

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

Proteolyse des Interleukin-11-Rezeptors durch die Protease RHBDL2

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

vorgelegt von
Lydia Friederike Koch
aus Kiel

Kiel (2021)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Garbers
Otto-von-Guericke-Universität
Medizinische Fakultät
Institut für Pathologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. hum. biol. Ottmar Janßen
Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2022

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 29.10.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Garbers
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis	v
Abkürzungen.....	vi
1 Einleitung.....	1
1.1 Proteolyse als regulatorischer Mechanismus.....	1
1.2 Interleukin-11 und sein Rezeptor	2
1.2.1 Interleukin-11.....	2
1.2.2 Der Interleukin-11-Rezeptor.....	4
1.3 Die Familie der Rhomboid-Proteasen und RHBDL2.....	8
1.3.1 Die Familie der Rhomboid-Proteasen.....	8
1.3.2 Rhomboid-like Protein 2 (RHBDL2)	10
1.4 Der IL-11-Rezeptor als potenzielles Substrat von RHBDL2.....	11
1.5 Fragestellung.....	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Antibiotika.....	14
2.1.2 Antikörper	14
2.1.3 Chemikalien.....	16
2.1.4 Enzyme und Zytokine	16
2.1.5 Geräte	17
2.1.6 Größenmarker.....	18
2.1.7 Kits.....	18
2.1.8 Plasmide	19
2.1.9 Primer.....	20
2.1.10 Puffer, Lösungen und Medien.....	21
2.1.11 Software.....	23
2.1.12 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.13 Zelllinien	24
2.2 Methoden	24

2.2.1	Gezielte DNA-Mutagenese mittels SOE-PCR.....	24
2.2.2	Zellkultur	27
2.2.3	Verarbeitung von Zellkulturüberständen und Zellen.....	29
2.2.4	SDS-PAGE und Western Blot.....	30
2.2.5	Zellviabilitätsassay	31
2.2.6	Durchflusszytometrie.....	33
2.2.7	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	33
3	Ergebnisse	36
3.1	Der IL-11R ist ein Substrat von RHBDL2.....	36
3.1.1	Spaltung des IL-11R durch RHBDL2 in transfizierten HEK293-Zellen.....	37
3.1.2	Klonierung einer katalytisch inaktiven Variante von RHBDL2	39
3.1.3	Lokalisation von RHBDL2 und RHBDL2-SA.....	41
3.1.4	Kolokalisation von RHBDL2 und IL-11R.....	42
3.2	Charakterisierung der Spaltungsstelle im IL-11R.....	45
3.2.1	Klonierung von IL-11R-Varianten und Western Blot-Analyse.....	45
3.2.2	Proteolyse der IL-11-Rezeptor-Variante IL-11R-A370F durch ADAM10.....	47
3.3	Die Rolle von Helix-destabilisierenden Aminosäuren im IL-11R für die Spaltung durch RHBDL2.....	49
3.3.1	Klonierung von IL-11R-Varianten mit veränderten Transmembrandomänen.	49
3.3.2	Helix-destabilisierende Aminosäuren in der IL-11R-TMD sind erforderlich....	49
3.4	Oberflächenexpression der IL-11R-Varianten.....	50
3.5	Biologische Aktivität des durch RHBDL2 generierten löslichen IL-11R.....	54
3.6	Spaltung des IL-11R durch endogenes RHBDL2.....	56
3.6.1	Versuch des Nachweises von endogenem RHBDL2 in HeLa-Zellen.....	56
3.6.2	Blockierung des konstitutiven IL-11R-Sheddings durch Metalloproteasen	57
4	Diskussion.....	59
4.1	Der IL-11-Rezeptor ist ein Substrat von RHBDL2	59
4.2	Charakterisierung der Spaltungsstelle des IL-11R durch RHBDL2	61
4.3	Die Rolle von Helix-destabilisierenden Aminosäuren im IL-11R für die Spaltung durch RHBDL2.....	62
4.4	Biologische Aktivität des durch RHBDL2 generierten löslichen IL-11R.....	63
4.5	Spaltung des IL-11R durch endogenes RHBDL2.....	63
4.6	Ausblick.....	64
	Zusammenfassung.....	66

Abstract.....	68
Literaturverzeichnis.....	70
Eidesstattliche Erklärung.....	78
Danksagung.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Signaltransduktion von IL-11.....	5
Abb. 2: Schematischer Aufbau des IL-11-Rezeptors.....	8
Abb. 3: Schematische Darstellung von RHBDL2.....	10
Abb. 4: Erkennungsmotiv in RHBDL2-Substraten.....	12
Abb. 5: Schema der Splicing-by-Overlap-Extension-PCR.....	25
Abb. 6: Mögliche Erkennungsmotive für RHBDL2 im IL-11-Rezeptor.....	36
Abb. 7: Kotransfektion von IL-11-Rezeptor und Rhomboid-Sekretasen.....	38
Abb. 8: Klonierung einer katalytisch inaktiven Variante von RHBDL2.....	40
Abb. 9: Western Blot von Überständen und Lysaten transient transfizierter HEK293-Zellen.....	41
Abb. 10: Expression von RHBDL2 und RHBDL2-SA in HeLa-Zellen.....	42
Abb. 11: Kolokalisation von IL-11-Rezeptor und RHBDL2.....	44
Abb. 12: IL-11R-Varianten zur Charakterisierung der Spaltungsstelle von RHBDL2.....	47
Abb. 13: Proteolyse der IL-11-Rezeptor-Variante IL-11R-A370F durch ADAM10.....	48
Abb. 14: Helix-destabilisierenden Aminosäuren in der Transmembrandomäne des IL-11-Rezeptors.....	50
Abb. 15: Oberflächenexpression der IL-11-Rezeptor-Varianten zur Charakterisierung der Spaltstelle.....	52
Abb. 16: Oberflächenexpression der IL-11-Rezeptor-Varianten mit veränderter Transmembrandomäne.....	53
Abb. 17: Biologische Aktivität von IL-11-Rezeptor-Varianten.....	55
Abb. 18: Testung eines RHBDL2-Antikörpers an HeLa- und HEK293-Zelllysaten.....	57
Abb. 19: Blockierung des konstitutiven IL-11-Rezeptor-Sheddings durch Metalloproteasen.....	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mastermix für PCR 1, 2 und 3.....	25
Tab. 2: PCR-Programm für PCR 1, 2 und 3.....	26
Tab. 3: Transfektion von Zellen.....	29
Tab. 4: Pipettierschema des Zellviabilitätsassays.....	32

Abkürzungen

ADAM.....	A Disintegrin and Metalloprotease
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FACS.....	fluorescence-activated cell sorting; Durchflusszytometrie
FCS.....	Fetal Calf Serum
gp130	Glykoprotein 130
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IL	Interleukin
IL-11	Interleukin 11
IL-11R.....	Interleukin-11-Rezeptor
IL-6	Interleukin 6
JAK/STAT-Signalweg.....	Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription-Signalweg
LB.....	Lysogeny Broth
MAPK-Signalweg.....	Mitogen-activated Protein Kinase-Signalweg
NE	Neutrophile Elastase
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PI3K-Kaskade.....	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Kaskade
PR3.....	Proteinase 3
RHBDL.....	Rhomboid-like protein
RLU.....	Relative Light Units
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE.....	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOE-PCR	Splicing-by-Overlap-Extension-Polymerase-Kettenreaktion
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS.....	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TC-Schalen	tissue-culture-Schalen
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor α
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Proteolyse als regulatorischer Mechanismus

Viele biologische Prozesse werden durch limitierte Proteolyse reguliert. Bei diesem Vorgang werden Peptidbindungen an bestimmten Stellen der Aminosäuresequenz eines Proteins gespalten, sodass neue Proteinfragmente entstehen, welche dann eine bestimmte Funktion erfüllen oder in der Folge weiter abgebaut werden. Bekannte Beispiele für die limitierte Proteolyse sind die Aktivierung von inaktiven Enzymvorstufen der Verdauungsenzyme Chymotrypsin und Pepsin sowie von Gerinnungsfaktoren (Ottesen, 1967). Doch diese klassischen Beispiele stellen nur einen Bruchteil der Prozesse dar, die durch limitierte Proteolyse reguliert werden. Laut der *Degradome Database* gibt es etwa 580 menschliche Proteasen (Pérez-Silva *et al.*, 2016). Dies sind jene Enzyme, die Proteolyse katalysieren und so über Lokalisation und Aktivität vieler Proteine bestimmen, Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen und molekulare Signale generieren sowie modulieren. Folglich spielen sie eine tragende Rolle bei DNA-Replikation und -Transkription, Zellproliferation und -differenzierung, Angiogenese, Neurogenese, Ovulation und Befruchtung, Wundheilung, Stammzellmobilisation, Blutgerinnung, Entzündung, Immunität sowie Zelltod (López-Otín und Bond, 2008). Proteasen sind aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen dauerhaft Gegenstand der Forschung und potenzielle Therapie-Ansatzpunkte bei Tumoren sowie neurodegenerativen, entzündlichen und kardiovaskulären Erkrankungen.

Der Schlüssel zur Erforschung von Proteasen und deren Rolle in Gesundheit wie Krankheit ist die Charakterisierung ihrer Substrate, denn so ergeben sich konsequenterweise ihre Funktionen im Organismus. Im Rahmen dieser Arbeit soll die limitierte Proteolyse des Interleukin-11-Rezeptors durch die Protease Rhomboid-like Protein 2 beleuchtet werden. Beide Proteine sind noch unzureichend erforscht, und noch viel weniger ihr Zusammenwirken. Dieses soll im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2 Interleukin-11 und sein Rezeptor

1.2.1 Interleukin-11

Die Interleukine (IL) bilden eine Gruppe von Zytokinen mit immunmodulatorischen Eigenschaften. Sie sind lösliche Proteine, die als auto- und parakrine Hormone agieren. Über hochaffine Rezeptoren an der Zelloberfläche lösen Interleukine zelluläre Signalwege aus und steuern somit Prozesse wie Zellproliferation, -reifung, -migration und -adhäsion (Brocker *et al.*, 2010). Die Effekte der einzelnen Interleukine sind breit gefächert und unterliegen vielen Einflüssen, wie zum Beispiel der Art der sezernierenden Zellen, der Art der Effektorzellen oder der aktuellen Phase der Immunantwort (Brocker *et al.*, 2010).

Bedeutung von Interleukin-11

Im Jahr 1990 entdeckten Paul *et al.* das Interleukin-11 (IL-11) als ein lösliches Protein, sezerniert von immortalisierten Knochenmarkszellen (Paul *et al.*, 1990). IL-11 zeigte hämatopoetische Eigenschaften und wurde 1997 als rekombinantes Protein unter dem Namen Oprelvekin (Handelsname Neumega®) in den USA als Medikament eingeführt (Dorner, Goldman und Keith, 1997). Es wird zur Vorbeugung einer schweren Chemotherapie-induzierten Thrombozytopenie bei Patienten mit einer nicht-myeloiden Krebserkrankung eingesetzt (Kaye, 1998).

Neben dem hämatopoetischen Effekt wurden viele weitere Wirkungen von IL-11 entdeckt, die sowohl von anti- als auch von proinflammatorischer Qualität sind. Zum einen spielt IL-11 eine Rolle bei der Geweberegeneration in Dickdarm und Herz (Kimura *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2010), außerdem hemmt es die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine (Trepicchio *et al.*, 1996). Zum anderen wurde IL-11 in vielen Krebsarten gefunden und treibt nachweislich die Entstehung von gastrointestinalen Tumoren voran (Putoczki und Ernst, 2010; Putoczki *et al.*, 2013). Eine erhöhte IL-11-Expression in Mammakarzinomen ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und fortschreitenden Metastasierung (Johnstone *et al.*, 2015). Außerdem wurde IL-11 zu einem wesentlichen Faktor bei der Entstehung von kardiovaskulärer Fibrose erklärt (Schafer *et al.*, 2017). Die zum Teil gegensätzlichen Beobachtungen deuten

darauf hin, dass IL-11 vor allem homöostatische Aufgaben hat und bei einem Ungleichgewicht daher sowohl protektive als auch pathologische Effekte hervorrufen kann.

IL-11 wird hauptsächlich von Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen produziert, aber auch von Keratinozyten, Synoviozyten, Chondrozyten und Osteoblasten (Negahdaripour, Nezafat und Ghasemi, 2016). Im Serum nachweisbar ist das Zytokin allerdings nur unter pathologischen Umständen. Erhöhte Serum-Level von IL-11 fanden sich bei viralen Entzündungen, Rheumatoider Arthritis und vielen Krebsarten (Einarsson *et al.*, 1996; Negahdaripour, Nezafat und Ghasemi, 2016; Elshabrawy *et al.*, 2018).

Interleukin-11 und Interleukin-6

IL-11 gehört zur IL-6-Zytokinfamilie, zu der auch Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1), Cardiotrophin-like cytokine (CLC) und IL-27 gehören. IL-6 ist dabei das am weitestreichend erforschte Zytokin seiner Familie (für Review s. Rose-John, 2018). Die Vertreter der IL-6-Familie weisen wie viele Zytokine die gleiche Topologie auf, und zwar ein Bündel aus vier α -Helices in einer *Up-up-down-down*-Topologie (Bazan, 1990). Die Familienmitglieder definieren sich über die Art der Signaltransduktion, indem sie mit dem Transmembranprotein Glykoprotein 130 (gp130) interagieren (Barton, Hudson und Heath, 1999). IL-6 und IL-11 binden jeweils an ihren spezifischen Rezeptor. Der Zytokin-Rezeptor-Komplex rekrutiert dann ein Homodimer von gp130, wodurch der *Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*-Signalweg (JAK/STAT-Signalweg), der *Mitogen-activated Protein Kinase*-Signalweg (MAPK-Signalweg) sowie die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Kaskade (PI3K-Kaskade) in Gang gesetzt werden. Obwohl beide Zytokine die gleichen intrazellulären Signalwege aktivieren, unterscheiden sich die biologischen Funktionen von IL-6 und IL-11 jedoch oder sind gar gegensätzlich. Diese Unterschiede sind zurückzuführen auf die beschränkte Expression des IL-6-Rezeptors und des IL-11-Rezeptors auf unterschiedlichen Zelltypen sowie mögliche graduelle Unterschiede von Dynamik und Kinetik der Signalwege (für Review s. Garbers und Scheller, 2013).

1.2.2 Der Interleukin-11-Rezeptor

Signaltransduktion und klinische Bedeutung

Für die Signalaktivierung bindet IL-11 an seinen spezifischen IL-11-Rezeptor, welcher als α -Rezeptor allein noch keine Signaltransduktion auslösen kann. Der gebildete Zytokin-Rezeptor-Komplex rekrutiert im Anschluss jedoch zwei Moleküle des β -Rezeptors gp130, welche dann dimerisieren und so die intrazellulären Signalkaskaden aktivieren (Matadeen *et al.*, 2007). Während gp130 ubiquitär exprimiert wird, wurde der IL-11-Rezeptor vor allem auf Fibroblasten, Lymphozyten, B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen, Osteoklasten und Epithelzellen gefunden (Putoczki und Ernst, 2010; FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT) *et al.*, 2014).

Klinische Relevanz erlangte der IL-11-Rezeptor, nachdem eine rezessiv vererbte Form eines kraniofazialen Syndroms in Zusammenhang mit *Missense*-Mutationen im IL-11-Rezeptor-Gen gebracht wurde. Die betroffenen Personen wiesen Kraniosynostose, maxilläre Hypoplasie, verspäteten Zahndurchbruch sowie überzählige Zähne auf (Nieminen *et al.*, 2011). Außerdem zeigten Experimente mit Mäusen, dass das Fehlen des IL-11-Rezeptors zu Fehlbildungen des Schädels führt und der IL-11-Signalweg essentiell für eine regelrechte Knochenbildung ist (Nieminen *et al.*, 2011; Agthe *et al.*, 2018).

Der IL-11-Rezeptor ist wie der IL-6-Rezeptor ein Transmembranprotein. Allerdings wurden im Serum von gesunden Menschen auch bis zu 50 ng/ml lösliche Formen des IL-6-Rezeptors nachgewiesen, unter pathophysiologischen Umständen bis zu 170 ng/ml (Mitsuyama *et al.*, 1991; Gaillard *et al.*, 1993; Montero-Julian, 2001). Trotz seiner fehlenden Membranverankerung kann der lösliche IL-6-Rezeptor sein Zytokin binden und agonistisch wirken. Aufgrund der beiden möglichen Formen der Signaltransduktion unterscheidet man den klassischen Signalweg mit dem membranständigen Zytokinrezeptor von dem Trans-Signalweg, der durch eine lösliche Form des Rezeptors initiiert wird (s. Abb. 1). Der Trans-Signalweg ermöglicht die Aktivierung von Zellen durch ein Zytokin, ohne dass die Zellen den entsprechenden membranständigen α -Rezeptor exprimieren müssen (Rose-John und Heinrich, 1994; Chalaris *et al.*, 2011).

Auch für den IL-11-Rezeptor ist zum ersten Mal eine natürlich vorkommende lösliche Form im Serum gesunder Menschen von bis zu 4 ng/ml nachgewiesen worden (Lokau *et al.*, 2016). Darüber hinaus zeigten *In-vitro*-Experimente mit rekombinanten Proteinen sowie Zellkulturexperimente, dass auch ein löslicher IL-11-Rezeptor IL-11 binden und die Signaltransduktion auf Zellen mit gp130 aktivieren kann (Pflanz *et al.*, 1999; Lokau *et al.*, 2016).

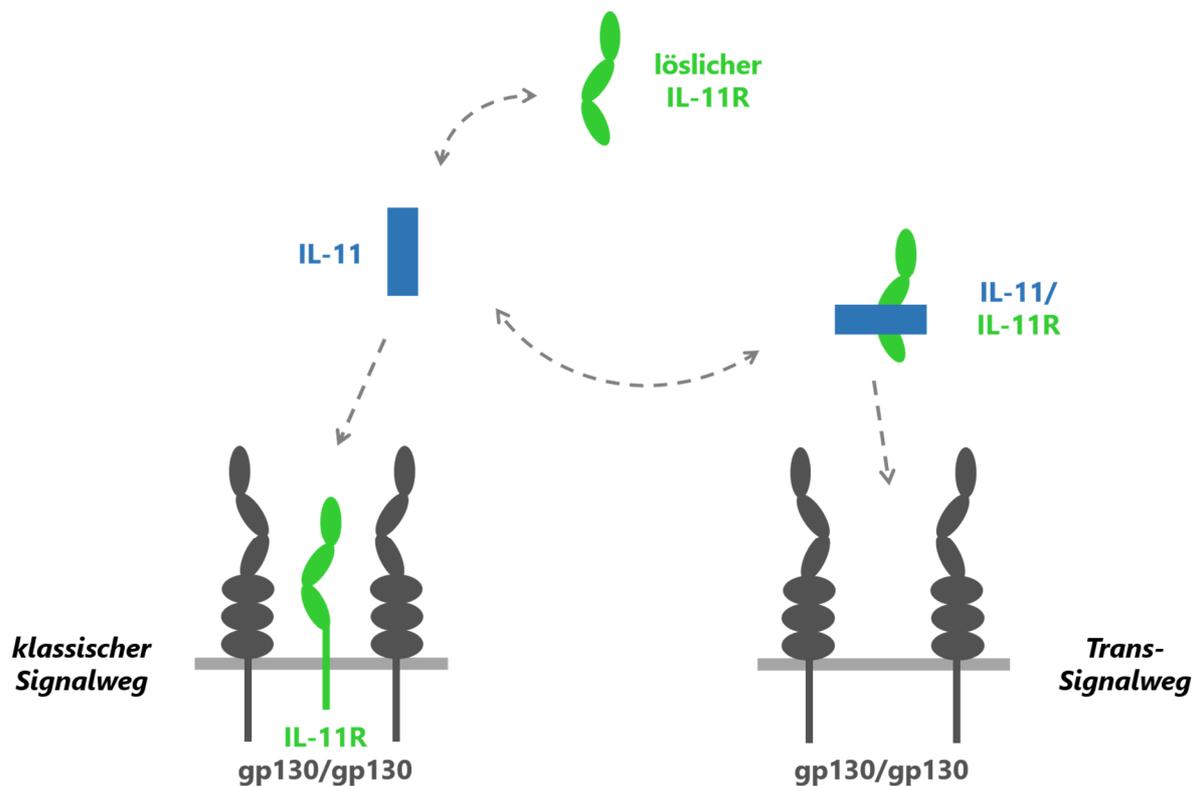


Abbildung 1: Signaltransduktion von IL-11. Im klassischen Signalweg bindet freies Interleukin-11 (IL-11) an seinen spezifischen, membranständigen Rezeptor (IL-11R). Der Zytokin-Rezeptor-Komplex rekrutiert ein Homodimer des ubiquitär exprimierten Glykoprotein 130 (gp130), welches daraufhin intrazelluläre Signalwege in Gang setzt. Im Trans-Signalweg bindet freies IL-11 an eine lösliche Form des IL-11-Rezeptors. Dieser Zytokin-Rezeptor-Komplex ist ebenso in der Lage die Signaltransduktion durch gp130 zu aktivieren und kann somit Zellen ansprechen, die keinen IL-11-Rezeptor in ihrer Membran exprimieren. Modifiziert nach Garbers und Scheller, 2013.

IL-6 betreffend weiß man, dass der klassische und der Trans-Signalweg unterschiedliche Funktionen haben. So werden durch den klassischen IL-6-Signalweg Abwehrmechanismen wie Fieberinduktion, B-Zell-Differenzierung und die Akute-Phase-Reaktion aktiviert. Der Trans-Signalweg hingegen spielt eine wichtige Rolle bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Kolon-Karzinomen. Dabei spielen die Hemmung von T-Zell-Apoptose, vermehrte Aktivität von TH17-Zellen in entzündetem

Gewebe und maligne Epithelzellproliferation durch IL-6 eine Rolle (für Review s. Chalaris *et al.*, 2011).

Für viele durch IL-6 bedingte Erkrankungen befinden sich Anti-IL-6-Therapeutika in klinischen Studien und einige sind bereits erfolgreich im Einsatz. So wird zum Beispiel der IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab therapeutisch angewendet bei Rheumatoider Arthritis, Morbus Castleman, Riesenzellerteritis und dem Zytokin-Freisetzungssyndrom (Garbers *et al.*, 2018). Aufgrund von Nebenwirkungen einer dauerhaften, generellen IL-6-Blockade ist eine spezifische Inhibierung des IL-6-Transsignalwegs für einige Erkrankungen sinnvoll. Das Fusionsprotein sgp130Fc, bestehend aus der Ektodomäne von gp130 und dem Fc-Teil eines IgG-Antikörpers, ist dem natürlichen löslichen gp130 nachempfunden und blockiert allein den IL-6-Trans-Signalweg, indem es die Zytokin-Rezeptor-Komplexe hochaffin bindet (Jostock *et al.*, 2001; Rose-John, Winthrop und Calabrese, 2017). Zurzeit befindet sgp130Fc sich unter dem Namen Olamkizept in einer klinischen Phase-II-Studie zur Erprobung bei Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Garbers *et al.*, 2018). Sgp130Fc blockiert *in vitro* ebenfalls den IL-11-Trans-Signalweg (Lokau *et al.*, 2016). Ob und wenn ja, welchen Anteil dies für die Wirkung von sgp130Fc beiträgt, muss in weiteren Studien geklärt werden. Darüber stellt sgp130Fc ein gutes Werkzeug dar, die Bedeutung des IL-6- und IL-11-Trans-Signalwegs zu erforschen.

