eingesetzt. Die Stimulation erfolgte für 30 min, die angegebenen Inhibitoren wurden 30 min vorher zugegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 A dargestellt. Aktivierung des P2X7R führte somit sowohl bei humanem (schwarze Balken) als auch bei murinem (graue Balken) IL-6R zu einem drei- bis fünffachen Anstieg des sIL-6R. Interessanterweise konnte diese Freisetzung sowohl mit GI als auch mit GW zum großen Teil gehemmt werden, was auf eine Beteiligung von ADAM10 hinwies. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da ADAM10 bislang eher als konstitutiv aktive Protease angesehen wurde und man davon ausging, dass induzierbares Shedding des IL-6R durch ADAM17 ausgeführt wurde.

Um auszuschließen, dass auch in diesem Fall ein speziesspezifischer Einfluss auf die Substraterkennung vorliegt, wurde das Experiment analog mit NIH3T3-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.20 B). Die Ergebnisse bestätigen allerdings die in HEK293-Zellen gewonnenen Erkenntnisse. Auch in murinen Zellen führt die Aktivierung des P2X7R zum Shedding des IL-6R durch ADAM10, unabhängig davon, ob es sich um humanen oder murinen Interleukin 6-Rezeptor handelt.

3.17 Stimulation des P2X7-Rezeptors in murinen Primärzellen führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass limitierte Proteolyse des IL-6R durch den P2X7R *in vitro* induziert werden kann, stellte sich die Frage, ob dieses auch eine Relevanz *in vivo* hat. Dafür wurden primäre Milzzellen aus Wildtyp- und P2X7R^{-/-}-Mäusen isoliert und mit BzATP stimuliert (Abbildung 3.21 A, B). Der P2X7R-Inhibitor wurde wie angegeben für 30 min vor der Stimulation mit den Zellen inkubiert. Die Quantifizierung des sIL-6R im Überstand der Zellen zeigte eine vierfache Erhöhung nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (A, schwarze Balken). Im Überstand stimulierter Zellen aus P2X7R^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein Anstieg an löslichem Rezeptor (grauer Balken). Die verbliebene Oberflächenexpression des endogenen mL-6R auf den Zellen wurden anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Abbildung 3.21 B zeigt den prozentualen Anteil der mL-6R-positiven CD3⁺-Zellen. Nach der BzATP-Stimulation hatten die Wildtyp-Zellen den überwiegenden Teil des membrangebundenen mL-6R verloren. Dieses war weder bei vorher mit

3 Ergebnisse

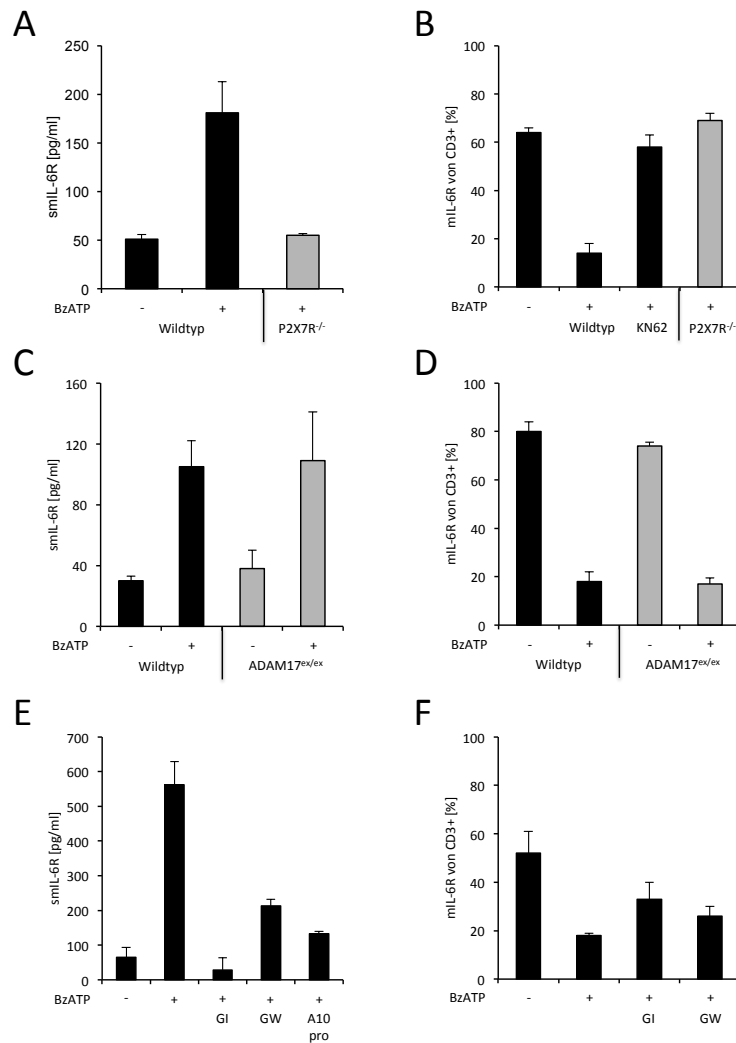


Abbildung 3.21: Stimulation des P2X7-Rezeptors in murinen Primärzellen führt zum IL-6R-Shedding durch ADAM10. (A), (B) Primäre Milzzellen von Wildtyp und P2X7R^{-/-}-Mäusen wurden isoliert und mit 300 μ M BzATP für 30 min inkubiert. Der Inhibitor KN62 wurde 30 min vor der Stimulation zugegeben. (A) Der smIL-6R wurde mittels ELISA quantifiziert, (B) der prozentuale Wert der mIL-6R positiven CD3⁺-Milzzellen mit der Durchflusszytometrie bestimmt (n=4). (C), (D) Primäre T-Zellen aus der Milz von Wildtyp und hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen wurden isoliert und wie unter (A) beschrieben stimuliert und der sIL-6R quantifiziert (n=2). (E), (F) Primäre T-Zellen aus der Milz von Wildtyp-Mäusen wurden mit 150 μ M BzATP wie beschrieben stimuliert und quantifiziert (n=4). Alle gezeigten Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SD von individuell analysierten Mäusen.

3 Ergebnisse

dem Inhibitor KN62 inkubierten Zellen noch bei Zellen aus P2X7R^{-/-}-Mäusen der Fall. Um einen Einfluss von ADAM17 bei diesem Stimulus zu untersuchen, wurde das eben beschriebene Experiment mit primären T-Zellen aus Wildtyp- und hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 C und D dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass An- oder Abwesenheit von ADAM17 in den stimulierten Zellen keinen Einfluss auf das ATP-induzierte Shedding des mIL-6R hat.

Da die *in vitro*-Experimente im vorherigen Abschnitt auf ADAM10 als verantwortliche Protease hindeuteten, wurden erneut T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen isoliert und mit BzATP stimuliert. Die Inhibitoren wurden wie üblich 30 min vor Stimulation zugesetzt. Sowohl bei isolierten T-Zellen als auch bei primären Milzzellen führte BzATP zu einem starken Anstieg des smIL-6R, der mit GI, GW und der ADAM10-Prodomäne nahezu vollständig inhibiert wurde (Abbildung 3.21 E). Abbildung 3.21 F zeigt die entsprechende Oberflächenexpression des mIL-6R der Zellen, bestimmt mittels Durchflusszytometrie. Die mit den beiden Inhibitoren vorbehandelten Zellen wiesen dabei trotz BzATP-Stimulation eine höhere Expression an mIL-6R auf. Die Inhibition von ADAM10 durch GI und GW reduzierte somit das BzATP-induzierte Shedding.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass Stimulation des P2X7R durch ATP einen physiologischer Stimulus des IL-6R Shedding in der Maus darstellt. Die in diesem Abschnitt geschilderten Experimente wurden zum Teil gemeinsam mit Dr. Nathalie Jänner (Biochemisches Institut, CAU Kiel), zum Teil von ihr alleine durchgeführt.

3.18 Durch P2X7-Rezeptor ausgelöstes Shedding trägt zum Serumlevel an smIL-6R bei

Der Untergang von Zellen und damit die Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum ist ein Vorgang, der in Lebewesen permanent abläuft. ATP ist in der Lage, purinerge Rezeptoren wie den P2X7R auf anderen Körperzellen zu aktivieren, was anschließend u. a. zur proteolytischen Freisetzung des mIL-6R führen kann, wenn die aktivierten Zellen endogen mIL-6R exprimieren.

Um abschätzen zu können, welche Relevanz dieser Signalweg in der Maus besitzt, wurde die Menge an smIL-6R im Serum von P2X7^{-/-}-Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Quantifizierung erfolgte mit einem ELISA gegen mIL-6R. Tatsächlich war in Mäusen ohne P2X7R der Serumlevel an smIL-6R signifikant um 15,5 % reduziert (16.05 ± 0.77 ng/ml gegenüber 13.60 ± 0.13 ng/ml, $p < 0.001$, siehe Abbildung 3.22).

3 Ergebnisse

Aktivierung des P2X7R trägt somit zum Serumlevel an smIL-6R in der Maus bei, wenn auch der überwiegende Teil durch andere Prozesse ausgelöst werden muss.

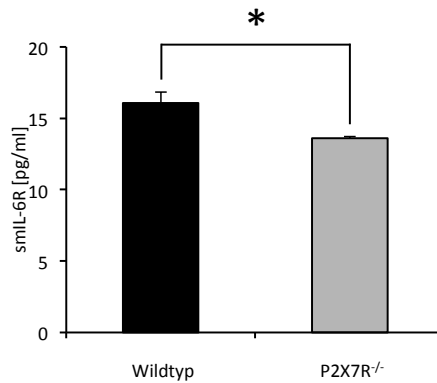


Abbildung 3.22: Durch P2X7-Rezeptor ausgelöstes Shedding trägt zum Serumlevel an smIL-6R bei. Die Menge an smIL-6R in aus Vollblut gewonnenem Serum wurde mittels eines ELISA gegen den mIL-6R bestimmt. Vergleich zwischen C57BL/6-Wildtyp und P2X7-Rezeptor^{-/-}-Mäusen. Gezeigt ist der Mittelwert von fünf Tieren pro Gruppe \pm SD. Alle Werte wurden dreifach bestimmt.

3.19 Apoptose führt zum Shedding des mIL-6R durch ADAM10

In der Arbeit von CHALARIS et al. (2007) wurde gezeigt, dass Apoptose ein natürlicher Stimulus ist, der zur proteolytischen Freisetzung des humanen IL-6R durch ADAM17 führt. Um zu untersuchen, ob dieses ebenfalls für den murinen IL-6R gilt, wurden Ba/F3-gp130-Zellen-hIL-6R-Zellen und Ba/F3-gp130-mIL-6R-GFP-Zellen für 8 h mit 500 ng/ml des Chemotherapeutikums Doxorubicin inkubiert, um Apoptose in den Zellen auszulösen. Ferner wurden die Inhibitoren GI und GW verwendet, um die verantwortliche Protease zu bestimmen. Abbildung 3.23 A bestätigt die Ergebnisse von CHALARIS et al. (2007) und zeigt eindeutig, dass der humane IL-6R in murinen Zellen nach Apoptose durch ADAM17 prozessiert wurde. Apoptotische Zellen wurden durch Färbung gegen Annexin V und Messung dieser mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Ba/F3-gp130-mIL-6R-GFP-Zellen zeigten ein anderes Bild. Auch hier führte Apoptose zur proteolytischen Freisetzung des löslichen Rezeptors, die sich aber sowohl mit GI als auch mit GW hemmen ließ, was auf ADAM10 als verantwortliche Protease

3 Ergebnisse

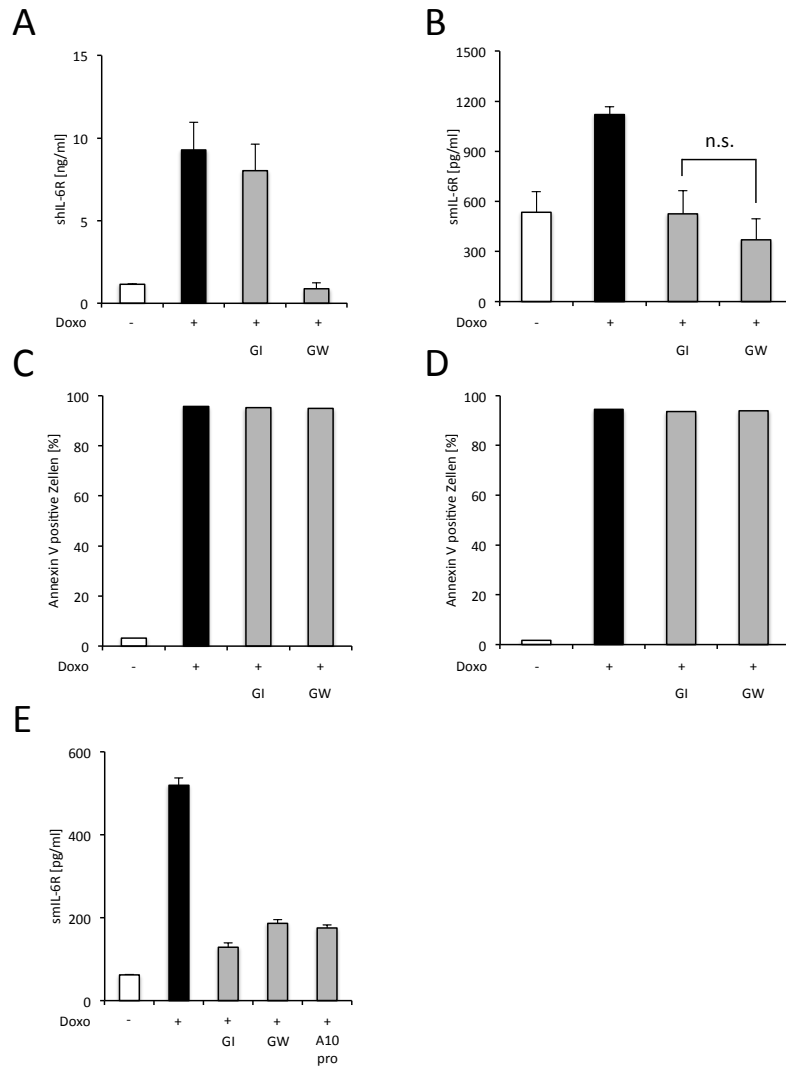


Abbildung 3.23: Apoptose führt zum Shedding des mIL-6R durch ADAM10. (A) Gleiche Zellzahlen Ba/F3-gp130-hIL-6R wurden für 8 h mit 500 ng/ml Doxorubicin (Doxo) behandelt. Inhibitoren wurden 30 min vorher zugesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mittels ELISA quantifiziert. (B) Analog zu (A) wurde das gleiche Experiment mit Ba/F3-gp130-mIL-6R-GFP durchgeführt. (C), (D) Apoptotische Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin wurden durch Färbung gegen Annexin V nachgewiesen. (E) Primäre murine T-Zellen wurden über Nacht mit 100 ng/ml Doxorubicin inkubiert. Die Inhibitoren wurden 30 min vorher zugegeben. Der smIL-6R im Überstand wurde anschließend mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind der Mittelwert \pm SD von sechs Mäusen.

3 Ergebnisse

hinweist (Abbildung 3.23 B). Der geringe Unterschied in der Inhibition zwischen GI und GW war nicht signifikant ($p=0,314$). Auch hier wurde mittels Annexin V-Färbung sichergestellt, dass die Zellen apoptotisch waren (Abbildung 3.23 D).

Als weiteres Experiment wurden primäre murine T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen isoliert und über Nacht mit 100 ng/ml Doxorubicin inkubiert. Der anschließend im Überstand der Zellen enthaltene smIL-6R wurde mittels ELISA quantifiziert. Auch hier führte die Stimulation mit Doxorubicin zum Shedding des mIL-6R, das durch die Inhibitoren GI, GW und die ADAM10-Prodomäne nahezu vollständig gehemmt wurde. Zusammengefasst deuten diese Experimente darauf hin, dass für das Shedding des IL-6R in der Maus nach Apoptose eher ADAM10 als ADAM17 verantwortlich ist.

3.20 Stimulation mit Anisomycin führt zum Shedding des humanem IL-6R durch ADAM17

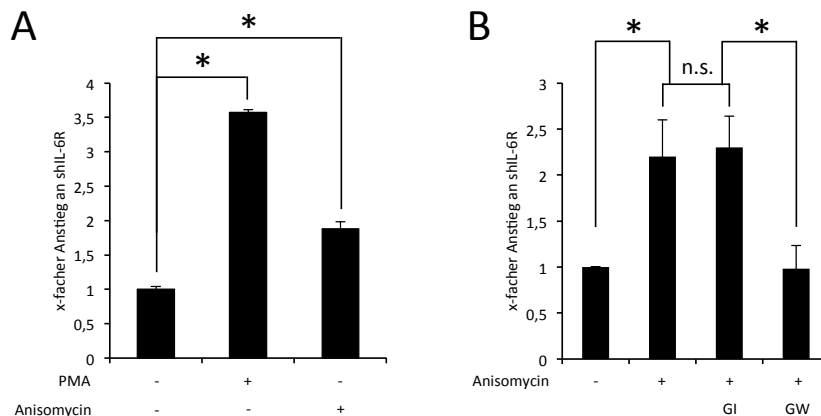


Abbildung 3.24: Stimulation mit Anisomycin führt zum Shedding des humanem IL-6R durch ADAM17. HEK293-Zellen wurden mit hIL-6R transfiziert. (A) Gleiche Zellzahlen wurden 48 h nach Transfektion wie angegeben mit 10 μ M Anisomycin oder 100 nM PMA für 1 h stimuliert. (B) Gleiche Zellzahlen wurden 48 h nach Transfektion wie angegeben mit Anisomycin für 1 h stimuliert. Die Inhibitoren GI und GW wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Die im Überstand enthaltene Menge shIL-6R wurde mittels ELISA quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an shIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm SD.

3 Ergebnisse

Die Arbeit von XU & DERYNCK (2010) zeigte, dass das Antibiotikum Anisomycin in der Lage ist, die p38 MAPK zu aktivieren, die wiederum ADAM17 durch Phosphorylierung von Thr⁷³⁵ aktiviert, was zum Shedding von Liganden der TGF α -Familie führt. Ob Anisomycin auch zur Freisetzung des IL-6R führt, wurde bisher nicht untersucht. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen mit hIL-6R transfiziert und sowohl mit PMA als auch mit Anisomycin stimuliert (siehe Abbildung 3.24 A). Als Kontrolle wurden die Zellen mit PMA stimuliert, was zu einer signifikanten Erhöhung des shIL-6R führte ($p=0,002$). Bei Stimulation mit Anisomycin zeigte sich, dass auch dieses in der Lage ist, Shedding des hIL-6R auszulösen. Der Anstieg an löslichem Rezeptor fällt dabei verglichen mit PMA geringer aus, unterscheidet sich aber signifikant von der unstimulierten Kontrolle ($p=0,04$).

Um zu bestimmen, welche Protease für das Anisomycin-induzierte Shedding verantwortlich ist, wurde das beschriebene Experiment mit den Inhibitoren GI (selektiv für ADAM10) und GW (inhibiert sowohl ADAM10 als auch ADAM17) wiederholt. Während GI keinen Einfluss auf das Shedding des hIL-6R hatte, konnte das Shedding mit GW vollständig inhibiert werden. Somit ist die durch Anisomycin aktivierte Protease als ADAM17 identifiziert.

3.21 Die p38 MAPK ist am Anisomycin-induzierten Shedding beteiligt

Der intrazelluläre Signalweg, der durch Anisomycin aktiviert wird und zum Shedding von ADAM17-Substraten führt, ist die p38 MAPK. Diese lässt sich effektiv mit der Chemikalie SB203580 hemmen. Um zu zeigen, dass auch das durch Anisomycin ausgelöste Shedding des humanen IL-6R von der intrazellulären Aktivität der p38 MAPK abhängt, wurden mit hIL-6R transfizierte HEK293-Zellen vor der Stimulation mit SB203580 inkubiert. Abbildung 3.25 A zeigt, dass sich das Shedding vollständig und signifikant durch den p38 MAPK-Inhibitor hemmen ließ ($p<0,001$), die Aktivität der p38 MAPK folglich notwendig war. Auf PMA-induziertes Shedding hatte der Inhibitor keinen Einfluss (siehe Abbildung 3.25 B), obwohl auch dieses durch ADAM17 vermittelt wurde. Beide Stimuli, sowohl PMA als auch Anisomycin, führen somit zur Stimulation der gleichen Protease, aktivieren aber offensichtlich völlig verschiedene intrazelluläre Signalwege, die dann zum Shedding des humanen IL-6R führen.

3 Ergebnisse

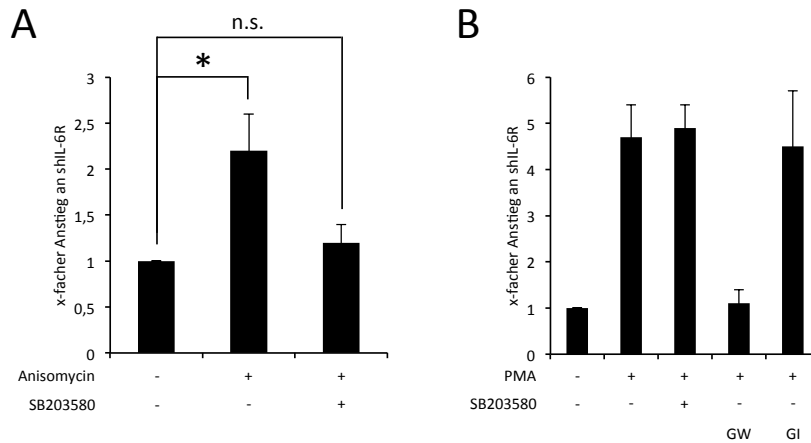


Abbildung 3.25: p38 MAPK ist am Anisomycin-induzierten Shedding beteiligt. HEK293-Zellen wurden mit hIL-6R transfiziert. (A) Gleiche Zellzahlen wurden 48 h nach Transfektion wie angegeben mit 1 μ M Anisomycin für 1 h stimuliert. Der p38 MAPK-Inhibitor SB203580 (10 μ M) wurde 30 min vor Beginn der Stimulation zugesetzt. (B) Gleiche Zellzahlen wurden 48 h nach Transfektion wie angegeben mit PMA für 1 h stimuliert. Die Inhibitoren GI, GW und SB203580 wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Die im Überstand enthaltene Menge shIL-6R wurde mittels ELISA quantifiziert. Zur Berechnung des Anstiegs an shIL-6R wurde die ohne Stimulation, konstitutiv freigesetzte Menge gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm SD.

3.22 Generierung eines Expressionsplasmids für humanen IL-6R ohne intrazelluläre Domäne

Zur weiteren Charakterisierung der Unterschiede zwischen PMA- und Anisomycin-induziertem Shedding des humanen IL-6R sollte der Einfluss der intrazellulären Domäne des IL-6R untersucht werden. Hierfür wurde eine IL-6R cDNA generiert, bei der der kodierende Bereich der intrazellulären Domäne durch GFP ersetzt wurde. Die allgemeine Vorgehensweise zeigt Abbildung 3.26. Hierfür wurde pcDNA3.1-hIL-6R-GFP als Vorlage verwendet und mit den beiden Oligonukleotiden IL6R-dICD-GFP-fw und IL6R-dICD-GFP-rev durch eine PCR ein Bereich amplifiziert, der den letzten Teil der Stalk-Domäne sowie die vollständige Transmembrandomäne enthielt. Nach Reinigung des PCR-Produkts wurde dieses mit *PmlI* und *BamHI* gespalten.

3 Ergebnisse

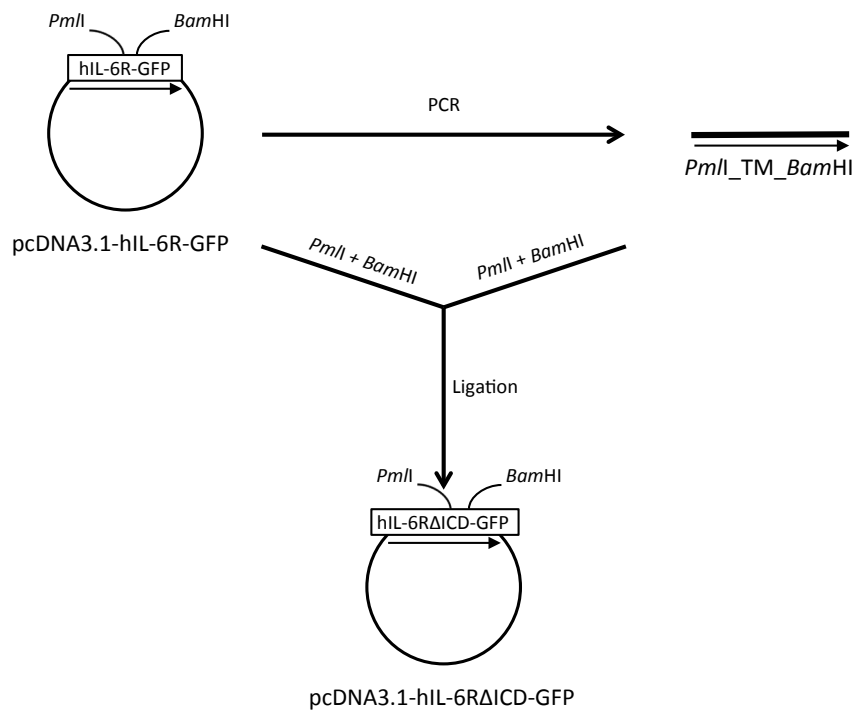


Abbildung 3.26: Schematische Übersicht der Generierung des Expressionsplasmids für humanen IL-6R ohne intrazelluläre Domäne pcDNA3.1-hIL-6RΔICD-GFP. Alle Details sind in Abschnitt 3.22 beschrieben.

Der Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsendonucleasen gespalten, dephosphoryliert und nach Reinigung mit dem PCR-Produkt ligiert. Hierdurch entstand ein Expressionsplasmid, das für den humanen IL-6R ohne intrazelluläre Domäne kodiert, der C-terminal mit GFP fusioniert ist. Es wird als pcDNA3.1-hIL-6RΔICD-GFP bezeichnet.

3.23 Die intrazelluläre Domäne des hIL-6R ist für Anisomycin-induziertes Shedding notwendig

Für das PMA-induzierte Shedding des humanen IL-6R wird die intrazelluläre Domäne des IL-6R nicht benötigt (MÜLLBERG et al., 1994). Ob dies auch für andere Stimuli gilt, die zum Shedding des IL-6R führen, wurde bislang nicht untersucht. Daher wurden HEK293-Zellen nach Transfektion mit hIL-6R oder hIL-6RΔICD-GFP mit Anisomycin

3 Ergebnisse

stimuliert (siehe Abbildung 3.27).

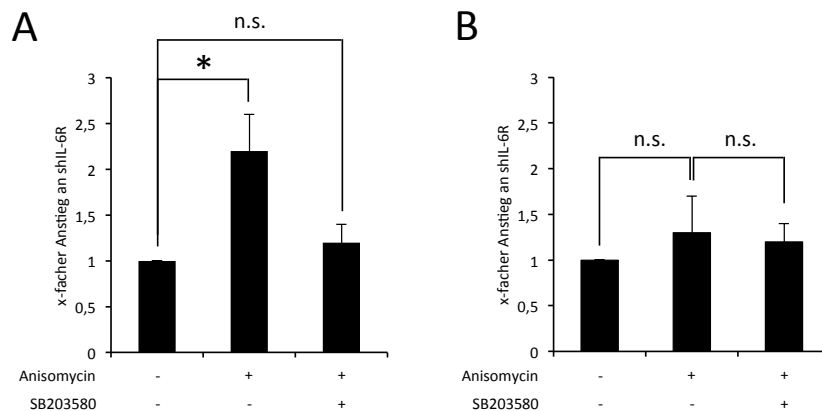


Abbildung 3.27: Die intrazelluläre Domäne des humanen IL-6R ist für das Anisomycin-induzierte Shedding notwendig. HEK293-Zellen wurden mit (A) hIL-6R oder (B) hIL-6RΔICD-GFP transfiziert. Gleiche Zellzahlen wurden 48 h nach Transfektion wie angegeben mit 1 μ M Anisomycin für 1 h stimuliert. Die im Überstand enthaltene Menge des shIL-6R wurde mittels ELISA quantifiziert. Der p38 MAPK-Inhibitor SB203580 (10 μ M) wurde 30 min vor Beginn der Stimulation zugesetzt. Zur Berechnung des Anstiegs an shIL-6R wurde die ohne Stimulation konstitutiv freigesetzte Menge an sIL-6R gleich 1 gesetzt und davon ausgehend die anderen Konzentrationen berechnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm SD.

Für den vollständigen hIL-6R zeigt sich, dass nach Stimulation mit Anisomycin ein signifikanter 2,5facher Anstieg des löslichen IL-6R im Überstand zu finden war ($p < 0,001$), der vollständig durch den p38 MAPK-Inhibitor SB203580 blockiert werden konnte ($p < 0,001$). Durch Deletion der intrazellulären Domäne war der Anstieg an löslichem hIL-6R nach Anisomycin-Stimulation deutlich reduziert und unterschied sich nicht signifikant von der unstimulierten Kontrolle ($p = 0,374$) sowie von dem mit SB203580 inhibierten Ansatz ($p = 0,333$). Die intrazelluläre Domäne des humanen IL-6R scheint folglich für das Anisomycin-induzierte Shedding benötigt zu werden.

4 Diskussion

4.1 Der IL-6 Signalweg und der lösliche IL-6 Rezeptor

Wie alle pleiotropen Zytokine ist auch Interleukin-6 (IL-6) an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Da es in den meisten entzündlichen Erkrankungen zu einer vermehrten Expression von IL-6 kommt, wird es häufig als proinflammatorisches Zytokin wahrgenommen. Allerdings spielt IL-6 auch in vielen metabolischen und regenerativen Prozessen eine wichtige Rolle, weist folglich sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf (SCHELLER et al., 2011).

Die biologischen Aktivitäten von IL-6 werden über einen Rezeptorkomplex, bestehend aus den beiden Transmembranproteinen IL-6R und gp130, signalisiert. IL-6 bindet hierbei zuerst an den IL-6R. Der Komplex rekrutiert im Anschluss zwei Moleküle gp130, was schließlich zur IL-6 Signaltransduktion führt. Dieser Signalweg wird als *IL-6 classic-signaling* bezeichnet. Über ihn vermittelt IL-6 seine regenerativen und antiinflammatorischen Eigenschaften. Entzündungsfördernd hingegen sind eher die Aktivitäten, die über einen zweiten Signalweg laufen, das so genannte *IL-6 trans-signaling*. Hierbei bindet IL-6 an eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R). Der so gebildete Komplex ist nun in der Lage, über Bindung an gp130 praktisch alle Zellen des Körpers zu aktivieren. Ihm steht somit ein viel größeres Repertoire an aktivierbaren Zellen zur Verfügung als IL-6 allein. Der Generierung des sIL-6R kommt in diesem Signalweg eine entscheidende Rolle zu. Im Menschen wird er entweder durch alternatives Splicen (10 %) oder limitierte Proteolyse (90 %) gebildet (HORIUCHI et al., 1994; MÜLLBERG et al., 1993a). Es wird allgemein angenommen, dass die konstante, konstitutive Proteolyse durch ADAM10, das (pathologisch) induzierte Shedding hingegen durch ADAM17 ausgeführt wird (MATTHEWS et al., 2003).

Mäuse werden seit langer Zeit als Versuchstiere eingesetzt, um die molekularen Grundlagen menschlicher Erkrankungen zu untersuchen. In der Maus ist für die Bildung des sIL-6R ausschließlich limitierte Proteolyse und kein alternatives Splicen beschrieben. Der Kenntnis über die hierfür verantwortliche Protease kommt somit eine entscheidende Bedeutung zu, möchte man Erkenntnisse aus den Tiermodellen auf die Anwendung

im Menschen übertragen. Um die Rolle des *IL-6 trans-signaling* zu untersuchen, bietet sich eine Knockout-Maus der entsprechenden Protease an, da in diesem Fall kein sIL-6R in der Maus entstehen könnte. Mäuse, die einen vollständigen Knockout von ADAM10 (HARTMANN et al., 2002) oder ADAM17 (BLACK et al., 1997; PESCHON et al., 1998) aufweisen, sind embryonal lethal, was ein Hinweis auf die wichtige Rolle dieser Proteasen in der Entwicklung ist. Kürzlich generierte hypomorphe ADAM17^{ex/ex}-Mäuse, die eine geringe ADAM17-Expression von nur 5 % in allen Geweben zeigen, sollten folglich eine Reduktion des Serumspiegels an sIL-6R aufweisen, wenn die entscheidende Protease fast vollständig fehlt. Dieses ist nicht der Fall, die Serumspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unterscheiden sich nicht. Eine Analyse von CD3⁺-Milzzellen, die mit dem ADAM17-Aktivator PMA stimuliert wurden, konnte nur einen geringen Einfluss von ADAM17 auf die Prozessierung des mIL-6R nachweisen. Die Oberflächenexpression des endogenen mIL-6R nahm nach Stimulation nur um rund 20 % ab, während auf den gleichen Zellen die Expression des bekannten ADAM17-Substrats L-Selectin nach Stimulation um 80 % reduziert war.

Aus diesen initialen Untersuchungen ergab sich die Frage, welche Rolle murines ADAM17 bei der Prozessierung des murinen IL-6R spielt und somit ob ADAM10 und ADAM17 in der Maus überhaupt bzw. in gleicher Weise für die Generierung des smIL-6R verantwortlich sind oder ob andere Proteasen an diesem Schritt beteiligt sind. Hierfür wurde zunächst in humanen HEK293-Zellen das Shedding sowohl von humanem als auch murinem IL-6R untersucht, wobei der IL-6R beider Spezies von humanem ADAM17 gleichermaßen gut prozessiert wurde. Zur Unterscheidung zwischen den beiden Metalloproteasen dienten die beiden Inhibitoren GW280264X (inhibiert ADAM10 und ADAM17) und GI254023X (spezifisch für ADAM10). Das analoge Experiment mit zwei verschiedenen murinen Zelllinien, die mit den beiden Rezeptoren transfiziert wurden, zeigte hingegen, dass die Aktivierung von murinem ADAM17 mit PMA zwar zur Prozessierung des humanen, aber nicht des murinen IL-6R führt. Hier zeigt sich ein erstaunlicher speziesspezifischer Unterschied in der Generierung des sIL-6R in der Maus.

4.2 Analyse der speziesspezifischen Proteolyse durch IL-6R Chimären

Um zu untersuchen, welche Bereiche des IL-6R für diesen Unterschied in der Prozessierung durch murines ADAM17 verantwortlich sind, wurden verschiede-

4 Diskussion

ne Chimären aus humanem und murinem IL-6R konstruiert. Hierbei wurde ein *gain of function*-Ansatz gewählt, d. h. im murinen, nicht-prozessierten IL-6R wurden Bereiche der Aminosäuresequenz durch den entsprechenden Teil des humanen IL-6R ersetzt. Anschließend wurde in geeigneten Assays untersucht, welche Bereiche ausgetauscht werden mussten, um aus der Chimäre ein Substrat des murinen ADAM17 zu machen. ADAM17 schneidet den humanen IL-6R in der Nähe der Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren Q357 und D358 (MÜLLBERG et al., 1994). Der Bereich um diese Schnittstelle unterscheidet sich zwischen Mensch und Maus nur in einer einzelnen Aminosäure, während der Rest des Stalkbereichs nur wenig konserviert ist. Eine Substitution dieser einzelnen Aminosäure, der exakt die humane Schnittstelle im murinen Rezeptor erzeugt, hatte allerdings keinen Einfluss auf die (Nicht-)Prozessierung durch murines ADAM17. Auch ein Austausch der gesamten Transmembran- oder der intrazellulären Domäne im murinen IL-6R durch das humane Äquivalent sorgte für keine messbare Erhöhung an löslichem Rezeptor nach PMA-Stimulation. Dieser Befund war nicht überraschend, da keine Konsensussequenz für den Schnitt durch ADAM17 in den bislang bekannten Substraten gefunden werden konnte (CAESCU, JESCHKE & TURK, 2009) und zudem die intrazelluläre Domäne des humanen IL-6R für die Prozessierung nach Stimulation durch PMA nicht benötigt wird (MÜLLBERG et al., 1994).

Der Unterschied für die spezies-abhängige Prozessierung musste folglich im extrazellulären Bereich des IL-6R liegen. Hierfür wurden vier Chimären erstellt, in denen die einzelnen Domänen (D1, D2, D3 und Stalk) separat ausgetauscht wurden, um den relevanten Teil näher einzugrenzen. Erstaunlicherweise wurde jede dieser vier Chimären von murinem ADAM17 in ihre lösliche Form überführt. Eine genaue Festlegung war somit nicht möglich. Alle weiteren erstellten Chimären, bei denen mehr als eine Domäne des extrazellulären Bereichs ausgetauscht war, verhielten sich ebenso, d. h. auch sie waren Substrate von murinem ADAM17. Dieses gilt auch für die Chimäre mIL-6R (S/TM/ICD). Obwohl, wie gezeigt, TM und ICD keinen Einfluss auf die Prozessierung haben, ist der Austausch des Stalk verantwortlich für die Substraterkennung durch murines ADAM17. Es muss also festgestellt werden, dass die gesamte dreidimensionale Struktur des IL-6R für Substraterkennung und Prozessierung durch mADAM17 notwendig ist und dieses nicht an einer einzelnen Domäne festgemacht werden kann. Unterstützt wird dieser Befund durch Untersuchungen von Antikörpern gegen CD40 und HB-EGF, die in der Lage sind, Shedding durch ADAM17 zu inhibieren. Die Bindungsepitope der Antikörper wurden in Regionen identifiziert, die weit von der Schnittstelle entfernt liegen (HAMAOKA et al., 2010; HANSEN et al., 2004), d. h. auch hier sind neben

der eigentlichen Schnittstelle weitere Bereiche in den extrazellulären Domänen für die Erkennung des Substrats durch die Protease wichtig. Für den IL-6R sind solche inhibierenden Antikörper bislang nicht beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass ebenfalls beim IL-6R Bereiche für die Substraterkennung wichtig sind, die distal der eigentlichen Schnittstelle liegen.

Alle konstruierten Chimären wurden auch auf ihr Verhalten gegenüber humanem ADAM17 getestet. Da im initialen Experiment sowohl der humane als auch der murine IL-6R geshedded wurden, ist es nicht weiter verwunderlich, dass auch sämtliche Chimären nach PMA-Stimulation von transfizierten HEK293-Zellen in die lösliche Form überführt wurden. Eine Spezies-Spezifität liegt in humanen Zellen somit nicht vor.

4.3 ADAM10 als wichtige induzierbare Protease des IL-6R

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass murines ADAM17 beim Shedding des murinen IL-6R nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Serumspiegel an löslichem IL-6R in der Maus muss folglich durch eine oder mehrere andere Proteasen verursacht werden. Da humaner IL-6R neben ADAM17 auch von ADAM10 prozessiert werden kann, stellte sich die Frage, ob dieses analog für den murinen IL-6R gilt. Hierfür wurde das Shedding in NIH3T3-Zellen nach Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin untersucht. Der molekulare Mechanismus unterscheidet sich bei Ionomycin grundsätzlich von dem, der durch PMA ausgelöst wird. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die dadurch an die Membran rekrutiert wird. PMA imitiert somit die Funktion von Diacylglycerol, dem natürlichen Aktivator der PKC (KRAFT & ANDERSON, 1983). Ionomycin stimuliert ADAM10, ohne dass daran PKC beteiligt wäre, indem es für einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels der Zellen sorgt, was wiederum u. a. ADAM10 aktiviert. Sowohl humaner als auch muriner IL-6R wurden nach entsprechender Stimulation von murinem ADAM10 geshedded. Blockiert werden konnte dieses sowohl durch die schon beschriebenen Inhibitoren als auch durch Transfektion mit siRNA, die zu einer Herunterregulierung von murinem ADAM10 führte. Dieses zeigt, dass zum einen murine ADAM10 in der Lage ist, murinen IL-6R zu shedden, und dass zum anderen keine Spezies-Spezifität besteht, wie sie murine ADAM17 aufweist.

Es wurde bereits beschrieben, dass Ionomycin zur Freisetzung des endogenen IL-6R in humanen THP-1-Zellen führt (JONES et al., 1998). Die hierfür verantwortliche Protease wurde allerdings nicht identifiziert. Untersuchungen mit transfizierten humanen HEK293-Zellen zeigten, dass humanes ADAM10 nach Stimulation mit Ionomycin sowohl humanen als auch murinen IL-6R shedded. Bislang wurde angenommen, dass

4 Diskussion

ADAM10 hauptsächlich für das konstitutive Shedding des IL-6R verantwortlich ist, da als Stimulus bisher nur beschrieben ist, dass die Depletion von Cholesterol zum Shedding des IL-6R durch ADAM10 führt (MATTHEWS et al., 2003). Ionomycin ist somit der zweite Stimulus, für den eine Induktion von ADAM10 gezeigt werden konnte, die zur Freisetzung des löslichen IL-6R führt.

Zur weiteren Untermauerung dieses Befundes wurde das Shedding des IL-6R in ADAM10^{-/-} MEFs untersucht. Wie erwartet führte PMA zur Freisetzung des humanen IL-6R durch mADAM17, nicht aber von murinem IL-6R, was auch in dieser Zelllinie die speziesabhängige Freisetzung des IL-6R demonstriert. Ionomycin führte ebenfalls zur Freisetzung des humanen IL-6R. Da ADAM10 in den Zellen vollständig fehlt, musste dieses durch eine andere Protease geschehen. Die vollständige Inhibition durch GW und die Tatsache, dass die rekombinante ADAM10-Prodomäne keinen inhibierenden Einfluss zeigte, belegte, dass ADAM17 in dieser Zelllinie die Rolle von ADAM10 übernehmen und den humanen IL-6R nach Stimulus durch Ionomycin freisetzen kann. Ein solcher Kompensationsmechanismus durch ADAM17 in ADAM10-defizienten Zellen ist bereits beschrieben worden (LE GALL et al., 2009). Anders sieht es beim murinen IL-6R aus. Auch hier führte Ionomycin zur Freisetzung des löslichen Rezeptors, die sich allerdings weder mit GW noch mit der rekombinanten ADAM10-Prodomäne hemmen ließ. Eine Kompensation durch ADAM17 war nicht zu beobachten. Die Prozessierung des mIL-6R in ADAM10^{-/-} MEFs muss folglich durch eine weitere, bislang nicht identifizierte Protease geschehen. Auch dieses unterstreicht die unterschiedliche Prozessierung von humanem und murinem IL-6R durch murine Proteasen.

Um ein artifizielles Verhalten der ADAM10^{-/-} MEFs auszuschließen, wurde das Experiment in ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} MEFs wiederholt. Wie erwartet wurde humaner IL-6R weder nach Stimulation durch PMA oder Ionomycin geshedded, was eindeutig zeigt, dass an der Freisetzung des humanen IL-6R ausschließlich ADAM10 und ADAM17 beteiligt sind. Im Gegensatz dazu war muriner IL-6R wie in den ADAM10^{-/-} MEFs nach Ionomycin-Stimulus in löslicher Form im Überstand nachweisbar. Auch in dieser Zelllinie war die Proteolyse weder durch GW noch durch die ADAM10-Prodomäne inhibierbar, was sich nur dadurch erklären lässt, dass der murine IL-6R noch von einer weiteren murinen Protease geshedded werden kann, die bisher noch nicht identifiziert worden ist. Hierfür sind in der Zukunft weitere Experimente notwendig.