Generierung löslicher Rezeptorformen

Lösliche Formen des IL-6-Rezeptors entstehen zu 10 % durch alternatives Splicing und zu 90 % durch limitierte Proteolyse (Riethmueller *et al.*, 2017). Das Abspalten des extrazellulären Teils eines Membranproteins wird Ektodomänen-*Shedding* genannt und wird durch Proteasen, welche in diesem Zusammenhang als Sheddasen bezeichnet werden, bewirkt. Eine wichtige Gruppe dieser Sheddasen sind die *A Disintegrin and Metalloproteases* (ADAMs), von denen ADAM10 und vor allem ADAM17 verantwortlich sind für die Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors (Matthews *et al.*, 2003). Beide Sheddasen haben eine große Gruppe von Substraten, wobei ADAM17 beispielsweise den proinflammatorischen Tumornekrosefaktor α (TNF α) aktiviert und ADAM10 ein Hauptakteur im für Zelldifferenzierung relevanten Notch-Signalweg ist (für weitergehende Informationen s. Scheller *et al.*, 2011, Weber und Saftig, 2012).

Löslicher und biologisch aktiver IL-11-Rezeptor kann durch ADAM10, jedoch kaum durch ADAM17 generiert werden (Lokau *et al.*, 2016). Außerdem entsteht er zu einem gewissen Maß auch durch die aus Neutrophilen stammenden Serin-Proteasen Neutrophile Elastase (NE) und Proteinase 3 (PR3) (Lokau *et al.*, 2016). Welche Protease *in vivo* löslichen IL-11-Rezeptor erzeugt ist bisher noch völlig unklar. Welche Funktion der Trans-Signalweg *in vivo* hat ist ebenfalls noch unverstanden. Einiges deutet darauf hin, dass der IL-11-Trans-Signalweg eine Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Fibrose spielen könnte (Schafer *et al.*, 2017).

Struktureller Aufbau des IL-11-Rezeptors

Der IL-11-Rezeptor ist ein Typ-I-Transmembranprotein aus drei extrazellulären Domänen, einer sogenannten *stalk*-Region, einer Transmembran- und einer intrazellulären Region (s. Abb. 2). Die Domäne D1 ist eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, die Domänen D2 und D3 sind Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen und enthalten den Zytokinbindungsbereich. Die sogenannte *stalk*-Region des IL-11-Rezeptors hat einerseits eine Platzhalterfunktion, um die Bindung zwischen den gp130-Molekülen und dem Zytokin-Rezeptor-Komplex zu ermöglichen, andererseits beinhaltet sie die Spaltstelle für die Proteolyse durch ADAM10 und andere Proteasen (Nitz *et al.*, 2015; Lokau *et al.*, 2016). Der intrazelluläre Teil bedingt die Sortierung des IL-11-Rezeptors zur apikalen und basolateralen Membran in polarisierten Zellen und ermöglicht die Transzytose von IL-11 von basolateral nach apikal (Monhasery *et al.*, 2016).

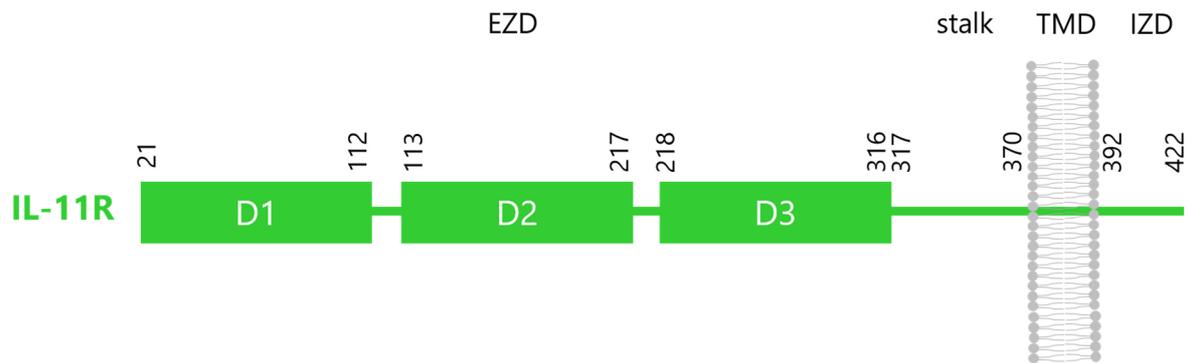


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des IL-11-Rezeptors. Der Interleukin-11-Rezeptor (IL-11R) ist ein Typ-I-Transmembranprotein und besteht aus drei extrazellulären Domänen (EZD), wovon Domäne 1 (D1) eine Immunglobulin-like Domäne ist, Domänen 2 und 3 (D2, D3) beinhalten den Zytokinbindungsbereich. Die stalk-Region (stalk) ist ein Platzhalter und enthält die Spaltungsstelle für die Protease ADAM10. Es schließen sich die Transmembrandomäne (TMD) und die intrazelluläre Domäne (IZD) an. Die Zahlen geben die Nummerierung der Aminosäuren an den jeweiligen Grenzstellen der Domänen an. Modifiziert nach Nitz et al., 2015.

1.3 Die Familie der Rhomboid-Proteasen und RHBDL2

1.3.1 Die Familie der Rhomboid-Proteasen

Die jüngste entdeckte Gruppe der Proteasen umfasst die Intramembran-Proteasen, welche ihr katalytisches Zentrum innerhalb der Lipiddoppelschicht einer Zellmembran beherbergen. Die benutzte Schnittstelle liegt dabei innerhalb oder in direkter Nachbarschaft der Transmembrandomäne der Substrate. Sie setzen so lösliche Proteinformen frei (Brown *et al.*, 2000; Freeman, 2008). Die Rhomboid-Proteasen bilden eine Familie von Intramembran-Proteasen, welche durch die Evolution hinweg in allen Reichen des Lebens erhalten worden sind (Lemberg und Freeman, 2007). Während sie in anderen Organismen bereits gut erforscht sind, halten sich die Erkenntnisse über Rhomboid-Proteasen in Säugetieren in Grenzen. Die ersten Rhomboid-Proteasen wurden in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo sie für die Freisetzung von Liganden des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) sorgen (Sturtevant, Roark und Bier, 1993).

Zu den Säugetier-Rhomboid-Proteinen gehören neben den aktiven Proteasen auch katalytisch inaktive Pseudoproteasen, die Derlins und iRhoms, welche zwar mit Proteinen in der Zellmembran agieren, diese jedoch nicht spalten (Lemberg und Freeman, 2007).

Zu den fünf Rhomboid-Proteasen in Säugetieren zählen die Sekretasen Rhomboid-like protein (RHBDL) 1-4 und die mitochondriale Protease PARL, welche die Stressantwort des Mitochondriums reguliert (Chan und McQuibban, 2013). RHBDL1 ist im Golgi-Apparat lokalisiert, RHBDL2 in der Zellmembran, RHBDL3 wahrscheinlich in Endosomen und RHBDL4 im endoplasmatischen Retikulum (Lohi, Urban und Freeman, 2004; Fleig *et al.*, 2012). Während über die Funktionen von RHBDL1 und 3 kaum etwas bekannt ist, wird RHBDL4 mit Tumorwachstum und Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht (für weitergehende Informationen s. Düsterhöft, Künzel und Freeman, 2017). Von RHBDL2 sind bereits einige Substrate und Funktionen bekannt, welche im nächsten Kapitel näher dargestellt werden sollen.

Allen Rhomboid-Proteasen gemeinsam ist ihr struktureller Aufbau aus 6 bis 7 Transmembrandomänen (TMD) mit einigen homologen Bereichen und ihr katalytisches Zentrum, das auch als katalytische Diade bezeichnet wird und aus einem Serin in TMD 4 und Histidin in TMD 6 besteht (Lemberg *et al.*, 2005; Lemberg und Freeman, 2007). Aufgrund der besonderen biophysikalischen Umgebung innerhalb der Lipiddoppelschicht laufen Substraterkennung und Proteolyse durch Rhomboid-Proteasen anders ab als bei Proteasen im wässrigen Milieu (Urban, 2010). Mehrere Studien legen nahe, dass Rhomboid-Proteasen zwei unabhängige Elemente ihrer Substrate erkennen. Zum einen binden sie mit ihrer im lipophilen Bereich liegenden *exosite* die TMD des Substrats, zum anderen kann dann eine Erkennungssequenz des Substrats am katalytischen Zentrum binden, das exponiert im wässrigen Milieu liegt (Strisovsky, Sharpe und Freeman, 2009; Adrain *et al.*, 2011). Liegt die Erkennungssequenz des Substrats inmitten oder nahe der TMD, sind zusätzliche Eigenschaften der TMD-Sekundärstruktur erforderlich. Die als α -Helix vorliegenden TMD sind in diesen Fällen durch sogenannte Helix-destabilisierende Aminosäuren gekennzeichnet, welche die Helixstruktur auflockern und so Platz für die Interaktion mit der Rhomboid-Protease schaffen (Akiyama und Maegawa, 2007; Strisovsky, Sharpe und Freeman, 2009). Helix-destabilisierende

Aminosäuren haben ein niedriges Helixpotenzial wie zum Beispiel Prolin, Glycin und Serin (Pace und Scholtz, 1998).

1.3.2 Rhomboid-like Protein 2 (RHBDL2)

Rhomboid-like Protein 2 (RHBDL2) ist das am besten untersuchte Mitglied der Rhomboid-Familie. Es ist in der Plasmamembran lokalisiert und ist aus 7 TMD aufgebaut (s. Abb. 3).

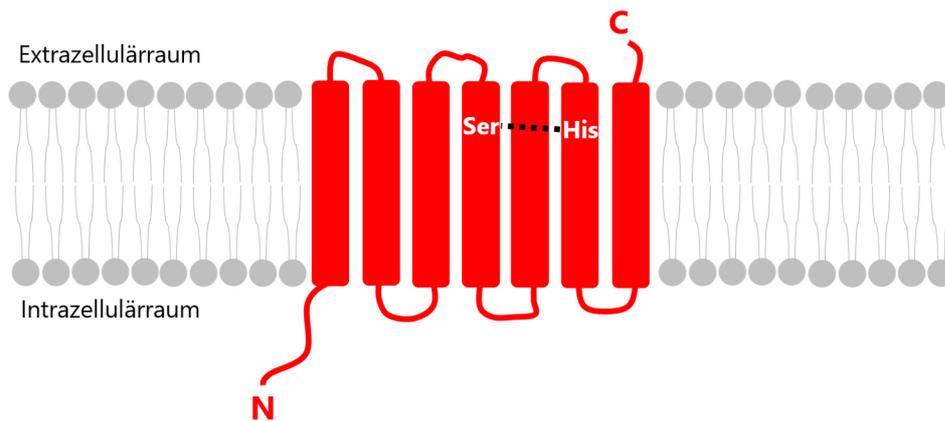


Abbildung 3: Schematische Darstellung von RHBDL2. Rhomboid-like Protein 2 (RHBDL2) ist ein Multipass-Transmembranprotein, dessen N-Terminus (N) intrazellulär liegt. Es enthält sieben Transmembrandomänen (rote Balken). Die katalytische Diade besteht aus einem Serin (Ser) in der vierten Transmembrandomäne und einem Histidin (His) in der sechsten Transmembrandomäne.

Als erstes physiologisches Substrat von RHBDL2 wurde Thrombomodulin identifiziert, welches als antikoagulatorisches Protein die Blutgerinnung und außerdem die Zelladhäsion und -migration reguliert (Weiler und Isermann, 2003; Cheng *et al.*, 2011). Sowohl in einem *in vitro*-Kratzwunden-Modell als auch in einem Mausmodell wurde die Bedeutsamkeit des Thrombomodulin-*Sheddings* durch RHBDL2 für die Wundheilung gezeigt (Cheng *et al.*, 2011).

Ein weiteres Substrat von RHBDL2 ist das endothelial exprimierte Protein CLEC14a, welches Zell-Zell-Kontakte und Angiogenese vermittelt (Rho *et al.*, 2011; Noy *et al.*, 2016). Die durch RHBDL2 freigesetzte Ektodomäne von CLEC14a fungiert als Inhibitor von Endothelprossung und Zellmigration (Noy *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu fungiert membrangebundenem CLEC14a als Tumormarker und treibt die Tumor-Angiogenese voran (Rho *et al.*, 2011).

Aufgrund der Rolle von Rhomboid-Proteasen im EGFR-Signalweg von *Drosophila melanogaster* wurden auch EGFR-Liganden von Säugern bezüglich des *Sheddings* durch Rhomboid-Proteasen untersucht. Tatsächlich war RHBDL2 in der Lage, proEGF in eine lösliche Form zu überführen, die den EGF-Rezeptor aktiviert. Die Aktivierung des EGFR in Säugern findet allerdings hauptsächlich durch ADAM10 vermitteltes *Shedding* statt und nur zu einem sehr geringen Teil durch RHBDL2. Erwähnenswert ist, dass ein vermehrtes RHBDL2 vermitteltes *Shedding* von Epidermalemem Wachstumfaktor (EGF) in einigen Tumorzelllinien beobachtet wurde und dies zu einer Anoikis-Resistenz führte (Adrain *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2014), was eine pathophysiologische Rolle von RHBDL2 bei Krebs und Metastasierung nahelegt.

Doch nicht nur EGF sondern auch der EGFR selbst ist ein Substrat von RHBDL2 (Liao und Carpenter, 2012). Die Inaktivierung des EGFR geschieht durch Internalisierung und Degradierung des Rezeptors (Haglund *et al.*, 2012), möglicherweise auch durch Liganden-induziertes *Shedding*, wie es bei einem verwandten Rezeptor der Fall ist (Zhou und Carpenter, 2000). Das *Shedding* des EGFR durch RHBDL2 wird durch Ligandenbindung sowie durch Kalziumeinstrom in die Zelle ausgelöst, was für einen physiologischen Prozess zur Herunterregulierung des EGFR spricht (Liao und Carpenter, 2012).

RHBDL2 spaltet außerdem die für Zellmotilität und -adhäsion verantwortlichen Proteine Ephrin B3 und B2, doch die physiologische Bedeutung von RHBDL2 in diesem Zusammenhang bleibt noch zu klären (Pascall und Brown, 2004).

Ein quantitativer Proteomikscreen zeigte die gemeinsame Expression von RHBDL2 und seinen Substraten im Epithel von Haut, Darm und Atmungsorganen sowie überlappende Assoziationen von Substraten und Protease mit Wundheilung sowie Krebs und impliziert somit eine Rolle von RHBDL2 in der epithelialen Homöostase (Johnson *et al.*, 2017).

1.4 Der IL-11-Rezeptor als potenzielles Substrat von RHBDL2

In der Literatur ist nichts über eine Verbindung von IL-11-Rezeptor (IL-11R) und RHBDL2 beschrieben. Doch einige Vorüberlegungen zu dieser Arbeit führten zu der Hypothese, dass der

Darüber hinaus sollten auch die anderen Rhomboid-Sekretasen bezüglich der IL-11R-Proteolyse untersucht werden, um die Frage nach Spezifität von RHBDL2 zu adressieren.

Ferner sollte eine eventuelle Kolokalisation von IL-11R und RHBDL2 in der Zelle durch Immunfluoreszenzfärbungen eruiert werden.

Die vermeintliche Spaltungsstelle im IL-11R sollte durch gezielte Mutationen desselben charakterisiert werden, ebenso die Rolle von Helix-destabilisierenden Aminosäuren in der TMD des IL-11R.

Nicht zuletzt sollte die biologische Aktivität des durch RHBDL2 generierten löslichen IL-11R in Zellviabilitätsassays überprüft werden.

Um die Frage der physiologischen Bedeutung der hier untersuchten Proteolyse zu beleuchten, sollte geprüft werden, ob auch endogen exprimiertes RHBDL2 zur Spaltung des IL-11R in der Lage ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Stockkonzentration 100 µg/ml; Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Stockkonzentration 100 U/ml und 100 µl/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH Chemie GmbH (München)

2.1.2 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für Western Blots (WB), Immunfluoreszenzfärbungen (IF) und Durchflusszytometrie (FACS) verwendet.

Primärantikörper

Anti-HA-Tag (C29F4)	monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen; Konzentration 1:1000 (WB und IF); Cell Signaling Technology Europe, B.V. (Frankfurt a. M.)
Anti-Myc-Tag (71D10)	monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen; Konzentration 1:1000 (WB) bzw. 1:100 (FACS); Cell Signaling Technology Europe, B.V. (Frankfurt a. M.)
Anti-Myc-Tag (9B11)	monoklonaler Antikörper aus der Maus; Konzentration 1:1000 (WB und IF); Cell Signaling Technology Europe, B.V. (Frankfurt a. M.)
Anti-RHBDL2 (12467-1-AP)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen; Konzentration 1:500 (WB); Proteintech Europe (Manchester, UK)

Anti- α -Actinin (D6F6) monoklonaler Antikörper aus der Maus; Konzentration 1:1000 (WB); Cell Signaling Technology Europe, B.V. (Frankfurt a. M.)

Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 Anti-Mouse Fluorophor-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege; Emissionswellenlänge 525 nm; Konzentration 1:300 (IF); Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit Fluorophor-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege; Emissionswellenlänge 525 nm; Konzentration 1:300 (IF) bzw. 1:100 (FACS); Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

Alexa Fluor 594 Anti-Rabbit Fluorophor-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege; Emissionswellenlänge 617 nm; Konzentration 1:300 (IF); Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

IRDye 680CW Anti-Mouse Fluorophor-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege; Emissionswellenlänge 694 nm; Konzentration 1:8000 - 1:6000 (WB); LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)

IRDye 680CW Anti-Rabbit Fluorophor-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus dem Esel; Emissionswellenlänge 694 nm; Konzentration 1:8000 - 1:6000 (WB); LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)

IRDye 800CW Anti-Mouse Fluorophor-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege; Emissionswellenlänge 795 nm; Konzentration 1:8000 - 1:6000 (WB); LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)

IRDye 800CW Anti-Rabbit Fluorophor-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus dem Esel; Emissionswellenlänge 795 nm; Konzentration

1:8000 1:6000 (WB); LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien von der Carl Roth GmbH & Co. KG in Karlsruhe bezogen.

ProLong® Gold Antifade Mountant	Eindeckmittel für fluoreszenz-markierte Zellproben; färbt Zellkerne mit DAPI-Farbstoff an; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Lysogeny Broth (LB)-Agar	Nährmedium für <i>E. coli</i> in Petrischalen; 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt und 2 % (v/w) Agar
Lysogeny Broth (LB)-Medium	Nährmedium für <i>E. coli</i> in Flüssigkultur; 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Pepton und 0,5 % (w/v) Hefeextrakt

2.1.4 Enzyme und Zytokine

Eco91I (BstEII)	Restriktionsendonuklease; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
EcoRI	Restriktionsendonuklease; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

Hyper-Interleukin-6	Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor (Fischer <i>et al.</i> , 1997); hergestellt am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Interleukin-11	ImmunoTools GmbH (Friesoythe)
NotI	Restriktionsendonuklease; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Phusion DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
 2.1.5 Geräte	
BD FACSCanto™ II	Durchflusszytometer; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Gelaire BSB 6	Sterilwerkbank; Gelaire (Sydney, Australien)
HERAcell® 150	CO ₂ -Inkubator für Zellkulturen; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Labgard Class II Type A/B3 Laminar Flow	Sterilwerkbank; NuAire (Plymouth, MN, USA)
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Elektrophorese-Kammer; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

NanoDrop® ND-1000	Spektralphotometer zur Messung von DNA-Konzentrationen; PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Odyssey® Fc Imager	Nahinfrarot-Fluoreszenz-Detektor mit zwei Kanälen für 700 nm und 800 nm; LICOR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Olympus® FLUOVIEW FV1000	Konfokales Lasermikroskop; Olympus Europa SE & Co. KG (Hamburg)
PowerPac 300 Electrophoresis Power Supply	Netzgerät für Elektrophorese; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Synergy HTX Multi-Mode Reader	BioTek Instruments GmbH (Bad Friedrichshall)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Transfersystem für Blots; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

2.1.6 Größenmarker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

2.1.7 Kits

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay	Promega GmbH (Mannheim)
--------------------------------------	-------------------------

GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)

2.1.8 Plasmide

pcDNA3.1-c-myc-hIL-11R	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-11-Rezeptor und ein N-terminales c-myc- <i>tag</i> codiert.
pcDNA3.1-mCherry	Expressionsvektor, dessen Insert für das rot fluoreszierende Protein mCherry codiert.
pcDNA3.1-HA-mRHBDL1	Expressionsvektor, dessen Insert für das murine RHBDL1 und ein dreifaches N-terminales HA- <i>tag</i> codiert. Zur Verfügung gestellt von Matthew Freeman (Adrain <i>et al.</i> , 2011).
pcDNA3.1-HA-mRHBDL2	Expressionsvektor, dessen Insert für das murine RHBDL2 und ein dreifaches N-terminales HA- <i>tag</i> codiert. Zur Verfügung gestellt von Matthew Freeman (Adrain <i>et al.</i> , 2011).
pcDNA3.1-HA-mRHBDL2-SA	Expressionsvektor, dessen Insert für das murine RHBDL2, in dem Serin 186 durch

Alanin ausgetauscht wurde, und ein dreifaches N-terminales HA-*tag* codiert.

pcDNA3.1-HA-mRHBDL3

Expressionsvektor, dessen Insert für das murine RHBDL3 und ein dreifaches N-terminales HA-*tag* codiert. Zur Verfügung gestellt von Matthew Freeman (Adrain *et al.*, 2011).

pcDNA3.1-HA-mRHBDL4

Expressionsvektor, dessen Insert für das murine RHBDL4 und ein dreifaches N-terminales HA-*tag* codiert. Zur Verfügung gestellt von Matthew Freeman (Adrain *et al.*, 2011).