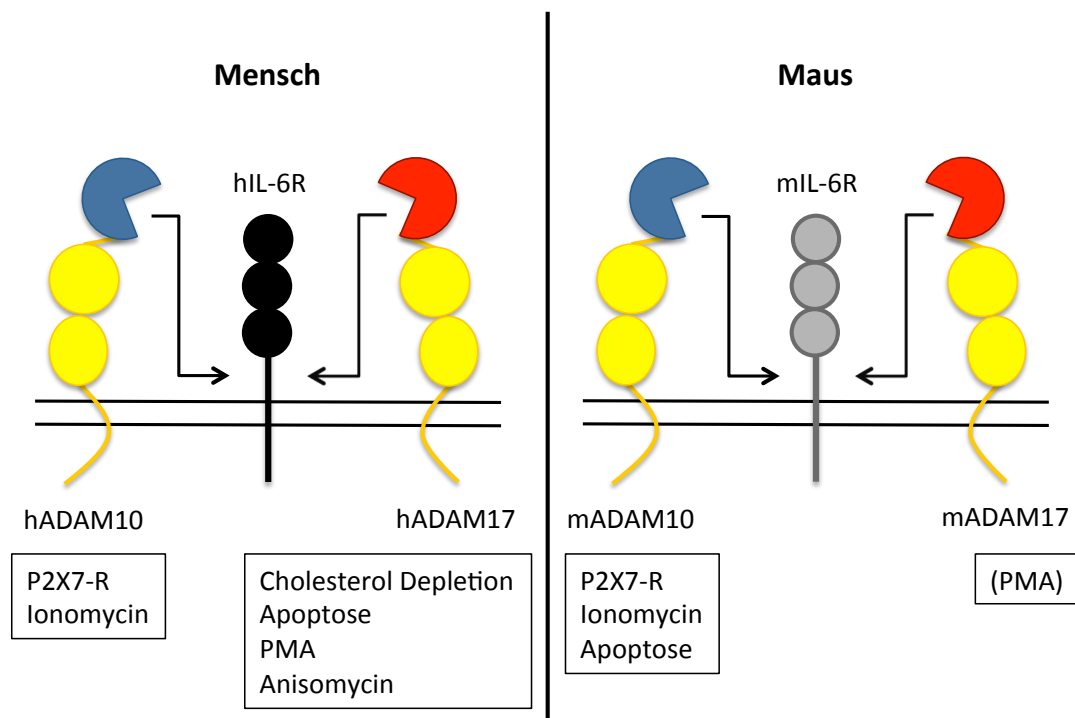


Abbildung 4.1: Schematische Zusammenfassung der unterschiedlichen Stimuli von ADAM10 und ADAM17 in Mensch und Maus. Im Menschen kann das Shedding des IL-6R durch ADAM10 mit Ionomycin oder durch Stimulation des P2X7-R ausgelöst werden. ADAM17 wird durch Depletion von Cholesterin, Apoptose, PMA oder Anisomycin aktiviert. Im Gegensatz dazu wird Shedding des murinen IL-6R hauptsächlich durch Aktivierung von ADAM10 verursacht (P2X7-R, Ionomycin, Apoptose), während die Aktivierung von ADAM17 durch PMA nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Um besser zu verstehen, welche physiologischen Prozesse zur Freisetzung des IL-6R führen, ist es notwendig, entsprechende Stimuli zu identifizieren, die weniger artifiziell als z. B. PMA sind. Für den humanen IL-6R konnte gezeigt werden, dass er nach Apoptose sowohl in humanen als auch in murinen Zellen durch ADAM17 prozessiert wird (CHALARIS et al., 2007). Durch Apoptose induziertes Shedding unterscheidet sich von PMA dadurch, dass es weder von der PKC noch von MAPK oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abhängig ist. Ein analoges Experiment mit Ba/F3-gp130-mIL-6R-Zellen zeigte, dass es auch hier nach Induktion von Apoptose durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin zur Freisetzung des löslichen Rezeptors kommt. Allerdings wird dieser Prozess ebenfalls von ADAM10 und nicht von ADAM17 vermittelt. Induk-

4 Diskussion

tion von Apoptose in primären murinen T-Zellen führt ebenfalls zur Freisetzung des mIL-6R durch ADAM10.

Ein weiterer physiologischer Stimulus ist die Aktivierung des purinergen Rezeptors P2X7 durch ATP. Auch für andere Membranproteine ist P2X7-R vermitteltes Ektodomänen-Shedding beschrieben, u. a. für CD21, CD23 und CD62/L-Selectin. Durch Doppeltransfektion humaner und muriner Zellen mit sowohl humanem als auch murinem IL-6R und P2X7-R sowie anschließender Stimulation mit dem ATP-Analogon BzATP konnte gezeigt werden, dass auch der IL-6R nach P2X7-R Stimulation geshedded wird. Diese Proteolyse wird spezieübergreifend von humanem und murinem ADAM10 ausgeführt. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors stellt damit einen weiteren Stimulus dar, der zur induzierbaren Aktivierung von ADAM10 führt, woraus die Freisetzung des löslichen IL-6R folgt. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Stimuli, die zur Freisetzung des löslichen IL-6R in Mensch und Maus führen, kann Abbildung 4.1 entnommen werden.

Der Nachweis der tatsächlichen physiologischen Relevanz dieser *in vitro*-Befunde konnte durch Experimente mit primären murinen Milz- und T-Zellen erbracht werden. Auch hier wurde der endogene mIL-6R nach BzATP-Stimulation proteolytisch durch murines ADAM10 freigesetzt. Vergleiche mit Zellen aus hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen belegten, dass ADAM17 in diesem Prozess keine Rolle spielt, die Freisetzung somit ausschließlich über ADAM10 geschieht. Ein Vergleich der mIL-6R Serumlevel in Wildtyp und P2X7-R^{-/-}-Mäusen zeigte eine signifikante Reduktion in den Knockoutmäusen. Dieses unterstreicht die physiologische Bedeutung des Sheddings, das durch Stimulation des P2X7-R ausgelöst wird, da es teilweise zum normalen Serumlevel des smIL-6R in der Maus beiträgt.

4.4 Einfluss der intrazellulären Domänen von Protease und Substrat

Schon sehr frühe Studien konnten zeigen, dass weder die intrazelluläre Domäne des humanen IL-6R (MÜLLBERG et al., 1994) noch die von ADAM17 (REDDY et al., 2000) für das Shedding nach Stimulation mit PMA notwendig sind. Eine mögliche Erklärung hierfür lieferte die Studie von WILLEMS et al. (2010), die belegte, dass PMA extrazelluläre Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) inaktiviert, was zu einer aktiven Konformation von ADAM17 durch geänderte Disulfidbrücken führt. Für andere Stimuli, die ADAM10 oder ADAM17 aktivieren, gab es bisher nur wenige Daten,

4 Diskussion

ob und in welcher Weise die intrazellulären Domänen von Protease und Substrat am Ektodomänen-Shedding beteiligt sind. Kürzlich konnten XU & DERYNCK (2010) zeigen, dass die p38 α MAP Kinase mit der intrazellulären Domäne von ADAM17 interagiert und diese an Thr⁷³⁵ phosphoryliert, was zum Ektodomänen-Shedding von Liganden der TGF α -Familie führt. Aktiviert wurde die p38 α MAPK durch Anisomycin, ein Antibiotikum, das in der Lage ist, Stress-induzierbare Signalwege wie p38 zu aktivieren. Bei Austausch von Thr⁷³⁵ gegen ein Alanin in der intrazellulären Domäne von ADAM17 war kein durch Anisomycin induziertes Shedding mehr detektierbar.

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der p38 α MAPK durch Anisomycin zur Freisetzung von löslichem humanem IL-6R führt, wurden HEK293-Zellen transient transfiziert und stimuliert. Anisomycin führte zum Ektodomänen-Shedding von humanem IL-6R. Die Beteiligung der p38 α MAPK wurde durch Hemmung mittels SB203580, die von ADAM17 durch Hemmung mit GW gezeigt.

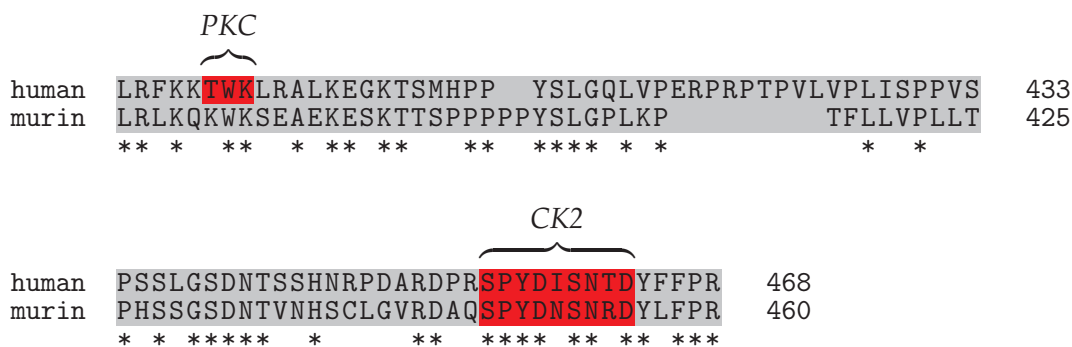


Abbildung 4.2: Alignment der ICD von humanem und murinem IL-6R. Das Alignment der Aminosäuresequenzen der ICDs von humanem und murinem IL-6R wurde mit dem Programm ClustalX erstellt (JEANMOUGIN et al., 1998). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) markiert. Rot markiert sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C (PKC) und Caseinkinase II (CK2).

Die Darstellung des Alignments erfolgte mit \TeXshade (BEITZ, 2000).

SB203580 hatte keinen Einfluss auf das PMA-induzierte Shedding, d. h. eine Beteiligung der p38 MAPK an diesem Prozess konnte ausgeschlossen werden, was wiederum unterstreicht, dass es sich hier um zwei fundamental verschiedene Signalwege handelt. Interessanterweise führte die Stimulation mit Anisomycin von HEK293-Zellen, die mit einem IL-6R ohne intrazelluläre Domäne (ICD) transfiziert wurden, zu keiner signifikant erhöhten Freisetzung an löslichem IL-6R. Durch dieses Experiment konnte das erste Mal gezeigt werden, dass die ICD des humanen IL-6R für das Shedding seines

4 Diskussion

extrazellulären Bereiches notwendig ist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass Anisomycin neben der p38 MAPK auch die Serin/Threonin-Kinase CK2 (Casein-Kinase II) aktivieren kann (SAYED et al., 2000). Wie Abbildung 4.2 zeigt, enthält die ICD des IL-6R zwei mögliche Phosphorylierungsstellen für die CK2, die zwischen Maus und Mensch konserviert sind. Es ist also durchaus möglich, dass nach Stimulation mit Anisomycin nicht nur ADAM17, sondern auch der IL-6R phosphoryliert wird und dieses zum Ektodomänen-Shedding beiträgt. Das würde bedeuten, dass mit der CK2 ein weiterer intrazellulärer Signalweg für die Regulation der Entstehung des löslichen IL-6R mit verantwortlich ist. CK2 ist an vielen entzündlichen Erkrankungen und der Tumorentstehung beteiligt (DUNCAN & LITCHFIELD, 2008), somit an Prozessen, in denen auch Shedding des IL-6R und IL-6 *trans-signaling* eine wichtige Rolle spielen. Es ist daher möglich, dass die Aktivität der CK2 und Shedding des IL-6R miteinander verknüpft sind.

Weiterhin bekannt ist, dass der IL-6R sowohl konstitutiv als auch nach PMA-Stimulus PKC-abhängig phosphoryliert wird (MÜLLBERG et al., 1994). Bisher ist allerdings weder die Phosphorylierungsstelle bestimmt worden, noch konnte der Phosphorylierung eine funktionale Relevanz zugeordnet werden. Eine mögliche PKC-Phosphorylierungsstelle ist interessanterweise nur im humanen, nicht aber im murinen IL-6R vorhanden (siehe Abbildung 4.2). Ob muriner IL-6R phosphoryliert wird, ist bislang noch nicht untersucht worden. Um wirklich zu verstehen, welche Rolle die intrazellulären Domänen von Proteasen und ihrer Substrate bei verschiedenen Stimuli spielen, bedarf es weiterer Analysen.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt entscheidende Unterschiede im Ektodomänen-Shedding des Interleukin-6 Rezeptors zwischen Mensch und Maus. Es konnte gezeigt werden, dass ADAM17 nur eine geringe Rolle in der Prozessierung des murinen IL-6R spielt. Auch die bisherige Annahme, dass ADAM10 vornehmlich für die konstitutive Freisetzung des löslichen IL-6R verantwortlich ist, muss in neuem Licht betrachtet werden, da in Mensch und Maus sowohl die physiologische Stimulation durch den P2X7-R als auch durch Ionomycin ausschließlich ADAM10, nicht aber ADAM17 aktivieren. Die in vielen Publikationen zu findende Unterteilung in langsame, konstitutive (ADAM10) und schnelle, induzierbare Freisetzung (ADAM17) muss somit überdacht werden. Ebenfalls ist fraglich, ob die bisher entwickelten ADAM17 defizienten Mäuse eine genaue Untersuchung des IL-6 *trans-signaling* erlauben oder ob nicht eher kon-

4 Diskussion

ditionale ADAM10^{-/-}-Mäuse dafür geeignet sind. ADAM17 defiziente Mäuse spiegeln nicht die Situation im Menschen wider, und Daten aus Krankheitsmodellen, die mit diesen Tieren gewonnen wurden, müssen mit Vorsicht interpretiert werden.

Weiter untersucht werden sollten außerdem die strukturellen Differenzen zwischen humanem und murinem IL-6R, die dazu führen, dass nach Apoptose humaner IL-6R von mADAM17, muriner IL-6R hingegen von mADAM10 geshedded wird. Hierfür bieten sich Ba/F3-gp130-Zellen an, die stabil mit den in dieser Arbeit beschriebenen Chimären transduziert sind. Mit ihrer Hilfe sollte es möglich sein, relevante Bereiche für diesen Vorgang zu identifizieren.

Eine entscheidende Rolle beim Ektodomänen-Shedding kommt der intrazellulären Domäne von Substrat und Protease zu. In dieser Arbeit konnten das erste Mal Hinweise darauf gefunden werden, dass die ICD des hIL-6R bei einem Stimulus benötigt wird, der zum Ektodomänen-Shedding führt. Welche intrazellulären Signalwege hierzu verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig untersucht werden und muss durch nachfolgende Experimente verifiziert werden, bei denen der Phosphorylierung des IL-6R eine entscheidende Bedeutung zukommt. Ob es auch hier speziesspezifische Differenzen zwischen Mensch und Maus gibt, wurde ebenfalls noch nicht untersucht.

Ein anderer wichtiger Punkt ist die Identifikation der weiteren murinen Protease, die in der Lage ist, den murinen IL-6R zu prozessieren. Die in dieser Arbeit verwendeten ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} MEFs bieten sich als Ausgangspunkt an, um mit verschiedenen Inhibitoren und spezifischen siRNAs die gesuchte Protease zu finden. Ihre Identifikation ist wichtig, um Ergebnisse aus murinen Krankheitsmodellen, an deren Pathogenese der sIL-6R beteiligt ist, richtig interpretieren zu können.

5 Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) übernimmt sowohl bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle in der Koordination von Immunantworten. Ein wichtiger Schritt ist hierbei das so genannte IL-6 Trans-signaling, bei dem IL-6 an den löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) bindet. Der entstandene Komplex ist in der Lage, praktisch alle Zellen durch Bindung an den membranständigen signaltransduzierenden Rezeptor 130 (gp130) zu aktivieren. IL-6 alleine kann dies nur bei Zellen, die den membrangebundenen IL-6R tragen. Löslicher IL-6R entsteht im Menschen hauptsächlich durch limitierte Proteolyse des membranständigen Rezeptors (Shedding), aber auch durch alternatives Splicen der IL-6R mRNA. Es ist bekannt, dass der humane IL-6R von ADAM17, einem Mitglied der A Disintegrin And Metalloprotease Proteinfamilie, und zu einem geringeren Teil von ADAM10 prozessiert wird. Man nimmt an, dass ADAM10 hierbei für das langsame, konstitutive Shedding verantwortlich ist, während ADAM17 den IL-6R schnell nach (patho-)physiologischer Stimulation schneidet. Analoge Daten zum murinen IL-6R gibt es bislang nicht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der IL-6R in der Maus nur in geringem Maße durch ADAM17 proteolytisch gespalten wird. Hypomorphe ADAM17^{ex/ex}-Mäuse, die eine um rund 95 % reduzierte ADAM17 Expression in allen Geweben aufweisen, zeigten keine Reduktion des Serumspiegels an löslichem murinem IL-6R (smIL-6R) verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Stimulation mit dem Phorbolster PMA war zum großen Teil nicht in der Lage, ADAM17-mediiertes Shedding des mIL-6R auszulösen, was unterstreicht, dass murines ADAM17 (mADAM17) nicht die Hauptprotease des mIL-6R ist. Shedding des mIL-6R durch ADAM17 konnte hingegen erzielt werden, wenn Teile des extrazellulären Bereiches durch ihr humanes Gegenstück ausgetauscht wurden. Die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne hatten hierauf keinen Einfluss. Dieses deutet auf eine wichtige Rolle des extrazellulären Bereiches des IL-6R in Bezug auf die Erkennung des Substrats IL-6R durch seine Protease hin.

Kürzlich wurde Apoptose als natürlicher Stimulus entdeckt, der ADAM17-mediiertes Shedding des hIL-6R verursacht und damit zur Auflösung einer akuten Entzündung beiträgt. Obwohl Apoptose ebenso das Shedding des IL-6R in der Maus auslöst, wur-

5 Zusammenfassung

de die verantwortliche Protease im Rahmen dieser Arbeit als murines ADAM10 (mADAM10) identifiziert. ADAM10 war ebenso verantwortlich für das durch Ionomycin ausgelöste Shedding von humanem und murinem IL-6R. In murinen embryonalen Fibroblasten, die defizient für ADAM10 sind, wurde die Proteolyse des humanen IL-6R von ADAM17 kompensiert, wo hingegen muriner IL-6R von einer bisher noch nicht identifizierten weiteren Protease geschnitten wurde. In weiteren Experimenten konnte die physiologische Stimulation des purinergen P2X7-Rezeptors als neuer Stimulus der IL-6R Proteolyse identifiziert werden, die ausschließlich durch humanes und murines ADAM10 vermittelt wurde. Dieser neue Signalweg trug zum physiologischen Serumlevel an smIL-6R in der Maus bei, was durch signifikant reduzierte Werte an smIL-6R im Blut P2X7-R defizienter Mäuse gezeigt werden konnte. Schließlich wurde das stressauslösende Antibiotikum Anisomycin als weiterer Stimulus der Proteolyse des hIL-6R durch ADAM17 mittels Aktivierung der p38 MAPK identifiziert. Für diesen Prozess war die intrazelluläre Domäne (ICD) des IL-6R erforderlich. Es stellt somit den ersten beschriebenen Prozess dar, in dem die ICD des IL-6R für das Shedding erforderlich ist. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit eine unerwartete Speziespezifität von ADAM10 und ADAM17 beim Shedding des IL-6R und identifiziert ADAM10 als neue induzierbare Protease des IL-6R in Mensch und Maus. Dies kann Konsequenzen für die Interpretation von Phenotypen von ADAM17 und ADAM10 defizienten Mäusen, insbesondere bei Krankheitsmodellen, haben.

6 Summary

Interleukin-6 (IL-6) is an important mediator of immune responses both during physiologic and pathophysiologic processes. A key event is the so-called *IL-6 trans-signaling*, in which the soluble Interleukin-6 receptor (sIL-6R) binds to IL-6. This complex is able to activate virtually all cells through binding to the membrane-bound glycoprotein 130 (gp130), whereas IL-6 alone is only able to activate cells expressing the membrane-bound IL-6R. In humans, the sIL-6R is predominantly generated by proteolytic cleavage of the membrane-anchored form (shedding) and to a minor extent by alternative splicing. It is known from previous studies that shedding of the human IL-6R is mediated by A Disintegrin And Metalloprotease 17 (ADAM17) and to a minor extent by ADAM10. It is believed that hereby ADAM10 is responsible for the slow, constitutive shedding, whereas ADAM17 is activated through (patho-)physiological stimuli. Comparable data for murine IL-6R are missing.

In this study, it was shown that ADAM17 is not the main sheddase of murine IL-6R in mice. In hypomorphic ADAM17^{ex/ex} mice, which have about 95 % reduced ADAM17, serum levels of soluble murine IL-6R (smIL-6R) were not reduced compared to wildtype mice. Phorbol ester stimulation was largely ineffective to induce ADAM17-mediated shedding of mIL-6R, indicating that murine ADAM17 (mADAM17) was not the major sheddase of murine IL-6R. Shedding of mIL-6R by mADAM17 was rescued in chimeric mIL-6R proteins containing any extracellular domain of human IL-6R but not the transmembrane or the intracellular domain. This points to a role of the extracellular domains of IL-6R in substrate/protease recognition.

Recently, apoptosis was identified as a physiological stimulus of ADAM17-mediated shedding of hIL-6R and IL-6 trans-signaling for the resolution of acute inflammation. Even though apoptosis induced mIL-6R shedding in mice, the responsible protease was identified as murine ADAM10 (mADAM10). ADAM10 was also identified as the protease responsible for Ionomycin-induced shedding of human and murine IL-6R. However, in ADAM10 deficient murine embryonic fibroblasts compensatory shedding of hIL-6R was mediated by ADAM17 but loss of ADAM10-mediated shedding of mIL-6R was compensated by a yet unidentified protease. Moreover, physiological stimulation

6 Summary

of the purinergic P2X7 receptor was discovered as a novel inducer of IL-6R shedding solely mediated by murine and human ADAM10. This pathway contributed to the physiologic serum level of sIL-6R in mice as shown by significant reduction of smIL-6R in the blood of P2X7-R deficient mice. Finally, the stress-inducing antibiotic anisomycin was shown to induce shedding of hIL-6R via ADAM17 depending on the activation of p38 MAPK, a process, in which the intracellular domain (ICD) of the IL-6R was needed. This showed for the first time the requirement of the ICD of the human IL-6R for a shedding event.

In conclusion, this work showed an unexpected species specificity of ADAM10 and ADAM17 and identified ADAM10 as novel inducible sheddase of IL-6R in mice and men, which might have consequences for the interpretation of phenotypes from ADAM17 and ADAM10 deficient mice, especially for animal models of human diseases.

Literaturverzeichnis

- Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T. A., Broadway, N., Hartmann, D., Sedlacek, R., Dietrich, S., Muetze, B., Schuster, B., Kallen, K.-J., Saftig, P., Rose-John, S. und Ludwig, A. (2004):** The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol*, 172, Nr. 10, 6362–6372
- Aga, M., Johnson, C. J., Hart, A. P., Guadarrama, A. G., Suresh, M., Svaren, J., Bertics, P. J. und Darien, B. J. (2002):** Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *J Leukoc Biol*, 72, Nr. 1, 222–232
- Ali, N. und Knäuper, V. (2007):** Phorbol ester-induced shedding of the prostate cancer marker transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs 2 is mediated by the disintegrin and metalloproteinase-17. *J Biol Chem*, 282, Nr. 52, 37378–37388
- Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., Benedetti, F. D., Poli, V. und Ciliberto, G. (1998):** Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 187, Nr. 4, 461–468
- Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S. und Müllberg, J. (2000):** Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem*, 267, Nr. 9, 2624–2631
- Amour, A., Knight, C. G., Webster, A., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knäuper, V., Docherty, A. J. und Murphy, G. (2000):** The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*, 473, Nr. 3, 275–279
- Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knäuper, V., Docherty, A. J. und Murphy, G. (1998):** TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett*, 435, Nr. 1, 39–44

Literaturverzeichnis

- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E. und Naour, F. L. (2008): Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol*, 181, Nr. 10, 7002–7013
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schürmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S. und Neurath, M. F. (2000): Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*, 6, Nr. 5, 583–588
- Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H. J. und Ansorge, S. (1999): Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J Interferon Cytokine Res*, 19, Nr. 11, 1277–1287
- Bech-Serra, J. J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J. und Canals, F. (2006): Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol Cell Biol*, 26, Nr. 13, 5086–5095
- Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, P. R., Rose-John, S. und Neurath, M. F. (2005): IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 4, Nr. 2, 217–220
- Beitz, E. (2000): TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics*, 16, Nr. 2, 135–139
- Bender, M., Hofmann, S., Stegner, D., Chalaris, A., Bösl, M., Braun, A., Scheller, J., Rose-John, S. und Nieswandt, B. (2010): Differentially regulated GPVI ecto-domain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood*, 116, Nr. 17, 3347–3355
- Bergmeier, W., Piffath, C. L., Cheng, G., Dole, V. S., Zhang, Y., von Andrian, U. H. und Wagner, D. D. (2004): Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/alpha shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res*, 95, Nr. 7, 677–683
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol*, 62, Nr. 3, 293–300

- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. E., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. und Cerretti, D. P. (1997):** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385, Nr. 6618, 729–733
- Blobel, C. P. (1997):** Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell*, 90, Nr. 4, 589–592
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X. und Stöckler, W. (1993):** Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*, 331, Nr. 1-2, 134–140
- Boots, A. W., Hristova, M., Kasahara, D. I., Haenen, G. R., Bast, A. und van der Vliet, A. (2009):** ATP-mediated activation of the NADPH oxidase DUOX1 mediates airway epithelial responses to bacterial stimuli. *J Biol Chem*, 284, Nr. 26, 17858–17867
- Boulanger, M. J., Chow, D., Brevnova, E. E. und Garcia, K. C. (2003):** Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, 300, Nr. 5628, 2101–2104
- Boutet, P., Agüera-González, S., Atkinson, S., Pennington, C. J., Edwards, D. R., Murphy, G., Reyburn, H. T. und Valés-Gómez, M. (2009):** Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol*, 182, Nr. 1, 49–53
- Bravo, J. und Heath, J. K. (2000):** Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J*, 19, Nr. 11, 2399–2411
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. und Israël, A. (2000):** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, 5, Nr. 2, 207–216
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. und Black, R. A. (1998):** Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*, 273, Nr. 43, 27765–27767

- Caescu, C. I., Jeschke, G. R. und Turk, B. E. (2009):** Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J*, 424, Nr. 1, 79–88
- Chakfe, Y., Seguin, R., Antel, J. P., Morissette, C., Malo, D., Henderson, D. und Séguéla, P. (2002):** ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J Neurosci*, 22, Nr. 8, 3061–3069
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Häslér, R., Becker, C., Neurath, M. F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J. und Rose-John, S. (2010a):** Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*, 207, Nr. 8, 1617–1624
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S. und Scheller, J. (2011):** The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* Epub ahead of press
- Chalaris, A., Gewiese, J., Paliga, K., Fleig, L., Schneede, A., Krieger, K., Rose-John, S. und Scheller, J. (2010b):** ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim Biophys Acta*, 1803, Nr. 2, 234–245
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., Jones, S. A., Rose-John, S. und Scheller, J. (2007):** Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, 110, Nr. 6, 1748–1755
- Chen, C.-D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S. E. und Abraham, C. R. (2007):** Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, Nr. 50, 19796–19801
- Chen, Q., Fisher, D. T., Clancy, K. A., Gauguet, J.-M. M., Wang, W.-C., Unger, E., Rose-John, S., Andrian, U. H. von, Baumann, H. und Evans, S. S. (2006):** Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. *Nat Immunol*, 7, Nr. 12, 1299–1308
- Cho, R. W., Park, J. M., Wolff, S. B. E., Xu, D., Hopf, C., Kim, J.-A., Reddy, R. C., Petralia, R. S., Perin, M. S., Linden, D. J. und Worley, P. F. (2008):** mGluR1/5-dependent long-term depression requires the regulated ectodomain cleavage of neuronal pentraxin NPR by TACE. *Neuron*, 57, Nr. 6, 858–871

- Chow, J. P. H., Fujikawa, A., Shimizu, H., Suzuki, R. und Noda, M. (2008):** Metalloproteinase- and gamma-secretase-mediated cleavage of protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J Biol Chem*, 283, Nr. 45, 30879–30889
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. und Shuai, K. (1997):** Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278, Nr. 5344, 1803–1805
- Chung, Y.-C. und Chang, Y.-F. (2003):** Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 83, Nr. 4, 222–226
- Coleman, H. A., Labrador, J.-P., Chance, R. K. und Bashaw, G. J. (2010):** The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development*, 137, Nr. 14, 2417–2426
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R. A. und Buell, G. (1997):** Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36, Nr. 9, 1277–1283
- Contin, C., Pitard, V., Itai, T., Nagata, S., Moreau, J.-F. und Déchanet-Merville, J. (2003):** Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem*, 278, Nr. 35, 32801–32809
- Cuadrado, A. und Nebreda, A. R. (2010):** Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, 429, Nr. 3, 403–417
- Dam, M. van, Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Brakenhoff, J. P., Graeve, L., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1993):** Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *J Biol Chem*, 268, Nr. 20, 15285–15290
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. und Kanellopoulos, J. M. (2011):** The Purinergic Receptor P2X7 Triggers alpha-Secretase-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem*, 286, Nr. 4, 2596–2606
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., Vita, G. D., Cuadrado, A. und Nebreda, A. R. (2007):** p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11, Nr. 2, 191–205
- Dolnik, O., Volchkova, V., Garten, W., Carbonnelle, C., Becker, S., Kahnt, J., Ströher, U., Klenk, H.-D. und Volchkov, V. (2004):** Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J*, 23, Nr. 10, 2175–2184
- Dominitzki, S., Fantini, M. C., Neufert, C., Nikolaev, A., Galle, P. R., Scheller, J., Monteleone, G., Rose-John, S., Neurath, M. F. und Becker, C. (2007):** Cutting edge:

Literaturverzeichnis

- trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol*, 179, Nr. 4, 2041–2045
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Surber, B., Vaidyanathan, S. X., Perez-Medrano, A., Wang, Y., Carroll, W. A. und Jarvis, M. F. (2009):** [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*, 56, Nr. 1, 223–229
- Donners, M. M. P. C., Wolfs, I. M. J., Olieslagers, S., Mohammadi-Motahhari, Z., Tchaikovski, V., Heeneman, S., van Buul, J. D., Caolo, V., Molin, D. G. M., Post, M. J. und Waltenberger, J. (2010):** A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, Nr. 11, 2188–2195
- Dubyak, G. R. und el-Moatassim, C. (1993):** Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*, 265, Nr. 3.1, 577–606
- Duncan, J. S. und Litchfield, D. W. (2008):** Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim Biophys Acta*, 1784, Nr. 1, 33–47
- Dyczynska, E., Sun, D., Yi, H., Sehara-Fujisawa, A., Blobel, C. P. und Zolkiewska, A. (2007):** Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J Biol Chem*, 282, Nr. 1, 436–444
- Díaz-Rodríguez, E., Cabrera, N., Esparís-Ogando, A., Montero, J. C. und Pandiella, A. (1999):** Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci*, 11, Nr. 4, 1421–1430
- Edwards, D. R., Handsley, M. M. und Pennington, C. J. (2008):** The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29, Nr. 5, 258–289
- Eichenauer, D. A., Simhadri, V. L., Strandmann, E. P. von, Ludwig, A., Matthews, V., Reiners, K. S., von Tresckow, B., Saftig, P., Rose-John, S., Engert, A. und Hansen, H. P. (2007):** ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res*, 67, Nr. 1, 332–338
- Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N.,**

Literaturverzeichnis

- Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S. und Yoshimura, A. (1997):** A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, Nr. 6636, 921–924
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F. und Postina, R. (2003):** Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem*, 270, Nr. 11, 2386–2393
- Esselens, C. W., Malapeira, J., Colomé, N., Moss, M., Canals, F. und Arribas, J. (2008):** Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biol Chem*, 389, Nr. 8, 1075–1084
- Etzerodt, A., Maniecki, M. B., Møller, K., Møller, H. J. und Moestrup, S. K. (2010):** Tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, 88, Nr. 6, 1201–1205
- Fabre-Lafay, S., Garrido-Urbani, S., Reymond, N., Gonçalves, A., Dubreuil, P. und Lopez, M. (2005):** Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem*, 280, Nr. 20, 19543–19550
- Farrell, A. W., Gadeock, S., Pupovac, A., Wang, B., Jalilian, I., Ranson, M. und Sluyter, R. (2010):** P2X7 receptor activation induces cell death and CD23 shedding in human RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1800, Nr. 11, 1173–1182
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S. und Virgilio, F. D. (1997a):** Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med*, 185, Nr. 3, 579–582
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Susino, M. D., Melchiorri, L., Baricordi, O. R. und Virgilio, F. D. (1997b):** Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*, 159, Nr. 3, 1451–1458
- Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ricciardi-Castagnoli, P. und Virgilio, F. D. (1996):** Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol*, 156, Nr. 4, 1531–1539
- Filippini, A., Taffs, R. E., Agui, T. und Sitkovsky, M. V. (1990):** Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem*, 265, Nr. 1, 334–340

- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grötzinger, J. und Rose-John, S. (1997): A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol*, 15, Nr. 2, 142–145
- Fong, K. P., Barry, C., Tran, A. N., Traxler, E. A., Wannemacher, K. M., Tang, H.-Y., Speicher, K. D., Blair, I. A., Speicher, D. W., Grosser, T. und Brass, L. F. (2011): Deciphering the human platelet sheddome. *Blood*, 117, Nr. 1, 15–26
- Franchimont, N., Lambert, C., Huynen, P., Ribbens, C., Relic, B., Chariot, A., Bours, V., Piette, J., Merville, M.-P. und Malaise, M. (2005): Interleukin-6 receptor shedding is enhanced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha and is partially mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme in osteoblast-like cells. *Arthritis Rheum*, 52, Nr. 1, 84–93
- Franzke, C.-W., Tasanen, K., Schäcke, H., Zhou, Z., Tryggvason, K., Mauch, C., Zigrino, P., Sunnarborg, S., Lee, D. C., Fahrenholz, F. und Bruckner-Tuderman, L. (2002): Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J*, 21, Nr. 19, 5026–5035
- Garcia-Marcos, M., Pochet, S., Marino, A. und Dehaye, J.-P. (2006): P2X7 and phospholipid signalling: the search of the "missing link in epithelial cells. *Cell Signal*, 18, Nr. 12, 2098–2104
- Garton, K. J., Gough, P. J., Blobel, C. P., Murphy, G., Greaves, D. R., Dempsey, P. J. und Raines, E. W. (2001): Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*, 276, Nr. 41, 37993–38001
- Garton, K. J., Gough, P. J., Philalay, J., Wille, P. T., Blobel, C. P., Whitehead, R. H., Dempsey, P. J. und Raines, E. W. (2003): Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem*, 278, Nr. 39, 37459–37464
- Gechtman, Z., Alonso, J. L., Raab, G., Ingber, D. E. und Klagsbrun, M. (1999): 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, Nr. 40, 28828–28835
- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C. und Graeve, L. (1996): Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*, 271, Nr. 22, 12991–12998

Literaturverzeichnis

- Gonzales, P. E., Galli, J. D. und Milla, M. E. (2008):** Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry*, 47, Nr. 37, 9911–9919
- Gu, B., Bendall, L. J. und Wiley, J. S. (1998):** Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*, 92, Nr. 3, 946–951
- Guo, L., Eisenman, J. R., Mahimkar, R. M., Peschon, J. J., Paxton, R. J., Black, R. A. und Johnson, R. S. (2002):** A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Mol Cell Proteomics*, 1, Nr. 1, 30–36
- Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P. und Stark, G. R. (1995):** A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J*, 14, Nr. 7, 1421–1429
- Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M. und Altevogt, D. P. (2003):** ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J*, 17, Nr. 2, 292–294
- Hamaoka, M., Chinen, I., Murata, T., Takashima, S., Iwamoto, R. und Mekada, E. (2010):** Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding. *J Biochem*, 148, Nr. 1, 55–69
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. und Ulevitch, R. J. (1994):** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265, Nr. 5173, 808–811
- Hansen, H. P., Dietrich, S., Kisseleva, T., Mokros, T., Mentlein, R., Lange, H. H., Murphy, G. und Lemke, H. (2000):** CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol*, 165, Nr. 12, 6703–6709
- Hansen, H. P., Recke, A., Reineke, U., Tresckow, B. V., Borchmann, P., Strandmann, E. P. V., Lange, H., Lemke, H. und Engert, A. (2004):** The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J*, 18, Nr. 7, 893–895
- Hartmann, D., Strooper, B. de, Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Illert, A. L., Figura, K. von und Saftig, P. (2002):** The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, 11, Nr. 21, 2615–2624

- Hattori, M., Osterfield, M. und Flanagan, J. G. (2000):** Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*, 289, Nr. 5483, 1360–1365
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. und Graeve, L. (1998):** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334, 297–314
- Hermey, G., Sjøgaard, S. S., Petersen, C. M., Nykjaer, A. und Gliemann, J. (2006):** Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J*, 395, Nr. 2, 285–293
- Hikita, A., Tanaka, N., Yamane, S., Ikeda, Y., Furukawa, H., Tohma, S., Suzuki, R., Tanaka, S., Mitomi, H. und Fukui, N. (2009):** Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Cell Biol*, 87, Nr. 4, 581–593
- Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. und Tanaka, S. (2006):** Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*, 281, Nr. 48, 36846–36855
- Hirano, T., Matsuda, T. und Nakajima, K. (1994):** Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells*, 12, Nr. 3, 262–277
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K. und Iwamatsu, A. (1986):** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, Nr. 6092, 73–76
- Hirota, K., Martin, B. und Veldhoen, M. (2010):** Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol*, 32, Nr. 1, 3–16
- Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T. und Kishimoto, T. (1992):** Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol*, 148, Nr. 7, 2175–2180
- Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M., Zhong, C., Wade, C., Chandran, P., Zhu, C., Carroll, W., Perez-Medrano, A., Iwakura, Y. und Jarvis, M. F. (2009):** The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1alpha knockout mice. *Behav Brain Res*, 204, Nr. 1, 77–81
- Hooper, N. M., Karran, E. H. und Turner, A. J. (1997):** Membrane protein secretases. *Biochem J*, 321, 265–279

- Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y. und Blobel, C. P. (2007):** Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol*, 179, Nr. 5, 2686–2689
- Horiuchi, K., Morioka, H., Takaishi, H., Akiyama, H., Blobel, C. P. und Toyama, Y. (2009):** Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TNF-alpha converting enzyme. *J Immunol*, 182, Nr. 12, 7408–7414
- Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M. und Yamamoto, N. (1994):** 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, Nr. 8, 1945–1948
- Hou, S.-W., Zhi, H.-Y., Pohl, N., Loesch, M., Qi, X.-M., Li, R.-S., Basir, Z. und Chen, G. (2010):** PTPH1 dephosphorylates and cooperates with p38gamma MAPK to increase ras oncogenesis through PDZ-mediated interaction. *Cancer Res*, 70, Nr. 7, 2901–2910
- Humphreys, B. D. und Dubyak, G. R. (1998):** Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol*, 64, Nr. 2, 265–273
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.-J., Rose-John, S. und Ludwig, A. (2003):** The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102, Nr. 4, 1186–1195
- Hundhausen, C., Schulte, A., Schulz, B., Andrzejewski, M. G., Schwarz, N., von Hundelshausen, P., Winter, U., Paliga, K., Reiss, K., Saftig, P., Weber, C. und Ludwig, A. (2007):** Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol*, 178, Nr. 12, 8064–8072
- Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P. und Burstein, S. A. (1989):** Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, Nr. 15, 5953–5957
- Jacobsen, K. T., Adlerz, L., Multhaup, G. und Iverfeldt, K. (2010):** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-beta precursor protein (APP) and

Literaturverzeichnis

- APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases. *J Biol Chem*, 285, Nr. 14, 10223–10231
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J.-P., Lackmann, M. und Nikolov, D. B. (2005):** Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, 123, Nr. 2, 291–304
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1998):** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, 23, Nr. 10, 403–405
- Jia, H. P., Look, D. C., Tan, P., Shi, L., Hickey, M., Gakhar, L., Chappell, M. C., Wohlford-Lenane, C. und McCray, P. B. (2009):** Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297, Nr. 1, L84–L96
- Jiang, J., Wu, S., Wang, W., Chen, S., Peng, J., Zhang, X. und Wu, Q. (2011):** Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin. *J Biol Chem*, Epub ahead of print
- Jones, S. A., Horiuchi, S., Novick, D., Yamamoto, N. und Fuller, G. M. (1998):** Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells. *Eur J Immunol*, 28, Nr. 11, 3514–3522
- Jostock, T., Müllberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F. und Rose-John, S. (2001):** Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*, 268, Nr. 1, 160–167
- Kaczur, V., Puskas, L. G., Nagy, Z. U., Miled, N., Rebai, A., Juhasz, F., Kupihar, Z., Zvara, A., Hackler, L. und Farid, N. R. (2007):** Cleavage of the human thyrotropin receptor by ADAM10 is regulated by thyrotropin. *J Mol Recognit*, 20, Nr. 5, 392–404
- Kalus, I., Bormann, U., Mzoughi, M., Schachner, M. und Kleene, R. (2006):** Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem*, 98, Nr. 1, 78–88
- Kawaguchi, N., Horiuchi, K., Becherer, J. D., Toyama, Y., Besmer, P. und Blobel, C. P. (2007):** Different ADAMs have distinct influences on Kit ligand processing: phorbol-ester-stimulated ectodomain shedding of Kitl1 by ADAM17 is reduced by ADAM19. *J Cell Sci*, 120, Nr. 6, 943–952

- Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U. M. und Klingmüller, U. (2002):** Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther*, 9, Nr. 8, 477–487
- Kim, J., Lilliehook, C., Dudak, A., Prox, J., Saftig, P., Federoff, H. J. und Lim, S. T. (2010):** Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem*, 285, Nr. 30, 22919–22926
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. und Taga, T. (1995):** Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, Nr. 4, 1243–1254
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M. und Hirano, T. (1999):** STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, 189, Nr. 1, 63–73
- Koenen, R. R., Pruessmeyer, J., Soehnlein, O., Fraemohs, L., Zerneck, A., Schwarz, N., Reiss, K., Sarabi, A., Lindbom, L., Hackeng, T. M., Weber, C. und Ludwig, A. (2009):** Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*, 113, Nr. 19, 4799–4809
- Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O. R., Ister, D., Pennington, C. J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.-W., Antolovic, D., Brew, K., Nagase, H., Stangl, M., Weyhern, C. W. H. von, Brücher, B. L. D. M., Brand, K., Coussens, L. M., Edwards, D. R. und Krüger, A. (2007):** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res*, 67, Nr. 18, 8615–8623
- Kraft, A. S. und Anderson, W. B. (1983):** Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, 301, Nr. 5901, 621–623
- Kumar, S., Boehm, J. und Lee, J. C. (2003):** p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2, Nr. 9, 717–726
- Kummer, M. P., Maruyama, H., Huelsmann, C., Baches, S., Weggen, S. und Koo, E. H. (2009):** Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for gamma-secretase. *J Biol Chem*, 284, Nr. 4, 2296–2306
- Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., Bissette, W., Wicks, J. R., Audoly, L. und Gabel, C. A. (2002):** Absence of the P2X7

Literaturverzeichnis

- receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*, 168, Nr. 12, 6436–6445
- Lambert, D. W., Yarski, M., Warner, F. J., Thornhill, P., Parkin, E. T., Smith, A. I., Hooper, N. M. und Turner, A. J. (2005):** Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem*, 280, Nr. 34, 30113–30119
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. und Harden, T. K. (2000):** Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem*, 275, Nr. 40, 31061–31068
- Le Gall, S. M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P. und Blobel, C. P. (2009):** ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell*, 20, Nr. 6, 1785–1794
- Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D. A., Niu, X.-D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D. und Blobel, C. P. (2010):** ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci*, 123, Nr. 22, 3913–3922
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., Kortylewski, M., Horne, D., Somlo, G., Forman, S., Jove, R. und Yu, H. (2010):** STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med*, 16, Nr. 12, 1421–1428
- Leksa, V., Loewe, R., Binder, B., Schiller, H. B., Eckerstorfer, P., Forster, F., Cardona, A. S., Ondrovicová, G., Kutejová, E., Steinhuber, E., Breuss, J., Drach, J., Petzelbauer, P., Binder, B. R. und Stockinger, H. (2011):** Soluble M6P/IGF2R Released by TACE Controls Angiogenesis via Blocking Plasminogen Activation. *Circ Res*, Epub ahead of print
- Lewandrowski, U., Wortelkamp, S., Lohrig, K., Zahedi, R. P., Wolters, D. A., Walter, U. und Sickmann, A. (2009):** Platelet membrane proteomics: a novel repository for functional research. *Blood*, 114, Nr. 1, 10–19
- Li, N., Wang, Y., Forbes, K., Vignali, K. M., Heale, B. S., Saftig, P., Hartmann, D., Black, R. A., Rossi, J. J., Blobel, C. P., Dempsey, P. J., Workman, C. J. und Vi-**

Literaturverzeichnis

- gnali, D. A. A. (2007):** Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *EMBO J*, 26, Nr. 2, 494–504
- Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A. und Walcheck, B. (2006):** ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood*, 108, Nr. 7, 2275–2279
- Lingwood, D. und Simons, K. (2010):** Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327, Nr. 5961, 46–50
- Liu, P. C. C., Liu, X., Li, Y., Covington, M., Wynn, R., Huber, R., Hillman, M., Yang, G., Ellis, D., Marando, C., Katiyar, K., Bradley, J., Abremski, K., Stow, M., Rupa, M., Zhuo, J., Li, Y.-L., Lin, Q., Burns, D., Xu, M., Zhang, C., Qian, D.-Q., He, C., Sharief, V., Weng, L., Agrios, C., Shi, E., Metcalf, B., Newton, R., Friedman, S., Yao, W., Scherle, P., Hollis, G. und Burn, T. C. (2006):** Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 5, Nr. 6, 657–664
- Liu, Q., Zhang, J., Tran, H., Verbeek, M. M., Reiss, K., Estus, S. und Bu, G. (2009):** LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener*, 4, 17–24
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M. H., Broadway, N., Andrews, R. C., Bickett, D. M., Leesnitzer, M. A. und Becherer, J. D. (2005):** Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*, 8, Nr. 2, 161–171
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y. und Blobel, C. P. (1999):** Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*, 274, Nr. 19, 13613–13618
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P. A., Munz, M. und Gires, O. (2009):** Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*, 11, Nr. 2, 162–171
- Malapeira, J., Esselens, C., Bech-Serra, J. J., Canals, F. und Arribas, J. (2010):** ADAM17 (TACE) regulates TGF β signaling through the cleavage of vasorin. *Oncogene*, Epub ahead of print