2.1.9 Primer

Konstrukt	Primernamen	Sequenz
Alle IL-11R-Konstrukte	Eco91I forward-1	TCAGTACCAGGTTACCCCCGACGCCTGCGA
	NotI reverse-4	GGAGCTCCAAACCTGTAGGCGGCCGCTCGA
IL-11R-A367G	A367G-2	CAAAGACGCCAGCACTCCTACCTGCTCCAC
	A367G-3	GTGGAGCAGGTAGGAGTGCTGGCGTCTTTG
IL-11R-A367Y	A367Y-2	CAAAGACGCCAGCACGTATACCTGCTCCAC
	A367Y-3	GTGGAGCAGGTATACGTGCTGGCGTCTTTG
IL-11R-A370G	A370G-2	AAGGATTCCCAAAGATCCCAGCACAGCTAC
	A370G-3	GTAGCTGTGCTGGGATCTTTGGGAATCCTT
IL-11R-A370Y	A370Y-2	AAGGATTCCCAAAGAGTACAGCACAGCTAC
	A370Y-3	GTAGCTGTGCTGTACTCTTTGGGAATCCTT
IL-11R-G373L	G373L-2	GGAAAGAAAGGATCAGCAAAGACGCCAGCA
	G373L-3	TGCTGGCGTCTTTGCTGATCCTTTCTTTCC
IL-11R-S376L	S376L-2	ACCAGTCCCAGGAATAGAAGGATTCCCAA
	S376L-3	TTTGGGAATCCTTCTATTCCTGGGACTGGT
IL-11R-G379L	G379L-2	GGCCCCAGCCACCAGTAACAGGAAAGAAAG
	G379L-3	CTTTCTTTCTGTTACTGGTGGCTGGGGCC
IL-11R-G383L	G383L-2	CCAGTGCCAGGGCTAGAGCCACCAGTCCCA
	G383L-3	TGGGACTGGTGGCTCTAGCCCTGGCACTGG
IL-11R-G388L	G388L-2	TCTCAGCCTCAGCCAGAGTAGCAGTGCCAG
	G388L-3	CTGGCACTGCTACTCTGGCTGAGGCTGAGA
RHBDL2-S186A (RHBDL2-SA)	S186A-1	CCAGACTACGCAGAATTCATGGAGAGTGTG
	S186A-2	ATAGACTCCTCCTGCAGCTCCCACAAGAGA
	S186A-3	TCTCTTGTGGGAGCTGCAGGAGGAGTCTAT
	S186A-4	GATATCTGCAGAATTCGCCCTTGCTCTAGA

2.1.10 Puffer, Lösungen und Medien

Für alle Puffer wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

DNA-Agarosegelelektrophorese

Ladepuffer	Bromphenolblau Glycerol in TBE-Puffer Xylencyanol	0,1 % (w/v) 20 % (v/v) 0,1 % (w/v)
TBE-Puffer (0,5×)	Borsäure EDTA Tris-HCl (pH 8,0)	44,5 mM 10,0 mM 44,5 mM
Agarosegel (50 ml)	TBE-Puffer (0,5×) Agarose Ethidiumbromid	50 ml 1 % (w/v) 3 µl

Durchflusszytometrie (FACS)

Phosphate Buffered Saline (PBS)	NaCl Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)	150 mM 8 mM 1,7 mM
FACS-Puffer	Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS	1 % (w/v)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli-Puffer (5×)	SDS β-Mercaptoethanol Glycerol Bromphenolblau Tris-HCl (pH 6,8)	2 % (w/v) 5 % (w/v) 10 % (w/v) 0,13 % (w/v) 60 mM
Laufpuffer (10×)	Tris-HCl (pH 8,3) Glycin Natriumdodecylsulfat (SDS)	25 mM 192 mM 0,1 % (w/v)
Sammelgel (6 ml)	Acrylamid 30 % Sammelgel-Puffer Tetramethylethylenediamin (TEMED) Ammoniumpersulfat (APS) ddH ₂ O	1 ml 1,5 ml 6 µl 60 µl 3,44 µl
Sammelgel-Puffer	Tris Natriumdodecylsulfat (SDS) HCl	0,5 M 0,4 % pH 6,8

Trenngel (10 % Acrylamid, 10 ml)	Acrylamid 30 % Trenngel-Puffer Tetramethylethylenediamin (TEMED) Ammoniumpersulfat (APS) ddH ₂ O	3,3 ml 2,6 ml 4 µl 100 µl 4 ml
Trenngel-Puffer	Tris Natriumdodecylsulfat (SDS) HCl	1,5 M 0,4 % pH 8,8

Western Blot

Tris Buffered Saline (TBS)	Tris-HCl (pH 8,0) NaCl	10 mM 150 mM
TBS-T	Tween-20 in TBS	0,05 % (v/v)
Transferpuffer	Tris-HCl (pH 8,5) Glycin SDS Methanol	25 mM 200 mM 0,01 % 20 % (v/v)
Blocking-Puffer	<i>Odyssey® Blocking Buffer</i> (LI-COR Biosciences GmbH)	50 % (v/v)

Zellyse

Lysepuffer	Tris/HCl NaCl Triton X-100 Protease Inhibitor Cocktail Complete, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	50 mM 150 mM 1 % 1 Tablette auf 50 ml
------------	--	--

Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München); verwendet für HEK293- und HeLa-Zellen
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Gibco™ DMEM, high glucose	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA); verwendet für BaF/3-gp130-Zellen

Zellkultur-Reagenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Ionomycin	Induktor von ADAM10; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Marimastat	Breitband-Matrixmetalloproteasen-Inhibitor; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

2.1.11 Software

BD FACSDiva™ Software	Erhebung und Auswertung von Daten der Durchflusszytometrie; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FV10-ASW Software	Erhebung von Daten der konfokalen Lasermikroskopie; Olympus Europa SE & Co. KG (Hamburg)
GraphPad Prism	Auswertung von Daten der Durchflusszytometrie und der Zellviabilitätsassays; GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Image Studio™ Software	Erhebung von Daten der Western Blots; LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Office 2010	Darstellung von Daten; Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders beschrieben wurden Pipettiermaterial, Reaktionsgefäße und Zellkultur-Gefäße von der Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht) bezogen.

Amersham™ Protran® 0,2 µm	Nitrocellulose-Membran; GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
CELLSTAR® TC-Platte 6 well	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Deckgläser und Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Parafilm	Laborfolie; Cole-Parmer GmbH (Wertheim)
Whatman®-Papier	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

2.1.13 Zelllinien

HEK293	immortalisierte, humane embryonale Nierenkarzinomzellen; bezogen von der DSMZ GmbH (Braunschweig)
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen; bezogen von der DSMZ GmbH (Braunschweig)
Ba/F3-gp130	Cytokin-abhängige, murine Pro-B-Zelllinie; stabil transfiziert mit cDNA für gp130; bezogen von Immunex (Seattle, WA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Gezielte DNA-Mutagenese mittels SOE-PCR

Splicing-by-Overlap-Extension-PCR

Um gezielt Mutationen in DNA-Plasmide einzubringen, wurde die Methodik der Splicing-by-Overlap-Extension-PCR (SOE-PCR) angewendet. Pro Konstrukt wurden drei PCR mit insgesamt vier verschiedenen Primern angesetzt. Mithilfe der PCR 1 und 2 wurden jeweils mit einem Primer, der die gewünschte Mutation enthielt, (P2 bzw. P3, siehe Abb. 5) und einem flankierenden Primer (P1 bzw. P4, siehe Abb. 5) zwei DNA-Fragmente vervielfältigt, deren Basensequenzen teilweise komplementär waren. Die beiden die Mutation enthaltenden Primer waren komplementär und enthielten je nach Konstrukt eine bis drei ausgetauschte Basen, die für die gewünschte Aminosäure codierten. So entstanden zwei Fragmente, deren Enden jeweils ein flankierender und ein die Mutation enthaltender Primer bildeten.

Die mit Ladepuffer versehenen Produkte der PCR 1 und 2 wurden neben einem DNA-Größenmarker auf einem 1%igen Agarose-Gel, welchem Ethidiumbromid zugesetzt wurde, bei 110 V 45 Minuten aufgetrennt. Die Bande der amplifizierten Fragmente wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten und mit dem GeneJET Gel Extraction Kit aufgereinigt.

In der PCR 3 fusionierten die extrahierten Produkte der PCR 1 und 2 und das Fusionsprodukt wurde unter Verwendung der beiden flankierenden Primer (P1 und P4, siehe Abb. 5) amplifiziert und wie oben beschrieben aufgereinigt.

Die genauen Angaben zu den PCR-Ansätzen und -Programmen sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

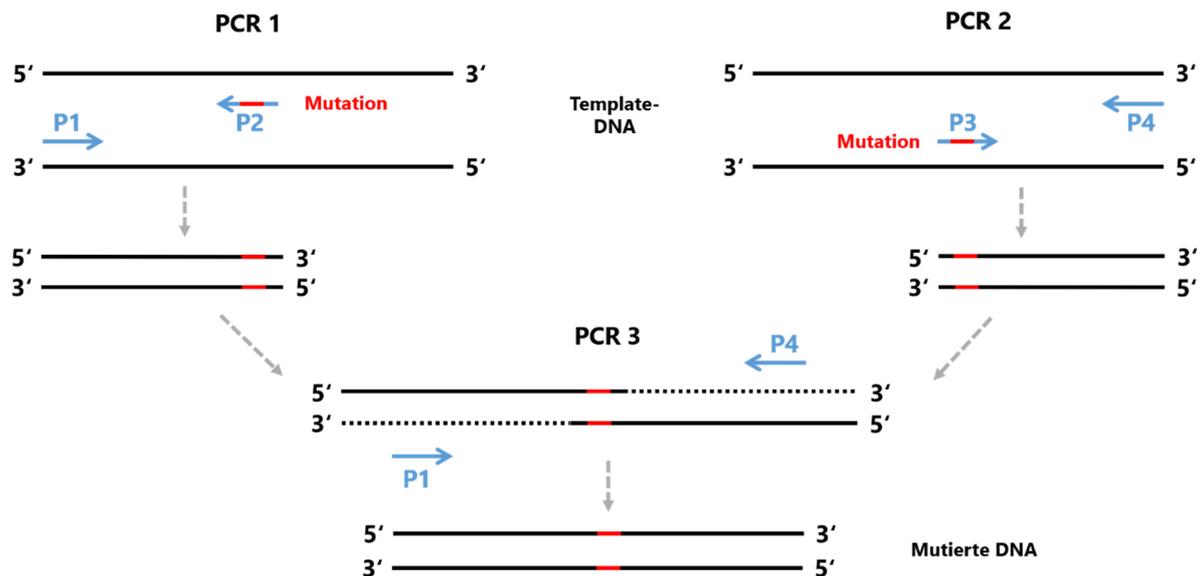


Abbildung 5: Schema der Splicing-by-Overlap-Extension-PCR. Unter Zuhilfenahme zweier flankierender Primer (P1 und P4) und zweier komplementärer, die Mutation enthaltender Primer (P2 und P3) wurden in zwei parallelen PCR-Ansätzen (PCR 1 und PCR 2) zwei DNA-Fragmente der Template-DNA vervielfältigt, deren Basensequenzen sich teilweise komplementär waren. In einer dritten PCR (PCR 3) konnten die amplifizierten Produkte aus PCR 1 und 2 hybridisieren, sodass ein Fusionsprodukt entstand, welches die gewünschte Mutation enthielt und mithilfe der flankierenden Primer (P1 und P4) vervielfältigt wurde.

Tabelle 1: Mastermix für PCR 1, 2 und 3.

PCR 1 und 2	Menge [µl]	PCR 3	Menge [µl]
5× HF Puffer	10	5× HF Puffer	10
dNTP-Mix	1	dNTP-Mix	1
Forward Primer	1	Forward Primer	1
Reverse Primer	1	Reverse Primer	1
Template (Plasmid)	x (10 ng)	PCR-Produkt 1	2
Phusion DNA Polymerase	0,5	PCR-Produkt 2	2
ddH ₂ O	ad 50	Phusion DNA Polymerase	0,5
		ddH ₂ O	ad 50

Tabelle 2: PCR-Programm für PCR 1, 2 und 3. Abweichende Zeiten für PCR 3 in Klammern.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s] (PCR 3)	Zyklen
1) Initiale Denaturierung	98	30	1
2) Denaturierung	98	10	32
3) Annealing	65	30	
4) Elongation	72	15 (30)	
5) Elongation	72	300	1
6) Lagerung	4	∞	1

Restriktionsspaltung und Ligation von Vektor und PCR-Produkt

Um das die Mutation enthaltende DNA-Fragment in den jeweiligen pcDNA3.1-Vektor einzubringen, wurden der Vektor und das Fusionsprodukt aus der PCR 3 mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dafür wurden ca. 5 µg des Vektors bzw. das gesamte aufgereinigte Fusionsprodukt mit 1 µl Restriktionsendonuklease sowie 5 µl Restriktionsendonuklease-Puffer zu 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt und für 2,5 h bei 37° C inkubiert. Der gespaltene Vektor wurde zudem für 30 Minuten und bei 37° C mit 1 µl FastAP behandelt, um die 5'- und 3'-Enden der DNA zu dephosphorylieren, wodurch eine spätere Ligation mit dem PCR-Produkt ermöglicht wurde. Der Vektor wurde mithilfe von Gelextraktion wie oben beschrieben extrahiert, das PCR-Produkt wurde ohne vorherigen Gellauf mit dem Gelextraktions-Kit aufgereinigt.

Für die Ligation wurden PCR-Produkt und Vektor im Verhältnis 3:1 mit 1 µl T4 DNA-Ligase und 2 µl 10× Ligase-Puffer zu einem 20 µl-Ansatz mit ddH₂O aufgefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Außerdem wurde ein Kontrollansatz ohne das PCR-Produkt hergestellt.

Transformation von kompetenten Bakterien und Plasmidpräparation

Zur Vermehrung des gewünschten Plasmids wurden 5 µl des Ligationsproduktes bzw. des Kontrollansatzes mit 50 µl kompetenten *Escherichia coli XL1-blue* 10 Minuten auf Eis inkubiert, dann 1 Minute bei 42° C hitzegeschockt und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 350 µl LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37° C schüttelnd inkubiert und auf einer LB-Agarplatte mit 0,1 % Ampicillin ausgestrichen. Die im Plasmid enthaltene Ampicillin-Resistenz ermöglichte die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien. Nach Inkubation über Nacht bei 37° C wurden pro Konstrukt mehrere Bakterienkolonien in je 2 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin

überführt und für eine weitere Nacht bei 37° C schüttelnd inkubiert. Von der Flüssigkultur wurden 1,5 ml zur Plasmidpräparation mithilfe des GeneJET Plasmid Miniprep-Kits und des dazugehörigen Herstellerprotokolls verwendet. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Plasmide wurden mithilfe des Nanodrop® ND-1000-Spektrophotometers bestimmt und angepasst.

Die Konstrukte wurden durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, Baden-Württemberg) sequenziert und auf Richtigkeit überprüft.

Vervielfältigung von Plasmiden

Um größere Mengen eines korrekt klonierten Plasmids zu gewinnen, wurden kompetente Bakterien wie oben beschrieben mit 1 µg des gewünschten Plasmids transformiert und auf einer LB-Agarplatte mit 0,1 % Ampicillin selektioniert. Eine Bakterienkolonie wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium und 0,1 % Ampicillin überführt und schüttelnd bei 37° C über Nacht inkubiert. Die Plasmide wurden dann aus der angewachsenen Flüssigkultur mithilfe des NucleoBond® Xtra Midi-Kits und des dazugehörigen Protokolls extrahiert. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Plasmide wurden mithilfe des Nanodrop® ND-1000-Spektralphotometers bestimmt und durch Verdünnung mit ddH₂O auf Werte um 2000 ng/ml eingestellt.

2.2.2 Zellkultur

Kultivierung von Zellen

Die adhärenenten Zelllinien HEK293 und HeLa wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (*high glucose*) mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 10 % FCS (im Folgenden als DMEM+/+ bezeichnet) auf 10 cm-*tissue-culture*-Schalen (10 cm-TC-Schalen) kultiviert, welche eine Standard-Wachstumsfläche für adhärenente Zellen aufweisen. Die Suspensionszelllinie Ba/F3-gp130 wurde in DMEM+/+ auf Petrischalen kultiviert. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37° C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ (v/v) gelagert.

Um ausreichend Fläche und Nährstoffe für ein optimales Zellwachstum zu gewähren, wurden die Zellkulturen wöchentlich passagiert und auf neue Schalen mit neuem Medium überführt.

Für HEK293-Zellen wurde der Zellrasen einer voll bewachsenen Zellkultur-Schale vom Medium befreit, in 10 ml PBS resuspendiert und bei 1.300 g für 4 Minuten zentrifugiert. Die vom Überstand befreiten Zellen wurden in DMEM+/+ aufgenommen und 1/20 bis 1/10 der Suspension auf eine neue Schale gegeben, welche dann auf 10 ml Medium aufgefüllt wurde.

HeLa-Zellen sind etwas stärker adhärent als HEK293-Zellen und wurden daher erst mit 10 ml PBS in der Schale gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung 5 Minuten bei 37° C inkubiert, sodass sich die Zell-Oberflächenverbindungen lösten und die Zellen abgelöst werden konnten. Die Trypsin-Aktivität wurde durch Zugabe von 9 ml DMEM+/+ angehalten und die Zellen bei 1.300 g für 4 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml DMEM+/+ aufgenommen und in oben beschriebener Weise passagiert.

Ba/F3-gp130-Zellen stammen von murinen Pro-B-Zellen ab und proliferieren nur unter Zugabe von gp130-aktivierenden Wachstumsfaktoren. Diese Zellen wurden mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 im Medium kultiviert. Von einer vollen Zellkultur-Schale wurde 1/100 bis 1/50 der Zellsuspension entnommen und auf eine neue Schale überführt, welche dann auf 10 ml mit DMEM+/+ aufgefüllt wurde.

Transiente Transfektion von Zellen

Für Experimente in dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen sowie HeLa-Zellen transient transfiziert. Das heißt, es wurden Plasmide in die Zellen geschleust, um die zeitweilige Produktion von in den Vektoren codierten Proteinen zu erwirken. Eine Auflistung der in die Zellen eingebrachten Plasmide ist unter 2.1.8 zu finden.

Die gewünschte Zellzahl wurde ausgesät und am nächsten Tag wurden die Zellen mit den folgenden Ansätzen transfiziert (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Transfektion von Zellen. DMEM-/- steht für Medium ohne Zusätze.

Zellkulturgefäß	Zellzahl bei Aussaat	Transfektionsansatz		
		DMEM-/-	Plasmid für Einzel- bzw. Koftransfektion	TurboFect™
10 cm-TC-Schale	$1,5-2,0 \times 10^6$	1000 µl	5 µg bzw. 2,5 µg + 2,5 µg	10 µl
6 cm-TC-Schale	$0,7 \times 10^6$	400 µl	4 µg bzw. 2 µg + 2 µg	5 µl
6-well-Platte	$0,35 \times 10^6$	200 µl	2 µg bzw. 1 µg + 1 µg	2 µl

Bei HeLa-Zellen wurde vor Zugabe des Transfektionsansatzes das Medium der Zellen durch die halbe Menge frischen DMEM+/+ ausgetauscht, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Das Medium wurde am nächsten Tag wieder auf 10 ml aufgefüllt.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden bei jedem Experiment zusätzlich Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches die DNA für das rot fluoreszierende Protein mCherry enthält. Dieses Protein reichert sich im Zytoplasma der Zellen an. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde 24 Stunden nach der Transfektion der Anteil der Zellen bestimmt, welche eine rote Fluoreszenz zeigten und somit das Plasmid aufgenommen hatten.

Stimulation von Zellen

Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zelleexperimente begonnen. Dazu wurden die Zellen zunächst von Medium befreit und mit PBS in der Schale gewaschen. Anschließend wurden 4 ml zusatzfreies Medium (DMEM-/-) in 10 cm-Schalen bzw. 1 ml DMEM-/- in ein well einer 6-well-Platte gegeben und die Zellen für den gewünschten Zeitraum bei 37°C inkubiert. Stimulantien oder Inhibitoren wurden dem Medium gegebenenfalls hinzugefügt.

2.2.3 Verarbeitung von Zellkulturüberständen und Zellen

TCA-Fällung von Zellkulturüberständen

Zur Analyse der Zellkulturüberstände wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und gefällt. Dazu wurde 1 ml des Mediums, in dem die Zellen für das jeweilige Experiment inkubiert wurden, bei 1.200 g und 4° C für 10 Minuten zentrifugiert, um gelöste Zellen zu sedimentieren.

Der Überstand wurde dann in einem neuen Gefäß bei 18.000 g und 4° C für 20 Minuten zentrifugiert, um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 1 ml 20 % Trichloressigsäure (TCA) gemischt, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und bei 18.000 g und 4° C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um Reste von TCA zu entfernen, wurde das gefällte Sediment mit 350 µl eiskaltem Aceton gewaschen, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und bei 18.000 g und 4° C für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Trocknung des Pellets wurde dieses in 30 µl 2,5-fachen Laemmli-Puffer gelöst und 10 Minuten bei 95° C schüttelnd aufgeköcht.

Herstellung von Zelllysaten

Die von Medium befreiten Zellen wurden in PBS resuspendiert und bei 1.300 g und 4° C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet je nach Größe 1:1 in 60–300 µl Lysepuffer aufgenommen und 1 Stunde auf Eis inkubiert, während das Gemisch einige Male mithilfe eines Vortexmischers verwirbelt wurde. Die lysierten Zellen wurden bei 18.000 g und 4° C für 20 Minuten zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Für die Vorbereitung eines Zelllysats für die SDS-PAGE wurden 20 µl Lysat mit 4 µl 5-fachem Laemmli-Puffer gemischt und für 10 Minuten bei 95° C schüttelnd aufgeköcht.

2.2.4 SDS-PAGE und Western Blot

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde die Methode der SDS-PAGE nach Laemmli angewandt. Es wurden dafür 10%ige Polyacrylamid-Gele, welche aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel bestanden, selbst hergestellt. Die Gele wurden in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und mit Proben sowie 2,5 µl Molekulargewichtsmarker beladen. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 80 V statt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, und wurde dann bei 130 V für 70 Minuten fortgeführt.

Western Blot

Um die der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran zu transferieren, wurde die *Western Blot*-Methode durchgeführt. Dafür wurden in die Kassette eines *Semi-Dry-Blotters* fünf in Transferpuffer getränkte Whatman®-Papiere, eine Nitrocellulose-Membran, das Polyacrylamid-Gel und fünf weitere Whatman®-Papiere geschichtet. Am Boden der Kassette befand sich die Anode, im Deckel die Katode, sodass die Proteine bei einer angelegten Spannung von 25 V für 40 Minuten vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrocellulose-Membran wanderten.

Detektion von Proteinen

Nach dem Blot wurde die Nitrocellulose-Membran einmal in TBS gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 ml Blocking-Puffer inkubiert. Die Primär-Antikörper-Inkubation erfolgte in 5 % BSA in TBS-T über Nacht bei 4°C, wobei beim Einsatz von mehreren Primär-Antikörpern verschiedene Spezies gewählt wurden (für Konzentrationen siehe 2.1.2). Nach dreimaligem Waschen der Membran für je 10 Minuten in TBS-T wurden die Sekundär-Antikörper, den Spezies der Primär-Antikörper entsprechend und mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt, in 5 % BSA in TBS-T eingesetzt. Die Membran wurde einmal mit TBS-T und dreimal mit TBS für je 10 Minuten gewaschen, woraufhin die Fluoreszenzsignale mit dem Odyssey® Fc Imager im 700 nm- und 800 nm-Kanal detektiert wurden.

2.2.5 Zellviabilitätsassay

Mithilfe eines Zellviabilitätsassays kann das Wachstum von Zellen quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde der CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay der Firma Promega verwendet, um die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen zu messen, welche unterschiedlichen Konditionen ausgesetzt wurden. Das CellTiter-Blue™-Reagens enthält Resazurin, welches von metabolisch aktiven und folglich lebenden Zellen zu Resofurin reduziert werden kann. Die Fluoreszenz von Resofurin kann mit einer Exzitationswellenlänge von 579 nm angeregt und einer Emissionwellenlänge von 584 nm gemessen werden.

Es wurden Ba/F3-gp130-Zellen in PBS gewaschen, in 5 ml DMEM+/+ mit 20 % FCS resuspendiert, gezählt und auf eine Konzentration von 10^5 Zellen/ml gebracht. Pro *well* einer

96-*well*-Platte wurden 50 µl der Zellsuspension vorgelegt, was einer Zellzahl von 5000 Zellen pro *well* entspricht. Zu den Zellen wurden 50 µl eines konditionierten Mediums gegeben, woraufhin sie für 48 h inkubiert wurden. Das konditionierte Medium enthielt 90 % frisches DMEM-/- und 10 % Überstände von mit RHBDL2 und IL-11R-Varianten transfizierten HEK293-Zellen, welche 48 h inkubiert wurden. Außerdem wurden dem konditionierten Medium gegebenenfalls 500 ng/ml IL-11 bzw. 10 ng/ml Hyper-IL-6 hinzugefügt. Das Pipettierschema ist in folgender Tabelle (Tabelle 4) abgebildet.

Tabelle 4: Pipettierschema des Zellviabilitätsassays. 5000 Zellen/*well*, Ü1–8 entsprechen Überständen verschieden transfizierter HEK293-Zellen, Negativkontrolle mit DMEM-/- (NK), Negativkontrolle nur mit IL-11, Positivkontrolle mit Hyper-IL-6 (Hy-IL-6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ü1	Ü1	Ü1	Ü1 + IL-11	Ü1 + IL-11	Ü1 + IL-11	NK	NK	NK			
B	Ü2	Ü2	Ü2	Ü2 + IL-11	Ü2 + IL-11	Ü2 + IL-11	IL-11	IL-11	IL-11			
C	Ü3	Ü3	Ü3	Ü3 + IL-11	Ü3 + IL-11	Ü3 + IL-11	Hy- IL-6	Hy- IL-6	Hy- IL-6			
D	Ü4	Ü4	Ü4	Ü4 + IL-11	Ü4 + IL-11	Ü4 + IL-11						
E	Ü5	Ü5	Ü5	Ü5 + IL-11	Ü5 + IL-11	Ü5 + IL-11						
F	Ü6	Ü6	Ü6	Ü6 + IL-11	Ü6 + IL-11	Ü6 + IL-11						
G	Ü7	Ü7	Ü7	Ü7 + IL-11	Ü7 + IL-11	Ü7 + IL-11						
H	Ü8	Ü8	Ü8	Ü8 + IL-11	Ü8 + IL-11	Ü8 + IL-11						

In jedes *well* mit Ba/F3-gp130-Zellen wurden 20 µl CellTiter-Blue™-Reagens pipettiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz mithilfe des Synergy HTX Multi-Mode Readers bei 37°C zum Zeitpunkt 0 und nach 60 Minuten bei 590 nm gemessen. In jedem Experiment wurden die Versuchssituationen als Triplikate angefertigt. Zur Normalisierung wurden die zum Zeitpunkt 0 gemessenen Werte von den nach 60 Minuten gemessenen Werte subtrahiert und als *relative light units* (RLU) angegeben.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren, mit dem Eigenschaften einzelner Zellen wie Größe, Granularität oder auch Fluoreszenz gemessen werden können. Parameter bei diesem Messverfahren sind die Effekte, die eine Zelle bei der schnellen Passage eines Laserstrahls hervorruft. Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit angewendet, um die Oberflächenexpression des IL-11-Rezeptors auf transfizierten Zellen zu messen. Dazu wurden zunächst HEK293-Zellen transient mit dem IL-11-Rezeptor, beziehungsweise Varianten davon, transfiziert und anschließend wie folgend beschrieben vermessen.

Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion aus der 6-*well*-Platte entnommen, in Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser und alle folgenden Zentrifugationsschritte fanden bei 600 g und 4° C für 7 Minuten statt. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und 300 µl dieser Zellsuspension wurden für die Durchflusszytometrie verwendet, der Rest wurde wie weiter oben beschrieben lysiert.

Der Primärantikörper Anti-Myc-Tag (71D10) wurde im Verhältnis 1:100 in FACS-Puffer verdünnt. Die Zellen wurden in jeweils 100 µl der Primärantikörperlösung für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit unter gleichen Bedingungen wie bei dem Primärantikörper, allerdings im Dunklen. Die zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschenen und zentrifugierten Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, sodass die Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen werden konnte.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Um die Lokalisation der zu untersuchenden Proteine in der Zelle zu bestimmen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und die gefärbten Zellen anschließend mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops untersucht.

Zunächst wurden HeLa-Zellen wie in 2.2.2 beschrieben in einer 10cm-TC-Schale ausgesät und mit Plasmid-DNA für IL-11R, RHBDL2 oder RHBDL2-SA transfiziert (für Plasmide s.

Abschnitt 2.1.8). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension gebracht und 2/3 der Zellsuspension in eine mit unbeschichteten Deckgläschen bestückte Petrischale überführt, welche dann mit DMEM+/+ auf 10 ml aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und adhärten an den Deckgläschen.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen 48 h nach der Transfektion dreimal mit PBS gewaschen und daraufhin mit 4 % PFA in PBS für 10 Minuten fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,12 % Glycin in PBS behandelt, um freie Aldehydgruppen zu binden und somit unspezifische Antikörperbindungen an diesen zu reduzieren. Zum weiteren Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen mit 10 % FCS in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn eine intrazelluläre Färbung erfolgen sollte, wurden der 10 %-FCS-Lösung 0,2 % Saponin zugesetzt, sodass die Zellen permeabilisiert wurden. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurden pro Deckgläschen 80 µl einer 1:2000-Verdünnung des Primärantikörpers in 10 % FCS (und gegebenenfalls 0,2 % Saponin) in PBS auf einen Parafilmstreifen pipettiert und die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen fünfmal in PBS (gegebenenfalls mit 0,2 % Saponin) getaucht. Die fluoreszierenden Sekundärantikörper, welche an die Fluorochrome Alexa Fluor 488 beziehungsweise Alexa Fluor 594 gekoppelt waren, wurden 1:300 verdünnt und die Deckgläschen mit dieser Lösung in Dunkelheit inkubiert, wobei ansonsten wie bei der Primärantikörper-Inkubation verfahren wurde. Anschließend wurden die Deckgläschen fünfmal in PBS (gegebenenfalls mit 0,2 % Saponin) und zweimal in Wasser getaucht. Auf einem Objektträger wurden zwei Deckgläschen der gleichen Färbung mit je einem Tropfen ProLong® Gold Antifade Mountant eingedeckt und über Nacht ausgehärtet. Der im Eindeckmittel enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert mit DNA und färbt somit die Zellkerne an.

Als Kontrolle wurden bei jedem Experiment auch untransfizierte Zellen gefärbt. Außerdem wurden Negativkontrollen angefertigt, bei der die Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, um das Ausmaß unspezifischer Bindungen abzubilden.

Letztlich wurden die vorbereiteten Zellen mithilfe des Mikroskops Olympus® FLUOVIEW FV1000 sichtbar gemacht. Die Exzitationslaser wurden den Exzitationswellenlängen der Fluorochrome Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 sowie DAPI entsprechend eingestellt, sodass Bilder in drei Kanälen aufgenommen wurden. Außerdem wurde ein Transmissionsbild erstellt. Die Bildaufnahmen erfolgten stets als sequentielle Scans, damit Exzitation und Detektion der einzelnen Fluorochrome getrennt abliefen. Außerdem wurde der Kalman-Filter während der Detektion angewendet, um Hintergrundrauschen zu reduzieren und Signale zu verstärken.

3 Ergebnisse

3.1 Der IL-11R ist ein Substrat von RHBDL2

RHBDL2 favorisiert im Bereich der Spaltungsstelle seiner Substrate Aminosäuren, die bestimmte chemische Eigenschaften aufweisen. In P1-Position (nach Schechter und Berger, 1967) befindet sich eine Aminosäure mit einer kleinen Seitenkette wie Alanin, in P4- und P2'-Position wird eine Aminosäure mit einer großen, hydrophoben Seitenkette bevorzugt (Adrain *et al.*, 2011).

Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz des IL-11R lassen sich im extrazellulären Bereich, wenige Aminosäuren außerhalb der TMD, zwei solcher Motive finden (s. Abb. 6). Erachtet man Alanin-367 als mögliche P1-Aminosäure, so wäre Glutaminsäure-364 mit großer Seitenkette in P4-Position und Leucin-369 mit hydrophober Seitenkette in P2'-Position. Im zweiten möglichen Erkennungsmotiv ist Alanin-370 in P1-Position, Alanin-367 mit hydrophober Seitenkette an P4-Position und die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Leucin-372 in P2'-Position.

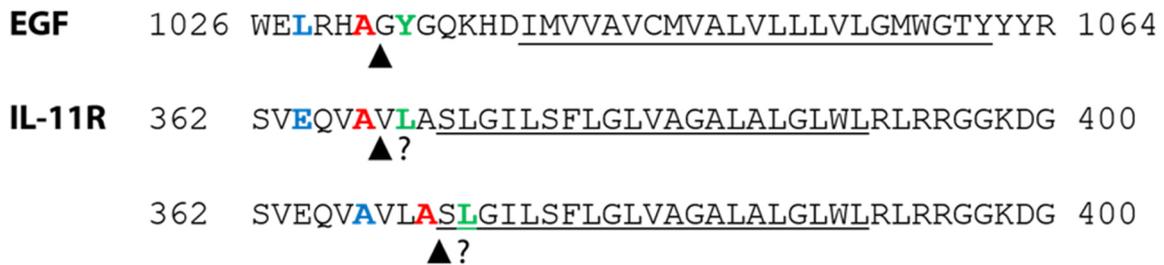


Abbildung 6: Mögliche Erkennungsmotive für RHBDL2 im IL-11-Rezeptor. Als Substrat von RHBDL2 weist der murine Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) in seiner Aminosäuresequenz ein Erkennungsmotiv auf, gekennzeichnet durch eine kleine Aminosäure in P1-Position (rot) sowie eine große und/oder hydrophobe Aminosäure in P4- und P2'-Position (blau und grün). Der IL-11-Rezeptor (IL-11R) weist in der Nähe seiner Transmembranregion zwei mögliche Erkennungsmotive für RHBDL2 auf. Die Spaltstelle ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Die Transmembranregion ist unterstrichen. Potenzielle Spaltstellen sind mit einem Dreieck und einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Die Hypothese, dass der IL-11R ein Substrat von RHBDL2 sein könnte, sollte daher mithilfe von Zellkultur-Experimenten überprüft werden.

3.1.1 Spaltung des IL-11R durch RHBDL2 in transfizierten HEK293-Zellen

Die Interaktion von RHBDL2 mit dem IL-11R sollte zunächst in einem Überexpressionsmodell in Säugerzellen untersucht werden. Gleichmaßen sollten die anderen in Säugern vorkommenden Sekretasen der Rhomboid-Familie auf die Fähigkeit zur Proteolyse des IL-11R getestet werden, um eine mögliche Spezifität zu erkennen.

Die für die Zell-Transfektion verwendeten Plasmide waren so konstruiert, dass die Proteine mit einem *tag* am N-Terminus exprimiert wurden. Die *tags* haben keinen funktionellen Einfluss, ermöglichen jedoch eine leichtere Detektion der Proteine mittels Western Blot. HEK293-Zellen wurden mit HA-*getaggetem* RHBDL1, RHBDL2, RHBDL3 oder RHBDL4 und jeweils myc-*getaggetem* IL-11R oder mCherry kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch serumfreies Medium ausgetauscht und nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C wurden die Überstände der Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Mit den Überständen und Lysaten wurde ein Western Blot durchgeführt, woraufhin die Membranen mit Anti-Myc-Tag und Anti-HA-Tag inkubiert wurden. Als Ladekontrolle diente Actinin, da es als Strukturprotein konstitutiv in der hier untersuchten Zelllinie exprimiert wird.

Die HEK293-Zellen exprimierten die gewollten Proteine, was an den entsprechenden Banden für IL-11R und RHBDL1-4 in den Lysaten zu erkennen ist (s. Abb. 7). Für den IL-11R erschienen drei getrennte Banden im Western Blot. Diese kommen wahrscheinlich durch unterschiedliche Glykosylierungen des Proteins zustande (Agthe *et al.*, 2018). Im Überstand der Zellen, die mit IL-11R und RHBDL2 kotransfiziert wurden, konnte eine Doppelbande von etwas weniger als 55 kDa für den IL-11R detektiert werden. Dies spricht dafür, dass RHBDL2 den IL-11R proteolytisch spaltet, sodass dieser in den Überstand freigesetzt wird. Im Überstand der mit IL-11R und RHBDL1, RHBDL3 oder RHBDL4 kotransfizierten Zellen hingegen erschien keine Bande, was dafürspricht, dass diese Rhomboid-Sekretasen keinen löslichen IL-11R erzeugen können. Dies wiederum zeigt, dass die Proteolyse des IL-11R innerhalb der Rhomboid-Sekretasen für RHBDL2 spezifisch ist.

In den Lysaten der mit IL-11R und RHBDL2 transfizierten Zellen erscheint eine zusätzliche vierte Bande für den IL-11R (s. Abb. 7). Aufgrund ihrer geringeren Größe könnte dies eine Form des IL-11R sein, die begünstigt durch die Überexpression bereits im sekretorischen Weg

zur Zellmembran auf RHBDL2 trifft und proteolytisch gespalten wird. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass ebenso begünstigt durch die Überexpression Glykosylierungsvorgänge des IL-11R nicht suffizient ablaufen. In der Folge könnte eine unvollständig glykolysierte und somit wahrscheinlich kleinere Form des IL-11R detektiert werden. Das Phänomen der zusätzlichen Bande in Zelllysaten wurde auch bei anderen RHBDL2-Substraten beobachtet (Johnson *et al.*, 2017).

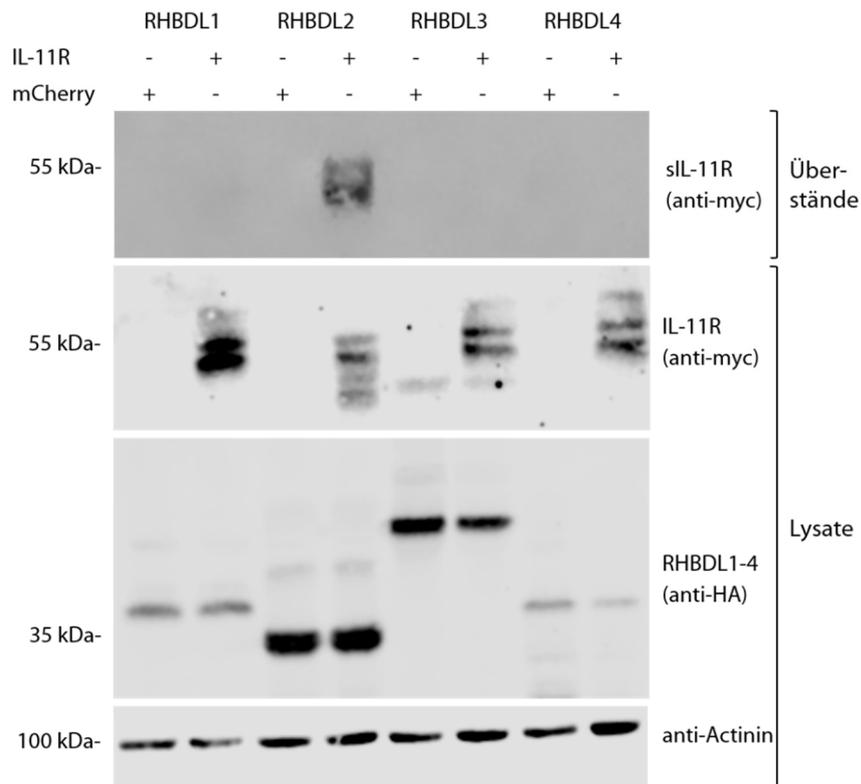


Abbildung 7: Kotransfektion von IL-11-Rezeptor und Rhomboid-Sekretasen. HEK293-Zellen wurden mit HA-getagtem RHBDL1-4 und myc-getagtem IL-11-Rezeptor (IL-11R) oder mCherry transient kotransfiziert. Überstände und Lysate der Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Actinin diente als Ladekontrolle. Löslicher IL-11R war nur im Überstand von mit IL-11R und RHBDL2 transfizierten Zellen detektierbar. In den Lysaten dieser Zellen erscheint eine zusätzliche Bande für den IL-11R. Der Western Blot repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Klonierung einer katalytisch inaktiven Variante von RHBDL2

Um nachzuweisen, dass RHBDL2 proteolytisch aktiv sein muss, um löslichen IL-11R freizusetzen, wurde zunächst eine katalytisch inaktive Variante von RHBDL2 kloniert. Diese Variante wird im Folgenden als RHBDL2-SA bezeichnet. Sollte löslicher IL-11R im Überstand von mit IL-11R und RHBDL2 transfizierten Zellen detektierbar sein, jedoch nicht im Überstand von mit IL-11R und RHBDL2-SA transfizierten Zellen, so spricht dies dafür, dass tatsächlich RHBDL2 an der Proteolyse beteiligt ist.

Für die Klonierung stand das Plasmid pcDNA3.1-HA-mRHBDL2 zur Verfügung, in dem mittels SOE-PCR und den unter 2.1.9 aufgeführten Primern Serin-168 im katalytischen Zentrum der Protease durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Die angewandten Methoden sind unter 2.2.1 im Detail beschrieben. In der ersten und zweiten PCR wurden mithilfe der Primer S186A-1 und S186A-2 beziehungsweise S186A-3 und S186A-4 die gewünschte Mutation eingefügt und die entstandenen Fragmente amplifiziert (s. Abb. 8A u. B). Nach Aufreinigung der Produkte der PCR 1 und 2 wurden die Fragmente in einer dritten PCR unter Verwendung der Primer S186A-1 und S186A-2 fusioniert (s. Abb. 8C). Mithilfe des Restriktionsenzym EcoRI wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1-HA-mRHBDL2 der Bereich entfernt, der durch das Produkt der PCR 3 ersetzt werden sollte (s. Abb. 8D). Der entstandene Vektor wurde ebenfalls aufgereinigt. Der Vektor und das Produkt aus PCR 3 wurden ligiert und das neu entstandene Plasmid anschließend durch Transformation von kompetenten Bakterien vermehrt, extrahiert und sequenziert. So wurde das Plasmid pcDNA3.1-HA-mRHBDL2-SA generiert.

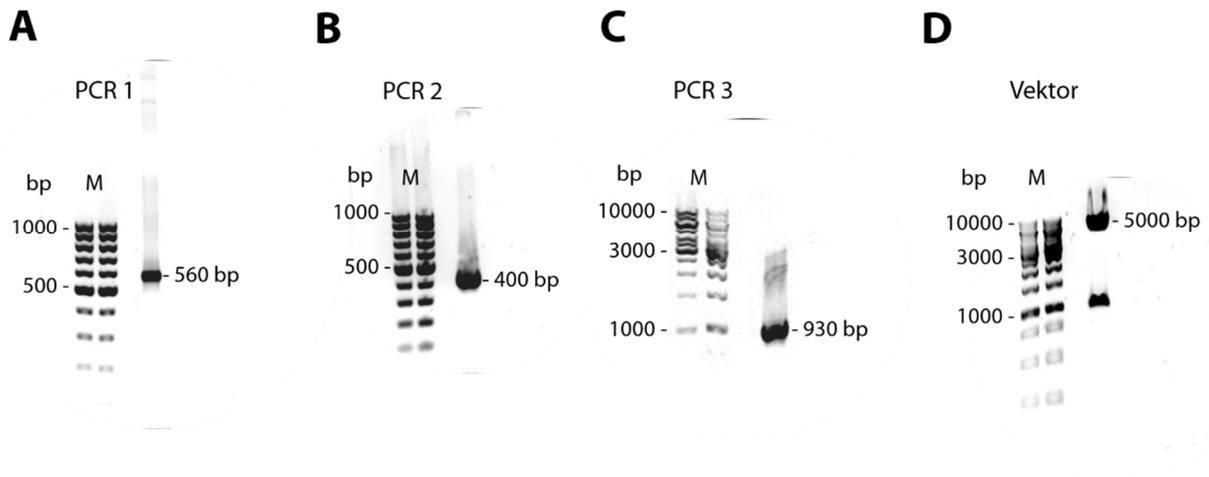


Abbildung 8: Klonierung einer katalytisch inaktiven Variante von *RHBDL2*. Dargestellt sind unter UV-Licht aufgenommene Ergebnisse von Agarosegel-Elektrophoresen. (A+B) In der ersten und zweiten Polymerasekettenreaktion (PCR 1 u. PCR 2) entstanden zwei etwa 560 beziehungsweise 400 Basenpaar (bp) lange Fragmente, welche die gewünschte Mutation enthielten und im Bereich der Mutation einen etwa 30 Basenpaar langen, komplementären Bereich aufwiesen. (C) In der dritten Polymerasekettenreaktion (PCR 3) wurden die Fragmente der PCR 1 und 2 mithilfe von flankierenden Primern fusioniert und amplifiziert, sodass ein etwa 930 bp langes Fragment entstand. (D) Aus dem ursprünglichen Plasmid wurde mithilfe eines Restriktionsenzym der Bereich des einzusetzenden Fragments ausgeschnitten (untere Bande der Probe). Der übrige Teil des Plasmids (Vektor) war ein etwa 5000 bp langes Fragment, welches aufgereinigt und zur Fusion mit dem Produkt der PCR 3 genutzt wurde. Als Größenmarker (M) wurde für A und B die GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder verwendet, für C und D die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Für die Überprüfung der Notwendigkeit der katalytischen Aktivität von *RHBDL2* für die Spaltung des *IL-11R* wurden HEK293-Zellen mit *myc-getaggttem* *IL-11R*, *HA-getaggttem* *RHBDL2* oder *HA-getaggttem* *RHBDL2-SA* und jeweils *mCherry* kotransfiziert und darüber hinaus auch in den Kombinationen *IL-11R* + *RHBDL2* sowie *IL-11R* + *RHBDL2-SA*. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch serumfreies Medium ausgetauscht und nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C wurden die Überstände der Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Mit den Überständen und Lysaten wurde ein Western Blot durchgeführt, woraufhin die Membranen mit Anti-Myc-tag und Anti-HA-tag inkubiert wurden. Als Ladekontrolle diente Actinin.

Die gewünschten Proteine wurden von den HEK293-Zellen exprimiert, was an den entsprechenden Banden für *IL-11R*, *RHBDL2* und *RHBDL2-SA* in den Lysaten zu erkennen ist (s. Abb 9). Im Überstand der Zellen, die mit *IL-11R* und *RHBDL2* kotransfiziert wurden, konnte eine Doppelbande von etwas weniger als 55 kDa für den *IL-11R* detektiert werden. Im

Überstand der mit IL-11R und RHBDL2-SA kotransfizierten Zellen hingegen erschien diese Bande nicht, was dafürspricht, dass die inaktive Protease den IL-11R nicht als lösliche Form in den Überstand freisetzen konnte. Dies wiederum impliziert, dass RHBDL2 als aktive Protease für die Spaltung des IL-11R von der Membran in den Überstand verantwortlich ist.

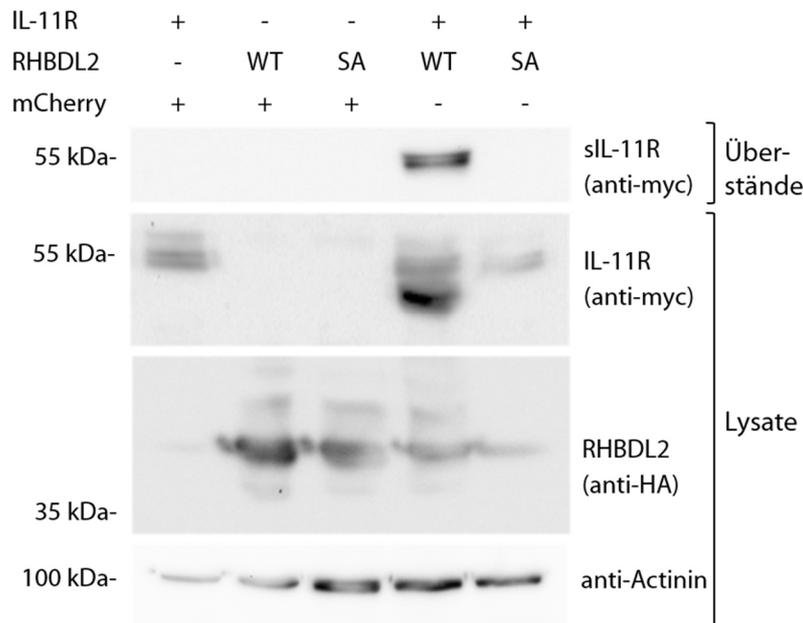


Abbildung 9: Western Blot von Überständen und Lysaten transient transfizierter HEK293-Zellen. (A) HEK293-Zellen wurden transient kotransfiziert mit myc-getaggttem IL-11-Rezeptor (IL-11R), HA-getaggttem RHBDL2 (WT), HA-getaggttem RHBDL2-SA (SA) und mCherry in verschiedenen Kombinationen. Überstände und Lysate der Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Actinin diente als Ladekontrolle. Löslicher IL-11-Rezeptor (sIL-11R) war nur im Überstand von mit IL-11-R und RHBDL2 transfizierten Zellen detektierbar. Die Kotransfektion von IL-11R und RHBDL2-SA (SA) führte nicht zur Detektion von löslichem IL-11R im Überstand. Der Western Blot repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Lokalisation von RHBDL2 und RHBDL2-SA

Um zu vergleichen, wo in der Zelle RHBDL2 und die mutierte Variante RHBDL2-SA exprimiert werden, wurden HeLa-Zellen transient mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und einer Immunfluoreszenzfärbung, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, unterzogen. Als Primärantikörper wurde Anti-HA-Tag und als Sekundärantikörper Alexa Fluor 594 Anti-Rabbit verwendet. Wie die lasermikroskopischen Bilder zeigen, werden sowohl RHBDL2 als auch RHBDL2-SA in der Zelle und an der Zelloberfläche exprimiert und zeigen dabei ein morphologisch ähnliches Verteilungsmuster (s. Abb. 10).