- Marcello, E., Gardoni, F., Luca, M. D. und Pérez-Otaño, I. (2010):** An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 285, Nr. 14, 10376–10384
- Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A. und Luca, M. D. (2007):** Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci*, 27, Nr. 7, 1682–1691
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., Strooper, B. de, Hartmann, D. und Saftig, P. (2005a):** ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, Nr. 26, 9182–9187
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P. und Reiss, K. (2005b):** L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*, 25, Nr. 20, 9040–9053
- Martens, A. S., Bode, J. G., Heinrich, P. C. und Graeve, L. (2000):** The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Cell Sci*, 113, 3593–3602
- Martin, L., Fluhrer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P. und Haass, C. (2008):** Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem*, 283, Nr. 3, 1644–1652
- Mathews, J. A., Gibb, D. R., Chen, B.-H., Scherle, P. und Conrad, D. H. (2010):** CD23 Sheddase A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is also required for CD23 sorting into B cell-derived exosomes. *J Biol Chem*, 285, Nr. 48, 37531–37541
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J. und Rose-John, S. (2003):** Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem*, 278, Nr. 40, 38829–38839
- Mendelson, K., Swendeman, S., Saftig, P. und Blobel, C. P. (2010):** Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *J Biol Chem*, 285, Nr. 32, 25024–25032

Literaturverzeichnis

- Merlos-Suárez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J. und Arribas, J. (2001):** Metalloprotease-dependent protransforming growth factor- α ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem*, 276, Nr. 51, 48510–48517
- Millichip, M. I., Dallas, D. J., Wu, E., Dale, S. und McKie, N. (1998):** The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 245, Nr. 2, 594–598
- Mitsuoka, H., Kume, N., Hayashida, K., Inui-Hayashiada, A., Aramaki, Y., Toyohara, M., Jinnai, T., Nishi, E. und Kita, T. (2009):** Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1). *Atherosclerosis*, 202, Nr. 1, 176–182
- Montero, J. C., Yuste, L., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A. und Pandiella, A. (2000):** Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *Mol Cell Neurosci*, 16, Nr. 5, 631–648
- Montero-Julian, F. A. (2001):** The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47, Nr. 4, 583–597
- Moon, H., Na, H.-Y., Chong, K. H. und Kim, T. J. (2006):** P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett*, 102, Nr. 1, 98–105
- Morrison, V. L., Barr, T. A., Brown, S. und Gray, D. (2010):** TLR-mediated loss of CD62L focuses B cell traffic to the spleen during Salmonella typhimurium infection. *J Immunol*, 185, Nr. 5, 2737–2746
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L. und Becherer, J. D. (1997):** Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 385, Nr. 6618, 733–736
- Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J. W., Palmisano, R. und Zhou, P. (2007):** The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem*, 282, Nr. 49, 35712–35721

- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. und Kishimoto, T. (1988):** The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med*, 167, Nr. 2, 332–344
- Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M. und Sato, C. (2011):** Low Cholesterol Triggers Membrane Microdomain-dependent CD44 Shedding and Suppresses Tumor Cell Migration. *J Biol Chem*, 286, Nr. 3, 1999–2007
- Müllberg, J., Dittrich, E., Graeve, L., Gerhartz, C., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1993a):** Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett*, 332, Nr. 1-2, 174–178
- Müllberg, J., Oberthür, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1994):** The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol*, 152, Nr. 10, 4958–4968
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1993b):** The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*, 23, Nr. 2, 473–480
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1992):** Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 189, Nr. 2, 794–800
- Müller-Newen, G., Köhne, C., Keul, R., Hemmann, U., Müller-Esterl, W., Wijdenes, J., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H. und Heinrich, P. C. (1996):** Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem*, 236, Nr. 3, 837–842
- Müller-Newen, G., Küster, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A., Graeve, L., Wijdenes, J. und Heinrich, P. C. (1998):** Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol*, 161, Nr. 11, 6347–6355
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., Strooper, B. D., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M. und Saya, H. (2004):** Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol*, 165, Nr. 6, 893–902
- Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G. D., Taga, T. und Kishimoto, T. (1993):** Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a

Literaturverzeichnis

- potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*, 82, Nr. 4, 1120–1126
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S. C. und Brosnan, C. F. (2005):** The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia*, 49, Nr. 2, 245–258
- Nebreda, A. R. und Porras, A. (2000):** p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*, 25, Nr. 6, 257–260
- Nicola, N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M. und Johnson, G. R. (1983):** Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem*, 258, Nr. 14, 9017–9023
- North, R. A. (2002):** Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82, Nr. 4, 1013–1067
- Oberg, H.-H., Wesch, D., Grüssel, S., Rose-John, S. und Kabelitz, D. (2006):** Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4⁺CD25⁻ and CD25^{high} regulatory T cells. *Int Immunol*, 18, Nr. 4, 555–563
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1988):** IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol*, 141, Nr. 5, 1543–1549
- Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C. C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T. und Yanagihara, T. (1998):** IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol*, 10, Nr. 5, 703–708
- Oswald, F., Täuber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S. und Schmid, R. M. (2001):** p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol*, 21, Nr. 22, 7761–7774
- Pan, D. und Rubin, G. M. (1997):** Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*, 90, Nr. 2, 271–280
- Parr-Sturgess, C. A., Rushton, D. J. und Parkin, E. T. (2010):** Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event. *Biochem J*, 432, Nr. 2, 283–294
- Pearson, W. R. und Lipman, D. J. (1988):** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, Nr. 8, 2444–2448

- Peiretti, F., Deprez-Beauclair, P., Bonardo, B., Aubert, H., Juhan-Vague, I. und Nalbone, G. (2003):** Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE. *J Cell Sci*, 116, Nr. Pt 10, 1949–1957
- Peng, M., Guo, S., Yin, N., Xue, J., Shen, L., Zhao, Q. und Zhang, W. (2010):** Ectodomain shedding of Fc α receptor is mediated by ADAM10 and ADAM17. *Immunology*, 130, Nr. 1, 83–91
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J. und Black, R. A. (1998):** An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282, Nr. 5392, 1281–1284
- Peters, M., Müller, A. M. und Rose-John, S. (1998):** Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood*, 92, Nr. 10, 3495–3504
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F. und Fahrenholz, F. (2004):** A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 113, Nr. 10, 1456–1464
- Potucek, Y. D., Crain, J. M. und Watters, J. J. (2006):** Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochem Int*, 49, Nr. 2, 204–214
- Pruessmeyer, J., Martin, C., Hess, F. M., Schwarz, N., Schmidt, S., Kogel, T., Hoettecke, N., Schmidt, B., Sechi, A., Uhlig, S. und Ludwig, A. (2010):** A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem*, 285, Nr. 1, 555–564
- Qu, D., Wang, Y., Esmon, N. L. und Esmon, C. T. (2007):** Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost*, 5, Nr. 2, 395–402
- Rabie, T., Strehl, A., Ludwig, A. und Nieswandt, B. (2005):** Evidence for a role of ADAM17 (TACE) in the regulation of platelet glycoprotein V. *J Biol Chem*, 280, Nr. 15, 14462–14468
- Rauci, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S. M., Monti, L., Bierhaus, A., Reiss, K., Saftig, P. und Bianchi, M. E. (2008):** A soluble form of the receptor for ad-

- vanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*, 22, Nr. 10, 3716–3727
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J. und Black, R. A. (2000):** Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, 275, Nr. 19, 14608–14614
- Reiss, K., Maretzky, T., Haas, I. G., Schulte, M., Ludwig, A., Frank, M. und Saftig, P. (2006):** Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 281, Nr. 31, 21735–21744
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. und Saftig, P. (2005):** ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J*, 24, Nr. 4, 742–752
- Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J. und Corfas, G. (2000):** Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem*, 275, Nr. 14, 10379–10387
- Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P. und Blobel, C. P. (1999):** Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*, 274, Nr. 6, 3531–3540
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T. und Rubin, G. M. (1996):** KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science*, 273, Nr. 5279, 1227–1231
- Rose, A. A. N., Annis, M. G., Dong, Z., Pepin, F., Hallett, M., Park, M. und Siegel, P. M. (2010):** ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS One*, 5, Nr. 8, 12093
- Rose-John, S., Ehlers, M., Grötzinger, J. und Müllberg, J. (1995):** The soluble interleukin-6 receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 762, 207–20
- Rose-John, S. und Heinrich, P. C. (1994):** Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*, 300, 281–290
- Rose-John, S., Hipp, E., Lenz, D., Legrés, L. G., Korr, H., Hirano, T., Kishimoto, T. und Heinrich, P. C. (1991):** Structural and functional studies on the human interleukin-6 receptor. Binding, cross-linking, internalization, and degradation of interleukin-

Literaturverzeichnis

- 6 by fibroblasts transfected with human interleukin-6-receptor cDNA. *J Biol Chem*, 266, Nr. 6, 3841–3846
- Rose-John, S. und Neurath, M. F. (2004):** IL-6 trans-signaling: the heat is on. *Immunity*, 20, Nr. 1, 2–4
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G. und Jones, S. A. (2006):** Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*, 80, Nr. 2, 227–236
- Rovida, E., Paccagnini, A., Rosso, M. D., Peschon, J. und Sbarba, P. D. (2001):** TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol*, 166, Nr. 3, 1583–1589
- Ruhe, J. E., Streit, S., Hart, S. und Ullrich, A. (2006):** EGFR signaling leads to down-regulation of PTP-LAR via TACE-mediated proteolytic processing. *Cell Signal*, 18, Nr. 9, 1515–1527
- Sabio, G., Arthur, J. S. C., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N. A. und Cuenda, A. (2005):** p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J*, 24, Nr. 6, 1134–1145
- Saccani, S., Pantano, S. und Natoli, G. (2002):** p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol*, 3, Nr. 1, 69–75
- Sahin, U. und Blobel, C. P. (2007):** Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS Lett*, 581, Nr. 1, 41–44
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P. und Blobel, C. P. (2004):** Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*, 164, Nr. 5, 769–779
- Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S. und Chen, Y. (1998):** IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*, 161, Nr. 12, 6480–6486
- Sayed, M., Kim, S. O., Salh, B. S., Issinger, O. G. und Pelech, S. L. (2000):** Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 275, Nr. 22, 16569–16573

- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. und Rose-John, S. (2011):** The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, Epub ahead of print
- Scheller, J. und Rose-John, S. (2006):** Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*, 195, Nr. 4, 173–183
- Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M. L., Becherer, J. D., Comoglio, P. M., Boccaccio, C. und Krüger, A. (2010):** A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem*, 285, Nr. 34, 26335–26340
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F. und Koch-Nolte, F. (2009):** NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol*, 182, Nr. 5, 2898–2908
- Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K.-J., Pachta, M., Rose-John, S. und Grötzinger, J. (2005):** Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. *Protein Sci*, 14, Nr. 3, 783–790
- Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Maretzky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., Strooper, B. de, Janssen, O. und Saftig, P. (2007):** ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ*, 14, Nr. 5, 1040–1049
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C. P., Saftig, P. und Reiss, K. (2008):** ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*, 102, Nr. 10, 1192–1201
- Schumann, R. R., Kirschning, C. J., Unbehauen, A., Aberle, H. P., Knope, H. P., Lamping, N., Ulevitch, R. J. und Herrmann, F. (1996):** The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol*, 16, Nr. 7, 3490–3503
- Seals, D. F. und Courtneidge, S. A. (2003):** The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 17, Nr. 1, 7–30
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. und Yoneda, Y. (1997):** Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-

Literaturverzeichnis

- targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J*, 16, Nr. 23, 7067–7077
- Sengstake, S., Boneberg, E.-M. und Illges, H. (2006):** CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. *Int Immunol*, 18, Nr. 7, 1171–1178
- Sikora, A., Liu, J., Brosnan, C., Buell, G., Chessel, I. und Bloom, B. R. (1999):** Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. *J Immunol*, 163, Nr. 2, 558–561
- Sim, J. A., Young, M. T., Sung, H.-Y., North, R. A. und Surprenant, A. (2004):** Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci*, 24, Nr. 28, 6307–6314
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A. und Logeat, F. (2003):** The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, Nr. 13, 7638–7643
- Skaper, S. D., Debetto, P. und Giusti, P. (2010):** The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J*, 24, Nr. 2, 337–345
- Sluyter, R. und Wiley, J. S. (2002):** Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol*, 14, Nr. 12, 1415–1421
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J. und Gabel, C. A. (2001):** Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *J Biol Chem*, 276, Nr. 1, 125–132
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. H. und Murphy, G. (2005):** ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci*, 118, Nr. Pt 11, 2371–2380
- Sperlágh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K. und Illes, P. (2006):** P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 78, Nr. 6, 327–346
- Sprecher, C. A., Grant, F. J., Baumgartner, J. W., Presnell, S. R., Schrader, S. K., Yamagiwa, T., Whitmore, T. E., O'Hara, P. J. und Foster, D. F. (1998):** Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 246, Nr. 1, 82–90
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. und Hilton, D. J. (1997):** A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, Nr. 6636, 917–921

- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M. P., Runz, S., Naour, F. L., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E. und Altevogt, P. (2006):** A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J*, 393, Nr. 3, 609–618
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., McKay, D. B. und Bode, W. (1995):** The metzincins–topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*, 4, Nr. 5, 823–840
- Sunnarborg, S. W., Hinkle, C. L., Stevenson, M., Russell, W. E., Raska, C. S., Peschon, J. J., Castner, B. J., Gerhart, M. J., Paxton, R. J., Black, R. A. und Lee, D. C. (2002):** Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*, 277, Nr. 15, 12838–12845
- Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Deutsch, U., Scherle, P., Hooper, A., Raffi, S. und Blobel, C. P. (2008):** VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ Res*, 103, Nr. 9, 916–918
- Tanaka, M., Kishimura, M., Ozaki, S., Osakada, F., Hashimoto, H., Okubo, M., Murakami, M. und Nakao, K. (2000):** Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 106, Nr. 1, 137–144
- Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba, F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N. und Higashiyama, S. (2004):** ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *J Biol Chem*, 279, Nr. 40, 41950–41959
- Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G. und Peiretti, F. (2006):** The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res*, 312, Nr. 20, 3969–3980
- Thathiah, A., Blobel, C. P. und Carson, D. D. (2003):** Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem*, 278, Nr. 5, 3386–3394
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., Annaert, W., Saftig, P., Hartmann, D. und Strooper, B. D. (2009):** ADAM10, the rate-limiting protease of regulated

Literaturverzeichnis

- intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem*, 284, Nr. 17, 11738–11747
- Tsakadze, N. L., Sithu, S. D., Sen, U., English, W. R., Murphy, G. und D'Souza, S. E. (2006):** Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem*, 281, Nr. 6, 3157–3164
- Ventura, J. J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M. und Nebreda, A. R. (2007):** p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 39, Nr. 6, 750–758
- Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., de Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. und Checler, F. (2001):** The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, 276, Nr. 41, 37743–37746
- Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M. und Rose-John, S. (1999):** A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding. *Eur J Biochem*, 263, Nr. 2, 438–446
- Vollmer, P., Walev, I., Rose-John, S. und Bhakdi, S. (1996):** Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infect Immun*, 64, Nr. 9, 3646–3651
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G. und Steinle, A. (2008):** Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*, 68, Nr. 15, 6368–6376
- Walker, F., Zhang, H.-H., Matthews, V., Weinstock, J., Nice, E. C., Ernst, M., Rose-John, S. und Burgess, A. W. (2008):** IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. *Blood*, 111, Nr. 8, 3978–3985
- Wang, X., He, K., Gerhart, M., Huang, Y., Jiang, J., Paxton, R. J., Yang, S., Lu, C., Menon, R. K., Black, R. A., Baumann, G. und Frank, S. J. (2002):** Metalloprotease-mediated GH receptor proteolysis and GHBP shedding. Determination of extracellular domain stem region cleavage site. *J Biol Chem*, 277, Nr. 52, 50510–50519

- Wang, Y., Zhang, A. C., Ni, Z., Herrera, A. und Walcheck, B. (2010):** ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. *J Immunol*, 184, Nr. 8, 4447–4454
- Wang, Y., Kim, K.-A., Kim, J.-H. und Sul, H. S. (2006):** Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr*, 136, Nr. 12, 2953–2956
- Wegenka, U. M., Buschmann, J., Lütticken, C., Heinrich, P. C. und Horn, F. (1993):** Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*, 13, Nr. 1, 276–288
- Weskamp, G., Ford, J. W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A. J. P., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., Sehara-Fujisawa, A., Black, R. A., Ludwig, A., Becherer, J. D., Conrad, D. H. und Blobel, C. P. (2006):** ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol*, 7, Nr. 12, 1293–1298
- Weskamp, G., Schlöndorff, J., Lum, L., Becherer, J. D., Kim, T.-W., Saftig, P., Hartmann, D., Murphy, G. und Blobel, C. P. (2004):** Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem*, 279, Nr. 6, 4241–4249
- Wiesinger, M. Y., Haan, S., Wüller, S., Kauffmann, M.-E., Recker, T., Küster, A., Heinrich, P. C. und Müller-Newen, G. (2009):** Development of an IL-6 inhibitor based on the functional analysis of murine IL-6Ralpha. *Chem Biol*, 16, Nr. 7, 783–794
- Wild-Bode, C., Fellerer, K., Kugler, J., Haass, C. und Capell, A. (2006):** A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J Biol Chem*, 281, Nr. 33, 23824–23829
- Willems, S. H., Tape, C. J., Stanley, P. L., Taylor, N. A., Mills, I. G., Neal, D. E., McCafferty, J. und Murphy, G. (2010):** Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J*, 428, Nr. 3, 439–450
- Witting, A., Chen, L., Cudaback, E., Straiker, A., Walter, L., Rickman, B., Möller, T., Brosnan, C. und Stella, N. (2006):** Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, Nr. 16, 6362–6367
- Xu, P. und Derynck, R. (2010):** Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell*, 37, Nr. 4, 551–566

Literaturverzeichnis

- Yan, Y., Shirakabe, K. und Werb, Z. (2002):** The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*, 158, Nr. 2, 221–226
- Yasukawa, K., Futatsugi, K., Saito, T., Yawata, H., Narazaki, M., Suzuki, H., Taga, T. und Kishimoto, T. (1992):** Association of recombinant soluble IL-6-signal transducer, gp130, with a complex of IL 6 and soluble IL-6 receptor, and establishment of an ELISA for soluble gp130. *Immunol Lett*, 31, Nr. 2, 123–130
- Yoshimura, A., Naka, T. und Kubo, M. (2007):** SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 7, Nr. 6, 454–465
- Young, J., Yu, X., Wolslegel, K., Nguyen, A., Kung, C., Chiang, E., Kolumam, G., Wei, N., Wong, W. L., DeForge, L., Townsend, M. J. und Grogan, J. L. (2010):** Lymphotoxin- α heterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 51, Nr. 1, 78–86
- Yu, M., Lam, J., Rada, B., Leto, T. L. und Levine, S. J. (2011):** Double-stranded RNA induces shedding of the 34-kDa soluble TNFR1 from human airway epithelial cells via TLR3-TRIF-RIP1-dependent signaling: roles for dual oxidase 2- and caspase-dependent pathways. *J Immunol*, 186, Nr. 2, 1180–1188
- Zatovicova, M., Sedlakova, O., Svastova, E., Ohradanova, A., Ciampor, F., Arribas, J., Pastorek, J. und Pastorekova, S. (2005):** Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer*, 93, Nr. 11, 1267–1276
- Zhang, L., Bukulin, M., Kojro, E., Roth, A., Metz, V. V., Fahrenholz, F., Nawroth, P. P., Bierhaus, A. und Postina, R. (2008):** Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem*, 283, Nr. 51, 35507–35516
- Zheng, Y., Schlondorff, J. und Blobel, C. P. (2002):** Evidence for regulation of the tumor necrosis factor α -convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem*, 277, Nr. 45, 42463–42470
- Zhong, Z., Wen, Z. und Darnell, J. E. (1994):** Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264, Nr. 5155, 95–98
- Zhu, L., Bergmeier, W., Wu, J., Jiang, H., Stalker, T. J., Cieslak, M., Fan, R., Boumsell, L., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Tamagnone, L., Wagner, D. D., Milla, M. E. und Brass, L. F. (2007):** Regulated surface expression and shedding support a dual

Literaturverzeichnis

role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, Nr. 5, 1621–1626

7 Anhang

7.1 Alignment von humanem und murinem ADAM17

```
human MRQSLFLTSVVPFVLAPRPPDDPGFGPHQRLEKLDLSLSDYDILSLSNI 50
murin MRRRLLILTTLVPFVLAPRPPEEAGSGSHPRLEKLDLSLSDYDILSLANI 50
** ** * ***** * * * ***** **

human QQHSVRKRDLQTSTHVELLLTFSALKRHFKLYLTSSTERFSQNFKVVVVD 100
murin QQHSIRKRDLQSATHLELLTFSALKRHFKLYLTSSTERFSQNLRVVVVD 100
**** ***** ** ***** *****

human GKNESEYTVKWQDFFTGHVVGEPDSRVLAHIRDDVVIIRINTDGAEYNI 150
murin GKEESEYSVKWQDFFSGHVVGEPDSRVLAHIGDDVTVRINTDGAEYNI 150
** **** ***** ***** ***** *****

human PLWRFVNDTKDKRMLVYKSEDIKNVSRQLQSPKVCGYLKVDNEELLPKGLV 200
murin PLWRFVNDTKDKRMLVYKSEDIKDFSRQLQSPKVCGYLNADSEELLPKGLI 200
***** ***** * *****

human DREPPEELVHRVKRRADPDPMKNTCKLLVVADHRFYRYMGRGEESTTTNY 250
murin DREPSEEFVRRVKRRAEPNPLKNTCKLLVVADHRFYKYMGRGEESTTTNY 250
**** * * ***** * * ***** *****

human LIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIEQIRILKSPQEVKPGKHYNM 300
murin LIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGVQIEQIRILKSPQEVKPGERHFNM 300
***** ***** * **

human AKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLAHLFYQDFDMGTLGL 350
murin AKSFPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLAHLFYQDFDMGTLGL 350
*** *****

human AYVGSPRANSHGGVCPKAYYSPVGKKNIYLNGLTSTKNYGKTILTKEAD 400
murin AYVGSPRANSHGGVCPKAYYNPTVKKNIYLNGLTSTKNYGKTILTKEAD 400
***** * *****
```

7 Anhang

human	LVTTHELGHNFGAEHDPDGLAECAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENKMF	450
murin	LVTTHELGHNFGAEHDPDGLAECAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENKMF	450

human	SNCSKQSIYKTIESKAQECFQERSNKVCGNSRVDEGEECDPGIMYLNNDT	500
murin	SNCSKQSIYKTIESKAQECFQERSNKVCGNSRVDEGEECDPGIMYLNNDT	500

human	CCNSDCTLKEGVQCSDRNSPCKNCQFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTG	550
murin	CCNSDCTLKPGVQCSDRNSPCKNCQFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTG	550
	***** *****	
human	NSSECPPPNAEDDTVCLDLGKCKDGKCI PFCEREQQLESCACNETDNSC	600
murin	NSSECPPPGAEDDTVCLDLGKCKAGKCI PFCREQELESCACVDTDNSC	600
	***** ***** ** ***** *****	
human	KVCCRDLSGRCPYVDAEQKNLFLRKGKPC TVGFCDMNGKCEKRVQDVIE	650
murin	KVCCRNLSGPCVPYVDAEQKNLFLRKGKPC TVGFCDMNGKCEKRVQDVIE	650
	***** ** *****	
human	RFWDFIDQLSINTFGKFLADNIVGSVLVFSLIFWIPFSILVHCVDKDKLDK	700
murin	RFWDFIDQLSINTFGKFLADNIVGSVLVFSLIFWIPFSILVHCVDKDKLDK	700

human	QYESLSLFHPSNVEMLSMDSASVRIKPF PAPERLQ PAPVIPS	747
murin	QYESLSLFHHSNIEMLSMDSASVRIKPF PAPERLQALQPAAMMP	750
	***** ** ***** ** *	
human	APAAPKLDHQRMDTIQEDPSTDSHMEDEGFEKDPFPNSSTA AKSFEDLTD	797
murin	VSAAPKLDHQRMDTIQEDPSTDSHVDDDGEKDPFPNSSTA AKSFEDLTD	800
	***** * *****	
human	HPVTRSEKAASF KLQRQNRVDSKETEC	824
murin	HPVTRSEKAASF KLQRQSRVDSKETEC	827
	***** *****	

Abbildung 7.1: Alignment von humanem und murinem ADAM17. Das Alignment der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem ADAM17 wurden mit dem Programm ClustalX erstellt (JEANMOUGIN et al., 1998). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) markiert. Die Darstellung des Alignments erfolgte mit `TeXshade` (BEITZ, 2000).

7.2 Schemata der Klonierung der IL-6R Chimären

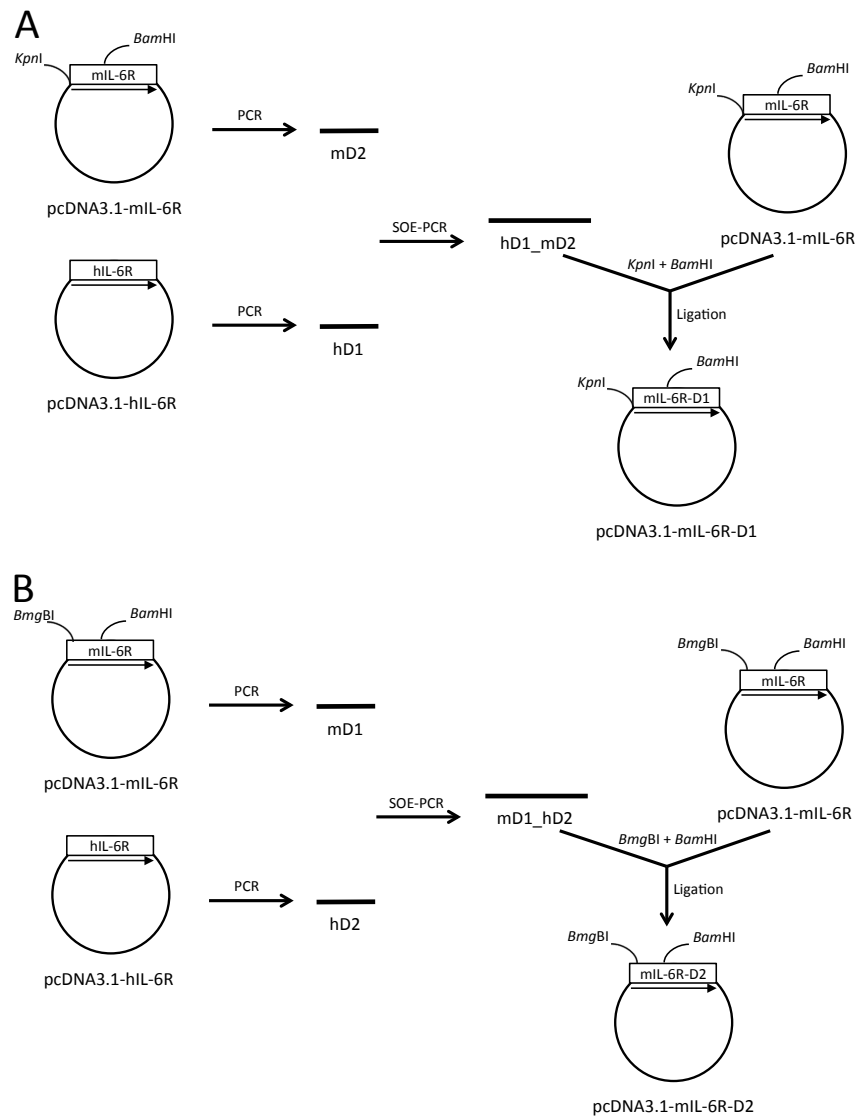


Abbildung 7.2: Schema der Klonierung der Chimären (A) D1 und (B) D2. Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.9.

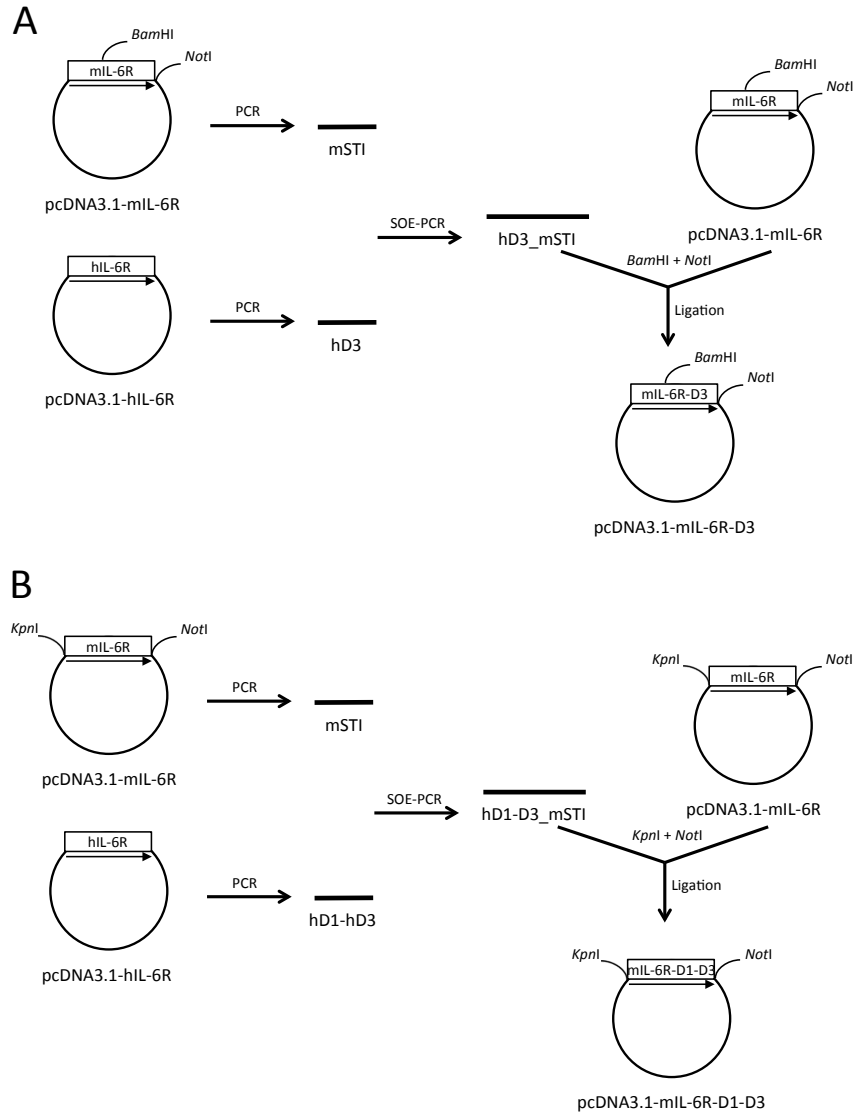


Abbildung 7.3: Schema der Klonierung der Chimären (A) D3 und (B) D1-D3. Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.9.

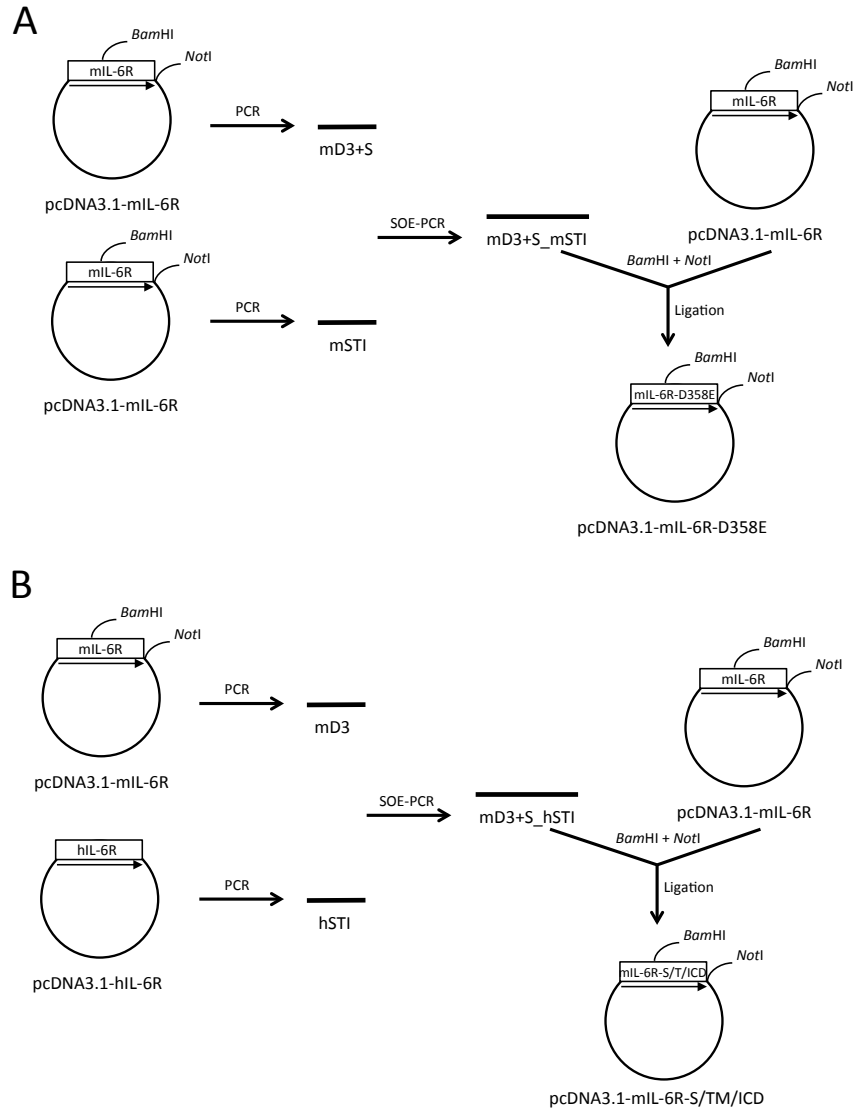


Abbildung 7.4: Schema der Klonierung der Chimären (A) D358E und (B) S/TM/ICD. Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.9.

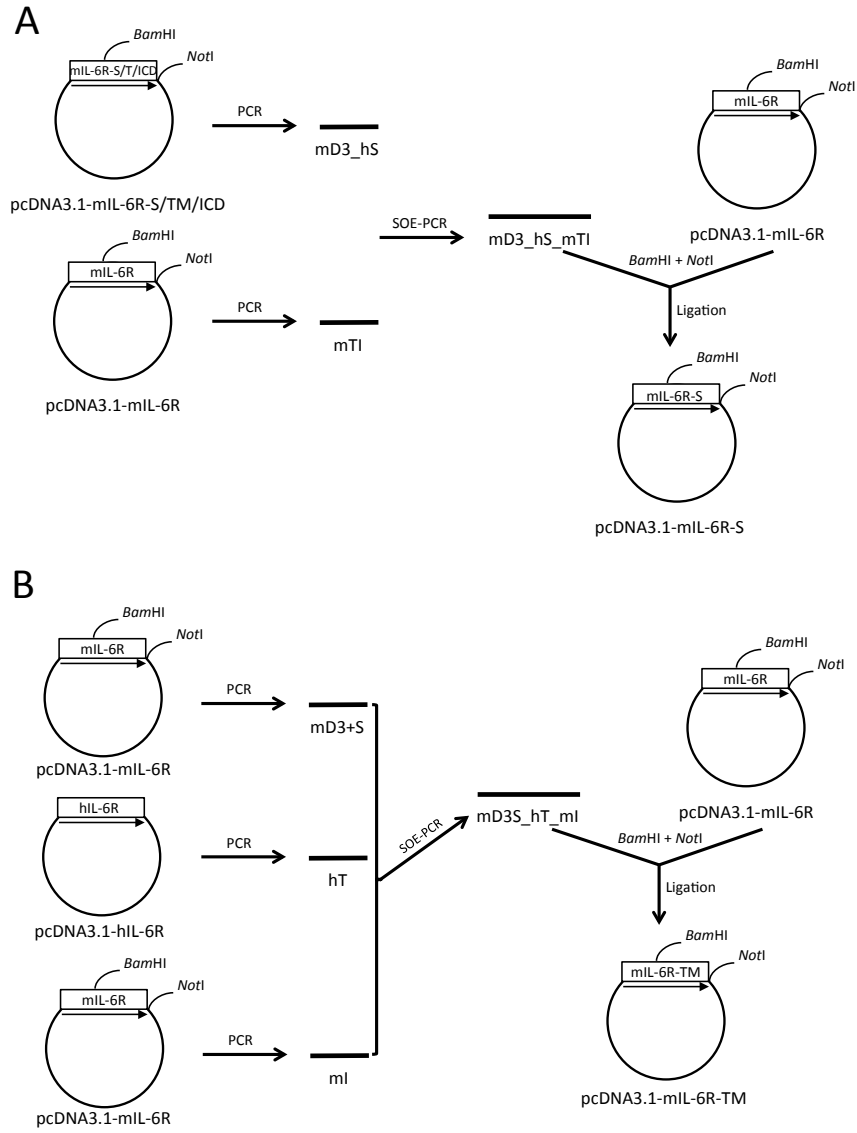


Abbildung 7.5: Schema der Klonierung der Chimären (A) S und (B) TM. Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.9.

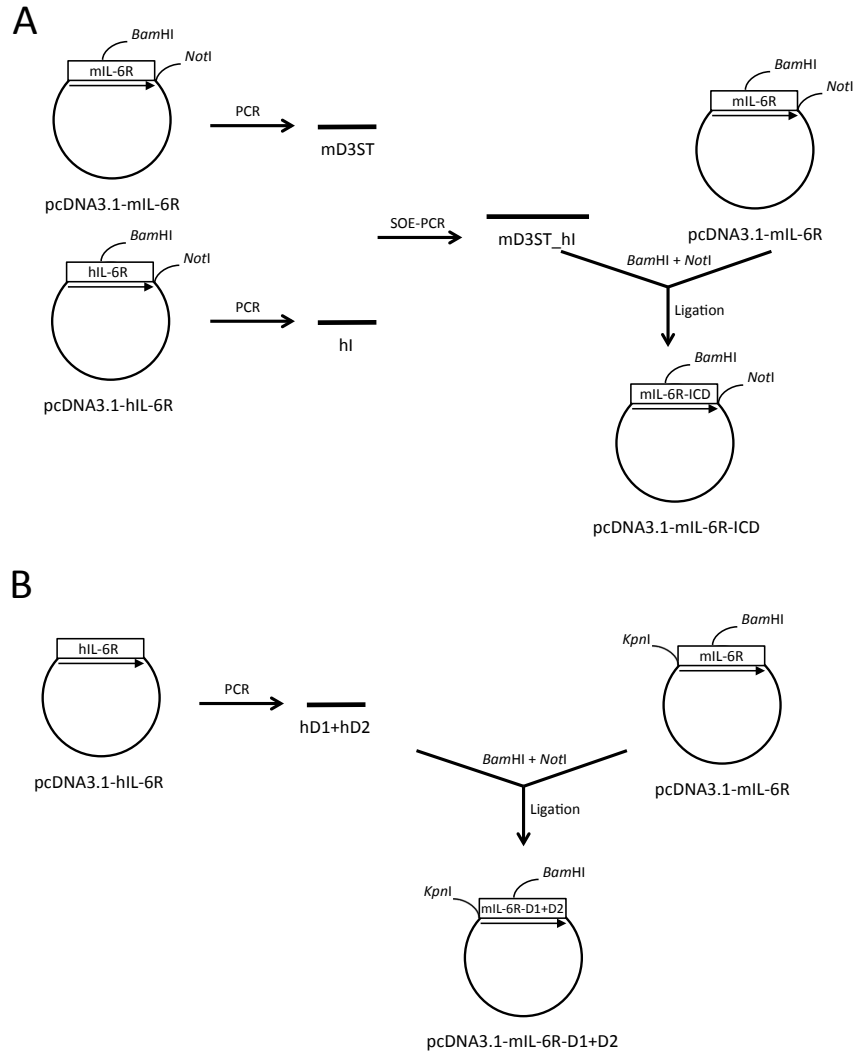


Abbildung 7.6: Schema der Klonierung der Chimären (A) ICD und (B) D1+D2. Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.9.

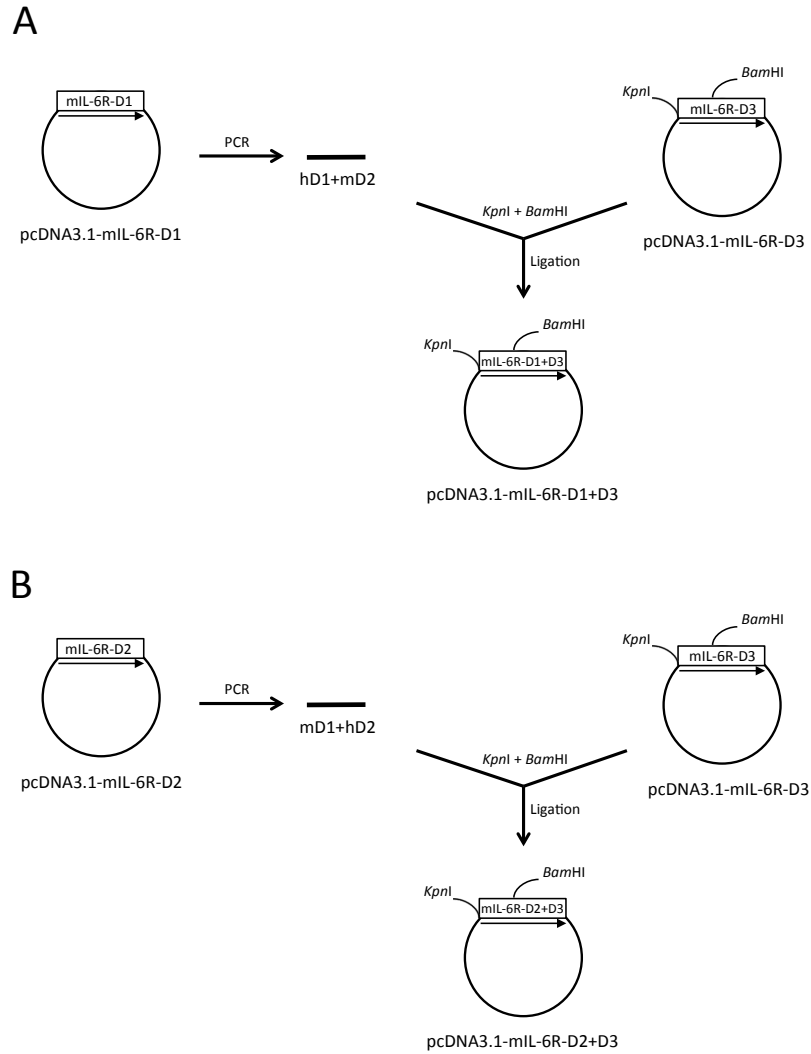


Abbildung 7.7: Schema der Klonierung der Chimären (A) D1+D3 und (B) D2+D3. Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 3.9.

Tabelle 7.1: Verwendete Primer und Restriktionsendonukleasen für die Konstruktion der Chimären.

Chimäre	PCR 1 Primer (Plasmid)	PCR 2 Primer (Plasmid)	SOE-PCR Primer	Restriktion
mIL-6R (D358E)	V5-1 + V6-2 (mIL-6R)	V6-3 + V3-4 (mIL-6R)	V5-1 + V3-4	<i>Bam</i> HI + <i>Nof</i> I
mIL-6R (D1)	V1-1 + V1-2 (hIL-6R)	V1-3 + V1-4 (mIL-6R)	V1-1 + V1-4	<i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI
mIL-6R (D2)	V2-1 + V2-2 (mIL-6R)	V2-3 + V2-4 (hIL-6R)	V2-1 + V2-4	<i>Bmg</i> BI + <i>Bam</i> HI
mIL-6R (D3)	V3-1 + V3-2 (hIL-6R)	V3-3 + V3-4 (mIL-6R)	V3-1 + V3-4	<i>Bam</i> HI + <i>Nof</i> I
mIL-6R (D1-D3)	V1-1 + V3-2 (hIL-6R)	V3-3 + V3-4 (mIL-6R)	V1-1 + V3-4	<i>Kpn</i> I + <i>Nof</i> I
mIL-6R (D1+D2)	V1-1 + V2-4 (hIL-6R)	–	–	<i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI
mIL-6R (D2+D3)	mIL-6R-fwd + V2-4 (mIL-6R-D2)	–	–	<i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI
mIL-6R (D1+D3)	V1-1 + V1-4 (mIL-6R-D1)	–	–	<i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI
mIL-6R (S)	V5-1 + V7-2 (mIL-6R-S/TM/ICD)	V7-3 + V3-4 (mIL-6R)	V5-1 + V3-4	<i>Bam</i> HI + <i>Nof</i> I
mIL-6R (TM) ¹	V5-1 + hT-2 (mIL-6R-S/TM/ICD)	hT-3 + V3-4 (mIL-6R)	V5-1 + V3-4	<i>Bam</i> HI + <i>Nof</i> I
mIL-6R (ICD)	V5-1 + hI-2 (mIL-6R)	hI-3 + hIL-6R-rev (hIL-6R)	V5-1 + hIL-6R-rev	<i>Bam</i> HI + <i>Nof</i> I
mIL-6R (S/TM/ICD)	V5-1 + V5-2 (mIL-6R)	V5-3 + hIL-6R-rev (hIL-6R)	V5-1 + hIL-6R-rev	<i>Bam</i> HI + <i>Nof</i> I

↗ Anhang

¹ Für diese Chimäre war initial noch eine dritte PCR notwendig: Primer hT-4 + hT-5, hIL-6R als Vorlage.