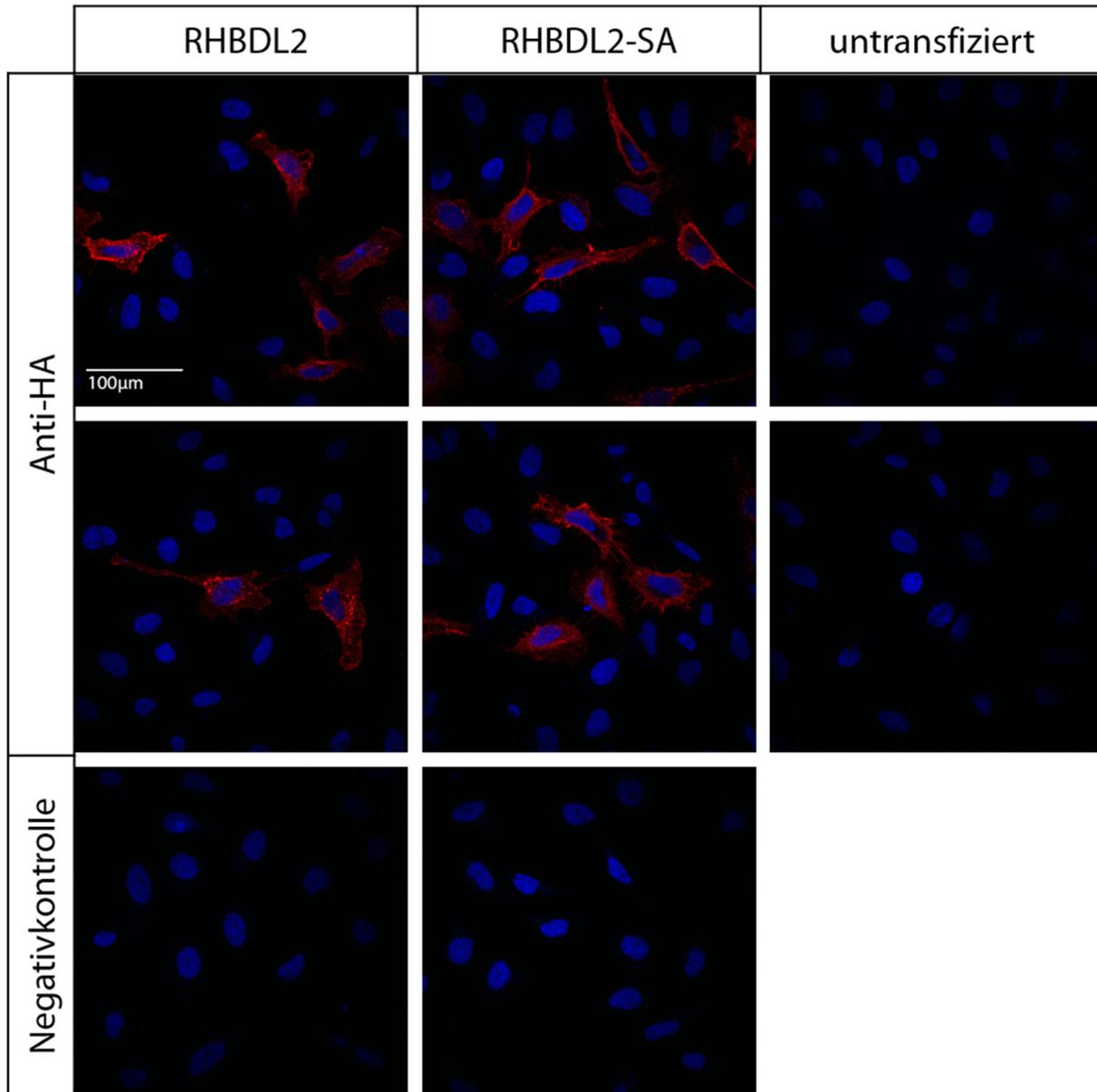


Abbildung 10: Expression von RHBDL2 und RHBDL2-SA in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden transient mit HA-getagtem RHBDL2 oder einer HA-getaggen, katalytisch inaktiven Variante von RHBDL2 (RHBDL2-SA) transfiziert. Die Zellen wurden einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen, wobei Anti-Myc-Tag (Anti-HA) als primärer und Alexa Fluor 594 Anti-Rabbit als sekundärer Antikörper verwendet wurden. Mithilfe von konfokaler Lasermikroskopie wurden die Zellen sichtbar gemacht. RHBDL2 und RHBDL2-SA sind rot, die DAPI-gefärbten Zellkerne blau dargestellt. Als Negativkontrollen dienen die Färbung untransfizierter Zellen sowie Färbungen von transfizierten Zellen mit dem Sekundärantikörper allein. Die mikroskopischen Bilder repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.4 Kolokalisation von RHBDL2 und IL-11R

Als nächstes wurde eine mögliche Kolokalisation von IL-11R und RHBDL2 überprüft. Dazu erfolgte die Einzel- und Koftransfektion von HeLa-Zellen mit Expressionsplasmiden für IL-11R

und RHBDL2. Anschließend wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet. Die Färbung permeabilisierter Zellen zeigte ein morphologisch unterschiedliches Verteilungsmuster von RHBDL2 und IL-11R. Während der IL-11R ein relativ homogenes Signal mit Betonung eines zellkernnahen Bereichs und der Zellmembran ergab, zeigte RHBDL2 ein inhomogeneres Signal mit vesikelartigen Clustern und geringerer Betonung der Zellmembran. Wurden beide Signale übereinandergelegt, zeigten sich einige gelb gefärbte Bereiche in Zellkernnähe und in der Zellmembran, die Korrelat einer Kolo-kalisation sind (s. Abb. 11A).

Eine reine Oberflächenfärbung der Zellen hätte Aufschluss darüber gegeben, ob der IL-11R und RHBDL2 in der Zellmembran kolo-kalisieren. Für den IL-11R war eine oberflächliche Färbung möglich, da sich das vom Primärantikörper erkannte *myc-tag* am N-Terminus und somit an der Ektodomäne des Proteins befindet. Bei RHBDL2 befindet sich das *HA-tag* zwar auch N-terminal, jedoch liegt der N-Terminus dieses Proteins intrazellulär. Dadurch war eine Oberflächenfärbung von RHBDL2 nicht möglich und es wurde eine kombinierte Färbung durchgeführt, bei der zuerst der IL-11R oberflächlich und RHBDL2 in der gesamten Zelle angefärbt wurde. Dafür musste der Primärantikörper für den IL-11R zunächst auf unpermeabilisierte Zellen gegeben werden. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen mit dem Primärantikörper für RHBDL2 und später den beiden Sekundärantikörpern inkubiert. Als Primärantikörper für den IL-11R bzw. RHBDL2 wurden Anti-Myc-Tag bzw. Anti-Myc-Tag verwendet, als Sekundärantikörper dienten Alexa Fluor 488 anti-Mouse bzw. Alexa Fluor 594 anti-Rabbit.

Nach oberflächlicher Färbung des IL-11R zeigte sich ein relativ homogenes Signal, welches sich über die Zellmembran erstreckte. Das intrazelluläre Signal für RHBDL2 war wie oben beschrieben. Bei der Übereinanderlegung beider Signale zeigte sich eine partielle Kolo-kalisation, u.a. an der Zellmembran (s. Abb. 11B).

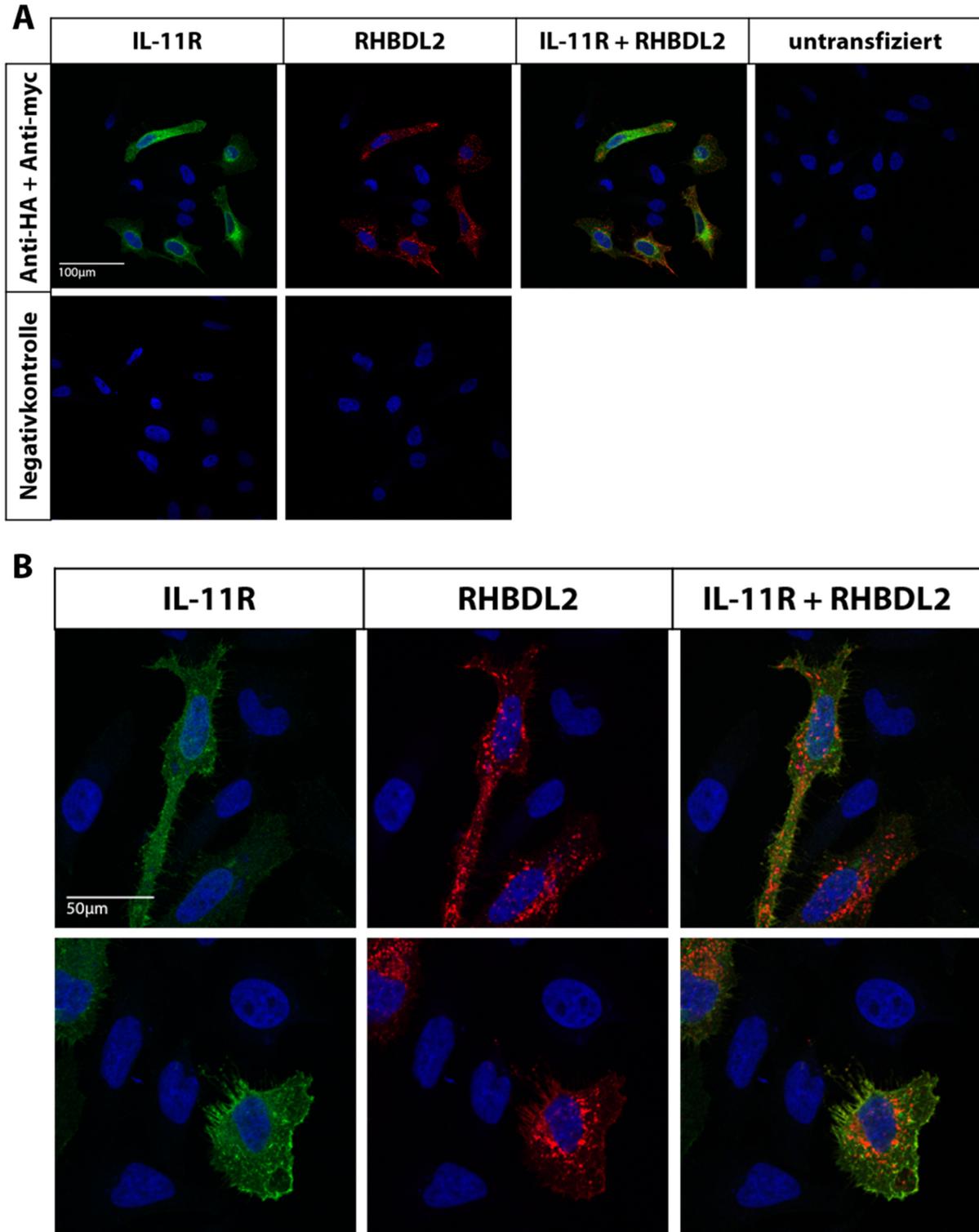


Abbildung 11: Kolokalisation von IL-11-Rezeptor und RHBDL2. (A) HeLa-Zellen wurden transient kotransfiziert mit myc-getagtem IL-11-Rezeptor (IL-11R) und HA-getagtem RHBDL2. Die Zellen wurden permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen, wobei Anti-Myc-Tag sowie Anti-HA-Tag als primäre und Alexa Fluor 594 Anti-Rabbit beziehungsweise Alexa Fluor 488 Anti-Mouse als sekundäre Antikörper verwendet wurden. Mithilfe von konfokaler Lasermikroskopie wurden die Zellen sichtbar gemacht. Der IL-11R ist grün, RHBDL2 rot und die DAPI-gefärbten Zellkerne sind blau dargestellt. Als Negativkontrollen dienten die Färbung untransfizierter Zellen sowie Färbungen von transfizierten Zellen mit dem Sekundärantikörper allein (hier nicht gezeigt). Einzeltransfektionen von Zellen mit IL-11R oder RHBDL2 sind hier nicht dargestellt. Die

mikroskopischen Bilder repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten. (A) Die Zellen wurden vor der Immunfluoreszenzfärbung permeabilisiert. (B) Mit HeLa-Zellen wurde verfahren wie in A, die Zellen wurden jedoch erst permeabilisiert, nachdem sie mit dem Primärantikörper für den IL-11R inkubiert worden waren. Folglich wurde der IL-11R nur oberflächlich und RHBDL2 in der gesamten Zelle angefärbt.

3.2 Charakterisierung der Spaltungsstelle im IL-11R

3.2.1 Klonierung von IL-11R-Varianten und Western Blot-Analyse

Die Schnittstelle, an der RHBDL2 den IL-11R spaltet, sollte näher lokalisiert werden. Zunächst wurden zwei Deletionsvarianten verwendet, von denen bei der ersten Variante die Aminosäuren Valin-363 bis Leucin-372 fehlen und somit auch die beiden potenziellen Spaltungsstellen nicht vorhanden sind. In der zweiten Deletionsvariante wurden die zehn Aminosäuren weiter N-terminal der ersten Deletionsstelle, also Histidin-353 bis Serin-362, entfernt. Im Folgenden werden die beiden Varianten als IL-11R-del-1 bzw. IL-11R-del-2 bezeichnet (s. Abb. 12A) (Lokau und Garbers, 2018).

HEK293-Zellen wurden mit den IL-11R-Varianten und RHBDL2 kotransfiziert und wurden 4 h nach Beginn des Experiments geerntet. Die Überstände und Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. Für die Variante IL-11R-del-2, nicht jedoch für IL-11R-del-1, konnte eine Bande im Überstand der Zellen detektiert werden, welche löslichen IL-11R nachweist (s. Abb. 12B). Dass IL-11R-del-1 nicht gespalten werden konnte, legt den Schluss nahe, dass die Spaltungsstelle des IL-11R für RHBDL2 im Bereich der Aminosäuren 363 bis 372 liegt. Daher wurden weitere Experimente mit anderen IL-11R-Varianten ausgeführt, in denen nun die potenziellen Spaltungsstellen mutiert wurden.

Es wurden zwei IL-11R-Varianten benutzt, in denen die Aminosäuren, die an den jeweiligen P1-Positionen für die beiden potenziellen Spaltungsstellen liegen, mutiert wurden. Alanin-367 und Alanin-370 wurden jeweils einzeln gegen Phenylalanin ausgetauscht, eine Aminosäure mit einer sperrigen, hydrophoben Seitenkette. Diese Varianten werden hier als IL-11R-A367F und IL-11R-A370F bezeichnet und waren zu Beginn dieser Arbeit schon in der Arbeitsgruppe vorhanden (s. Abb. 12A). Solche Mutationen von potenziellen Spaltungsstellen wurden bereits

angewendet, um die Spaltung von Substraten durch RHBDL2 zu blockieren (Adrain *et al.*, 2011).

HEK293-Zellen wurden mit den IL-11R-Varianten und RHBDL2 kotransfiziert und wurden 4 h nach Beginn des Experiments geerntet. Die Überstände und Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert (s. Abb. 12B). Für die Variante IL-11R-A370F konnte keine Bande für den IL-11R im Zellüberstand detektiert werden, während für IL-11R-A367F das typische Bandenmuster erschien. Phenylalanin an Position 370 blockierte also die Spaltung durch RHBDL2, woraus sich schlussfolgern lässt, dass Alanin-370 eine für die Spaltung entscheidende Aminosäure ist. Alanin-367 scheint dagegen keine wichtige Rolle für eine funktionierende Spaltung zu spielen.

Die Spaltungsstelle sollte mithilfe von weiteren IL-11R-Mutationen in diesem Bereich charakterisiert werden. Die Alanine an Positionen 370 und 367 wurden jeweils durch Glycin, das sich von Alanin nur durch eine fehlende Methylgruppe unterscheidet, und durch Tyrosin, welches eine ähnlich große und hydrophobe Seitenkette wie Phenylalanin aufweist, ausgetauscht. Die vier Varianten IL-11R-A367G, -A367Y, -A370G und -A370Y wurden auf Grundlage des Plasmids pcDNA3.1-c-myc-hIL11R und mittels SOE-PCR kloniert (s. Abb. 12A).

Die IL-11R-Varianten wurden mit RHBDL2 in HEK293-Zellen kotransfiziert und die Zellen sowie Überstände mittels Western Blot analysiert (s. Abb. 12B). Die Varianten IL-11R-A367G, -A367Y und -A370G konnten im Überstand detektiert werden und wurden folglich von RHBDL2 gespalten. Nur die Variante IL-11R-A370Y erschien nicht als Bande im Überstand der Zellen, was impliziert, dass an Position 370 des IL-11R eine kleine Aminosäure wie Alanin oder Glycin für eine erfolgreiche Proteolyse durch RHBDL2 erforderlich ist. Ferner unterstützen diese Ergebnisse die bisherigen Erkenntnisse über Substrate von RHBDL2 und ihr Erkennungsmotiv im Bereich der Spaltungsstelle. RHBDL2 benötigt eine kleine Aminosäure wie Alanin in P1-Position sowie eine große, hydrophobe Aminosäure in P4- bzw. P2'-Position seines Substrats (Adrain *et al.*, 2011).

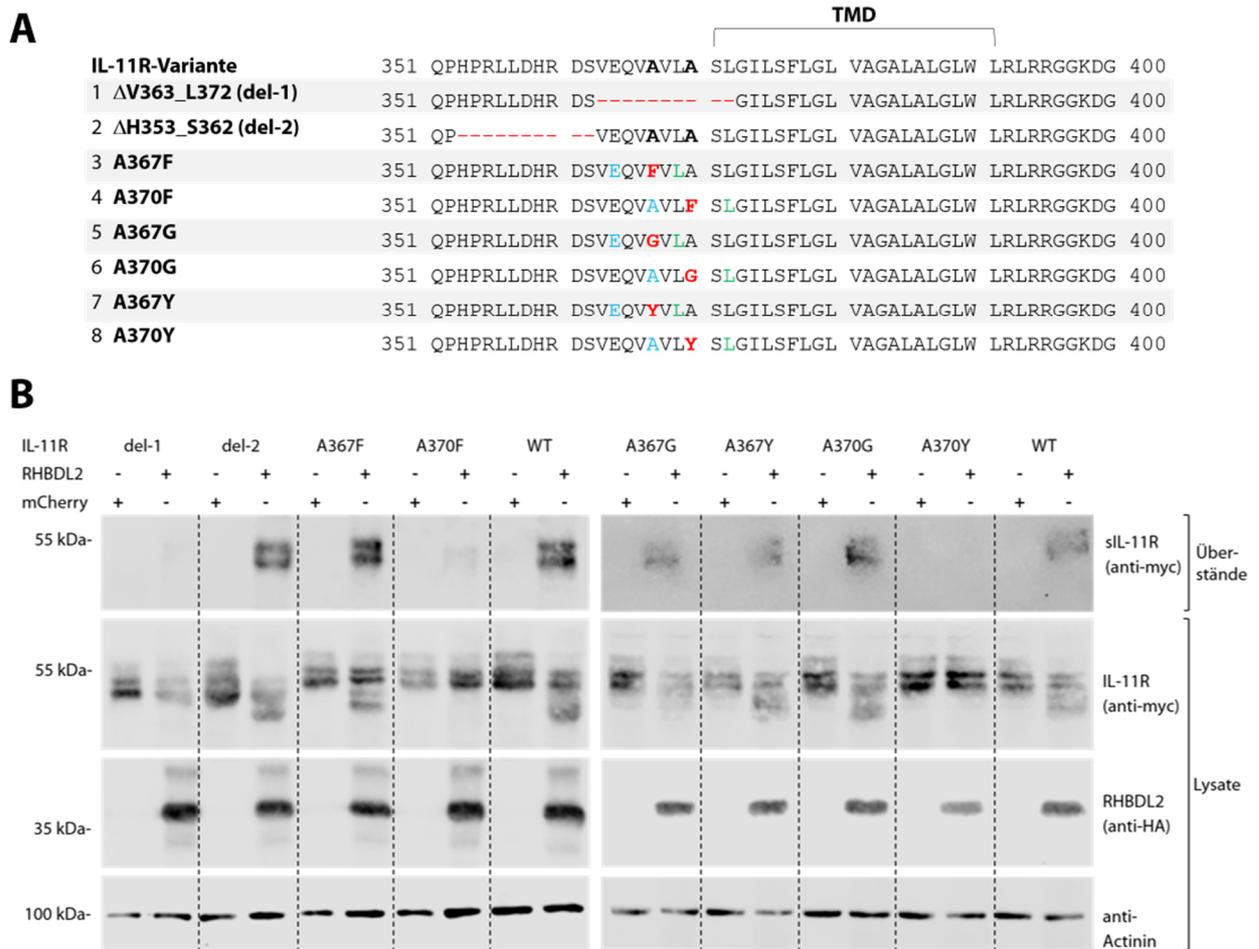


Abbildung 12: IL-11R-Varianten zur Charakterisierung der Spaltungsstelle von RHBDL2. (A) Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz des IL-11-Rezeptors (IL-11R), die Transmembrandomäne (TMD) befindet sich in dem eingeklammerten Bereich. Die potenziellen P1-Positionen der Spaltungsstelle sind fett markiert. In rot sind die Deletionen bzw. Punktmutationen der P1-Position gekennzeichnet. In blau sind die P4-Positionen, grün die P2'-Positionen der vermeintlichen Spaltungsstellen markiert, welche mit großen und/oder hydrophoben Aminosäuren besetzt sind. (B) HEK293-Zellen wurden transient kotransfiziert mit dem IL-11R-Wildtyp (WT) bzw. mit den IL-11R-Varianten und mCherry oder RHBDL2. Überstände und Lysate der Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Actinin diente als Ladekontrolle. Löslicher IL-11R wurde in den Überständen der mit IL-11R, IL-11R-del-2, -A367F, -A367G, -A367Y und -A370G transfizierten Zellen detektiert, jedoch nicht in den Überständen der mit IL-11R-del-1, -A370F und -A370Y transfizierten Zellen. Die beiden Western Blots repräsentieren jeweils eines von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Proteolyse der IL-11-Rezeptor-Variante IL-11R-A370F durch ADAM10

Die Metalloprotease ADAM10 wurde mit als erste Sheddase des IL-11R beschrieben (Lokau *et al.*, 2016). Aus diesem Grund schien die Frage interessant, ob die für RHBDL2 nicht spaltbare Variante IL-11R-A370F noch durch ADAM10 gespalten werden kann. HEK293-Zellen wurden in 6-well-Platten transient mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche die cDNA von IL-11R-A370F bzw. mCherry enthalten. 48 h nach Transfektion wurde ein Teil der Zellen mit dem

Kalzium-Ionophor Ionomycin stimuliert, das als potenter Induktor von ADAM10 gilt (Jones *et al.*, 1998). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Nach 1 h Inkubationszeit in 1 μ M Ionomycin bzw. DMSO in Serum-freiem Medium wurden die Zellen und deren Überstände geerntet.

Im Western Blot zeigte sich, dass die Variante IL-11R-A370F, welche nicht von RHBDL2 gespalten wird, trotzdem ein Substrat für ADAM10 ist (s. Abb. 13). Die ADAM10-Spaltstelle im IL-11R wurde noch nicht exakt bestimmt, aber ein Arginin in Position 355 ist für die Proteolyse erforderlich und befindet sich wahrscheinlich angrenzend an die Spaltstelle (Lokau *et al.*, 2016). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass RHBDL2 und ADAM10 den IL-11R an unterschiedlichen Stellen proteolytisch spalten und folglich leicht unterschiedliche lösliche Formen desselben generieren.

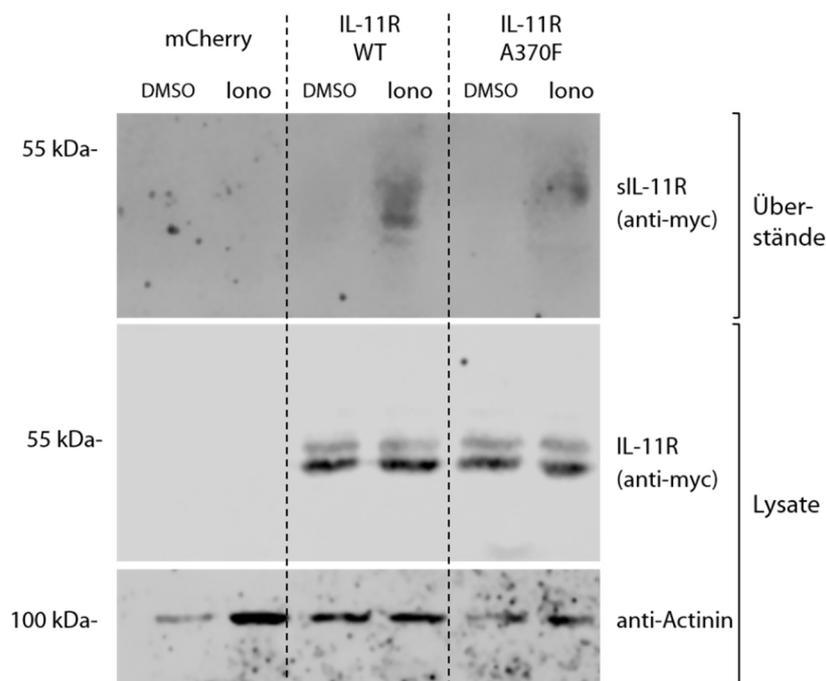


Abbildung 13: Proteolyse der IL-11-Rezeptor-Variante IL-11R-A370F durch ADAM10. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert mit mCherry oder myc-getaggttem IL-11-Rezeptor-Wildtyp (IL-11R-WT) oder der myc-getaggtten IL-11-Rezeptor-Variante IL-11R-A370F (IL-11R A370F). Die Zellen wurden 1 h mit 1 μ M des ADAM10-Induktors Ionomycin (Iono) oder dem Lösungsmittel Dimethylsulfat (DMSO) inkubiert. Überstände und Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente Actinin. Löslicher IL-11R (sIL-11R) konnte in den Überständen von mit IL-11R WT und IL-11R A370F transfizierten Zellen, die mit Ionomycin behandelt wurden, detektiert werden.

3.3 Die Rolle von Helix-destabilisierenden Aminosäuren im IL-11R für die Spaltung durch RHBDL2

In der TMD des IL-11R kommen mit Serin-376 und Glycin an den Positionen 373, 379, 383 sowie 388 fünf Aminosäuren vor, die auf eine Alpha-Helix destabilisierend wirken (Wang und Feng, 2003). Solche Aminosäuren sind in vielen Substraten von Rhomboid-Proteasen vorhanden und es wird vermutet, dass sie für die Proteolyse essentiell sind (Strisovsky, 2013). In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob und wie weitreichend die Helix-destabilisierenden Aminosäuren Einfluss auf die Proteolyse des IL-11R durch RHBDL2 haben.

3.3.1 Klonierung von IL-11R-Varianten mit veränderten Transmembrandomänen

Es wurden mittels SOE-PCR, dem Plasmid pcDNA3.1-c-myc-hIL11R und den unter 2.1.9 aufgeführten Primern fünf Varianten des IL-11R kloniert, in denen je eine Helix-destabilisierende Aminosäure in der TMD durch eine Helix-stabilisierende Aminosäure ausgetauscht wurde. Jede zu mutierende Aminosäure wurde durch Leucin ersetzt, welches ein hohes Helixpotenzial aufweist. So wurden die Varianten IL-11R-G373L, -S376L, -G379L, -G383L und -G388L kloniert (s. Abb. 14A).

3.3.2 Helix-destabilisierende Aminosäuren in der IL-11R-TMD sind erforderlich

HEK293-Zellen wurden mit den IL-11R-Varianten mit veränderten TMD und RHBDL2 kotransfiziert und mittels Western Blot auf eine erfolgte Proteolyse des IL-11R analysiert (s. Abb. 14B). Die Variante IL-11R-G373L, in der die erste destabilisierende Aminosäure von N-terminal ausgetauscht wurde, war nicht im Überstand der Zellen detektierbar. Die Variante IL-11R-S376L war nur als schwache Bande im Überstand zu erkennen und die restlichen Varianten erschienen ähnlich dem IL-11R-Wildtyp als ausgeprägtere Bande. Dies deutet darauf hin, dass die erste destabilisierende Aminosäure in der TMD des IL-11R für eine erfolgreiche Proteolyse durch RHBDL2 erforderlich ist, während die Aminosäuren C-terminal der Spaltstelle weniger bis keinen Einfluss auf die Spaltung haben.

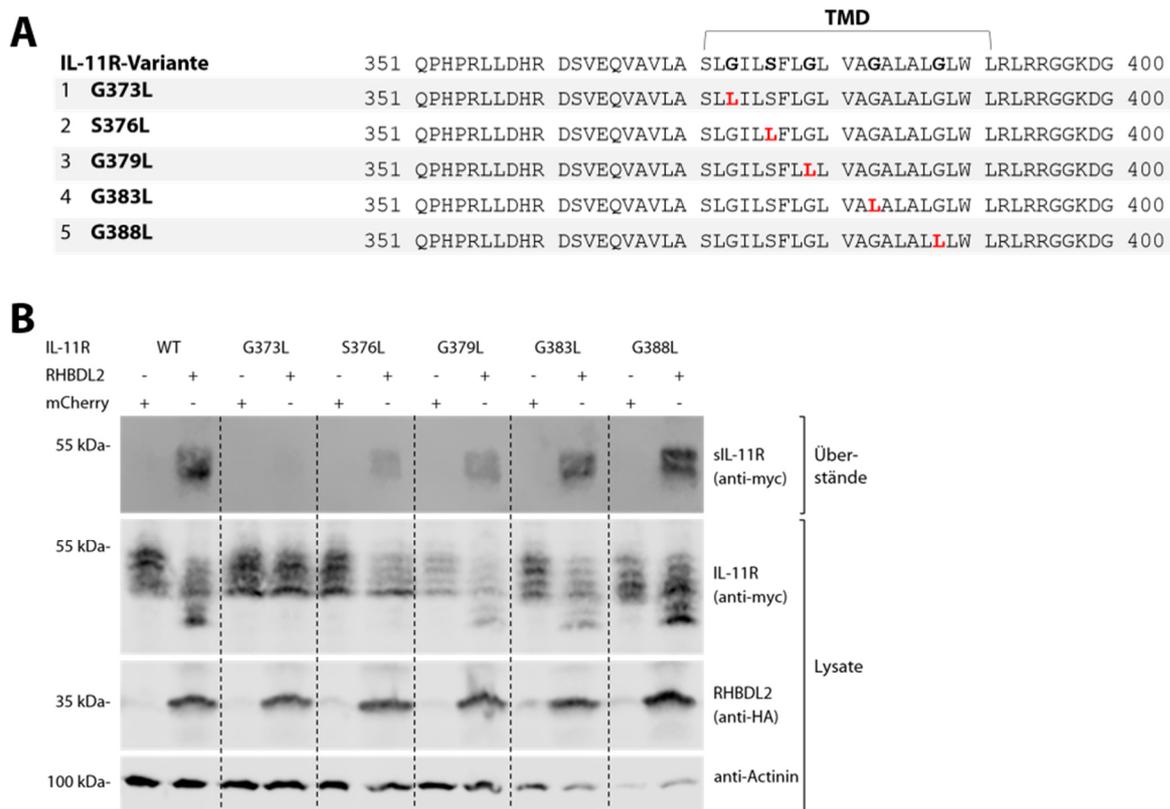


Abbildung 14: Helix-destabilisierenden Aminosäuren in der Transmembrandomäne des IL-11-Rezeptors. (A) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des IL-11-Rezeptors (IL-11R). Die Transmembrandomäne (TMD) ist mit einer Klammer eingegrenzt. Die Helix-destabilisierenden Aminosäuren sind fett markiert, die vorgenommenen Punktmutationen sind rot gekennzeichnet. (B) HEK293-Zellen wurden transient kotransfiziert mit myc-getagtem IL-11R-Wildtyp (WT) bzw. dessen mutierten Varianten und mCherry oder HA-getagtem RHBDL2. Überstände und Lysate der Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Actinin diente als Ladekontrolle. Löslicher IL-11R wurde in den Überständen von mit IL-11R-Wildtyp, -G379L, -G383L und -G388L transfizierten Zellen detektiert. Für IL-11R-S376L zeigte sich entweder keine oder eine schwache Bande, IL-11R-G373L wurde nie im Überstand detektiert. Der Western Blot repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Oberflächenexpression der IL-11R-Varianten

Dass einige der klonierten IL-11R-Varianten nicht von RHBDL2 in den Überstand abgespalten werden, kann einerseits Folge einer gestörten Substraterkennung sein, könnte andererseits aber auch an einem gestörten Transport des mutierten IL-11R an die Zelloberfläche liegen. Mittels Durchflusszytometrie, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, wurde überprüft, ob alle IL-11R-Varianten an der Zelloberfläche exprimiert werden.

Die Varianten IL-11R-del-1 und -del-2 wurden bereits auf ihre Oberflächenexpression untersucht und wurden ähnlich wie der IL-11R-Wildtyp in der Zellmembran exprimiert

(Lokau und Garbers, 2018). Auch die anderen Varianten zur Charakterisierung der Spaltstelle IL-11R-A367F, -A370F, -A367G, -A370G, -A367Y und -A370Y wurden ähnlich dem IL-11R-Wildtyp an der Zelloberfläche exprimiert (s. Abb. 15).

Die TMD-Mutationsvarianten des IL-11R werden ebenfalls alle an der Zelloberfläche exprimiert, das Ausmaß variierte jedoch je nach Variante stärker als bei den vorhergehenden Mutationsvarianten (s. Abb. 16). Die Varianten IL-11R-G373L und -G383L hatten die schwächsten Expressionen, die jedoch immer noch mehr als 60 % der Wildtypexpression entsprachen. Die verminderte Oberflächenexpression von IL-11R-G373 verglichen mit der Wildtyp-Variante erklärt jedoch nicht die fehlende Proteolyse (s. Abb. 14B), da die Variante IL-11R-G383 ähnlich stark reduziert exprimiert wird und dennoch von RHBDL2 gespalten wird.

Da alle IL-11R-Varianten an der Zelloberfläche exprimiert wurden, kann man von einem ausreichenden Transport der translatierten Proteine in die Zellmembran ausgehen.

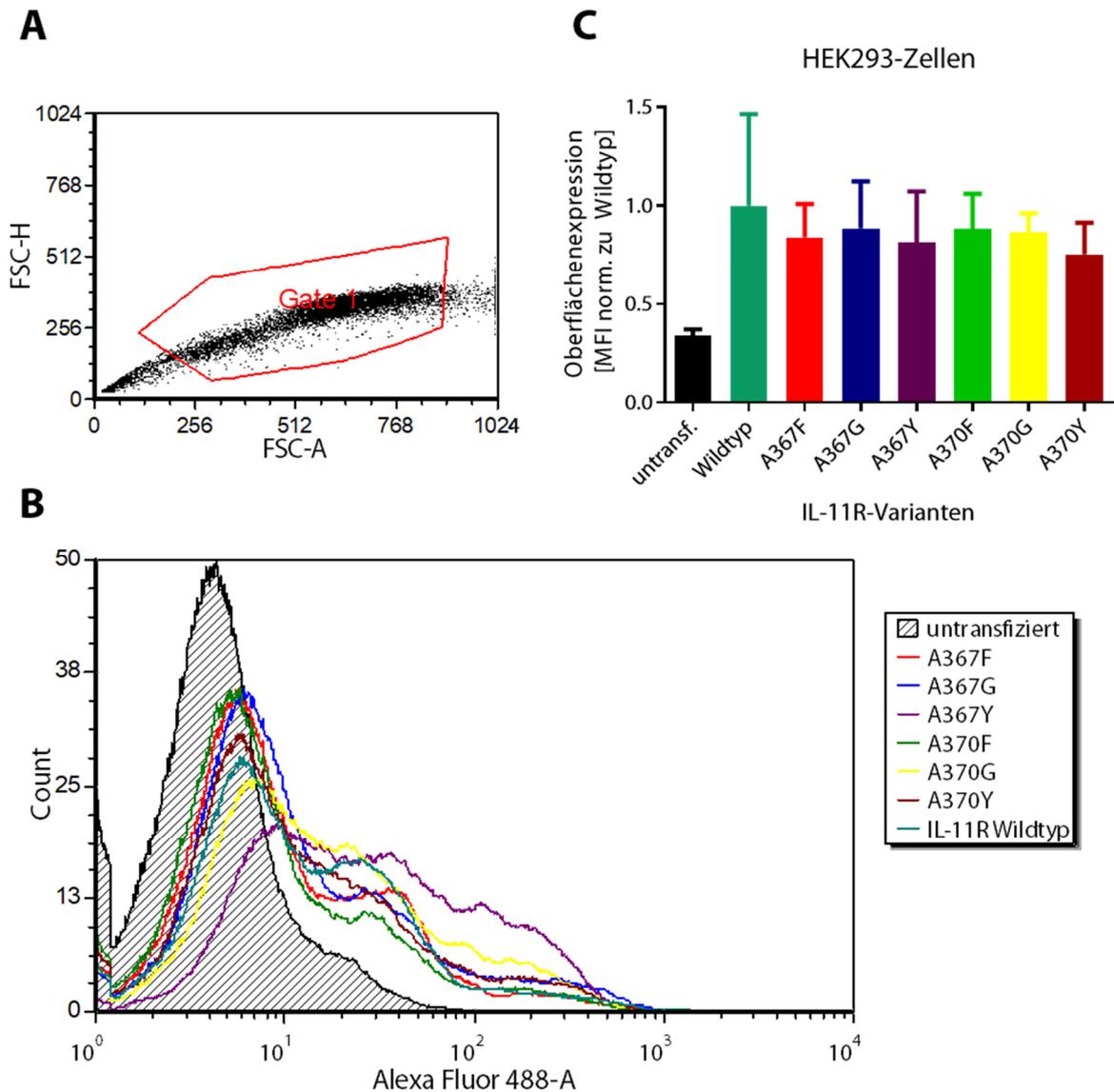


Abbildung 15: Oberflächenexpression der IL-11-Rezeptor-Varianten zur Charakterisierung der Spaltstelle. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert mit myc-getaggten IL-11-Rezeptor-Wildtyp (IL-11R-Wildtyp; türkis) oder den Mutationsvarianten IL-11R-A367F (rot), -A367G (blau), -A367Y (violett), -A370F (grün), -A370G (gelb) und -A370Y (braun). Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper Anti-Myc-Tag und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 anti-Rabbit gefärbt und mittels Durchflusszytometrie vermessen. Untransfizierte Zellen (untransf.) dienen als Vergleich. (A) Nach Auftragen von Forward Scatter-Fläche (FSC-A) gegen Forward Scatter-Höhe (FSC-H) wurde ein Gate (Gate 1) von Zellen ausgewählt, um Zelldubletten und kleinere Partikel auszuschließen. (B) Zellzahl (Count) und Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor 488 (Alexa-Fluor 488-A) wurden gemessen. A+B repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten. (C) Die Oberflächenexpression ist in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI), welche auf die IL-11R-Wildtyp-Expression normalisiert wurde, angegeben. Das Balkendiagramm zeigt die gemittelten Werte von drei unabhängigen Experimenten.

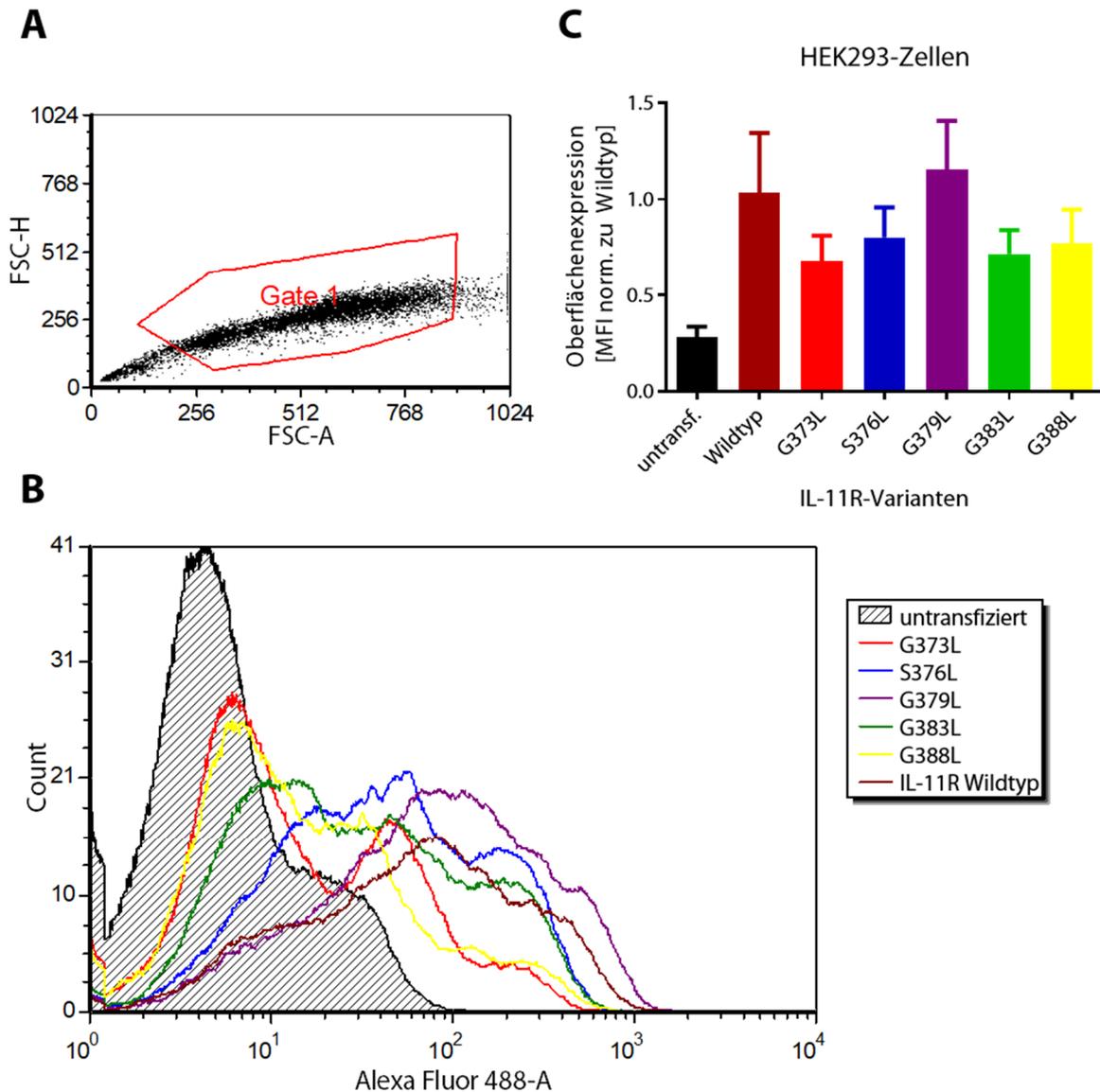


Abbildung 16: Oberflächenexpression der IL-11-Rezeptor-Varianten mit veränderter Transmembrandomäne. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert mit myc-getaggtm IL-11-Rezeptor-Wildtyp (IL-11R-Wildtyp; braun) oder den Mutationsvarianten IL-11R-G373L (rot), -S376L (blau), -G379L (violett), -G383L (grün), -G388L (gelb). Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper Anti-Myc-Tag und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 anti-Rabbit gefärbt und mittels Durchflusszytometrie vermessen. Untransfizierte Zellen (untransf.) dienen als Vergleich. (A) Nach Auftragen von Forward Scatter-Fläche (FSC-A) gegen Forward Scatter-Höhe (FSC-H) wurde ein Gate (Gate 1) von Zellen ausgewählt, um Zeldubletten und kleinere Partikel auszuschließen. (B) Zellzahl (Count) und Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor 488-A) wurden gemessen. A+B repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten. (C) Die Oberflächenexpression ist in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI), welche auf die IL-11R-Wildtyp-Expression normalisiert wurde, angegeben. Das Balkendiagramm zeigt die gemittelten Werte von drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Biologische Aktivität des durch RHBDL2 generierten löslichen IL-11R

Eine wichtige Frage ist, ob der durch RHBDL2 generierte lösliche IL-11R biologisch aktiv ist, das heißt, ob er IL-11 binden und durch Homodimerisierung von gp130 den Trans-Signalweg aktivieren kann. Für das folgende Experiment wurden Ba/F3-gp130-Zellen verwendet, die nur bei Aktivierung der durch gp130 vermittelten Signalkaskade überleben und proliferieren.

Es wurden Zellviabilitätsassays mit Ba/F3-gp130-Zellen und Überständen von mit IL-11R bzw. den IL-11R-Mutationsvarianten IL-11R-del-1, -del-2, -A367F sowie -A370F und RHBDL2 transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Durch Western Blot-Analyse der Überstände wurde zuvor sichergestellt, dass löslicher IL-11R in den Überständen enthalten war. Durch Zugabe des Zytokins IL-11 in einer Konzentration von 500 ng/ml zu den Ba/F3-gp130-Zellen sollte sich zeigen, ob der generierte lösliche IL-11R in den HEK293-Zell-Überständen in der Lage ist, zusammen mit IL-11 den Trans-Signalweg zu aktivieren. Als Positivkontrolle wurden die Ba/F3-gp130-Zellen mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 inkubiert. Hyper-IL-6 ist ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem IL-6-Rezeptor und aktiviert schon in geringer Konzentration den gp130-vermittelten Signalweg, sodass die Zellen proliferieren (Fischer *et al.*, 1997). Als Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen mit DMEM-/- bzw. mit 500 ng/ml IL-11 allein. Darüber hinaus wurde auch der Überstand von untransfizierten HEK293-Zellen verwendet, welcher ebenfalls keine Proliferation der Ba/F3-gp130-Zellen auslösen sollte.

Die Zellen proliferierten mit dem Überstand von mit IL-11R-Wildtyp und RHBDL2 transfizierten HEK293-Zellen und unter Zugabe von IL-11 ebenso stark wie in der Positivkontrolle (s. Abb. 17). Dies impliziert, dass der von RHBDL2 generierte lösliche IL-11R biologisch aktiv ist.

Auch die anderen Varianten IL-11R-del-1, -del-2, -A367F und -A370F führten zu einem vermehrten Wachstum im Zellviabilitätsassay, im Gegensatz zu den Zellen, die ohne IL-11 inkubiert wurden oder mit dem Überstand untransfizierter HEK293-Zellen inkubiert wurden. Aufgrund der Ergebnisse der Western Blots, dass die Varianten del-1 und A370F nicht von RHBDL2 in den Überstand gespalten wurden, lag die Annahme nahe, dass diese Überstände im Zellviabilitätsassay kein Zellwachstum auslösen würden. Nach anfänglichen Experimenten

mit 50 % konditionierten Überständen ergab sich eine überschießende Proliferation der Ba/F3-gp130-Zellen, sodass der Anteil der konditionierten Überstände auf 10 % gesenkt wurde. In diesen Experimenten sah man, dass es tatsächlich konsistente Unterschiede zwischen den einzelnen IL-11R-Varianten in Hinblick auf die Zellviabilität gab (s. Abb. 17). Die Varianten del-1 und A370F führten zu einer geringeren Zellviabilität als die Varianten del-2 und A367F sowie der IL-11R-Wildtyp. Dass die Unterschiede nicht noch deutlicher waren, wie es der Western Blot vermuten ließ, ist jedoch zunächst verwunderlich. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass geringe Mengen löslichen IL-11R, die nicht im Western Blot erfasst wurden und konstitutiv durch andere Proteasen wie ADAM10 generiert wurden, für ein Überleben und Wachstum der Ba/F3-gp130-Zellen ausreichten.