7.3 Substrate von ADAM10

Tabelle 7.2: Bisher beschriebene Substrate von ADAM10

Art des Substrats	Name des Proteins	Referenz
Zytokine/ Wachstumsfaktoren	TRANCE	HIKITA et al. (2006)
	Betacellulin	SAHIN et al. (2004)
	cMet	KOPITZ et al. (2007); SCHELTER et al. (2010)
	CX3CL1/Fractalkine	HUNDHAUSEN et al. (2003)
	CXCL16	ABEL et al. (2004)
	EGF	SAHIN et al. (2004)
	TNF	HIKITA et al. (2009)
	MICA	WALDHAUER et al. (2008)
Rezeptoren	CD91/LRP1/APOER	LIU et al. (2009)
	NRP-1	SWENDEMAN et al. (2008)
	GPVI	BENDER et al. (2010)
	Fc α R, CD89	PENG et al. (2010)
	IL-6R α	MATTHEWS et al. (2003)
	Notch-1	PAN & RUBIN (1997)
	Thyrotropinrezeptor	KACZUR et al. (2007)
	CD30	EICHENAUER et al. (2007)
	CD23	WESKAMP et al. (2006); MATHEWS et al. (2010)
	DLL1	SIX et al. (2003)
	ERBB2 (HER2/neu)	LIU et al. (2006)
	VEGFR2	DONNERS et al. (2010)
	Robo	COLEMAN et al. (2010)
	PDGFR β	MENDELSON et al. (2010)
	RAGE	ZHANG et al. (2008); RAUCCI et al. (2008)

7 Anhang

	ACE2	JIA et al. (2009)
	LOX-1	MITSUOKA et al. (2009)
	Ephrin A5	JANES et al. (2005)
	Ephrin A2	HATTORI, OSTERFIELD & FLANAGAN (2000)
Adhäsions- moleküle	CD44	NAGANO et al. (2004); MURAI et al. (2011)
	Collagen IV	MILLICHIP et al. (1998)
	Collagen XVII	FRANZKE et al. (2002)
	F11R, JAM-A	KOENEN et al. (2009)
	Desmoglein-2	BECH-SERRA et al. (2006)
	E-cadherin	MARETZKY et al. (2005a)
	N-cadherin	REISS et al. (2005)
	VE-cadherin	SCHULZ et al. (2008)
	Pcdh γ C3/B4	REISS et al. (2006)
	Nectin-1	KIM et al. (2010)
	L1CAM	GUTWEIN et al. (2003); MARETZKY et al. (2005b)
Sonstige	APP	POSTINA et al. (2004)
	PRNP, PrPc	VINCENT et al. (2001)
	Pmel17	KUMMER et al. (2009)
	FasL	SCHULTE et al. (2007)
	Klotho	CHEN et al. (2007)
	CD223/LAG-3	LI et al. (2007)
	GPNMB/Osteoactivin	ROSE et al. (2010)
	LYPD3, C4.4A	ESSELENS et al. (2008)
	Bri2/Itm2b	MARTIN et al. (2008)
	Corin	JIANG et al. (2011)

7.4 Substrate von ADAM17

Tabelle 7.3: Bisher beschriebene Substrate von ADAM17

Art des Substrats	Name des Proteins	Referenz
Zytokine/ Wachstumsfaktoren	TNF	MOSS et al. (1997); BLACK et al. (1997)
	TGF α	PESCHON et al. (1998)
	AREG	SUNNARBORG et al. (2002)
	EREG	SAHIN et al. (2004)
	EPGN, Epigen	SAHIN & BLOBEL (2007)
	NRG1, Heregulin	MONTERO et al. (2000)
	HB-EGF	MERLOS-SUÁREZ et al. (2001)
	Pref1	WANG et al. (2006)
	Fractalkine/CX3CL1	GARTON et al. (2001)
	SEMA4D	ZHU et al. (2007)
	LAG-3	LI et al. (2007)
	DLL1	DYCYNSKA et al. (2007)
	KL-1	KAWAGUCHI et al. (2007)
	KL-2	KAWAGUCHI et al. (2007)
	MICA	WALDHAUER et al. (2008)
	MICB	BOUTET et al. (2009)
	LTA	YOUNG et al. (2010)
	TRANCE/RANKL	LUM et al. (1999)
	CSF-1	HORIUCHI et al. (2007)
	TMEFF2	ALI & KNÄUPER (2007)
	Jagged	PARR-STURGESS, RUSHTON & PARKIN (2010)
Rezeptoren	p55 TNF α RI	REDDY et al. (2000)
	p75 TNF α RII	PESCHON et al. (1998)

7 Anhang

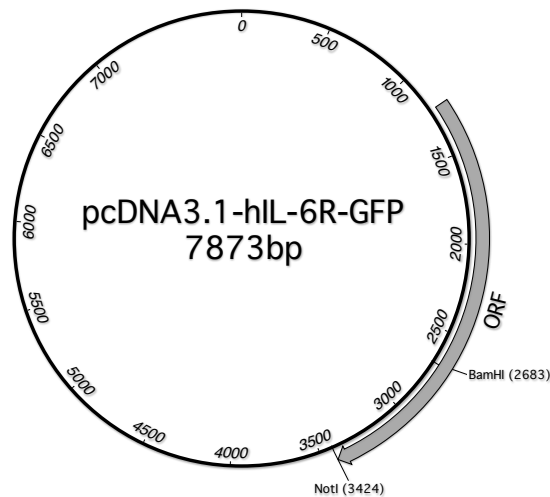
p75NTR	WESKAMP et al. (2004)
IL-6R α	ALTHOFF et al. (2000)
IL-1R2	REDDY et al. (2000)
NTRK1, TrkA	DÍAZ-RODRÍGUEZ et al. (1999)
GHR	WANG et al. (2002)
CSF1R, M-CSFR	ROVIDA et al. (2001)
SORL1, SORLA	GUO et al. (2002)
SORCS1	HERMEY et al. (2006)
SORCS3	HERMEY et al. (2006)
SORT1	HERMEY et al. (2006)
CD91/LRP1/APOER	LIU et al. (2009)
PTPRF, PTP-LAR	RUHE et al. (2006)
EPCR	QU et al. (2007)
ACE2	LAMBERT et al. (2005)
NPR	CHO et al. (2008)
HER4/ErbB4	RIO et al. (2000)
Notch1	BROU et al. (2000)
TNFRSF8, CD30	HANSEN et al. (2000)
TNFRSF5, CD40	CONTIN et al. (2003)
GPIba	BERGMEIER et al. (2004)
GPV	RABIE et al. (2005)
GPVI	BENDER et al. (2010)
SDC1	PRUESSMEYER et al. (2010)
SDC4	PRUESSMEYER et al. (2010)
KDR, VEGFR2	SWENDEMAN et al. (2008)
Fc α R, CD89	PENG et al. (2010)
Ptprz	CHOW et al. (2008)

7 Anhang

	FLT3L	HORIUCHI et al. (2009)
	M6P/IGF2R	LEKSA et al. (2011)
Adhäsions- moleküle	ICAM-1	TSAKADZE et al. (2006)
	VCAM-1	GARTON et al. (2003)
	NCAM	KALUS et al. (2006)
	ALCAM	BECH-SERRA et al. (2006)
	L1-CAM	MARETZKY et al. (2005b)
	EpCAM	MAETZEL et al. (2009)
	DSG2	BECH-SERRA et al. (2006)
	CD62L	PESCHON et al. (1998)
	Collagen XVII	FRANZKE et al. (2002)
	PVRL4, Nectin-4	FABRE-LAFAY et al. (2005)
	CD44	STOECK et al. (2006)
	F11R, JAM-A	KOENEN et al. (2009)
Sonstige	APP	BUXBAUM et al. (1998)
	GP	DOLNIK et al. (2004)
	CA9	ZATOVICOVA et al. (2005)
	PRNP, PrPc	VINCENT et al. (2001)
	Klotho	CHEN et al. (2007)
	MUC-1	THATHIAH, BLOBEL & CARSON (2003)
	LYPD3, C4.4A	ESSELENS et al. (2008)
	VASN	MALAPEIRA et al. (2010)
	CD163	ETZERODT et al. (2010)
	Pmel17	KUMMER et al. (2009)
	APLP2	JACOBSEN et al. (2010)

7.5 Plasmidkarten

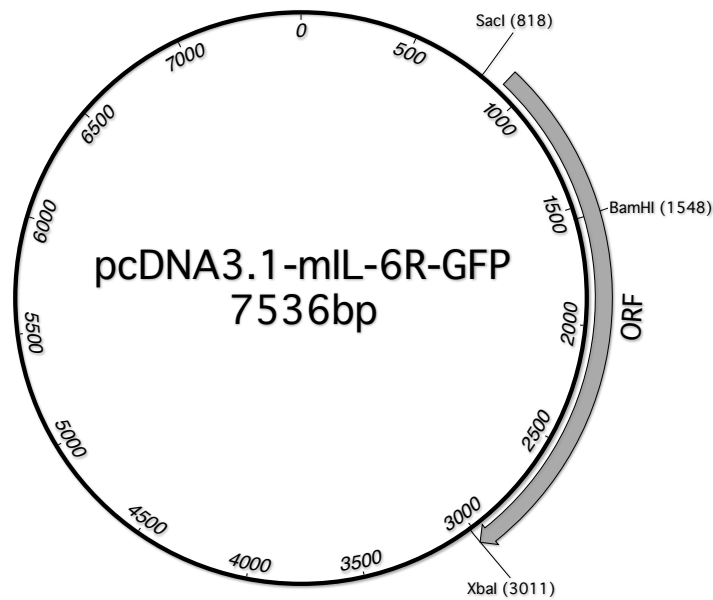
pcDNA3.1-hIL-6R-GFP



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGVEPEDNATVHW
 VLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS
 CFRKSPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQCQYSESQKFSCQLAV
 PEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQCGILQPDPANITVTAVARNPRWLSVTWQD
 PHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ
 GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSS
 SVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRLALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRP
 TPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPRSDLELKLRLIQ
 STVPRARDPPVATMVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKF
 ICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY
 KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFK
 IRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTA
 AGITLGMDELYK

Abbildung 7.8: Offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-hIL-6R-GFP. Das GFP ist grau markiert. Die graphische Darstellung aller Plasmidkarten erfolgte mit MacVector 11 (MacVector, Inc., Cary, NC, USA).

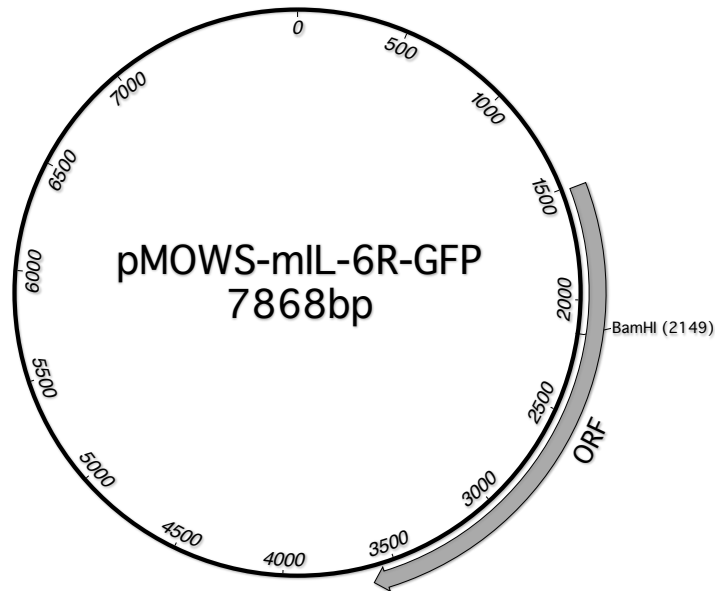
pcDNA3.1-mIL-6R-GFP



MLTVGCTLLVALLAAPAVALLVGLSCRALEVANGT V T S L P G A T V T L I C P G K E A A G N V T I H W
VYSGSQNREWTTTGNLVLRLDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLSCFRK
NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMQPDPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVQVRGKEELDLGQW
SEWSPEVTGTPWIAEPRTTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSS
MSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPLKPTFLL
VPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP R M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K
Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H
K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H
Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K

Abbildung 7.9: Offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-GFP. Das GFP ist grau markiert.

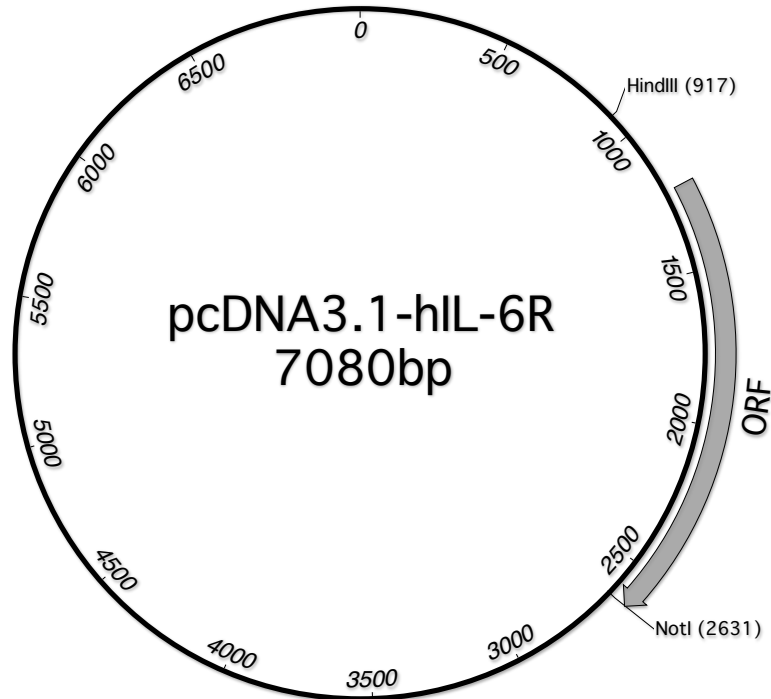
pMOWS-mIL-6R-GFP



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNLTLVLRDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLSCFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMQVDPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
 WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPAQYQCVIHDALRGVKHVQVRGKEELDLGQW
 SEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSS
 MSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPYSLGPLKPTFLL
 VPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP**RMVSKGEELFTGVVPIVELD**
GDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMK
QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH
KLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH
YLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

Abbildung 7.10: Offener Leserahmen des Plasmids pMOWS-mIL-6R-GFP. Das GFP ist grau markiert.

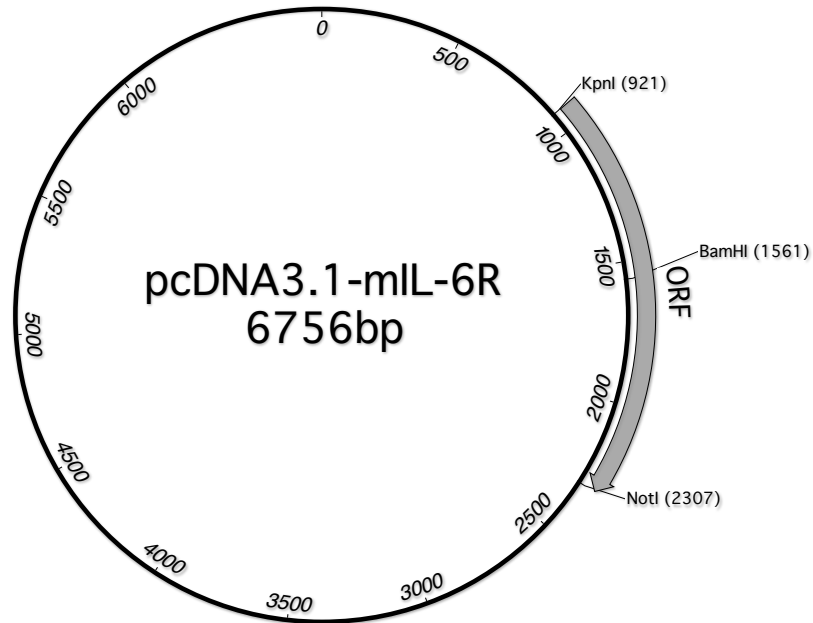
pcDNA3.1-hIL-6R



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGVEPEDNATVHW
 VLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS
 CFRKSPLSNVVCEWGRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQCQYSQESQKFSCQLAV
 PEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQD
 PHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ
 GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSS
 SVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRLALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRP
 TPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR

Abbildung 7.11: Offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-hIL-6R.

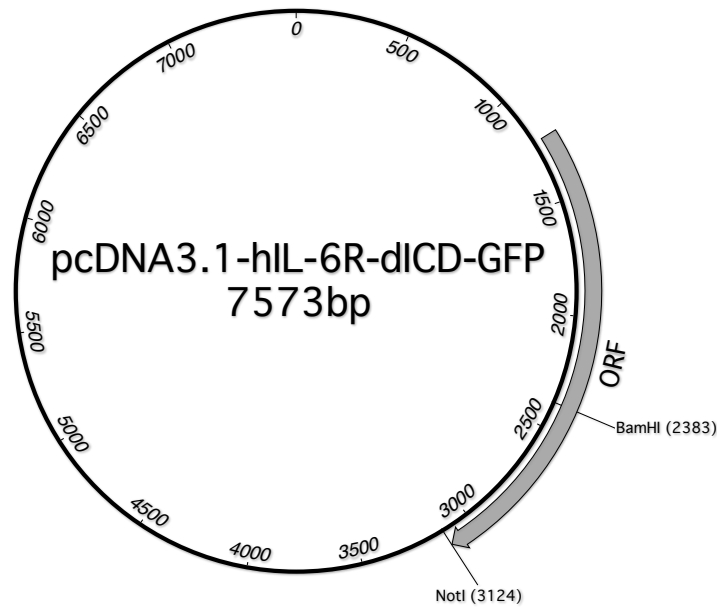
pcDNA3.1-mIL-6R



MLTVGCTLLVALLAAPAVLVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNLVLRLDVQLSDTG DYLC SLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLS CFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMVQPDPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
 WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVQVRGKEELDLGQW
 SEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSS
 MSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPYSLGPLKPTFLL
 VPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFPFR

Abbildung 7.12: Offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R.

pcDNA3.1-hIL-6R-ΔICD-GFP



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTTLTCPGVEPEDNATVHW
 VLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS
 CFRKSPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCQYSQESQKFSCQLAV
 PEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSTQTFQCGILQPDPANITVTAVARNPRWLSVTWQD
 PHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ
 GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSS
 SVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRDPPVATMVSKGEELFTGVVPIVLVDGDVNGHK
 FSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKS
 AMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN
 SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSA
 LSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

Abbildung 7.13: Offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-hIL-6RΔICD-GFP. Das GFP ist grau markiert.

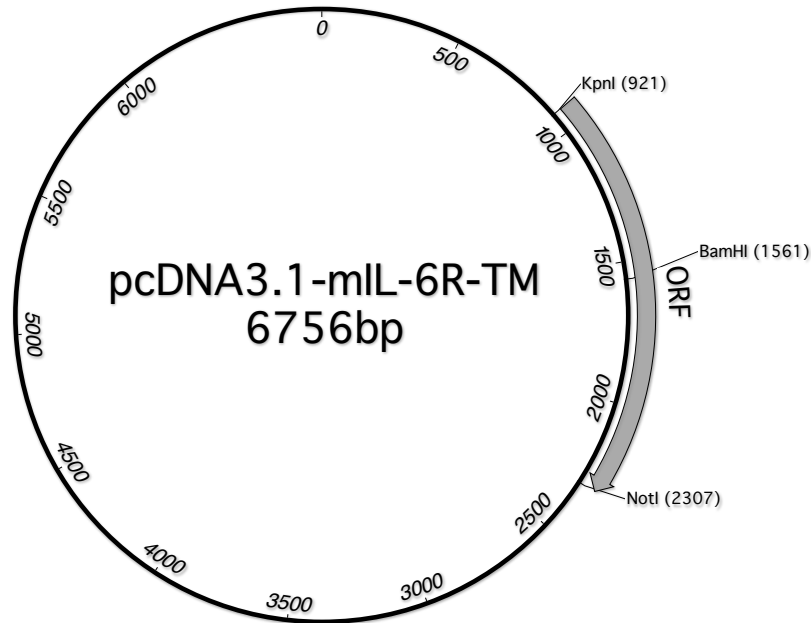
pcDNA3.1-mIL-6R-D358E



MLTVGCTLLVALLAAPAVLVGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
VYSGSQNREWTTTGNLTLVLRDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLSCFRK
NPLVNAICEWRPSSPSTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMQPDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVQVRGKEELDLGQW
SEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQDSSS
MSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPKPTFLL
VPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP

Abbildung 7.14: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D358E. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

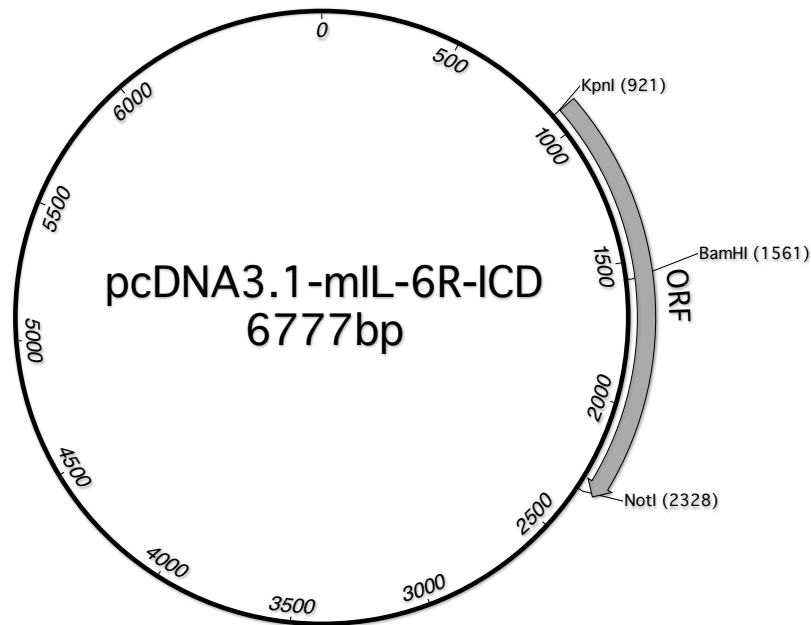
pcDNA3.1-mIL-6R-TM



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNLVLRLDVQLSDTG DYLC SLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLS CFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMVQPDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
 WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLL PVAQYQCVIHDALRGVKHV VQVRGKEELDLGQW
 SEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSS
 MPLPTFLVAGGSLAFGTL L CIAIV LRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPYS LGPLKPTFL L
 VPLLTPHSSGSDNTVNH SCLGVRDAQSPYDNSNRDYL FPR