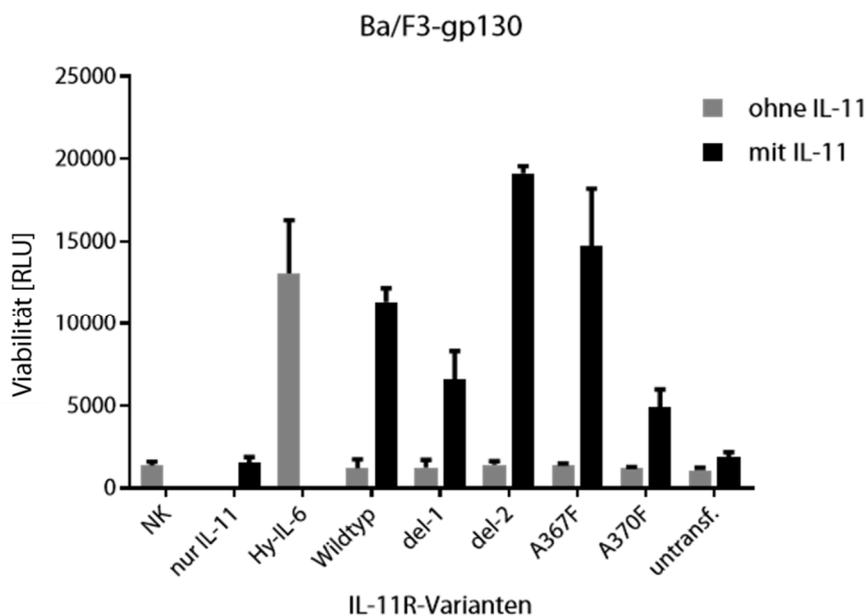


Abbildung 17: Biologische Aktivität von IL-11-Rezeptor-Varianten. Pro well einer 96-well-Platte wurden 5000 Ba/F3-gp130-Zellen ausgesät und mit 10 % konditionierten Überständen inkubiert. Die konditionierten Überstände stammten von HEK293-Zellen, welche transient mit RHBDL2 und IL-11-Rezeptor (Wildtyp) oder IL-11-Rezeptor-Varianten (del-1, del-2, A367F, A370F) kotransfiziert wurden. Außerdem wurden Überstände von untransfizierten HEK293-Zellen (untransf.) verwendet. Die Ba/F3-gp130-Zellen wurden ohne IL-11 oder mit 500 ng/ml IL-11 inkubiert. Als Negativkontrollen wurden die Zellen mit zusatzfreiem Medium (NK) oder mit 500 ng/ml IL-11 in zusatzfreiem Medium (nur IL-11) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 10 ng Hyper-IL-6 (Hy-IL-6) inkubiert. Nach 24 h wurde mit den Zellen ein Zellviabilitätsassay durchgeführt. Die Viabilität der Zellen ist in *relative light units* (RLU) angegeben. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.6 Spaltung des IL-11R durch endogenes RHBDL2

3.6.1 Versuch des Nachweises von endogenem RHBDL2 in HeLa-Zellen

Im Gegensatz zu HEK293-Zellen exprimieren HeLa-Zellen endogenes RHBDL2 (Adrain *et al.*, 2011). Bis dato gab es keinen in der Arbeitsgruppe etablierten Antikörper, der an endogenes RHBDL2 bindet. Mithilfe eines polyklonalen RHBDL2-Antikörpers (s. Abschnitt 2.1.2) konnte in einer Studie endogenes RHBDL2 in HeLa-Zellen detektiert werden (Johnson *et al.*, 2017). Es sollte nun versucht werden, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Dazu wurden HeLa-Zellen auf einer 10 cm-TC-Schale ausgesät und nach 48 Stunden geerntet. Das entsprechende Zelllysat wurde mittels Western Blot analysiert. Zusätzlich wurden Lysate von mit RHBDL2 transfizierten HEK293-Zellen mit aufgetragen. Es konnte in den Lysaten der HEK293-Zellen, welche mit RHBDL2 transfiziert wurden, eine Bande im Bereich von 35 kDa detektiert werden (s. Abb. 18). Diese Bande entspricht der Größe des detektierten HA-getaggten RHBDL2 in anderen Western Blots dieser Arbeit. Obwohl der Antikörper das überexprimierte murine RHBDL2 in den HEK293-Zelllysaten also gut detektierbar machte, gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, endogenes RHBDL2 in HeLa-Zellen nachzuweisen (s. Abb. 18).

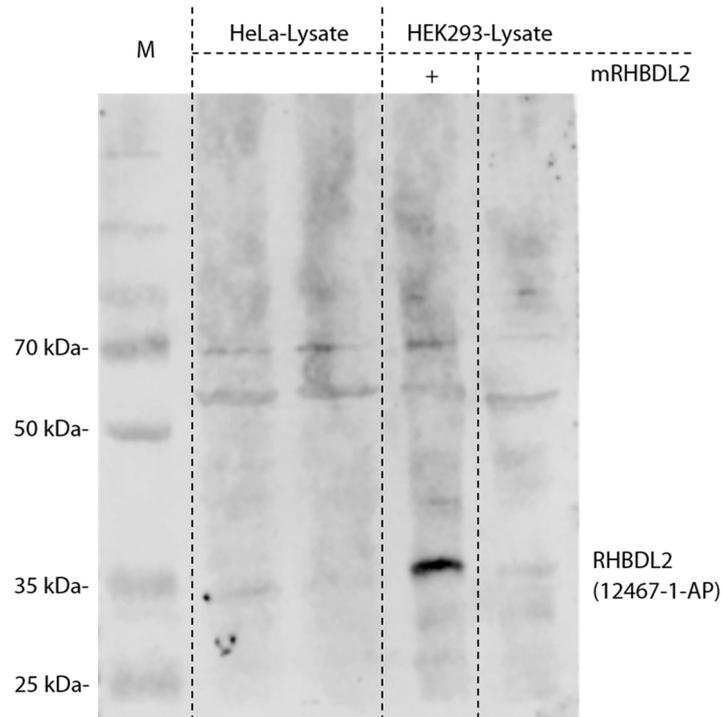


Abbildung 18: Testung eines RHBDL2-Antikörpers an HeLa- und HEK293-Zelllysaten. Untransfizierte HeLa- und HEK293-Zellen sowie mit murinem RHBDL2 (mRHBDL2) transfizierte HEK293-Zellen wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert. Als Primärantikörper diente Anti-RHBDL2 (12467-1-AP). Etwa auf Höhe der 35 kDa-Bande des Größenmarkers (M) ist eine eindeutige Bande in den Lysaten der mit mRHBDL2 transfizierten HEK293-Zellen detektierbar. Weder in den untransfizierten HEK293- noch in den HeLa-Zelllysaten ist diese Bande zu sehen.

3.6.2 Blockierung des konstitutiven IL-11R-Sheddings durch Metalloproteasen

Die Metalloprotease ADAM10 wurde als eine Protease identifiziert, die endogen löslichen und biologisch aktiven IL-11R generiert (Lokau *et al.*, 2016). Um sich der Frage nach *Shedding* des IL-11R durch endogenes RHBDL2 zu nähern, sollte zunächst überprüft werden, ob trotz Blockierung von Metalloproteasen löslicher IL-11R produziert wird. Da HeLa-Zellen RHBDL2 endogen exprimieren (Adrain *et al.*, 2011), boten sich diese als geeignete Zellen für dieses Experiment an. Da die fehlende Detektion von RHBDL2 in den hier verwendeten HeLa-Zellen nicht zwingend das Nichtvorhandensein von RHBDL2 bedeutet, wurde dieses funktionelle Experiment durchgeführt.

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert mit dem IL-11R oder dessen Mutationsvariante IL-11R-A370F. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 1 μ M des Metalloproteasen-Inhibitors Marimastat oder 1 μ M DMSO behandelt. DMSO war das Lösungsmittel für Marimastat und fungierte deshalb als Negativkontrolle. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden Zellen und

Überstände geerntet und mittels Western Blot analysiert. In den Überständen der HeLa-Zellen, die den IL-11R oder IL-11R-A370F exprimierten und nur mit DMSO behandelt wurden, war löslicher IL-11R detektierbar (s. Abb. 19). Dagegen konnte in den Überständen der entsprechenden mit Marimastat behandelten Zellen keine Bande für den löslichen IL-11R detektiert werden. In Anbetracht dieses Ergebnisses konnte also keine Proteolyse des IL-11R durch endogenes RHBDL2 in HeLa-Zellen gezeigt werden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten HeLa-Zellen eventuell doch kein endogenes RHBDL2 exprimieren. Dies würde den fehlenden Nachweis mittels Antikörper im Western Blot (s. Abschnitt 3.6.1) und das Ergebnis des hier besprochenen Experiments erklären.

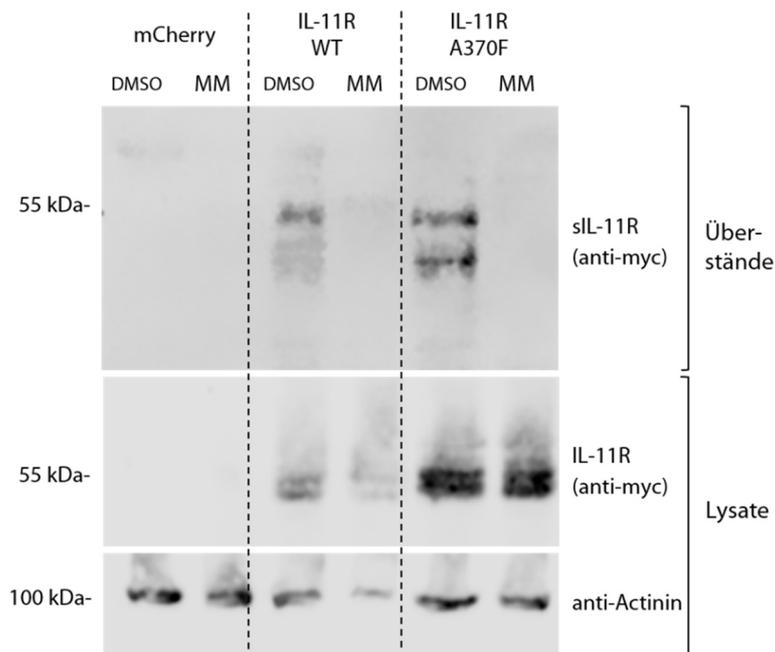


Abbildung 19: Blockierung des konstitutiven IL-11-Rezeptor-Sheddings durch Metalloproteasen. HeLa-Zellen wurden transient transfiziert mit mCherry oder myc-getaggttem IL-11-Rezeptor-Wildtyp (IL-11R-WT) oder der myc-getaggtten IL-11-Rezeptor-Variante IL-11R-A370F (IL-11R A370F). Die Zellen wurden 24 h mit 1 μ M des Metalloproteasen-Inhibitors Marimastat (MM) oder dem Lösungsmittel Dimethylsulfat (DMSO) inkubiert. Überstände und Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente Actinin. Löslicher IL-11R (sIL-11R) konnte nur in den Überständen von mit IL-11R-WT und IL-11R-A370F transfizierten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Der IL-11-Rezeptor ist ein Substrat von RHBDL2

Die Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass löslicher IL-11R im Zellkulturmedium der mit RHBDL2 und IL-11R kotransfizierten Zellen nachzuweisen war. Löslicher IL-11R fand sich allerdings nicht im Medium von Zellen, welche mit der katalytisch inaktiven RHBDL2-SA-Variante und IL-11R kotransfiziert wurden. RHBDL2 und RHBDL2-SA wiesen in der Immunfluoreszenzfärbung keine Unterschiede in der zellulären Expression auf, was impliziert, dass sich RHBDL2-SA abgesehen von der katalytischen Aktivität nicht wesentlich von der Wildtyp-Variante unterscheidet. In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass der IL-11R ein Substrat von RHBDL2 ist. Zu diesem Schluss passt, dass die meisten bisher identifizierten RHBDL2-Substrate wie der IL-11R Typ-I-Membranproteine sind (Lohi, Urban und Freeman, 2004; Noy *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2017). Interessant ist auch Folgendes: In einem quantitativen Proteomikscreen wurden systematisch RHBDL2-Substrate in einer menschlichen Zelllinie gesucht, wobei nicht der IL-11R aber unter anderen der aus der gleichen Proteinfamilie stammende IL-6R als Substrat gefunden wurde (Johnson *et al.*, 2017). In der erwähnten Studie wurde allerdings nur die Zelllinie HEK293ET untersucht, die endogen keinen IL-11R exprimiert. Zudem stammen die Ergebnisse des Proteomikscreen nur aus einem einzigen, wenn auch umfangreich verifizierten, biologischen Replikat. Daher erhebt die Studie auch nicht den Anspruch, alle RHBDL2-Substrate vollumfänglich zu identifizieren oder die biologische Relevanz der beobachteten Proteolysen zu bewerten. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass die Proteolyse des IL-11R durch RHBDL2 biologisch relevant sein könnte. Dies können nur weitere *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimente klären.

Zellkulturexperimente mit den anderen Rhomboid-Sekretasen RHBDL1, RHBDL3 und RHBDL4 haben gezeigt, dass nur RHBDL2 in der Lage ist, löslichen IL-11R zu generieren. Somit ist diese Proteolyse spezifisch für RHBDL2. Auch für andere Substrate konnte eine Spezifität von RHBDL2 gegenüber den anderen Rhomboid-Proteasen gezeigt werden (Adrain *et al.*, 2011; Noy *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2017). Wodurch diese Spezifität bedingt ist, ist bisher

unklar. Einerseits könnte die Verortung der Rhomboid-Sekretasen in den Membranen verschiedener Zellkompartimente ein Grund für die Spezifität sein. Andererseits kommen RHBDL1 und 3 nicht nur im Golgi-Apparat sondern wie RHBDL2 auch zu einem geringeren Anteil in der Zellmembran vor (Lohi, Urban und Freeman, 2004). Zudem durchläuft der IL-11R auf seinem sekretorischen Weg auch den Golgi-Apparat (Agthe *et al.*, 2018), sodass eine räumliche Trennung von IL-11R und den anderen Rhomboid-Proteasen innerhalb der Zelle nicht der einzige spezifitätsbestimmende Faktor zu sein scheint.

Die mittels Lasermikroskopie visualisierte Kollokalisierung von RHBDL2 und IL-11R sollte Aufschluss darüber geben, wo die beiden Proteine miteinander interagieren. Nach Permeabilisierung und Färbung der Zellen zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster und teilweise überlappende Signale für RHBDL2 und IL-11R in den Zellen. Einerseits könnte dies bedeuten, dass die Proteolyse des IL-11R schon innerhalb der Zelle im sekretorischen Weg stattfindet, andererseits könnte dies schlicht ein artifizieller Effekt der Überexpression der Proteine sein.

Um eine Kollokalisierung nur in der Zellmembran zu betrachten, wäre eine reine Oberflächenfärbung der Zellen eine naheliegende Methode. Da im verwendeten Plasmid RHBDL2 nur am intrazellulär gelegenen N-Terminus mit einem *tag* versehen war und es bisher keinen etablierten RHBDL2-Antikörper gab, konnte RHBDL2 nicht an der Zelloberfläche angefärbt werden. Stattdessen wurde RHBDL2 in der gesamten Zelle und nur der IL-11R oberflächlich angefärbt. So wurde eine teilweise Kollokalisierung an der Zelloberfläche beobachtet, wenn diese auch möglicherweise durch intrazelluläre Signale überstrahlt wurde. Aufgrund der Einschränkung der angewandten Methode sind Aussagen zur Kollokalisierung von RHBDL2 und IL-11R in der Zellmembran nur begrenzt möglich. Zukünftig könnte man versuchen, den in dieser Arbeit getesteten polyklonalen RHBDL2-Antikörper für eine Färbung von RHBDL2 an der Zelloberfläche zu verwenden.

4.2 Charakterisierung der Spaltungsstelle des IL-11R durch RHBDL2

Die Zellkulturexperimente mit verschiedenen Deletionsvarianten des IL-11R zur Charakterisierung der Spaltungsstelle haben gezeigt, dass RHBDL2 den IL-11R im Bereich von Valin-363 bis Leucin-372 spaltet. Darüber hinaus konnte durch gezielte Mutation von P1-Aminosäuren an zwei potenziellen Spaltstellen gezeigt werden, dass die Aminosäure an Position 370 kritisch für eine erfolgreiche Proteolyse ist. RHBDL2 spaltete den IL-11R nur, wenn sich an Position 370 eine kleine Aminosäure wie Alanin oder Glycin befand. Größere Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tyrosin an derselben Position verhinderten die Proteolyse. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass RHBDL2 den IL-11R am Übergang vom *stalk*-Bereich zur TMD zwischen Alanin-370 und Serin-371 spaltet. Geht man von Alanin-370 als P1-Aminosäure aus, so befinden sich in P2-Position mit Leucin-372 eine große, hydrophobe Aminosäure und an Position P4' mit Alanin-367 eine hydrophobe Aminosäure, was mit dem beschriebenen Erkennungsmotiv von Rhomboid-Proteasen übereinstimmt (Strisovsky, Sharpe und Freeman, 2009).

Wichtig zu erwähnen ist, dass alle IL-11R-Varianten an der Zelloberfläche exprimiert wurden und somit eine gestörte Lokalisation des IL-11R an der Zelloberfläche als Grund für eine fehlende Proteolyse ausgeschlossen wurde. Eine weitere Möglichkeit, die Spaltungsstelle zu verifizieren, wäre eine massenspektrometrische Analyse des durch RHBDL2 generierten löslichen IL-11R.

Die genauen Spaltstellen, an denen andere Proteasen wie ADAM10, Neutrophile Elastase oder Proteinase 3 den IL-11R spalten, sind noch nicht bestimmt worden. ADAM10 spaltet den IL-11R wahrscheinlich in der Nähe von Arginin-355 (Lokau *et al.*, 2016). Die beiden neutrophilen Proteasen generieren einen molekular kleineren löslichen IL-11R als ADAM10, was auf eine andere Spaltungsstelle hinweist (Lokau *et al.*, 2016). Nichtsdestotrotz sind alle diese Formen eines löslichen IL-11R biologisch aktiv (Lokau *et al.*, 2016).

4.3 Die Rolle von Helix-destabilisierenden Aminosäuren im IL-11R für die Spaltung durch RHBDL2

Die Relevanz von Helix-destabilisierenden Aminosäuren in Abhängigkeit von der Lage der Spaltungsstelle zur TMD wurde bereits für einige Rhomboid-Substrate gezeigt (Strisovsky, Sharpe und Freeman, 2009). Durch die Destabilisierung der Helix wird das Erkennungsmotiv des Substrats gewissermaßen offengelegt und kann mit dem katalytischen Zentrum der Protease interagieren. Diese Destabilisierung ist umso wichtiger, je weiter in oder an der TMD das Erkennungsmotiv und die Spaltstelle des Substrats liegen (Strisovsky, Sharpe und Freeman, 2009). Die Protease ihrerseits erzeugt durch ihre Struktur ein hydratisiertes Mikromilieu im katalytischen Zentrum, sodass die Proteolyse in der eigentlich lipophilen Zellmembran ablaufen kann (Urban, 2010).

Das Austauschen einzelner Helix-destabilisierender Aminosäuren in der TMD des IL-11R durch die Helix-stabilisierende Aminosäure Leucin führte teilweise zu einer Verhinderung der Proteolyse durch RHBDL2. Wurde Glycin an Position 388, 383 oder 379 ausgetauscht, beeinflusste dies die Generierung löslichen IL-11R nicht. Wurde Serin-376 ausgetauscht, war die Proteolyse, der kaum bis schwächer ausgeprägten Bande im Western Blot nach zu urteilen, beeinträchtigt. Das Austauschen von Glycin-373 verhinderte die Proteolyse gänzlich. Daraus kann man schlussfolgern, dass zumindest die beiden Helix-destabilisierenden Aminosäuren Glycin-373 und Serin-376, welche der Spaltstelle am nächsten sind, für eine effektive Proteolyse erforderlich sind. Die hier verwendeten IL-11R-Varianten mit veränderten TMD werden alle an der Zelloberfläche exprimiert, sodass eine gestörte Expression der IL-11R-Varianten an der Zelloberfläche als Grund für eine fehlende Proteolyse ausgeschlossen wurde.

In den Western Blots nahm die Intensität der Banden mit zunehmender Entfernung von künstlich eingefügter Helix-stabilisierender Aminosäure zur Spaltstelle zu. Diese graduell erscheinenden Unterschiede in der Effektivität der Proteolyse unterstützen die These, dass eine Helixdestabilisierung möglichst nahe an der Spaltstelle für eine erfolgreiche Proteolyse durch RHBDL2 essenziell ist.

4.4 Biologische Aktivität des durch RHBDL2 generierten löslichen IL-11R

In Zellviabilitätsassays mit Ba/F3-gp130-Zellen hat löslicher IL-11R, welcher durch RHBDL2 generiert wurde, unter Zugabe von IL-11 das Überleben und Wachstum der Zellen bewirkt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der durch RHBDL2 generierte lösliche IL-11R biologisch aktiv ist. Dieses Ergebnis macht es wahrscheinlicher, dass die Proteolyse des IL-11R durch RHBDL2 nicht nur akzidentell geschieht, sondern eine biologische Funktion hat.

Darüber hinaus haben die Mutationsvarianten IL-11R-del-2, -A367G und -A370G zu einem ähnlich starken Zellwachstum wie der IL-11R-Wildtyp geführt, sodass auch diese Formen biologisch aktiv genannt werden können. Obwohl die Varianten IL-11R-del-1 und -A370F von RHBDL2 nicht gespalten werden können führten Überstände von mit diesen Varianten und RHBDL2 transfizierten HEK293-Zellen zu einem geringen Wachstum der Ba/F3-gp130-Zellen unter Zugabe von IL-11. Dies deutet darauf hin, dass die IL-11R-Varianten in den HEK293-Zellen durch konstitutives *Shedding*, z.B. durch Proteasen wie ADAM10, in den Überstand abgespalten wurden und zusammen mit IL-11 das Zellwachstum angeregt haben. Diese Mengen konstitutiv entstandenen IL-11R waren unter Umständen so gering, dass sie im Western Blot nicht zu detektieren waren. Um diese Hypothese zu prüfen, könnte man das konstitutive *Shedding* in den HEK293-Zellen mithilfe eines Metalloprotease-Inhibitors unterbinden und das Zellviabilitätsexperiment wiederholen. So könnte man auch isolierter die biologische Aktivität des durch RHBDL2 entstandenen löslichen IL-11R betrachten.

4.5 Spaltung des IL-11R durch endogenes RHBDL2

Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse über die Proteolyse des IL-11R durch RHBDL2 ergeben sich viele neue Fragen. Geschieht diese Proteolyse nur unter Laborbedingungen oder hat sie eine biologische und physiologische Relevanz? Eine konkrete Fragestellung dazu ist, ob die Proteolyse des IL-11R auch durch endogen exprimiertes RHBDL2 stattfindet.

Es wurde gezeigt, dass HeLa-Zellen von sich aus RHBDL2 exprimieren (Johnson *et al.*, 2017). Nichtsdestotrotz gelang es in dieser Arbeit nicht, mithilfe eines polyklonalen Antikörpers per Western Blot endogenes RHBDL2 in HeLa-Zelllysaten zu detektieren. Eine mögliche Erklärung

ist, dass die Mengen von endogenem RHBDL2 in den Zellysaten nicht für eine Detektion im Western Blot ausreichen. Da endogene Proteine in vielfach geringerer Konzentration in der Zelle vorliegen, als wenn die Zellen mit der entsprechenden cDNA transfiziert wurden, müssen größere Mengen Zellysat für die Western Blots aufgetragen werden. Eventuell ist die endogene Expression von RHBDL2 in den hier verwendeten HeLa-Zellen auch zu gering, so dass man andere Zelllinien testen könnte. Laut einer großen Proteomstudie haben beispielsweise die humanen Zelllinien HaCaT, Capan-2 und RT4 eine vielfach höhere Transkriptionsrate für RHBDL2 als HeLa-Zellen (Thul *et al.*, 2017).