Abbildung 7.15: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-TM. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

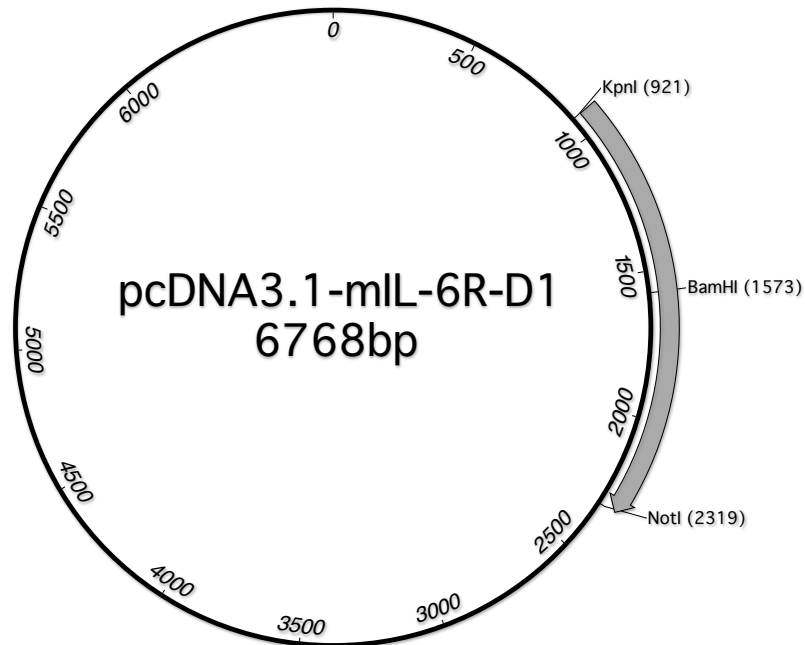
pcDNA3.1-mIL-6R-ICD



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNLVLRLDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLSCFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMVQPDPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
 WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVVQVRGKEELDLGQW
 SEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSS
 MSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIIILRFKKTWKLRALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPT
 PVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR

Abbildung 7.16: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-ICD. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

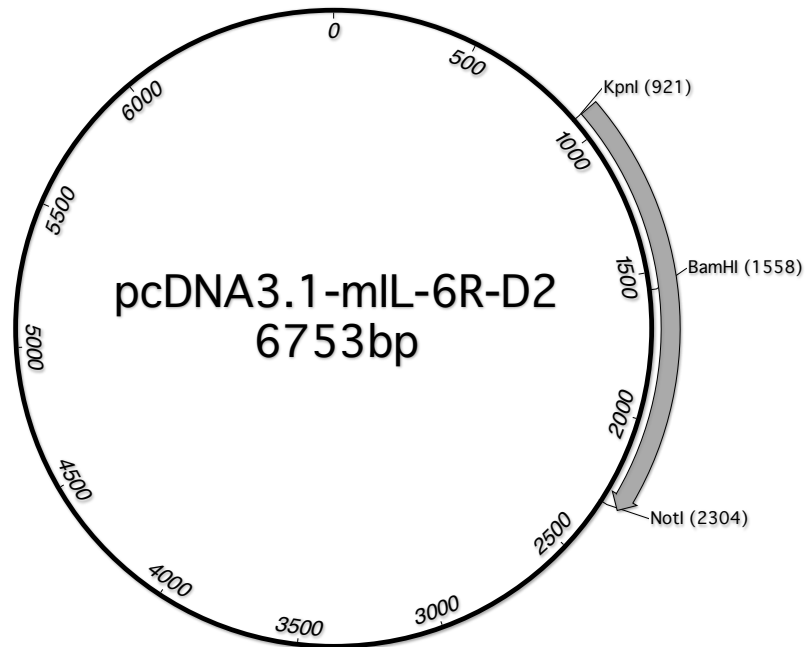
pcDNA3.1-mIL-6R-D1



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVPEPNATVHW
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPPEPKLS
CFRKNPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDQVPCQYSQQLKSFSCQVE
ILEGDKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMQDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSQ
HPETWDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVVQVRGKEELD
LGQWSEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQ
ESSMSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPKP
TFLLVPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFPR

Abbildung 7.17: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D1.
Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

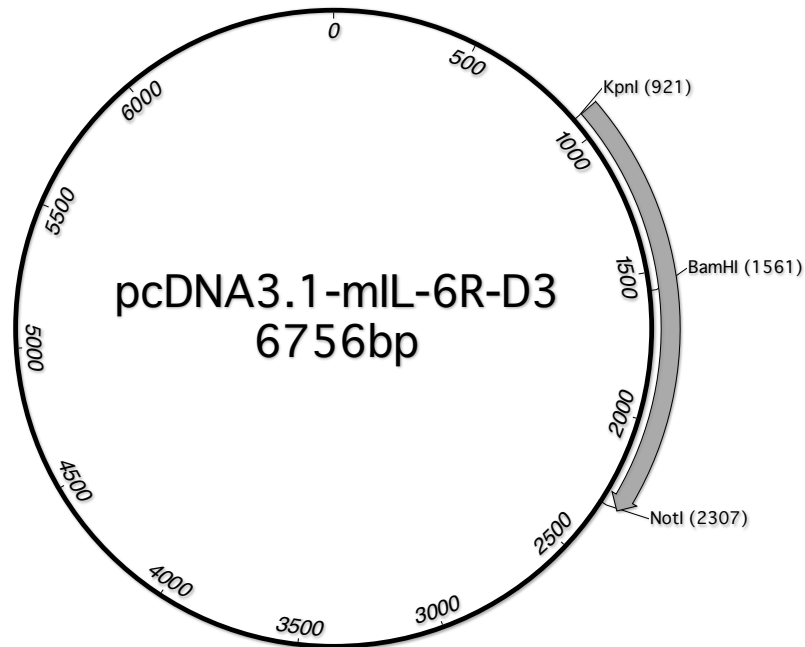
pcDNA3.1-mIL-6R-D2



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
VYSGSQNREWTTTGNLTLVLRDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPQLSCFRK
SPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCCQYSQESQKFSCQLAVPEGD
SSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPETW
DPSYYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVQVRGKEELDLGQWS
EWSPEVTGTPWIAEPRTTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSM
SLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIIILRLKQKWKSEA EKESKTTSPPPPYSLGPLKPTFLLV
PLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP

Abbildung 7.18: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D2.
Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

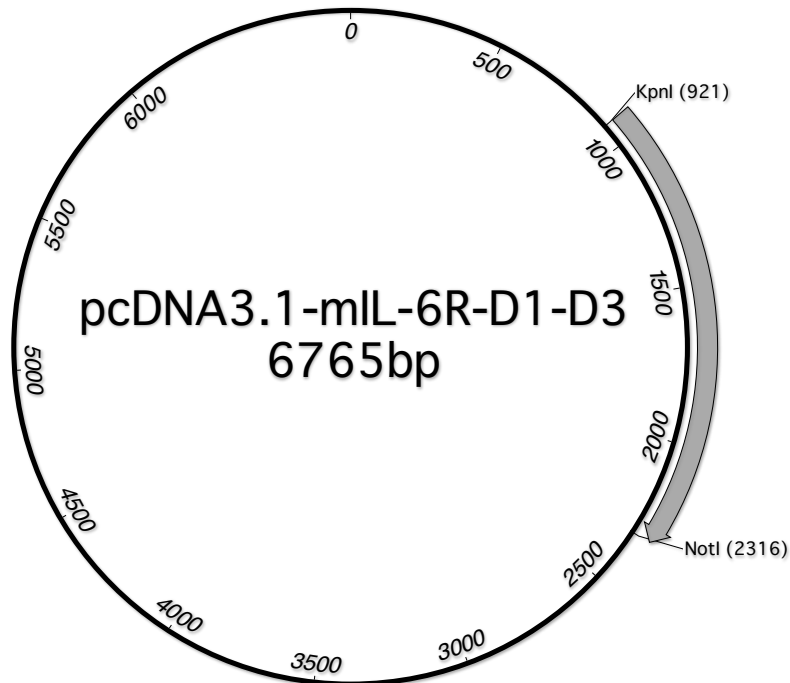
pcDNA3.1-mIL-6R-D3



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNLVLRLDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLSCFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHS
 WNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEW
 SEWSPEAMGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSS
 MSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPLKPTFLL
 VPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP

Abbildung 7.19: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D3.
 Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

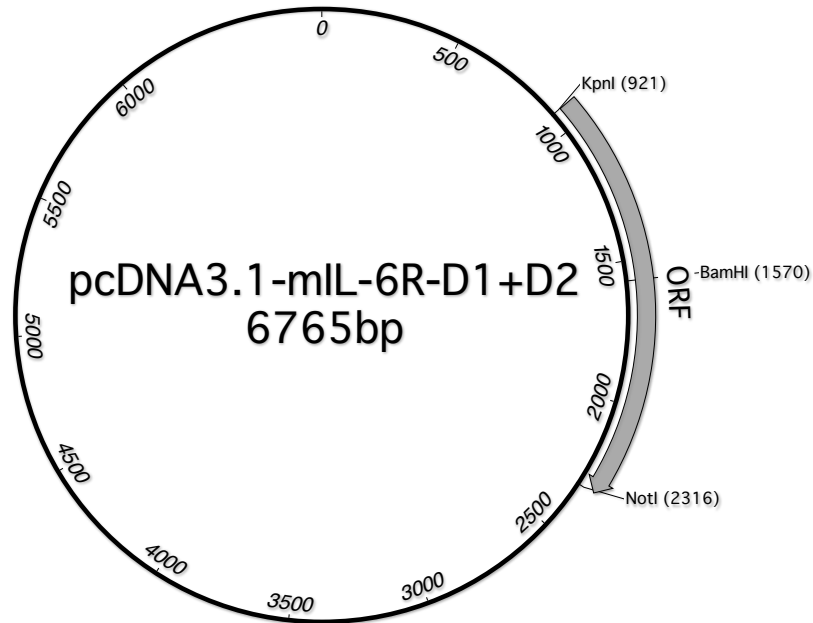
pcDNA3.1-mIL-6R-D1-D3



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDNATVHW
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLS
CFRKSPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCCQYSQESQKFSCQLAV
PEGDSSFYIVSMCVASSVSGSKFSTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQD
PHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ
GEWSEWSPEAMGTPWIAEPRTTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQE
SSSMSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPLKPT
FLLVPLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFPFR

Abbildung 7.20: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D1-D3. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

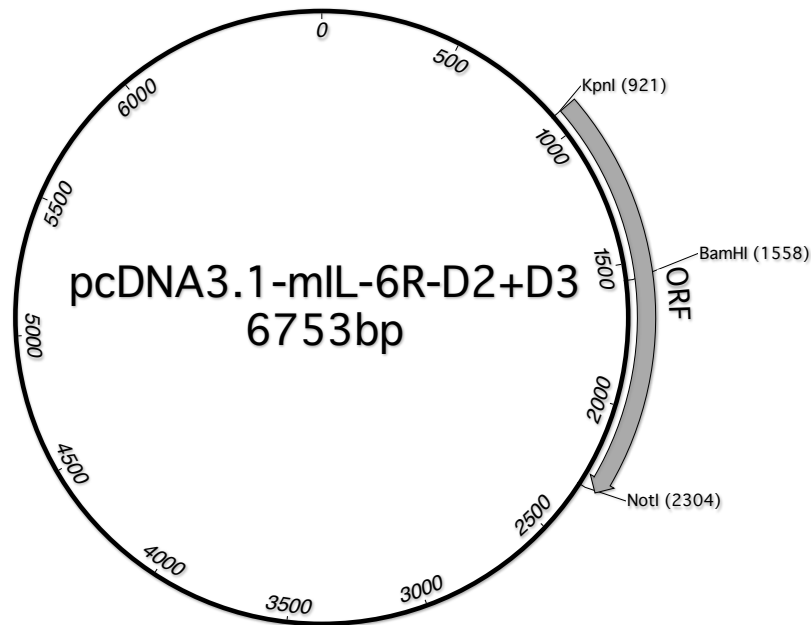
pcDNA3.1-mIL-6R-D1+D2



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDNATVHW
 VLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS
 CFRKSPLSNVVCEWGRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQCQYSQESQKFSCQLAV
 PEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSQWQH
 PETWDPSYYLLQFQLRYPVWSKEFTVLLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVVQVRGKEELD
 GQWSEWSPEVTGTPWIAEPRTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQE
 SSSMSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPLKPT
 FLLVPLLLPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFPFR

Abbildung 7.21: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D1+D2. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

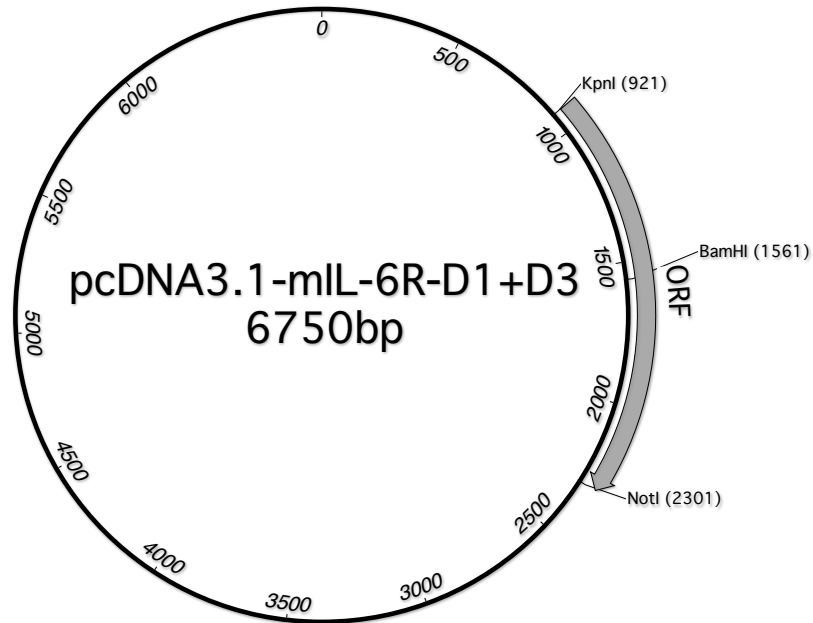
pcDNA3.1-mIL-6R-D2+D3



MLTVGCTLLVALLAAPAVALLVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
VYSGSQNREWTGNTLVLRDVQLSDTG DYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPPEEPQLSCFRK
SPLSNVVC EWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFN SPAEDFQEP CQYSQESQKFSCQLAVPEGD
SSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSW
NSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWS
EWSPEAMGTPWIAEPRTTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQESSM
SLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEA EKESKTTSPPPPYSLGPLKPTFLLV
PLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP R

Abbildung 7.22: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D2+D3. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

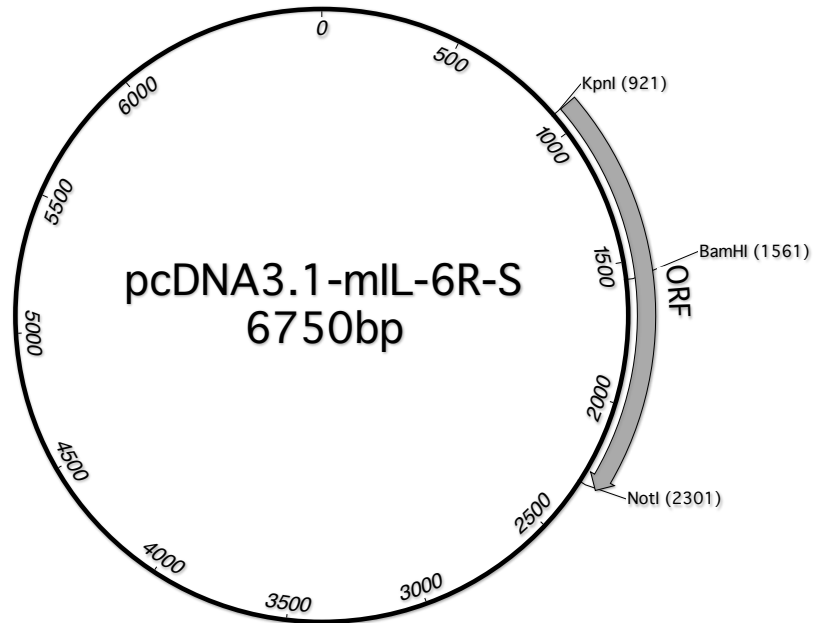
pcDNA3.1-mIL-6R-D1+D3



MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCTPGVEPEDNATVHW
 VLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPKLS
 CFRKNPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDQVPCQYSQQLKSFSCQVE
 ILEGDKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMQVDPDPANITVTAVARNPRWLSVTWQ
 DPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFITWVVKDLQHHCVIHDASGLRHVVQLRAQEEFG
 QGEWSEWSPEAMGTPWIAEPRTTPAGILWNPTQVSVEDSANHEDQYESSTEATSVLAPVQ
 ESSMSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPLKP
 TFLLVPLLLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFPFR

Abbildung 7.23: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-D1+D3. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

pcDNA3.1-mIL-6R-S



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNLTLVLRDVQLSDTG DYLC SLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLS CFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMVQPDPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
 WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVQVRGKEELDLGQW
 SEWSPEVTGTPW **TESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVS**
 LPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRLKQKWSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPKPTFLLVP
 LLTPHSSGSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDNSNRDYLFP

Abbildung 7.24: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-S.
 Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

pcDNA3.1-mIL-6R-S/TM/ICD



MLTVGCTLLVALLAAPAVALVLGSCRALEVANGTVTSLPGATVTLICPGKEAAGNVTIHW
 VYSGSQNREWTTTGNTLVLRDVQLSDTGDYLCSLNDHLVGTVPLLVDVPPEEPKLSCFRK
 NPLVNAICEWRPSSTPSPTTKAVLFAKKINTTNGKSDFQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEG
 DKVYHIVSLCVANSVGSKSSHNEAFHSLKMVQPDPANLVVSAIPGRPRWLKVSQHPET
 WDPSYLLQFQLRYRPVWSKEFTVLLLPVAQYQCVIHDALRGVKHVVQVRGKEELDLGQW
 SEWSPEVTGTPW **TESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVP**
LPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPV
LVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR

Abbildung 7.25: Plasmidkarte und offener Leserahmen des Plasmids pcDNA3.1-mIL-6R-S/TM/ICD. Bereiche, die aus dem humanen IL-6R stammen, sind hellgrau hinterlegt.

7.6 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Originalbeiträge

Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S. and Scheller, J. (2011): Species Specificity of ADAM10 and ADAM17 in IL-6 trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6R shedding. *J Biol Chem*, In Revision

Malchow, S., Thaiss, W., Jänner, N., Waetzig, G. H., Gewiese-Rabsch, J., **Garbers, C.**, Yamamoto, K., Rose-John, S. and Scheller, J. (2011): Essential role of neutrophil mobilization in concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1812, Nr. 3, 290–301

Übersichtsartikel

Chalaris, A., **Garbers, C.**, Rabe, B., Rose-John, S. and Scheller, J. (2011): The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*, Epub ahead of print

Scheller, J., Chalaris, A., **Garbers, C.**, and Rose-John, S. (2011): ADAM17 as master-switch of pro- and anti-inflammatory responses. *Trends Immunol*, In Revision

Tagungsbeiträge

Garbers, C., Chalaris, A., Meyer, D., Jänner, N., Rose-John, S. and Scheller, J. (2010): Human but not mouse IL-6R is a substrate for TACE: analysis of the molecular basis of species specificity using chimeric IL-6R proteins. *8th Joint Conference of the ICS and ISICR*, Chicago, IL, USA

7.7 Lebenslauf

Name: Christoph Garbers

Geburtstag: 08. September 1982

Geburtsort: Lüneburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

03/2008 – 02/2011	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. Rose-John mit dem Titel <i>Der Interleukin-6 Rezeptor: Spezies-spezifische Unterschiede der proteolytischen Freisetzung durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 zwischen Maus und Mensch</i>
02/2008	3. Staatsexamen und Approbation als Apotheker
07/2007 – 12/2007	Praktikum in der Belvedere Apotheke, Kiel
01/2007 – 06/2007	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. Maser mit dem Titel <i>Klonierung und Charakterisierung der humanen Dicarboxyl-/L-Xylulose-Reduktase (DCXR)</i>
10/2002 – 11/2006	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2. Staatsexamen)
2002	Allgemeine Hochschulreife (Gymnasium Oedeme, Lüneburg)

7.8 Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John und Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Biochemie anfertigen zu können, sowie für die intensive Betreuung und die vielen konstruktiven Diskussionen, ohne die ich die Arbeit nicht in der kurzen Zeit hätte fertigstellen können.

Dörte Meyer, Steffi Schmidt und Thies Reick danke ich für die qualitativ wie quantitativ sehr gute Mitarbeit, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Dr. Athena Chalaris und Dr. Jan Suthaus möchte ich für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen danken und dafür, dass sie sich so oft Zeit genommen haben, um mir fachlich weiter zu helfen.

Dr. Doreen M. Floss danke ich für ihre Freundschaft, die vielen Gespräche und die Bereitschaft, mich an ihrem großen methodischen Wissen teilhaben zu lassen.

Dr. Nathalie Jänner danke ich für die Zusammenarbeit bei den Experimenten zum P2X7-Rezeptor. Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte (UKE Hamburg) danke ich für die Plasmide für humanen und murinen P2X7-Rezeptor sowie für die P2X7^{-/-}-Mäuse.

Björn Spudy bin ich dankbar für seine Freundschaft, den täglichen Gang zur Mensa, ungezählte *Americanos*, profunde Hilfe, wann immer ich ein Protein exprimieren und reinigen musste, und noch so viel mehr. Allen Kollegen aus Labor 137, aber insbesondere meinen beiden Nachbarn aus der Anfangszeit, Antje Schütt und Dr. Sven Malchow sowie Wolfgang Thaiss, danke ich für ihre Freundschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und viele hilfreiche Diskussionen.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist und ich mich stets auf sie verlassen kann.

Abschließend gilt der größte Dank meiner wundervollen Frau Yvonne. Worte können nicht beschreiben, wie sehr du zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hast. Ich liebe dich.

7.9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Christoph Garbers, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe. Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

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.

Kiel, den 10.03.2011

Christoph Garbers