Im Überstand von HeLa-Zellen, welche mit dem IL-11R transfiziert wurden und in denen konstitutives *Shedding* durch Metalloproteasen inhibiert wurde, ließ sich kein löslicher IL-11R detektieren. Dies würde die Vermutung unterstützen, dass der Hauptteil des löslichen IL-11R durch ADAM10 generiert wird (Lokau *et al.*, 2016). Allerdings sollte auch hier erwogen werden, das Experiment mit anderen Zellen, die eine höhere RHBDL2-Expression aufweisen, zu wiederholen. Denn es werden viele RHBDL2-Substrate wie EGF oder Ephrin B3 auch von ADAM-Proteasen gespalten und es ist noch unzureichend untersucht, in welchen Kontexten die Proteolyse durch RHBDL2 redundant ist oder eine eigenständige Funktion hat (Sahin *et al.*, 2004; Atapattu, Lackmann und Janes, 2014). Da RHBDL2 nicht ubiquitär sondern hauptsächlich in Haut, Magen-Darm-Trakt, Hoden und Harnblase exprimiert wird, wären gewebespezifische Funktionen der Protease denkbar (FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT) *et al.*, 2014).

4.6 Ausblick

Bisher wurde eine Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen identifiziert, bei denen IL-11 und sein Rezeptor eine entscheidende Rolle spielen. Diese umfassen Hämatopoese und Geweberegeneration ebenso wie Entzündung, Karzinogenese und Fibrose (Paul *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2010; Putoczki und Ernst, 2010; Putoczki *et al.*, 2013; Schafer *et al.*, 2017). Es bedarf weiterer Forschung um herauszufinden, welche Bedeutung der IL-11-Trans-Signalweg *in vivo* hat und welche Proteasen den IL-11-

Rezeptor in die dafür erforderliche lösliche Form überführen. Die gastrointestinale Karzinogenese, Fertilität und physiologische Schädelausbildung bei Mäusen ist am ehesten durch den klassischen IL-11-Signalweg bedingt und unabhängig vom Trans-Signalweg (Agthe *et al.*, 2017, 2018; Balic *et al.*, 2017). Dahingegen fanden Schafer und Kollegen Hinweise für eine Bedeutung des IL-11-Trans-Signalwegs bei der Entstehung von kardiovaskulärer Fibrose (Schafer *et al.*, 2017).

Erwähnenswert sind auch die bisherigen Möglichkeiten, den IL-11-Signalweg zu inhibieren, da sie mögliche experimentelle und therapeutische Ansätze bieten. Sogenannte IL-11-Muteine binden mit vielfach höherer Affinität als IL-11 an den IL-11-Rezeptor und unterbinden so sowohl den klassischen als den Trans-Signalweg von IL-11 (Underhill-Day *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Putoczki *et al.*, 2013). Das Fusionsprotein sgp130Fc, bestehend aus der Ektodomäne von gp130 und dem Fc-Teil eines IgG-Antikörpers, blockiert den für viele entzündliche Erkrankungen zentralen IL-6-Trans-Signalweg, indem es die IL-6/sIL-6R-Komplexe hochaffin bindet (Jostock *et al.*, 2001; Rose-John, Winthrop und Calabrese, 2017). Zurzeit befindet sich sgp130Fc unter dem Namen Olamkizept in zwei klinischen Phase-II-Studie zur Erprobung bei Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Sgp130Fc blockiert *in vitro* ebenfalls den IL-11-Trans-Signalweg (Lokau *et al.*, 2016). Welche klinische Relevanz dies haben könnte, ist jedoch noch nicht untersucht worden. Unabhängig davon bietet sgp130Fc die Möglichkeit, weiter zu erforschen, bei welchen Vorgängen der IL-11-Trans-Signalweg eine Rolle spielt.

Zusammenfassung

Interleukin-11 und sein Rezeptor vermitteln vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Hämatopoese, Geweberegeneration, Knochenbildung, Entzündung, Karzinogenese und Fibrose. Beim klassischen Signalweg liegt der Interleukin-11-Rezeptor membrangebunden vor und rekrutiert nach Bindung von Interleukin-11 ein Homodimer des ebenfalls membranständigen Glykoprotein gp130, was zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden führt. Die Signaltransduktion kann zudem durch einen löslichen Interleukin-11-Rezeptor vermittelt werden. Der so gebildete Zytokin-Rezeptor-Komplex kann so auch Zellen aktivieren, welche nicht den Interleukin-11-Rezeptor, sondern nur gp130 auf der Zelloberfläche exprimieren. Dies wird als Trans-Signalweg bezeichnet und wird durch die limitierte Proteolyse des zunächst membranständigen Rezeptors ermöglicht.

Die Serinprotease Rhomboid-like protein 2 (RHBDL2) ist Mitglied der evolutionär stark konservierten Familie der Rhomboidproteasen und gehört zu den Intramembranproteasen. Bisherige Forschung legt eine Rolle von RHBDL2 und seinen Substraten in der epithelialen Homöostase und Prozessen wie Wundheilung, Angiogenese und Krebsentstehung nahe. Viele RHBDL2-Substrate weisen ein ähnliches Erkennungsmotiv auf, das auch im Interleukin-11-Rezeptor enthalten ist, welcher jedoch bisher noch nicht als Substrat von RHBDL2 identifiziert wurde. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob der Interleukin-11-Rezeptor tatsächlich durch RHBDL2 gespalten werden kann und wenn ja, wo die Spaltungsstelle liegt und ob der gespaltene Rezeptor biologisch aktiv ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Interleukin-11-Rezeptor als Substrat von RHBDL2 bestätigt und charakterisiert werden. In Experimenten mit HEK293-Zellen, welche mit der cDNA für den Interleukin-11-Rezeptor und RHBDL2 transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass RHBDL2 in der Lage ist, den membrangebundenen Interleukin-11-Rezeptor durch Proteolyse in eine lösliche Form zu überführen. In weiteren Experimenten mit gezielt veränderten Interleukin-11-Rezeptor-Varianten konnte die Spaltstelle der Protease RHBDL2 näher charakterisiert werden. Sie befindet sich nahe der Transmembrandomäne des Interleukin-11-Rezeptors zwischen Alanin-370 und Serin-371 und ist inmitten eines

Erkennungsmotivs lokalisiert, das auch für andere RHBDL2-Substrate beschrieben wurde. Ebenso wurde die Bedeutsamkeit von Helix-destabilisierenden Aminosäuren in der Transmembrandomäne eines RHBDL2-Substrats auch für den Interleukin-11-Rezeptor festgestellt. Die Spaltung durch endogen exprimiertes RHBDL2 in HeLa-Zellen konnte in ersten Experimenten bisher nicht belegt werden. Jedoch konnte mittels Zellviabilitätsassays gezeigt werden, dass der durch RHBDL2 erzeugte lösliche Interleukin-11-Rezeptor ein biologisch aktiver Agonist ist.

Abstract

Interleukin-11 and its receptor mediate diverse physiological and pathophysiological processes such as hematopoiesis, tissue regeneration, bone formation, inflammation, carcinogenesis and fibrosis. Interleukin-11 binds to its membrane-bound receptor which then recruits a homodimer of the transmembrane glycoprotein gp130 leading to the activation of intracellular signal cascades. This process is called classic signaling. In trans-signaling, however, interleukin-11 binds to a soluble interleukin-11 receptor, which then is able to activate cells expressing gp130, but not the membrane-bound interleukin-11 receptor. Interleukin-11 trans-signaling is initiated by the limited proteolysis of the interleukin-11 receptor.

The serine protease rhomboid-like protein 2 (RHBDL2) is a member of the highly conserved rhomboid protease family and belongs to the intramembrane proteases. Recent research implicates a role of RHBDL2 and its substrates in epithelial homeostasis, in wound healing, angiogenesis and carcinogenesis. Many substrates of RHBDL2 show a similar recognition motif, which is also present in the interleukin-11 receptor, but which has not been identified as a RHBDL2 substrate yet. Therefore, the question arises whether the interleukin-11 receptor can indeed be cleaved by RHBDL2, and if so, where the cleavage site is located and whether the cleaved receptor is biologically active.

In this study, the interleukin-11 receptor was confirmed to be a substrate of RHBDL2 and the cleavage site was characterized. Experiments with HEK293 cells transfected with cDNA for interleukin-11 receptor and RHBDL2 showed that membrane bound interleukin-11 receptor can be cleaved by RHBDL2 into a soluble IL-11 receptor. Further cell experiments using site-specific mutants of the interleukin-11 receptor revealed the cleavage site, which is located in close proximity to the transmembrane domain and lies between alanine-370 and serine-371, fitting in with the postulated recognition motif of RHBDL2 substrates. Moreover, the crucial role of helix-destabilizing amino acids in the transmembrane domain of RHBDL2 substrates has also been shown for the interleukin-11 receptor. Initial experiments with HeLa-cells failed to show cleavage of the interleukin-11 receptor by endogenously expressed RHBDL2. However,

cell viability assays revealed that the soluble interleukin-11 receptor generated by RHBDL2 is a biologically active agonist.

Literaturverzeichnis

- Adrain, C. *et al.* (2011) 'Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2', *EMBO Reports*, 12(5), pp. 421–427. doi: 10.1038/embor.2011.50.
- Agthe, M. *et al.* (2017) 'Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice', *Placenta*, 57, pp. 13–16. doi: 10.1016/J.PLACENTA.2017.05.015.
- Agthe, M. *et al.* (2018) 'Mutations in Craniosynostosis Patients Cause Defective Interleukin-11 Receptor Maturation and Drive Craniosynostosis-like Disease in Mice.', *Cell reports*, 25(1), p. 10–18.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.005.
- Akiyama, Y. und Maegawa, S. (2007) 'Sequence features of substrates required for cleavage by GlpG, an Escherichia coli rhomboid protease', *Molecular Microbiology*, 64(4), pp. 1028–1037. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05715.x.
- Atapattu, L., Lackmann, M. und Janes, P. W. (2014) 'The role of proteases in regulating Eph/ephrin signaling', *Cell Adhesion & Migration*, 8(4), pp. 294–307. doi: 10.4161/19336918.2014.970026.
- Balic, J. J. *et al.* (2017) 'Interleukin-11-driven gastric tumourigenesis is independent of trans-signalling', *Cytokine*, 92, pp. 118–123. doi: 10.1016/j.cyto.2017.01.015.
- Barton, V. A., Hudson, K. R. und Heath, J. K. (1999) 'Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11.', *The Journal of biological chemistry*, 274(9), pp. 5755–61. doi: 10.1074/JBC.274.9.5755.
- Bazan, J. F. (1990) 'Haemopoietic receptors and helical cytokines', *Immunology Today*, 11, pp. 350–354. doi: 10.1016/0167-5699(90)90139-Z.
- Brocker, C. *et al.* (2010) 'Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family', *Human Genomics*, 5(1), p. 30. doi: 10.1186/1479-7364-5-1-30.
- Brown, M. S. *et al.* (2000) 'Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans.', *Cell*, 100(4), pp. 391–398. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80675-3.
- Chalaris, A. *et al.* (2011) 'The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer', *European Journal of Cell Biology*, 90(6–7), pp. 484–494. doi: 10.1016/J.EJCB.2010.10.007.

- Chan, E. Y. L. und McQuibban, G. A. (2013) 'The mitochondrial rhomboid protease: Its rise from obscurity to the pinnacle of disease-relevant genes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(12), pp. 2916–2925. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2013.05.012.
- Cheng, T.-L. *et al.* (2011) 'Functions of rhomboid family protease RHBDL2 and thrombomodulin in wound healing.', *The Journal of investigative dermatology*, 131(12), pp. 2486–94. doi: 10.1038/jid.2011.230.
- Cheng, T.-L. *et al.* (2014) 'RHBDL2 is a critical membrane protease for anoikis resistance in human malignant epithelial cells.', *TheScientificWorldJournal*, 2014, p. 902987. doi: 10.1155/2014/902987.
- Dorner, A. J., Goldman, S. J. und Keith, J. C. (1997) 'Interleukin-11', *BioDrugs*, 8(6), pp. 418–429. doi: 10.2165/00063030-199708060-00002.
- Düsterhöft, S., Künzel, U. und Freeman, M. (2017) 'Rhomboid proteases in human disease: Mechanisms and future prospects', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(11), pp. 2200–2209. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2017.04.016.
- Einarsson, O. *et al.* (1996) 'Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness.', *The Journal of clinical investigation*, 97(4), pp. 915–24. doi: 10.1172/JCI118514.
- Elshabrawy, H. A. *et al.* (2018) 'IL-11 facilitates a novel connection between RA joint fibroblasts and endothelial cells', *Angiogenesis*, pp. 1–14. doi: 10.1007/s10456-017-9589-y.
- FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT) *et al.* (2014) 'A promoter-level mammalian expression atlas.', *Nature*, 507(7493), pp. 462–70. doi: 10.1038/nature13182.
- Fischer, M. *et al.* (1997) 'A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion', *Nature Biotechnology*, 15(2), pp. 142–145. doi: 10.1038/nbt0297-142.
- Fleig, L. *et al.* (2012) 'Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins.', *Molecular cell*, 47(4), pp. 558–69. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.008.
- Freeman, M. (2008) 'Rhomboid Proteases and their Biological Functions', *Annual Review of Genetics*, 42(1), pp. 191–210. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091628.

- Gaillard, J.-P. *et al.* (1993) 'Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy', *European Journal of Immunology*, 23(4), pp. 820–824. doi: 10.1002/eji.1830230408.
- Garbers, C. *et al.* (2018) 'Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine', *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(6), pp. 395–412. doi: 10.1038/nrd.2018.45.
- Garbers, C. und Scheller, J. (2013) 'Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different', *Biological Chemistry*, 394(9), pp. 1145–1161. doi: 10.1515/hsz-2013-0166.
- Gibson, D. L. *et al.* (2010) 'Interleukin-11 Reduces TLR4-Induced Colitis in TLR2-Deficient Mice and Restores Intestinal STAT3 Signaling', *Gastroenterology*, 139(4), pp. 1277–1288. doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.057.
- Haglund, K. *et al.* (2012) 'The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting.', *Journal of cell science*, 125(Pt 2), pp. 265–75. doi: 10.1242/jcs.091280.
- Johnson, N. *et al.* (2017) 'Quantitative proteomics screen identifies a substrate repertoire of rhomboid protease RHBDL2 in human cells and implicates it in epithelial homeostasis', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-07556-3.
- Johnstone, C. N. *et al.* (2015) 'Emerging roles for IL-11 signaling in cancer development and progression: Focus on breast cancer', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(5), pp. 489–498. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.015.
- Jones, S. A. *et al.* (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', *European Journal of Immunology*, 28(11), pp. 3514–3522. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3514::AID-IMMU3514>3.0.CO;2-T.
- Jostock, T. *et al.* (2001) 'Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses', *European Journal of Biochemistry*, 268(1), pp. 160–167. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x.
- Kaye, J. A. (1998) 'FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia', *Stem Cells*, 16(S1), pp. 207–223. doi: 10.1002/stem.5530160724.

- Kimura, R. *et al.* (2007) 'Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine', *Cytokine*, 38(2), pp. 107–115. doi: 10.1016/J.CYTO.2007.05.011.
- Lee, C. G. *et al.* (2008) 'Endogenous IL-11 signaling is essential in Th2- and IL-13-induced inflammation and mucus production.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 39(6), pp. 739–46. doi: 10.1165/rcmb.2008-0053OC.
- Lemberg, M. K. *et al.* (2005) 'Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases.', *The EMBO journal*, 24(3), pp. 464–72. doi: 10.1038/sj.emboj.7600537.
- Lemberg, M. K. und Freeman, M. (2007) 'Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases', *Genome Research*, 17(11), pp. 1634–1646. doi: 10.1101/gr.6425307.
- Liao, H.-J. und Carpenter, G. (2012) 'Regulated Intramembrane Cleavage of the EGF Receptor', *Traffic*, 13(8), pp. 1106–1112. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01371.x.
- Lohi, O., Urban, S. und Freeman, M. (2004) 'Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids.', *Current biology: CB*, 14(3), pp. 236–41. doi: 10.1016/j.cub.2004.01.025.
- Lokau, J. *et al.* (2016) 'Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling', *Cell Reports*, 14(7), pp. 1761–1773. doi: 10.1016/J.CELREP.2016.01.053.
- Lokau, J. und Garbers, C. (2018) 'The length of the interleukin-11 receptor stalk determines its capacity for classic signaling.', *The Journal of biological chemistry*, 293(17), pp. 6398–6409. doi: 10.1074/jbc.RA118.001879.
- López-Otín, C. und Bond, J. S. (2008) 'Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease', *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), pp. 30433–30437. doi: 10.1074/jbc.R800035200.
- Matadeen, R. *et al.* (2007) 'The dynamics of signal triggering in a gp130-receptor complex.', *Structure (London, England : 1993)*, 15(4), pp. 441–8. doi: 10.1016/j.str.2007.02.006.
- Matthews, V. *et al.* (2003) 'Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE).', *The Journal of biological chemistry*, 278(40), pp. 38829–39. doi: 10.1074/jbc.M210584200.

- Mitsuyama, K. *et al.* (1991) 'Colonic mucosal interleukin-6 in inflammatory bowel disease.', *Digestion*, 50(2), pp. 104–11. doi: 10.1159/000200747.
- Monhasery, N. *et al.* (2016) 'Transcytosis of IL-11 and Apical Redirection of gp130 Is Mediated by IL-11 α Receptor', *Cell Reports*, 16(4), pp. 1067–1081. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.062.
- Montero-Julian, F. A. (2001) 'The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function.', *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 47(4), pp. 583–97.
- Negahdaripour, M., Nezafat, N. und Ghasemi, Y. (2016) 'A panoramic review and in silico analysis of IL-11 structure and function', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 32, pp. 41–61. doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2016.06.002.
- Nieminen, P. *et al.* (2011) 'Inactivation of IL11 Signaling Causes Craniosynostosis, Delayed Tooth Eruption, and Supernumerary Teeth', *The American Journal of Human Genetics*, 89(1), pp. 67–81. doi: 10.1016/J.AJHG.2011.05.024.
- Nitz, R. *et al.* (2015) 'Modular organization of Interleukin-6 and Interleukin-11 α -receptors', *Biochimie*, 119, pp. 175–182. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2015.11.005.
- Noy, P. J. *et al.* (2016) 'Sprouting angiogenesis is regulated by shedding of the C-type lectin family 14, member A (CLEC14A) ectodomain, catalyzed by rhomboid-like 2 protein (RHBDL2)', *FASEB Journal*, 30(6), pp. 2311–2323. doi: 10.1096/fj.201500122R.
- Ottesen, M. (1967) 'Induction of Biological Activity by Limited Proteolysis', *Annual Review of Biochemistry*, 36, pp. 55–76. doi: 10.1146/annurev.bi.36.070167.000415.
- Pace, C. N. und Scholtz, J. M. (1998) 'A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins.', *Biophysical journal*, 75(1), pp. 422–7.
- Pascall, J. C. und Brown, K. D. (2004) 'Intramembrane cleavage of ephrinB3 by the human rhomboid family protease, RHBDL2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(1), pp. 244–252. doi: 10.1016/J.BBRC.2004.03.039.
- Paul, S. R. *et al.* (1990) 'Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), pp. 7512–6. doi: 10.1073/PNAS.87.19.7512.

- Pérez-Silva, J. G. *et al.* (2016) ‘The Degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease.’, *Nucleic acids research*, 44(D1), pp. D351-5. doi: 10.1093/nar/gkv1201.
- Pflanz, S. *et al.* (1999) ‘A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130’, *FEBS Letters*, 450(1-2), pp. 117-122. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00477-9.
- Putoczki, T. und Ernst, M. (2010) ‘More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer’, *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), pp. 1109-1117. doi: 10.1189/jlb.0410226.
- Putoczki, T. L. *et al.* (2013) ‘Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically.’, *Cancer cell*, 24(2), pp. 257-71. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.017.
- Rho, S.-S. *et al.* (2011) ‘Clec14a is specifically expressed in endothelial cells and mediates cell to cell adhesion’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), pp. 103-108. doi: 10.1016/J.BBRC.2010.11.075.
- Riethmueller, S. *et al.* (2017) ‘Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation’, *PLoS Biology*, 15(1), e2000080. doi: 10.1371/journal.pbio.2000080.
- Rose-John, S. (2018) ‘Interleukin-6 Family Cytokines’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
- Rose-John, S. und Heinrich, P. C. (1994) ‘Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function.’, *The Biochemical journal*, 300 (Pt 2), pp. 281-90.
- Rose-John, S., Winthrop, K. und Calabrese, L. (2017) ‘The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications’, *Nature Reviews Rheumatology*, 13(7), pp. 399-409. doi: 10.1038/nrrheum.2017.83.
- Sahin, U. *et al.* (2004) ‘Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands.’, *The Journal of cell biology*, 164(5), pp. 769-79. doi: 10.1083/jcb.200307137.
- Schafer, S. *et al.* (2017) ‘IL11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis’, *Nature*, 552(7683), p. 110. doi: 10.1038/nature24676.

- Schechter, I. und Berger, A. (1967) 'On the size of the active site in proteases. I. Papain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(2), pp. 157–162. doi: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X.
- Scheller, J. *et al.* (2011) 'ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration.', *Trends in immunology*, 32(8), pp. 380–7. doi: 10.1016/j.it.2011.05.005.
- Strisovsky, K. (2013) 'Structural and mechanistic principles of intramembrane proteolysis - Lessons from rhomboids', *FEBS Journal*, 280(7), pp. 1579–1603. doi: 10.1111/febs.12199.
- Strisovsky, K., Sharpe, H. J. und Freeman, M. (2009) 'Sequence-Specific Intramembrane Proteolysis: Identification of a Recognition Motif in Rhomboid Substrates', *Molecular Cell*, 36(6), pp. 1048–1059. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.006.
- Sturtevant, M. A., Roark, M. und Bier, E. (1993) 'The Drosophila rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway', *Genes and Development*, 7(6), pp. 961–973. doi: 10.1101/gad.7.6.961.
- Thul, P. J. *et al.* (2017) 'A subcellular map of the human proteome.', *Science (New York, N.Y.)*, 356(6340), eaal3321. doi: 10.1126/science.aal3321.
- Trepicchio, W. L. *et al.* (1996) 'Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(8), pp. 3627–34.
- Underhill-Day, N. *et al.* (2003) 'Functional characterization of W147A: a high-affinity interleukin-11 antagonist.', *Endocrinology*, 144(8), pp. 3406–14. doi: 10.1210/en.2002-0144.
- Urban, S. (2010) 'Taking the plunge: integrating structural, enzymatic and computational insights into a unified model for membrane-immersed rhomboid proteolysis.', *The Biochemical journal*, 425(3), pp. 501–12. doi: 10.1042/BJ20090861.
- Wang, J. und Feng, J.-A. (2003) 'Exploring the sequence patterns in the α -helices of proteins', *Protein Engineering Design and Selection*, 16(11), pp. 799–807. doi: 10.1093/protein/gzg101.
- Weber, S. und Saftig, P. (2012) 'Ectodomain shedding and ADAMs in development.', *Development (Cambridge, England)*, 139(20), pp. 3693–709. doi: 10.1242/dev.076398.

Literaturverzeichnis

Weiler, H. und Isermann, B. H. (2003) 'Thrombomodulin', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), pp. 1515–1524. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00306.x.

Zhou, W. und Carpenter, G. (2000) 'Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4.', *The Journal of biological chemistry*, 275(44), pp. 34737–43. doi: 10.1074/jbc.M003756200.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Lydia Friederike Koch, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mithilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe. Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 05.04.2021

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Christoph Garbers für die Bereitstellung des Themas und die in allen Phasen meiner Arbeit hervorragende Betreuung. Neben seiner Expertise war diese geprägt von Zugewandtheit und einem immer offenen Ohr für Fragen.

Außerdem möchte ich Maria Agthe, Juliane Lokau und Charlotte Flynn meinen großen Dank äußern, die mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und anderen Labor-Gefährten wie Christian Bretscher, Alyn Gerneth, Britta Hansen, Christopher Borowski, Birte Kespohl, Tina Daunke, Niklas Prenissl und Anna Rogge möchte ich danken für ihre ständige Hilfsbereitschaft, aber auch für das freundschaftliche und humorvolle Miteinander.

Des Weiteren gebührt mein ausdrücklicher Dank der *Integrated Research Training Group* des SFB 877 sowie dem deutschen Staat. Ohne deren bereitgestellte Möglichkeiten und finanzielle Unterstützung hätte ich diese Arbeit so kaum verwirklichen können.

Schließlich möchte ich meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden danken, die mich auf meinem Weg immer geduldig, liebevoll und unterstützend begleitet haben.